

# РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ГОЛУБИКИ БОЛОТНОЙ ЛИСТЬЯХ

**А.А. Шамилов**

к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: shamilovxii@yandex.ru

**В.Н. Бубенчикова**

д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники,  
ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Курск, Россия)  
E-mail: bubenikova.ksmu@yandex.ru

**Е.Р. Гарсия**

преподаватель, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,  
кафедра неорганической, физической и коллоидной химии,  
Пятигорский медико-фармацевтического институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: x-pharm@mail.ru

**Х.А. Ибаева**

аспирант, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,  
Пятигорский медико-фармацевтического институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: ibaeva.hadizhat@mail.ru

**М.В. Ларский**

к.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: m.v.larsky@pmedpharm.ru

**Актуальность.** Современные требования к контролю качества лекарственного растительного сырья рекомендуют оценивать как суммарное содержание основных групп биологически активных соединений, так и содержание мажорных соединений.

**Цель исследования** – разработка и последующая валидационная оценка методик количественного определения суммы фенольных соединений и мажорного компонента хлорогеновой кислоты в голубике болотной листьях.

**Материал и методы.** Количественное определение суммы фенольных соединений в голубике болотной листьях проводили методом спектрофотометрии. Содержание хлорогеновой кислоты определяли методом капиллярного электрофореза с подтверждением результатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанные методики валидированы.

**Результаты.** Разработаны и валидированы методики спектрофотометрического определения суммы фенольных соединений и количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза. Содержание суммы фенольных соединений колебалось от 4,94±0,17%, до 9,09±0,17%, содержание хлорогеновой кислоты – от 1,75±0,08% до 4,34±0,16%.

**Выводы.** Лекарственное растительное сырье – голубики болотной листья, предлагается стандартизировать по сумме фенольных соединений и мажорному компоненту – хлорогеновой кислоте – методами спектрофотометрии и капиллярного электрофореза. Установлен норматив содержания фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 4,5%, определено содержание хлорогеновой кислоты не менее 1,5%.

**Ключевые слова:** голубика болотная, листья, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, спектрофотометрия, капиллярный электрофорез.

**Для цитирования:** Шамилов А.А., Бубенчикова В.Н., Гарсия Е.Р., Ибаева Х.А., Ларский М.В. Разработка и валидация методики количественного определения фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(2):14–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-03>

Современная концепция стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) предусматривает обоснование выбора основного соединения, которое может являться маркером данного вида и даже рода – источника ЛРС, обуславливать

фармакологическое действие или являться мажорным компонентом [1]. Листья голубики болотной – перспективный источник биологически активных соединений, таких как флавоноиды (производные кверцетина, лютеолина), гидроксикоричные кис-

лоты (коричная, хлорогеновая, кофейная), кумарины (дигидрокумарин, умбеллиферон); сапонины, в том числе урсоловая кислота,  $\alpha$ -амирин; стероидные соединения, в том числе ситостерин; карбоновые кислоты (пальмитиновая, леулиновая, малоновая и лимонная кислоты); свободные и связанные сахара, макро- и микроэлементы, аминокислоты [2–7]. Листья наряду с плодами оказывают антикатарактальное, антидиабетическое, гепатопротекторное, иммуномодулирующее [8], мочегонное и актопротекторное [9] действия. Для дальнейшей разработки лекарственных средств на основе субстанций из листьев голубики болотной и включения их в Государственный реестр лекарственных средств необходимо разработать методики стандартизации и регламентировать нормы качества сырья.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я** – разработка методик стандартизации голубики болотной листьев и их валидация.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы листьев голубики болотной *Vaccinium uliginosum* L., собранные в нескольких регионах Российской Федерации в фазу плодоношения. Образцы сушили воздушно-теневым способом.

Методику разрабатывали на образце сырья, собранном в Куйвозовском сельском поселении Ленинградской области (август 2019 г.). Были подобраны оптимальные условия пробоподготовки для извлечения максимального количества фенольных соединений.

Количественный анализ суммы фенольных соединений проводили методом спектрофотометрии (СФ) в диапазоне длин волн 200–400 нм. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Использовали стандартный образец хлорогеновой кислоты (Chlorogenic acid CRS, code: Y0000569, 97.1%, Ph. Eur. Reference Standard). Расчет количественного содержания выполняли, используя величину удельного показателя светопоглощения хлорогеновой кислоты в спирте этиловом 70%-ном согласно ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья» [10] или с использованием оптической плотности раствора стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты в спирте этиловом 70%-ном (0,01 мг/мл).

Количественное содержание хлорогеновой кислоты определяли методом капиллярного элек-

трофореза (КЭ) с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 105М (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром (диаметр капилляра 75 мкм,  $\frac{L_{\text{общ}}}{L_{\text{эф}}} = \frac{50}{60}$  см).

Предварительно капилляр промывали, выполняли подготовку буферного и испытуемого растворов [11]. Для выбора оптимальных условий разделения хлорогеновой кислоты от сопутствующих соединений в извлечении меняли параметры анализа: использовали боратный буферный раствор с рН 8,8–9,8, концентрациями 50, 25 и 10 мМ, при напряжении 10, 15, 20 и 25 кВ. Температура в капилляре +20 °С, ввод пробы осуществляли гидродинамически при 150 мбар·с; детектирование – при длине волны 254 нм. Количественное содержание хлорогеновой кислоты рассчитывали с использованием уравнения зависимости аналитического сигнала от концентрации СО хлорогеновой кислоты.

Для подтверждения полученных результатов количественного определения хлорогеновой кислоты использовали обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Исследование проводили на хроматографе «Стайер» (НПО Аквилон, Россия), снабженном УФ-детектором. Для разделения применяли колонку Luna C18 (2) 150×4,6 мм, заполненную октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм. Определение проводили в изократическом режиме элюирования с использованием подвижной фазы ацетонитрил – 0,5%-ный водный раствор муравьиной кислоты (20:80), детекцию пиков осуществляли при длине волны 330 нм. Перед введением 1,0 мл исходного извлечения голубики болотной листьев помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки подвижной фазой. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, температура колонки и образца – 20 °С. Параллельно в тех же условиях проводили анализ растворов СО кислоты хлорогеновой (диапазон концентраций 0,000796–0,009552%). Количественное содержание хлорогеновой кислоты рассчитывали по уравнению зависимости аналитического сигнала от концентрации стандартного образца, полученного при анализе серии растворов СО хлорогеновой кислоты.

Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям специфичность, линейность, прецизионность и правильность в пределах аналитической области [10–13].

Статистическую обработку результатов выполняли в Microsoft Excel 2016.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На начальном этапе были подобраны оптимальные условия получения извлечения из листьев голубики болотной с максимальным содержанием суммы фенольных соединений (табл. 1).

**Методика получения извлечения из голубики болотной листьев.** Точную навеску сырья с размером частиц 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют спирт этиловый объемом 50 мл, колбу закрывают пробкой и взвешивают. Экстракцию ведут в течение 30 мин с момента закипания экстракционной смеси на водяной бане с температурой 80–90 °С в ней и подключенным обратным холодильником. После окончания экстракции и охлаждения полученного извлечения до комнатной температуры потерю спирта этилового 70%-ного восполняют до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Извлечение пропускают через бумажный фильтр (раствор А). Далее 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70%-ным и перемешивают (раствор Б). Затем 2 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70%-ным и пере-

мешивают (раствор В). Максимум светопоглощения испытуемого извлечения (раствор В) наблюдают при длине волны 328±2 нм.

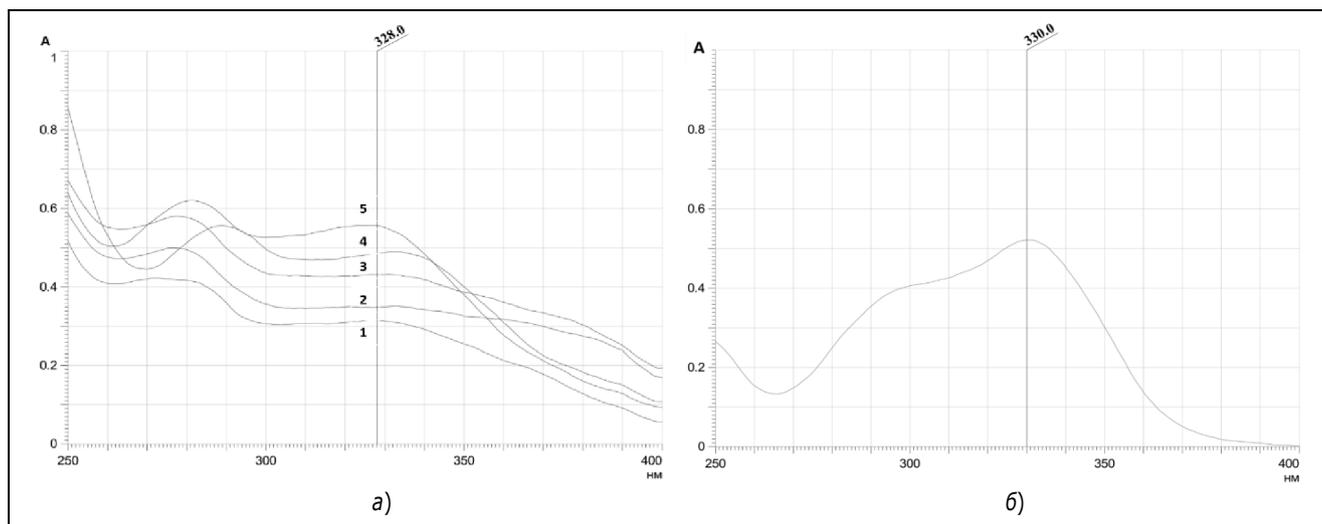
В указанных условиях были получены извлечения из листьев голубики болотной, собранных из 5 мест естественного произрастания (рис. 1), и рассчитано количественное содержание суммы фенольных соединений (табл. 2).

Методом УФ-спектрофотометрии в голубики болотной листьях определено количественное содержание суммы фенольных соединений от 4,94 до 9,09% в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье (табл. 2).

Методом капиллярного электрофореза установлено присутствие хлорогеновой кислоты как мажорного компонента в тех же извлечениях (растворы Б) по совпадению времени миграции пика СО хлорогеновой кислоты. Были подобраны оптимальные условия разделения пика хлорогеновой кислоты от сопутствующих веществ (табл. 3). При выборе рН буферного раствора остальные условия не изменялись (напряжение +20 кВ, концентрация натрия тетрабората 10 мМ). При выборе концентрации натрия тетрабората и напряжения использовали буферный раствор с рН 9,2.

**Таблица 1. Результаты подбора оптимальных условий получения извлечения для оценки показателя «количественное определение» из голубики болотной листьев**

Условия экстрагирования		Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в воздушно-сухом сырье, %
Степень измельченности сырья, мм	1	9,09±0,17
	2	8,33±0,16
	3	7,39±0,11
Время экстракции, мин	30	9,09±0,17
	60	9,09±0,41
	90	8,95±0,11
	120	8,33±0,18
Экстрагент	Вода очищенная	8,42±0,32
	Спирт этиловый 40%-ный	8,22±0,17
	Спирт этиловый 70%-ный	9,09±0,17
	Спирт этиловый 96%-ный	6,72±0,32
Соотношение сырье:экстрагент	1:25	7,87±0,22
	1:50	9,09±0,17
	1:100	9,08±0,26



**Рис. 1.** УФ-спектры: а – водно-спиртового извлечения из листьев голубики болотной (1 – деревня Шамокша, Ленинградская область; 2 – гора Иремель, Челябинская область; 3 – гора Малый Иремель, Челябинская область; 4 – село Визимьяры, Республика Марий Эл; 5 – Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область); б – раствора СО хлорогеновой кислоты (0,01 мг/мл)

**Таблица 2. Результаты количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту и хлорогеновой кислоты в образцах голубики болотной листьев**

Образец	Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту $\bar{x} \pm \Delta x$ , %	Содержание хлорогеновой кислоты $\bar{x} \pm \Delta x$ , %
Ленинградская область, Всеволожский район, Куйвозовское сельское поселение	9,09±0,17	4,34±0,16
Гора Иремель (Челябинская область)	5,72±0,14	1,75±0,08
Гора Малый Иремель (Челябинская область)	7,03±0,23	1,83±0,09
Ленинградская область, Лодейнопольский район, деревня Шамокша	4,94±0,17	1,87±0,06
Республика Марий Эл, поселок Визимьяры (Пятиозерье)	7,88±0,25	4,01±0,12

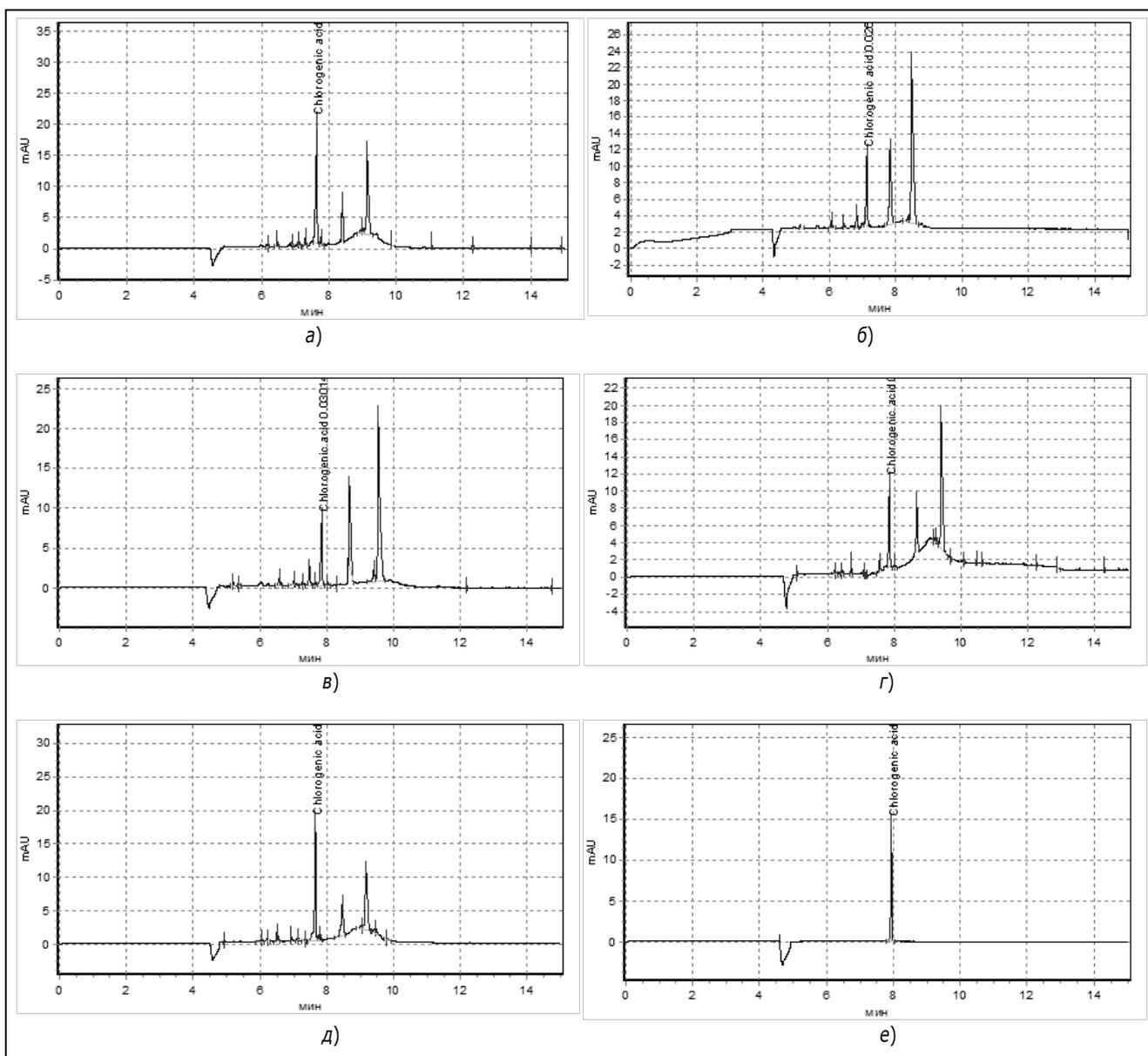
**Таблица 3. Результаты подбора оптимальных условий количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза**

Эффективность, тыс. теоретических тарелок					
pH 8,6	pH 8,8	pH 9,0	pH 9,2	pH 9,4	pH 9,6
67	88	121	132	49,6	78
pH 9,8	25 мМ	50 мМ	+10 кВ	+15 кВ	+25 кВ
37	153	221	137	95	58

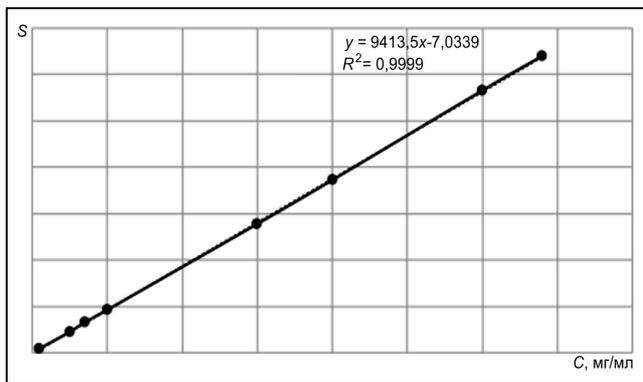
Согласно полученным результатам, анализ извлечения из голубики болотной листьев оптимально проводить в боратном буферном растворе с концентрацией 10 мМ и рН 9,2, напряжение на электродах +20 кВ. Несмотря на самую высокую эффективность пика хлорогеновой кислоты при использовании боратного буферного раствора с концентрацией 50 мМ, наблюдали неэффективное разделение пика с сопутствующим соединением. К тому же высокие концентрации ведущего электролита перегружают систему и способствуют уширению пиков [14]. Использование напряжения

меньше +20 кВ ведет к значительному увеличению времени анализа без заметного улучшения эффективности пика.

В указанных условиях были проанализированы извлечения из листьев голубики болотной (раствор Б), собранных из 5 мест естественного произрастания (рис. 2), и рассчитано количественное содержание суммы хлорогеновой кислоты по уравнению зависимости аналитического сигнала от концентрации стандартного образца в аналитической области концентраций от 0,005–0,34 мг/мл (табл. 2, рис. 3).



**Рис. 2.** Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из листьев голубики болотной: а – Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; б – гора Иремель, Челябинская область; в – гора Малый Иремель, Челябинская область; г – деревня Шамокша, Ленинградская область; д – село Визимьяры, Республика Марий Эл; е – электрофореграмма СО хлорогеновой кислоты (0,05 мг/мл)



**Рис. 3.** График зависимости аналитического сигнала от концентрации стандартного образца для расчета содержания хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза

Методом капиллярного электрофореза в голубики болотной листьях определено количественное содержание хлорогеновой кислоты, что составило от 1,75 до 4,34% в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье (см. табл. 2).

Методики количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту методом спектрофотометрии и количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза валидировали по показателям специфичность, линейность, прецизионность на двух уровнях: 1) повторяемость, внутрилабораторная прецизионность; 2) правильность (табл. 4).

Специфичность методик (СФ и КЭ) подтверждали при сравнении спектров раствора СО хлорогеновой кислоты и извлечения из голубики болотной листьев (рис. 1) и времени миграции пика хлорогеновой кислоты в извлечении и СО хлорогеновой кислоты (рис. 2).

Основываясь на результатах исследования, возможно установить предел количественного содержания суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в голубике болотной листьях не менее 4,5% и предел количественного содержания хлорогеновой кислоты – не менее 1,5% и включить эти показатели в проект нормативного документа на данный вид ЛРС.

Для подтверждения результатов, полученных с помощью КЭ, образец сырья, используемый при валидации методики, анализировали методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рис. 4,а, хроматограмма раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты – на рис. 4,б.

Как следует из представленных данных, на хроматограмме растительного экстракта наблюдается основной пик со временем удерживания 3,06 мин, совпадающий со временем удерживания пика на хроматограмме раствора СО кислоты хлорогеновой. В диапазоне концентраций 0,000796–0,009552% соблюдалась линейная зависимость между концентрацией кислоты хлорогеновой и площадью пика на хроматограмме (рис. 5).

По данным рис. 5, линейная зависимость описывается уравнением вида  $y = bx + a$ , где  $b = 545741$ ;  $a = 18,041$ ; коэффициент корреляции составляет 0,99. Линейный регрессионный анализ методом наименьших квадратов показывает статистическую незначимость коэффициента  $a$ , что свидетельствует об удовлетворительной правильности методики. Полученный график линейности использовали для расчета количественного содержания хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях. Результаты установления количественного содержания в пересчете на сухое сырье представлены в табл. 5.

**Таблица 4. Валидационная оценка методик количественного определения суммы фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях**

Показатель	Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту	Количественное определение хлорогеновой кислоты	Параметр, норматив [10–13]
Линейность	$y = 0,0471x + 0,000003$ $R = 0,99$	$y = 9413,5x + 7,0339$ $R = 0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность, повторяемость	$\varepsilon(\%) = 1,90$	$\varepsilon(\%) = 3,73$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%) = 1,81 - 3,00$	$RSD(\%) = 2,84 - 4,09$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$1,07 < 2,31$	$0,55 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

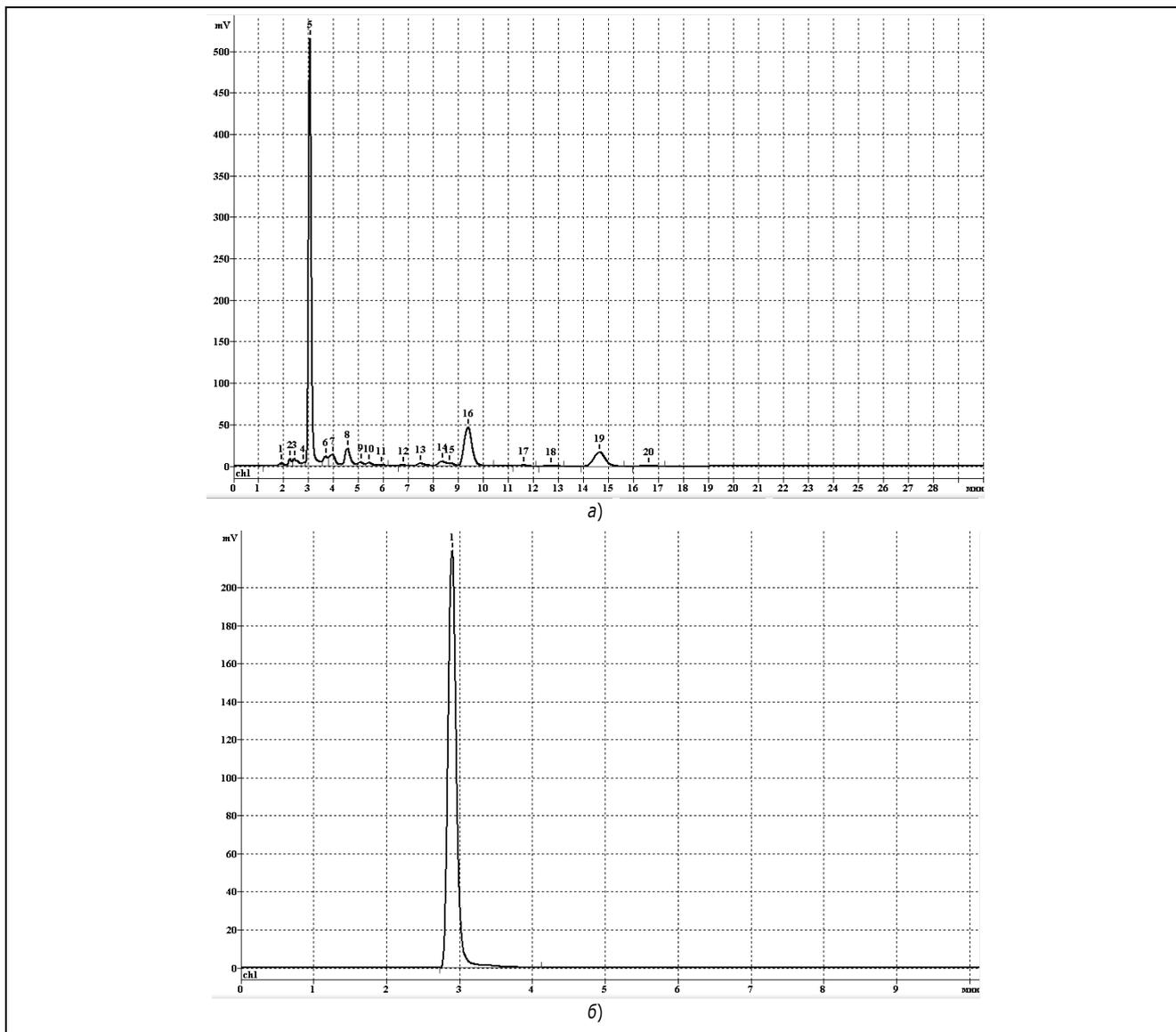


Рис. 4. Хроматограммы: а – извлечения из голубики болотной листьев; б – 0,003184% раствора СО хлорогеновой кислоты



Рис. 5. График линейной зависимости площади пика от концентрации раствора СО кислоты хлорогеновой

**Таблица 5. Результаты количественного определения хлорогеновой кислоты в голубике болотной листьях методом ВЭЖХ**

№ п/п	Навеска, г	Площадь пика хлорогеновой кислоты, мВ·с	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	1,0040	4178,81	4,13	$\bar{X} = 4,12$ $S_x = 0,142267$ $S_{\bar{x}} = 0,05808$ $\Delta x = 0,15$ $\varepsilon = 3,62\%$
2	1,0028	4243,02	4,19	
3	1,0098	4415,21	4,36	
4	1,0017	4101,21	4,05	
5	1,0022	4086,12	4,03	
6	1,0016	4012,11	3,96	

Полученные результаты свидетельствуют, что среднее содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом образце составляет  $4,12 \pm 0,15\%$  (относительная погрешность определения  $\pm 3,62\%$ ), что сопоставимо с результатами КЭ.

### ВЫВОДЫ

Для стандартизации листьев голубики болотной разработана методика спектрофотометрического определения суммы фенольных соединений, определены условия проведения экстракции: навеска сырья 1,0 г, объем экстрагента 50 мл, степень измельчения сырья 1 мм, экстрагент – спирт этиловый 70%-ный, время экстракции – 30 мин.

Обоснован выбор мажорного компонента – хлорогеновой кислоты, количественное определение которой предложено проводить с применением сепарационного метода анализа – капиллярного электрофореза. Результаты, полученные методом капиллярного электрофореза, воспроизводятся высокоточным методом – высокоэффективной жидкостной хроматографией. Установлены валидационные характеристики разработанных методик.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А. Метаболиты лекарственных растений как биологически активные соединения. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016; 19 (2): 15–22.
2. Охрименко Л.П., Калинин Г.И., Лукша Е.А., Коломиец Н.Э. Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, толокнянки, черники и зимолюбки, произрастающих в республике Саха (Якутия). Химия растительного сырья. 2009; 3: 109–115.
3. Stremoukhov O.O., Koshovyi O.M., Zalyubovs'ka O.I. The study of fatty and organic acids of *Vaccinium uliginosum* leaves. Вісник фармації. 2016; 4: 31–33.

4. Стремоухов А.А., Кошевой О.Н., Бородина Н.В., Криворучко Е.В. Сравнительное исследование карбоновых кислот надземной части голубики обыкновенной. Украинский биофармацевтический журнал. 2018; 1(54): 46–50.
5. Таланов А.А., Фурса Н.С. Углеводы листьев и плодов голубики. Фармация. 2009; 3: 27–28.
6. Таланов А.А., Круглов Д.С., Фурса Н.С. Масс-спектрометрическое определение элементного состава различных органов голубики. Российский медико-биологический вестник имени академика ИП Павлова. 2012; 20(1): 121–126.
7. Таланов А.А., Кузьмичева Н.А., Фурса Н.С. Сравнительная характеристика аминокислотного состава подземных и надземных органов голубики. Вестник фармации. 2010; 1: 9–17.
8. Ma L., Sun Zh., Zeng Ya. et al. Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. International journal of molecular sciences. 2018; 19(9): 2785.
9. Таланов А.А. Фармакогностическое изучение голубики болотной (*Vaccinium uliginosum* L.): автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. Пермь. 2013. 24 с.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации: XIV издания. Том 1, 4. <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php>, свободный. Дата обращения: 01.11.2021.
11. Шамилов А.А., Бубенчикова В.Н., Гарсия Е.Р., Ларский М.В., Чирякин А.С. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники обыкновенной листьях. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2021; 31(1): 4–15.
12. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf), свободный. Дата обращения: 23.01.2021.
13. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. Под ред. В.В. Береговых. М.: Литтерра, 2008. 132 с.
14. Сенченко С.П. Прогноз электрофоретического поведения фенольных соединений в условиях капиллярного зонного электрофореза. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015; 7: 3–9.

Поступила после доработки 21 декабря 2021 г.

# INVESTIGATION AND VALIDATION OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS AND CHLOROGENIC ACID IN THE *VACCINIUM ULIGINOSUM* LEAVES

© Authors, 2022

## A.A. Shamilov

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor of Department of Pharmacognosy, Botany and Technology of Phytopreparations, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute (PMPI), Branch of Volgograd State Medical University, Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: shamilovxii@yandex.ru, ORCID iD 0000-0002-6730-9518

## V.N. Bubenchikova

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Head of Department of Pharmacognosy and Botany, Kursk State Medical University, Ministry of Health of Russia (Kursk, Russia)  
E-mail: bubenchikova.ksmu@yandex.ru; ORCID iD 0000-0001-9682-0684

## E.R. Garsiya

Lecturer, Department of Pharmacognosy, Botany and Technology of Phytopreparations, Department of Inorganic, Physical and Colloidal Chemistry, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University, Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: x-pharm@mail.ru, ORCID iD 0000-0003-3217-0680

## Kh.A. Ibaeva

Post-graduate Student, Department of Pharmacognosy, Botany and Technology of Phytopreparations, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University, Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: ibaeva.hadizhat@mail.ru

## M.V. Larsky

Ph.D. (Pharm.), Head of Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University, Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: m.v.larsky@pmedpharm.ru; ORCID iD 0000-0002-4406-7165

**Relevance.** The modern requirements of qualitative control of medicinal plant raw material recommends to evaluate total amount of biological active compounds and amount of major substances.

**Aim.** Investigation and validation of quantitative analysis of total amount of phenolic compounds and major substance chlorogenic acid in the *Vaccinium uliginosum* leaves.

**Materials and methods.** Quantitative analysis of total amount of phenolic compounds in the *V. uliginosum* leaves was carried out by spectrophotometry. Amount of chlorogenic acid was measured by capillary electrophoresis as main method and by high-performance liquid chromatography as comparative method. Developed methods were validated.

**Results.** We investigated and validated methods of spectrophotometric analysis of total amount of phenolic compounds and quantitative analysis of chlorogenic acid by capillary electrophoresis. Total amount of phenolic compounds were  $4.94 \pm 0.17\%$  –  $9.09 \pm 0.17\%$ , amount of chlorogenic acid –  $1.75 \pm 0.08\%$  –  $4.34 \pm 0.16\%$

**Conclusions.** Medicinal plant raw material – *Vaccinium uliginosum* leaves – are recommended to be standardized by total amount of phenolic compounds and amount of major substance – chlorogenic acid – using spectrophotometry and capillary electrophoresis respectively. Total amount of phenolic compounds calculated to g chlorogenic acid at 100 g of raw material should be no less 4.5%, amount of chlorogenic acid – no less 1.5%.

**Key words:** *Vaccinium uliginosum*, leaves, phenolic compounds, chlorogenic acid, spectrophotometry, capillary electrophoresis.

**For citation:** Shamilov A.A., Bubenchikova V.N., Garsiya E.R., Ibaeva Kh.A., Larsky M.V. Investigation and validation of quantitative analysis of phenolic compounds and chlorogenic acid in the *Vaccinium uliginosum* leaves. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(2):14–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-03>

## REFERENCES

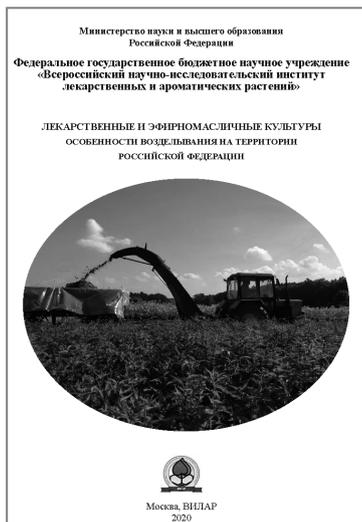
1. Kurkin V.A. Metabolity lekarstvennykh rasteniy kak biologicheski aktivnyye soedineniya. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2016; 19 (2): 15–22.
2. Ohrimenko L.P., Kalinkina G.I., Luksha E.A., Kolomic N.Je. Issledovanie fenol'nykh soedinenij list'ev golubiki, brusniki, tolokjanki, cherniki i zimoljubki, proizrastajushchih v respublike Saha (Jakutija). Himija rastitel'nogo syr'ja. 2009; 3: 109–115.

3. Stremoukhov O.O., Koshovyi O.M., Zalyubovs'ka O.I. The study of fatty and organic acids of Vaccinium uliginosum leaves. Вісник фармації. 2016; 4: 31–33.
4. Stremouhov A.A., Koshevoj O.N., Borodina N.V., Krivoruchko E.V. Sravnitel'noe issledovanie karbonovyh kislot nadzemnoj chasti golubiki obyknovennoj. Ukrainskij biofarmaceuticheskij zhurnal. 2018; 1(54): 46–50.
5. Talanov A.A., Fursa N.S. Uglevody list'ev i plodov golubiki. Farmacija. 2009; 3: 27–28.
6. Talanov A.A., Kruglov D.S., Fursa N.S. Mass-spektrometričeskoe opredelenie jelementnogo sostava razlichnyh organov golubiki. Rossijskij mediko-biologičeskij vestnik imeni akademika IP Pavlova. 2012; 20(1): 121–126.
7. Talanov A.A., Kuz'micheva N.A., Fursa N.S. Sravnitel'naja harakteristika aminokislotojnogo sostava podzemnyh i nadzemnyh organov golubiki. Vestnik farmacii. 2010; 1: 9–17.
8. Ma L., Sun Zh., Zeng Ya. et al. Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. International journal of molecular sciences. 2018; 19(9): 2785.
9. Talanov A.A. Farmakognostičeskoe izučenie golubiki bolotnoj (Vaccinium uliginosum L.): avtoref. dis. ... kand. farmacevt. nauk. Perm'. 2013. 24 s.
10. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii: XIV izdanija. Tom 1, 4. <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>, svobodnyj. Data obrashhenija: 01.11.2021.
11. Shamilov A.A., Bubenchikova V.N., Garsija E.R., Larskij M.V., Chirjapkin A.S. Razrabotka i validacija metodiki količestvennogo opredelenija arbutina v brusniki obyknovennoj list'jah. Voprosy obespečenija kachestva lekarstvennyh sredstv. 2021; 31(1): 4–15.
12. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf), svobodnyj. Data obrashhenija: 23.01.2021.
13. Validacija analitičeskijh metodik dlja proizvodelej lekarstv: Tipovoe rukovodstvo predprijatija po proizvodstvu lekarstvennyh sredstv. Pod red. V.V. Beregovykh. M.: Litterra, 2008. 132 s.
14. Senchenko S.P. Prognoz jelektroforetičeskogo povedenija fenol'nyh soedinenij v uslovijah kapillarnogo zonnogo jelektroforeza. Voprosy biologičeskoj, medicinskoj i farmacevtičeskoj himii. 2015; 7: 3–9.



## ИЗДАНИЯ ФГБНУ ВИЛАР

### ЛЕКАРСТВЕННЫЕ И ЭФИРНОМАСЛИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ: ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Под общей редакцией академик РАН *Н.И. Сидельникова*



**Авторы: Аникина А.Ю., Бушковская Л.М., Басалаева И.В. и др.**

*Посвящается 90-летию ВИЛАР и его ученым-растениеводам*

В книге представлены обобщенные материалы многолетних исследований Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений, связанные с разработкой технологий возделывания лекарственных культур в различных почвенно-климатических зонах Российской Федерации. В издании сконцентрированы сведения по выращиванию лекарственных культур: описана их биология, медицинское значение, особенности агротехники и семеноводства, приведены данные по новым сортам и требования к качеству получаемого сырья. Указаны основные вредители и болезни лекарственных растений, обозначены условия достижения оптимальной фитосанитарной обстановки в агробиоценозах. *Данная книга рассчитана на широкий круг читателей: агрономов и фермеров, занимающихся возделыванием лекарственных культур, научных сотрудников, специализирующихся в области лекарственного растениеводства, ее материалы также могут быть полезны для студентов, аспирантов и преподавателей высших учебных заведений агрономического и фармацевтического профиля подготовки.*

По вопросам приобретения книг и монографий обращаться в ФГБНУ ВИЛАР:  
117216, г. Москва, ул. Грина, д. 7; +7 (495) 338-11-09; e-mail: vilarnii@mail.ru  
<http://vilarnii.ru/institute/our-publications/>