

УДК 615.014.07:547.972.2:615.322:582.688.31  
DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2018.4.9703>

## РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ПАГОНАХ ЧОРНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ

© Л. В. Вронська

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

[vronska\\_liudmyla@ukr.net](mailto:vronska_liudmyla@ukr.net)

**Мета роботи.** Розробка спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної.

**Матеріали і методи.** У дослідженнях застосовували зразки пагонів чорниці, зібрані у Закарпатській, Івано-Франківській, Тернопільській і Волинській областях впродовж 2014–2018 рр., і зразки лікарського засобу «Чорниці пагони» (ПрАТ «Ліктрави», Україна). Визначення вмісту флавоноїдів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії, вимірюючи абсорбцію комплексу флавоноїдів з алюміній хлоридом. Для вимірювання абсорбції і запису електронних спектрів поглинання застосовували спектрофотометр Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies).

**Результати й обговорення.** Електронні спектри поглинання, отримані для випробовуваних розчинів і стандартного розчину рутину в умовах комплексоутворення флавоноїдів з алюміній хлоридом, були ідентичними за ходом кривих світлопоглинання і характеризувались положенням максимуму поглинання при  $(410 \pm 2)$  нм і  $(412 \pm 2)$  нм відповідно, що дозволило обрати рутин за стандарт для перерахунку вмісту флавоноїдів у досліджуваній сировині. При дослідженні впливу концентрації етанолу на вилучення флавоноїдів, встановлено, що для приготування вихідного розчину проби слід застосовувати 70 % (об/об) етанол. Вилучення флавоноїдів з аналітичною метою слід виконувати при нагріванні зі зворотним холодильником трикратно – по чергово з 60, 20 і 15 мл етанолу впродовж 30, 15 і 15 хв відповідно. Важливим моментом методики є підготовка сировини – для аналізу слід застосовувати дрібну фракцію (355) подрібненої сировини, враховуючи її вміст у розрахунковій формулі. Встановлено, що вміст флавоноїдів у досліджуваних дикорослих зразках є в межах 1,14–1,86 %, а в промислових серіях (за винятком сировини серії 20614) – в межах 0,7–1,0 %.

**Висновки.** Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення флавоноїдів у сировині пагонів чорниці звичайної. Здійснено кількісне визначення вмісту флавоноїдів у 17 зразках сировини різного походження. Для оцінки якості пагонів чорниці запропоновано ввести додатковий показник «Вміст флавоноїдів» з критерієм – не менше 0,6 % флавоноїдів у перерахунку на рутин і суху сировину.

**Ключові слова:** пагони чорниці звичайної; флавоноїди; спектрофотометрія; кількісне визначення; вміст; критерій якості.

**Вступ.** Пагони чорниці звичайної застосовують самостійно або у складі багатокомпонентних сумішей як цукрознижувальний засіб [1–3]. Вони містять таніни, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди та інші біологічно активні речовини, дослідженню яких присвячено багато робіт [4–6]. Кореляційного зв'язку цукрознижувальної дії листя чи пагонів чорниці з певним класом біологічно активних речовин у них в літературі не описано. Результати вивчення складу і вмісту флавоноїдів пагонів чорниці звичайної представлені в роботах [4–8]. Донедавна кількісним показником якості пагонів чорниці був вміст дубильних речовин, який визначали методом перманганатометричного титрування [9, 10]. У другому виданні Державної Фармакопеї України (ДФУ) вперше було означено показники і критерії якості сировини пагонів чорниці та сировини листя чорниці у вигляді монографій національної частини

[11]. Кількісним критерієм якості листя чорниці встановлено вміст флавоноїдів – не менше 0,8 %, у перерахунку на гіперозид, тоді як для пагонів чорниці запропоновано визначення суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол – не менше 4 % [11]. Флавоноїди мають різну біологічну дію, впливаючи комплексно на стан всіх систем організму, вони непрямо чинять цукрознижувальну дію, що досліджено авторами [12]. Таким чином, визначення вмісту флавоноїдів пагонів чорниці звичайної є актуальним завданням як з точки зору контролю якості для забезпечення очікуваної фармакологічної дії сировини, екстракту з неї чи ГЛЗ на її основі, так і з метою напрацювання нових кількісних показників і критеріїв якості.

Мета роботи – розробка спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної.

**Матеріали і методи.** Дикорослі зразки пагонів чорниці зібрані в Закарпатській, Івано-Франківській, Тернопільській і Волинській областях впродовж 2014–2018 років. Промислові зразки сировини закупили в різний період в аптеках як лікарський засіб «Чорниці пагони» (ПрАТ «Ліктрави», Україна). Промислові зразки на момент аналізу були придатні для застосування згідно з термінами придатності, вказаними на упаковці, а дикорослі зразки аналізували практично відразу після висушування.

Визначення вмісту флавоноїдів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії. Для кількісного визначення застосовували спектрофотометричну методику, яка базується на вимірюванні абсорбції комплексу алюміній хлориду з флавоноїдами. Кількісний вміст перераховували на рутин, паралельно проводили вимірювання абсорбції стандартного розчину рутину (розчин порівняння).

**Вихідний розчин.** Точну наважку подрібненої сировини поміщали у плоскодонну колбу місткістю 100 мл зі шліфом, додавали фіксований об'єм екстрагенту (спиртовий розчин з фіксованим вмістом етанолу) і кип'ятили зі зворотним холодильником визначений час. Вилучення флавоноїдів із сировини здійснювали тричі, змінюючи об'єми екстрагенту і час кип'ятіння, збираючи охолоджений витяг у мірну колбу місткістю 100 мл. Отриманий витяг фільтрували.

**Випробовуваний розчин.** Аліквоту вихідного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 3,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводили об'єм розчину до позначки *етанолом* (70 %, об/об) Р, перемішували.

**Компенсаційний розчин.** Аліквоту вихідного розчину, рівну за об'ємом аліквоті, використаній при приготуванні випробовуваного розчину, поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину до позначки *етанолом* (70 %, об/об) Р, перемішували.

Запис електронних спектрів поглинання і вимірювання абсорбції розчинів здійснювали на спектрофотометрі Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies) у кварцових кюветах із товщиною світлопоглинаючого шару 10 мм.

**Результати й обговорення.** В електронних спектрах поглинання випробовуваних розчинів, в умовах комплексоутворення флавоноїдів з алюміній хлоридом спостерігали максимум поглинання в діапазоні довжин хвиль ( $410 \pm 2$ ) нм. Максимум поглинання комплексу рутину з алюміній хлоридом за цих же умов спостерігається при довжині хвилі ( $412 \pm 2$ ) нм. Раніше проведені хроматографічні дослідження компонентного складу флавоноїдів вітчизняних зразків пагонів чорниці вказують на наявність рутину, гіперозиду і кверцитрину [6]. Враховуючи присутність рутину у пагонах чорниці, подібність ходу кривих світлопоглинання та розташування максимумів абсорбції на них для випробовуваних розчинів та розчину рутину, раціонально використати рутин як стандарт для розрахунку вмісту флавоноїдів.

У зв'язку з тим, що автори раніше пропонували різні умови екстрагування флавоноїдів при підготовці проб сировини для кількісного визначення, було здійснено вивчення впливу часу кип'ятіння і концентрації етанолу на вилучення цих біологічно активних речовин. Наважку подрібненої сировини кип'ятили з етанолом (60–80 %, об/об) впродовж різного часу, в отриманих витягах визначали вміст флавоноїдів. Результати визначення вмісту флавоноїдів, отримані за різних досліджуваних умов підготовки вилучення, наведено в таблиці 1.

Дослідження впливу концентрації етанолу на вилучення флавоноїдів встановили, що при застосуванні послідовної двократної екстракції 60 мл і 35 мл етанолу впродовж 60 хв і 30 хв відповідно вміст флавоноїдів дещо зростає (на відносних 5 %) при збільшенні концентрації етанолу з 50 до 60 % (об/об) і залишається практично незмінним при застосуванні 60–80 % етанолу. Як було встановлено раніше, флавоноїди пагонів чорниці представлені глікозидами кверцетину – рутин, гіперозид і кверцитрин, у незначній кількості є глікозиди кемпферолу [6]. Очевидно, що при тривалому кип'ятінні сировини з 60–80 % етанолом (об/об) відбувається добре розчинення і вилучення глікозидних форм флавоноїдів. Тому для подальших визначень 70 % (об/об) етанол було обрано для отримання вилучення при кількісному визначенні флавоноїдів. Застосовуючи визначену концентрацію екстрагенту, обрано оптимальне співвідношення сировина-екстрагент: як впливає з представлених результатів (табл. 1) співвідношення маси сировини і об'єму екстрагента від 1:100 до 1:400 забезпечує практично однакове вилучення флавоноїдів. Одночасно було вибрано об'єм аліквоти для приготування випробовуваного розчину: при наважці 0,5 г – аліквота 5,0 мл і при наважці 1,0 г – 2,5 мл. Проте об'єм аліквоти може змінюватись при високому вмісті флавоноїдів. Для промислових зразків запропоновані співвідношення є допустимими, проте дикорослі зразки мають вищий вміст і тоді масу наважки і об'єм аліквоти слід коректувати.

Щоб оптимізувати підготовку вилучення, було вивчено вплив часу кип'ятіння сировини з екстрагентом на визначуваній вміст флавоноїдів в сировині. В процесі першої екстракції суха сировина з найвищим вмістом біологічно активних речовин контактує з екстрагентом. Тому для першого вилучення запропоновано застосовувати більший об'єм екстрагенту і триваліше екстрагування. Як впливає з отриманих результатів, для першої стадії вилучення достатнє 30 хвилинне кип'ятіння сировини з екстрагентом. Для отримання другого і третього вилучення використано менші об'єми екстрагента і коротші періоди кип'ятіння (див. табл. 1).

**Методика кількісного визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної.**

**Вихідний розчин.** 0,5 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у плоскодонну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл

Таблиця 1. Результати вивчення впливу концентрації етанолу, маси наважки і часу кип'ятіння на вилучення флавоноїдів (n=5, P=0,95)

Маса наважки, г	V <sub>ал</sub> , мл	Концентрація етанолу, % (об/об)	Об'єм екстрагенту в екстракції, мл			Час кип'ятіння впродовж екстракції, хв			Вміст флавоноїдів, у перерахунку на рутин і суху сировину, %
			1	2	3	1	2	3	
Дикоросла сировина, Волинська область, зразок 1 2016 року									
1,0022	5,0	50	60	35	-	60	30	-	1,72 ± 0,03
1,0024	5,0	60	60	35	-	60	30	-	1,82 ± 0,02
1,0036	5,0	70	60	35	-	60	30	-	1,82 ± 0,03
1,0024	5,0	80	60	35	-	60	30	-	1,85 ± 0,04
Промисловий зразок (дрібна фракція), серія 10116									
0,2620	10,0	70	60	20	15	60	15	15	1,45 ± 0,02
0,5033	5,0	70	60	20	15	60	15	15	1,46 ± 0,02
0,7536	5,0	70	60	20	15	60	15	15	1,44 ± 0,01
1,0040	2,5	70	60	20	15	60	15	15	1,45 ± 0,02
Дикоросла сировина (дрібна фракція), Волинська область, зразок 2 2016 року									
0,9997	2,0	70	60	20	15	30	15	15	2,51 ± 0,01
1,0003	2,0	70	60	20	15	45	15	15	2,54 ± 0,02
0,9997	2,0	70	60	20	15	60	15	15	2,51 ± 0,02
1,0008	2,0	70	60	20	15	75	15	15	2,52 ± 0,01

етанолу (70 %, об/об), кип'ятять зі зворотним холодильником на водяній бані впродовж 30 хв, охолоджують, отриманий витяг фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл через паперовий фільтр. До залишку у колбі додають 20 мл етанолу (70 %, об/об) і кип'ятять зі зворотним холодильником впродовж 15 хв, охолоджують і фільтрують отриманий витяг у ту ж мірну колбу. Вилучення повторюють, застосовуючи 15 мл етанолу (70 %, об/об) впродовж 15 хв, охолоджений вміст колби разом із сировиною переносять на фільтр, фільтруючи отримуваний витяг у ту ж мірну колбу. Фільтр із сировиною і колбу промивають етанолом (70 %, об/об), доводячи об'єм розчину у мірній колбі до позначки.

**Випробовуваний розчин.** 5,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину до позначки етанолом (70 %, об/об) P, перемішують.

**Компенсаційний розчин.** 5,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину до позначки етанолом (70 %, об/об) P, перемішують.

**Стандартний розчин рутину.** 0,05 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ рутину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і розчиняють в етанолі (70 %, об/об), доводячи об'єм розчину до позначки етанолом (70 %, об/об) P, перемішують.

**Розчин порівняння.** 1,0 мл стандартного розчину рутину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл,

додають 3,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину до позначки етанолом (70 %, об/об) P, перемішують.

**Компенсаційний розчин.** 1,0 мл стандартного розчину рутину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину до позначки етанолом (70 %, об/об) P, перемішують.

Через 45 хв вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння відносно своїх компенсаційних розчинів на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм.

Вміст суми флавоноїдів (X, %) у сировині, в перерахунку на рутин і суху речовину, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A \cdot 100 \cdot b}{5 \cdot A_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

де

$m_0$  – маса наважки ДФЗ рутину, в грамах;

$m$  – маса наважки сировини, взятої для аналізу, в грамах;

$A$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$b$  – вміст дрібної фракції (355) (2.9.12) у подрібненому зразкові досліджуваної сировини, у відсотках;

$W$  – втрата в масі при висушуванні сировини, у відсотках.

У запропонованих умовах було проаналізовано зразки дикорослої сировини і промислові зразки «Па-

гони чорниці» (ПрАТ «Ліктрави», Україна). Електронні спектри поглинання випробовуваних розчинів для окремих зразків сировини наведені на рисунку 1, а результати визначення представлені у таблиці 2.

З отриманих результатів випливає, що вміст флавоноїдів у дикорослих зразках сировини є вищим, ніж у промислових, в окремих випадках – у 2 і більше разів. Порівнюючи отримані результати із даними інших авторів щодо вмісту флавоноїдів у пагонах чорниці, слід зазначити, що останні також дуже різняться: 0,62–1,02 % у перерахунку на кверцетин-3-О-β-D-ксилопіранозид [13]; 1,3–1,4 % у перерахунку на гіперозид [7]; 2,86–3,11 % у перерахунку на рутин [8]. Авторами [3] рекомендовано введення показника якості пагонів чорниці «не менше 0,6 % флавоноїдів у перерахунку на рутин». Така розбіжність вмістів пов'язана із різними стандартними речовинами, обраними для перерахунку, різними способами підготовки проб і отримання вилучення, а також з умовністю поняття пагони. Заготівля цієї сировини дає суміш із різним співвідношенням стебел і листя. Одні зразки містять менше здерев'янілих стебел і більше листя, тому містять більше флавоноїдів, інші – навпаки, тому вміст флавоноїдів в них є нижчим. Саме через це вміст флавоноїдів у промислових зразках є меншим.

З метою з'ясування впливу останнього чинника вивчено показник якості з ДФУ – «Сторонні домішки». У монографії другого Доповнення до другого видання ДФУ, серед іншого, вказано, що стебел повинно бути не більше 70 %. Проте цей показник є достатньо умовним: яким пагонам – молодим чи здерев'янілим, належали стебла візуально не визначити і в сторон-

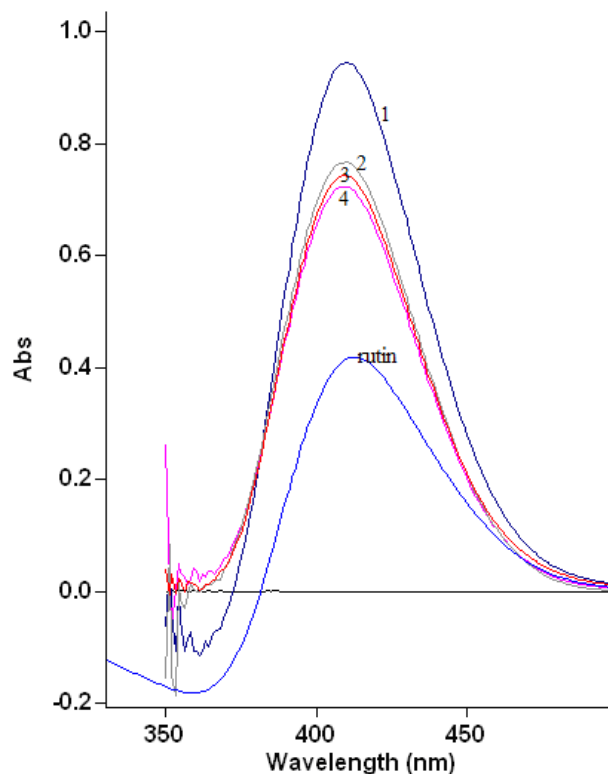


Рис. 1. Електронні спектри поглинання випробовуваних розчинів для зразків сировини із Закарпатської (1), Тернопільської (2), Івано-Франківської (3), Волинської (2014 р.) (4) областей і розчину порівняння рутину в умовах кількісного визначення флавоноїдів.

ніх домішках це окремо не вказано. Тому раціональним, крім вже прописаних показників якості, є вве-

Таблиця 2. Результати кількісного визначення флавоноїдів у зразках сировини пагони чорниці (n=5, P=0,95)

Регіон і рік заготівлі зразка / серія промислового зразка	Вміст флавоноїдів, %
Тернопільська область, 2014 р.	1,20 ± 0,01
Закарпатська область, 2015 р.	1,54 ± 0,02
Івано-Франківська область, 2015 р.	1,18 ± 0,01
зразок 1, Волинська область, 2015 р.	1,14 ± 0,01
зразок 2, Волинська область, 2015 р.	1,65 ± 0,02
зразок 1, Волинська область, 2016 р.	1,86 ± 0,02
зразок 2, Волинська область, 2016 р.	1,75 ± 0,01
Волинська область, 2017 р.	1,38 ± 0,01
Волинська область, 2018 р.	1,44 ± 0,01
серія 20811	0,80 ± 0,02
серія 10412	1,04 ± 0,02
серія 10113	0,82 ± 0,01
серія 20513	0,77 ± 0,01
серія 20614	0,54 ± 0,02
серія 10116	0,85 ± 0,01
серія 31016	0,71 ± 0,01
серія 30818	0,82 ± 0,02

дення показника фракційності порошку здрібненої сировини. При подрібненні дикорослих зразків пагонів чорниці, що були заготовлені самостійно, отримано 60–78 % дрібної фракції, яка є однорідною і 22–40 % грубої фракції (рис. 2), яка при тривалому подрібненні дає волокна. Для промислових зразків це співвідношення становить 40–44 % і 56–60 % відповідно. Таким чином, незважаючи на дотримання фармакопейної вимоги щодо вмісту стебел, отримуємо різний відсоток дрібної фракції, яка містить біологічно активні речовини, і він є значно нижчий для сировини промислової заготівлі.

При підготовці сировини для кількісного визначення здерев'янілі частини пагонів практично не подрібнюються технічними засобами, доступними у лабораторії. Це додатково створює прецедент неможливості отримання однорідної наважки подрібненої сировини, що веде до появи випадкової похибки. Якщо відбирати для аналізу дрібну фракцію з певним розміром часток, наприклад, дотримуючись фармакопейних вимог (фракція, що проходить через сито 355), то слід вводити у розрахункову формулу частку цієї фракції у зразку досліджуваної сировини. Виходячи із таких міркувань, у розрахункову формулу

було введено відсоток дрібної фракції (355), яку відбирали для кількісного визначення.

Застосовуючи запропоновану методика пробопідготовки і кількісного визначення, отримано значення вмісту флавоноїдів у досліджуваних дикорослих зразках у межах 1,14–1,86 %, а в промислових серіях (за винятком сировини серії 20614) – в межах 0,7–1,0 %. Отримані результати вказують на те, що вміст флавоноїдів не менше 0,6 % у перерахунку на рутин, можна обрати альтернативним критерієм якості. Цей критерій є об'єктивнішим, ніж запропонований у Другому доповненні до другого видання ДФУ сумарний вміст фенолів. Для кількісного визначення останніх застосовується спектрофотометрична методика, яка базується на вимірюванні абсорбції відновленої форми фосфорно-молібдено-вольфрамової гетерополексислоти, але це відновлення є менш селективним, ніж комплексоутворення флавоноїдів із алюміній хлоридом.

Перспективним і актуальним є контроль вмісту флавоноїдів при дослідженні технології екстрактів і розробці готових лікарських засобів на їхній основі, часто комбінованих, для забезпечення стандартизації у ланцюзі: лікарська рослинна сировина – екстракт – готовий лікарський засіб.



**Рис. 2.** Фотографії здрібненої сировини пагонів чорниці звичайної: 1 – зразок грубої фракції дикорослої сировини (Волинська обл., 2018 р.); 2 – зразок дрібної фракції дикорослої сировини (Волинська обл., 2018 р.); 3 – зразок грубої фракції сировини серії 31016.

**Висновки.** 1. Встановлено, що для вилучення флавоноїдів раціонально використати трикратне екстрагування 60 мл, 20 мл і 15 мл етанолу (70 %, об/об) при температурі кипіння водяної бані впродовж 30 хв, 15 хв і 15 хв відповідно, витримуючи кінцеве співвідношення сировина – екстрагент 1:100.

2. Обґрунтовано необхідність виділення і взяття для аналізу дрібної фракції (355) досліджуваної сировини, отримуваної при її подрібненні, визначення її частки у сировині і введення даного значення у розрахункову формулу для кількісного визначення вмісту флавоноїдів.

3. Для визначення флавоноїдів запропонована спектрофотометрична методика, яка базується на вимірюванні абсорбції комплексу флавоноїдів з алюміній хлоридом у середовищі етанолу (70 %, об/об). Для перерахунку вмісту флавоноїдів обрали рутин.

4. За результатами кількісного визначення флавоноїдів у 17 зразках пагонів чорниці запропоновано додатковий показник якості цієї сировини – вміст флавоноїдів із критерієм «не менше 0,6 % у перерахунку на рутин і суху сировину».

## РАЗРАБОТКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ПОБЕГАХ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Л. В. Вронска

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины»

vronska\_liudmyla@ukr.net

**Цель работы.** Разработка спектрофотометрической методики определения флавоноидов в побегах черники обыкновенной.

**Материалы и методы.** В исследованиях применялись образцы побегов черники, собранные в Закарпатской, Ивано-Франковской, Тернопольской и Волынской областях в 2014–2018 гг., и образцы лекарственного средства «Черники побеги» (ЧАО «Лектравы», Украина). Определение содержания флавоноидов проводили методом абсорбционной спектрофотометрии, измеряя абсорбцию комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом. Для измерения абсорбции и записи электронных спектров поглощения применяли спектрофотометр Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies).

**Результаты и обсуждение.** Электронные спектры поглощения, полученные для испытуемых растворов и стандартного раствора рутина в условиях комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, были идентичными за ходом кривых светопоглощения и характеризовались положением максимума поглощения при  $(410 \pm 2)$  нм и  $(412 \pm 2)$  нм соответственно, что позволило выбрать рутин в качестве стандарта для пересчета содержания флавоноидов в исследуемом сырье. При исследовании влияния концентрации этанола на извлечение флавоноидов установлено, что для приготовления исходного раствора пробы следует применять 70 % (об / об) этанол. Извлечение флавоноидов с аналитической целью следует выполнять при нагревании с обратным холодильником трехкратно – поочередно с 60, 20 и 15 мл этанола в течение 30, 15 и 15 мин соответственно. Важным моментом методики является подготовка сырья – для анализа следует применять мелкую фракцию (355) измельченного сырья, учитывая ее содержание в расчетной формуле. Установлено, что содержание флавоноидов в исследуемых дикорастущих образцах находится в пределах 1,14–1,86 %, а в промышленных сериях (за исключением сырья серии 20614) – в пределах 0,7–1,0 %.

**Выводы.** Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения флавоноидов в сырье побегов черники. Осуществлено количественное определение содержания флавоноидов в 17 образцах сырья различного происхождения. Для оценки качества побегов черники предложено ввести дополнительный показатель «Содержание флавоноидов» с критерием – не менее 0,6 % флавоноидов в пересчете на рутин и сухое сырье.

**Ключевые слова:** побеги черники обыкновенной; флавоноиды; спектрофотометрия; количественное определение; содержание; критерий качества.

## DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF FLAVONOIDS DETERMINATION IN BILBERRY SHOOTS

L. V. Vronska

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

vronska\_liudmyla@ukr.net

**The aim of the work.** Developing a spectrophotometric method of flavonoids determination in bilberries shoots.

**Materials and Methods.** The samples of bilberries shoots, collected in Transcarpathian, Ivano-Frankivsk, Ternopil and Volyn regions in 2014–2018, as well as the samples of the drug Shoots of Bilberries (PJSC Liktravy, Ukraine) were used in the study. The determination of flavonoids content was carried out by absorption spectrophotometry, measuring the absorption of flavonoids complex with aluminum chloride. The spectrophotometer Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies) was used to measure the absorption and record the electronic absorption spectra.

**Results and Discussion.** Electronic absorption spectra, which were obtained for the test solutions and the standard rutin solution in the conditions of complexation of flavonoids with aluminum chloride, were identical in the course of light absorption curves and were characterized by absorption maximum at  $(410 \pm 2)$  nm and  $(412 \pm 2)$  nm respectively that made it possible to make rutin a standard for recalculation of flavonoids content in the investigated plant raw material. When investigating the ethanol concentration effect on flavonoids extraction, it was established that 70% (v / v) of ethanol should be used to prepare the sample solution. The flavonoids removal for an analytical purpose should be performed by heating under a reflux condenser three times – alternately together with 60, 20 and 15 ml of ethanol for 30, 15 and 15 minutes, respectively. An important aspect of the technique is the preparation of raw materials: a fraction (355) of crushed raw

material should be used for analysis, given its content in the calculation formula. It was established that the flavonoids content in the studied wild samples is within the range of 1.14–1.86 %, and in the industrial series (except of raw materials of the series 20614) – 0.7–1.0 %.

**Conclusions.** The spectrophotometric method of flavonoids quantitative determination in the bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) shoots was developed. Quantitative determination of the flavonoids content in 17 samples of raw materials of different origin was carried out as well. To evaluate the bilberry shoots quality, it was suggested to introduce an additional index 'flavonoids content' with a criterion – not less than 0.6 % of flavonoids equivalent to rutin and dry raw material.

**Key words:** bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.); shoots; flavonoids; spectrophotometry; quantitative determination; contents; quality criterion.

### Список літератури

1. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua>
2. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Chapter 4. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) / [Wing-kwan Chu, Sabrina C. M. Cheung, Roxanna A. W. Lau, and Iris F. F. Benzie ] ; Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. [2nd edition]. – Boca Raton (FL): CRC Press. – 2011. [режим доступу [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/#ch4\\_51#ch4\\_51](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/#ch4_51#ch4_51)].
3. Рязанова Т. К. Новые подходы к комплексному использованию плодов и побегов черники обыкновенной / Т. К. Рязанова, В. А. Куркин // Извест. Самарского научн. центра РАН. – 2012. – Т. 14, № 5(3). – С. 754-757.
4. Line Nybakken. Increased growth and phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) following forest clear-cutting / Line Nybakken, Vidar Selas, Mikael Ohlson // Scandinavian J. of Forest Research. – 2013. – V. 28, Iss. 4. – P. 319-330.
5. Рязанова Т. К. Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной / Т. К. Рязанова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8. – С. 1136–1140.
6. Vronska L.V. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots / L. V. Vronska, M. B. Chubka, A. Ye. Demyd // Фармац. часопис. – 2015. – № 3. – С. 28–33. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2015.3.4951>
7. Мечникова Г. Я. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах *Vaccinium myrtillus* L. / Г. Я. Мечникова, Н. В. Матюшенко, О. В. Смирнова // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 66–71.
8. Петров Е. В. Разработка методики количественного определения содержания флавоноидов в побегах черники обыкновенной / Е. В. Петров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3(73). – С. 253–255.
9. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия : учеб. пособие / под ред. Г. П. Яковлева и К. Ф. Блиновой. – СПб. : СпецЛит, 2004. – С. 442–444.
10. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків: "Прапор", 2000. – С. 403–405.
11. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Довопнення 2. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. – С. 220–225.
12. Дослідження гіпоглікемічних властивостей сухого екстракту чорниці звичайної / Х. І. Курило, І. М. Кліщ, А. С. Вольська, О. З. Барчук // Медична та клінічна хімія. – 2016. – № 2. – С. 38–41.
13. Куркин В. А. Количественное определение суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Хим.-фармац. журн. – 2013. – Т. 47, № 4. – С. 34–37.

### References

1. State Register of Ukrainian Drugs. [Electronic resources]. – Available from: <http://www.drlz.kiev.ua>
2. Wing-kwan Chu, Sabrina C M Cheung, Roxanna AW Lau, Iris FF Benzie. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Chapter 4. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Boca Raton (FL): CRC Press; 2011. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/#ch4\\_51#ch4\\_51](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/#ch4_51#ch4_51).
3. Ryazanova TK, Kurkin VA. New approaches to the integrated use of blackberry fruits and shoots. Izvest Samarskogo nauchn tsentra RAN. 2012;5(3): 754-7. Russian.
4. Nybakken Line, Selas Vidar, Ohlson Mikael. Increased growth and phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) following forest clear-cutting. Scandinavian J of Forest Research. 2013;28(4): 319-30.
5. Ryazanova TK. Pharmacognostic study of the fruits and shoots of bilberry. Fundamentalnyye issledovaniya. 2013;8: 1136-40. Russian.
6. Vronska LV, Chubka MB, Demyd AYе. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots. Farmats chasopys. 2015;3: 28-33.
7. Mechnikova GYa, Matyushenko NV, Smirnova OV. Validation of the method of quantitative determination of the flavonoids amount in the shoots *Vaccinium myrtillus* L. Bashkirskiy khimicheskij zhurnal. 2013;20(2): 66-71. Russian.
8. Petrov EV. Development of method for the quantitative determination of the flavonoids content in the shoots of bilberry. Byulleten VSNTS SO RAMN. 2010;3(73): 253-5. Russian.
9. Yakovlev GP, Blinova KF. Medicinal plant materials.

Pharmacognosy: studies. allowance [Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: учеб. пособие] SPb: SpetsLit; 2004. Russian.

10. Kovalev VM, Pavlii OI, Isakova TI. Pharmacognosy with the basics of biochemistry of plants [Фармакогнозія з основами біохімії рослин] Kharkiv: Prapor; 2000. Ukrainian.

11. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd ed. Kharkiv: State

Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicines; 2018. Ukrainian.

12. Kurylo H I, Klishch IM, Volska AS, Barchuk OZ. Investigation of hypoglycemic properties of dry bilberry extract. Medychna ta klinichna khimiia. 2016;2: 38-41. Ukrainian.

13. Kurkin VA, Ryazanova TK. Quantitative determination of the flavonoids sum in the bilberries. Khym farmats zhurn. 2013;47(4): 34-7.

Отримано 27.09.2018