

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ АРОНИИ МИЧУРИНА

О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.10.2022 г.

Аннотация. Лекарственные растения, содержащие флавоноиды, находят применение в медицинской практике благодаря их широкому спектру фармакологического действия. По этой причине актуален поиск новых источников данной группы биологически активных веществ (БАВ).

Одним из перспективных видов сырья, содержащих флавоноиды, являются листья аронии Мичурина, также известной как рябина черноплодная, однако до настоящего момента методика количественного определения содержания флавоноидов в сырье отсутствовала.

Цель работы - разработка и последующая валидация спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

Объектом исследования служили высушенные листья аронии Мичурина сорта «Мулатка», собранные на территории Тамбовской области в 2021 году; сушка воздушно-теневая. Сырье собирали на четырех стадиях развития растения: фаза цветения, фаза начала плодоношения, фаза технической зрелости плодов, фаза начала покраснения листьев.

Установлено, что оптимальным экстрагентом для обеспечения максимального выхода флавоноидов из листьев рябины черноплодной является спирт этиловый 60% при соотношении сырья и экстрагента 1:50 и экстрагировании в течение 90 минут. Частицы сырья должны проходить через сито с диаметром отверстий 1 мм. Реакцию комплексообразования следует проводить с 6% раствором алюминия хлорида в соотношении 1:3, на протяжении 80 минут.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемых листьях составило  $3.53\% \pm 0.17\%$ . Проведена валидация разработанной методики. Подтверждено, что пределы критериев приемлемости валидационных характеристик не превышены. Подтверждением специфичности методики являлось увеличение максимума поглощения при добавлении стандартного раствора рутина к исследуемому извлечению. Средний процент открываемости при добавлении стандартного образца составил 100.63%. Коэффициент корреляции  $r \geq 0.99$  подтвердил линейность методики. Относительное стандартное отклонение при определении сходимости составило 1.98%, а межлабораторной прецизионности - 2.85%, что не превышает 2% и 5% соответственно.

Методика валидна по вышеперечисленным показателям и может использоваться для определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

С использованием разработанной методики установлено, что оптимальным сроком заготовки листьев аронии для получения максимального выхода флавоноидов является фаза начала плодоношения растения.

**Ключевые слова:** арония Мичурина, рябина черноплодная, флавоноиды, рутин, количественное определение, дифференциальная спектрофотометрия, валидация.

Флавоноиды – группа фенольных соединений, широко распространенных в растительном мире. Лекарственные растения, содержащие данные БАВ, находят применение в медицинской практике. Флавоноиды способны проявлять антиоксидантную, капилляроукрепляющую, желчегонную, гепатопротекторную, противовоспалительную, диуретическую, гипотензивную и другие виды активности [1].

Арония Мичурина (*Aronia mitschurinii* Skvortsov & Maitulina) - широко культивируемый плодово-ягодный кустарник рода Арония, известный в народе как рябина черноплодная [2,3].

Рядом исследований доказано, что данное растение является гибридом представителей близкородственных родов семейства Розоцветные: аронии черноплодной и рябины обыкновенной [4-8].

Плоды рябины черноплодной достаточно широко изучены [9], в то время как информация по листьям ограничена. В соответствии с литературными данными в них содержатся преимущественно вещества полифенольной природы, в том числе флавоноиды. Разными исследователями были обнаружены такие представители данной группы БАВ, как кверцетин, рутин, гиперозид, изокверцитин, кемпферол, апигенин [10-13].

Проведенные нами предварительные исследования спиртовых извлечений из листьев аронии Мичурина методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) также подтвердили присутствие в полученных образцах нескольких флавоноидов, среди которых был идентифицирован рутин [14].

Однако методика количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина ранее не была разработана.

Целью работы являлись разработка и последующая валидация спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили высушенные листья аронии Мичурина сорта «Мулатка», заготовленные от культивируемого растения в Тамбовской области в 2021 году. Сушку проводили воздушно-теневым методом. В зависимости от сроков сбора сырья было подготовлено четыре образца:

- Образец 1 – на стадии цветения, май (влажность 6.12 %);
- Образец 2 – на стадии начала плодоношения, июнь (влажность 6.16 %);
- Образец 3 – на стадии зрелости плодов, август (влажность 6.48 %);
- Образец 4 – на стадии начала покраснения листьев, сентябрь (влажность 6.52%).

Методику разрабатывали с использованием образца под номером 3.

В качестве стандартного образца (СО) использовали рутин (Acros Organics, Бельгия, степень чистоты  $\geq 97\%$ ).

Для количественного определения флавоноидов в листьях рябины черноплодной использовали метод дифференциальной спектрофотометрии. Подбирали оптимальные условия экстрагирования флавоноидов из сырья, а так же оптимальные условия проведения реакции их комплексообразования с раствором алюминия хлорида (табл.1) [15-19]. Определение проводили на спектрофото-

метре СФ-2000 (Россия) при длине волны  $410 \pm 2$  нм в пересчете на рутин. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1  
Условия количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина

Условия экстрагирования сырья	
Экстрагент	Спирт этиловый 50 - 90% с шагом в 10%, 96%
Соотношение сырья : экстрагент	1:25, 1:50, 1:100
Время экстракции	30 мин - 180 мин с шагом 30 минут
Размер частиц сырья	0.2-0.5 мм, 0.5-1.0 мм, 1.0-2.0 мм, 2.0-3.0 мм
Условия проведения реакции комплексообразования	
Концентрация раствора алюминия хлорида	2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%
Соотношение объемов извлечения и раствора алюминия хлорида	1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5
Время созревания окраски комплекса	20 мин - 110 мин с шагом 10 минут

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичности, правильности, линейности, сходимости, межлабораторной прецизионности [20].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенных исследований было установлено, что наибольший выход флавоноидов наблюдается в случае экстрагирования листьев аронии Мичурина спиртом этиловым с концентрацией 60%. При этом необходимо соблюдать соотношение «сырье : экстрагент» 1:50. Оптимальное время извлечения флавоноидов из сырья 90 минут. При увеличении времени экстрагирования до 120 минут выход флавоноидов повышался незначительно, а дальнейшее увеличение времени приводило к его снижению. Экстракция происходила полнее при измельчении сырья до размеров 0.5 – 1.0 мм (табл. 2) .

На следующем этапе определяли оптимальные условия образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом. Наиболее устойчивая окраска наблюдалась при добавлении к извлечению 6% раствора алюминия хлорида в соотношении 1:3 при выдерживании раствора для созревания окраски в течение 80 мин (табл. 3).

На основании полученных экспериментальных результатов оптимальной является следующая методика определения флавоноидов в листьях аронии:

Таблица 2

Влияние условий экстрагирования на выход флавоноидов из листьев аронии Мичурина

Условия экстракции	Содержание флавоноидов в извлечении, %
Концентрация спирта, %	
50	2.73 ± 0.52
60	3.67 ± 0.24
70	2.30 ± 0.28
80	2.01 ± 0.36
90	1.91 ± 0.42
96	1.49 ± 0.23
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:25	3.35 ± 0.25
1:50	3.40 ± 0.34
1:100	3.39 ± 0.41
Время экстрагирования, мин	
30	3.01 ± 0.26
60	3.05 ± 0.21
90	3.68 ± 0.37
120	3.70 ± 0.45
150	3.17 ± 0.32
180	3.03 ± 0.61
Размер частиц сырья, мм	
0.2 – 0.5	3.15 ± 0.25
0.5 – 1.0	3.46 ± 0.14
1.0 – 2.0	3.52 ± 0.31
2.0 - 3.0	3.35 ± 0.43

Таблица 3

Выбор оптимальных условий образования комплекса флавоноидов листьев аронии Мичурина с алюминия хлоридом

Условие комплексообразования	Концентрация флавоноидов в образце, %
Концентрация раствора алюминия хлорида, %	
2	2.36 ± 0.19
3	2.44 ± 0.21
4	2.79 ± 0.17
5	3.10 ± 0.05
6	3.45 ± 0.13
7	3.36 ± 0.23
Соотношение «объем извлечения : объем 6% раствора алюминия хлорида»	
1:1	3.15 ± 0.19
1:2	3.57 ± 0.26
1:3	3.63 ± 0.27
1:4	3.64 ± 0.31
1:5	3.63 ± 0.52
Время выдерживания образца с раствором алюминия хлорида, мин	
20	3.69 ± 0.27
30	3.79 ± 0.43
40	3.81 ± 0.31
50	3.80 ± 0.24
60	3.88 ± 0.17
70	3.92 ± 0.17
80	4.00 ± 0.19
90	3.80 ± 0.23
100	3.79 ± 0.38
110	3.77 ± 0.22

Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60% спирта этилового и взвешивают. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 80 минут. Охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят 60% спиртом до первоначальной массы. Охлажденную смесь фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в 96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают. Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410±2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 2 мл извлечения, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца рутина: около 0.025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до полного растворения рутина. Охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора до метки, перемешивают и оставляют на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410±2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: 1 мл раствора А, 1 капля раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл.

Основные метрологические характеристики методики представлены в таблице 4.

Специфичность, правильность, линейность, сходимоссть и межлабораторная прецизионность были доказаны в ходе валидации разработанной методики.

При добавлении к исследуемому извлечению СО рутина спектр имеет значительное увеличение максимума поглощения, что подтверждает специфичность методики (рис. 1)

Таблица 4

Метрологические характеристики спектрофотометрического определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина ( $P=95\%$ ,  $t(P, f)=2,57$ )

$\bar{x}, \%$	n	f	S <sup>2</sup>	S	S <sub>0</sub>	S, %	$\Delta x$	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
3.52	6	5	0.0292	0.1710	0.0698	1.98	0.42	0.17	4.85

Таблица 5

Результаты определения правильности методики количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина

Содержание флавоноидов в извлечении, мг/мл	Введено рутин, мг/мл	Рассчитанное количество, мг/мл	Найдено, мг/мл	Открываемость, %
0.005	0.250	0.255	0.257	100.86
			0.265	103.67
			0.262	102.58
	0.500	0.505	0.499	98.82
			0.528	104.53
	0.750	0.755	0.518	102.44
0.131			99.84	
0.754			96.15	
			0.726	96.77

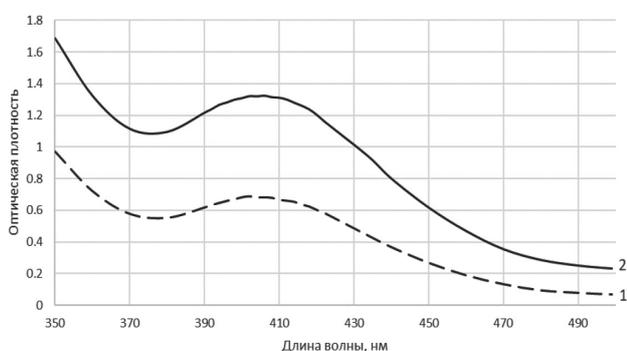


Рис. 1. Вид спектра поглощения извлечения из листьев аронии Мичурина: 1 – без добавки СО рутин, 2 – с добавкой СО рутин.

Определение правильности методики проводили методом добавок СО рутин к аликвоте полученного извлечения. Прибавляли по 0.5 мл, 1.0 мл и 1.5 мл 0.05% раствора СО в трех повторениях. Результаты определения правильности приведены в таблице 5. Открываемость в среднем составила 100.63%, что соответствует критерию приемлемости  $100\% \pm 5\%$ . Линейность подтверждали путем приготовления растворов, отбирая извлечение в диапазоне от 70 до 130% номинального значения (табл.6).

Таблица 6

Схема разбавления извлечения для определения линейности методики

Концентрация	Объем	
	Извлечения, мл	Разведения, мл
70%	0.7	25
80%	0.8	25
90%	0.9	25
100%	1.0	25
110%	1.1	25
120%	1.2	25
130%	1.3	25

Зависимость оптической плотности от содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин линейна, что отражено на рисунке 2.

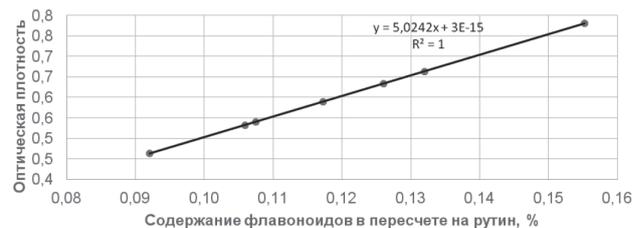


Рис. 2. График линейной зависимости оптической плотности от содержания флавоноидов в пересчете на рутин

Валидационные характеристики определения линейности методики приведены в таблице 7. Линейность зависимости подтверждается коэффициентом корреляции  $r \geq 0.99$ .

Сходимость методики определялась в шести повторениях. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями также в шести повторениях. Результаты приведены в таблице 7. Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости 2% и 5%, соответственно.

Таким образом, было доказано, что разработанная методика валидна и, как следствие, может использоваться для определения содержания флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

Содержание суммы флавоноидов в листьях рябины черноплодной достаточно высоко и сопоставимо, а в некоторых случаях превышает таковое в фармакопейных видах растительного сырья (табл. 8). Например, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках бузины черной должно быть не

Валидационные характеристики методики определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат	
Линейность	Уравнение прямой	$y=3.8065x+5.0242$	
	Угловой коэффициент (a)	3.8065	
	Свободный член b	5.0242	
	Коэффициент корреляции	0.9999	
Сходимость	Проба	Содержание суммы флавоноидов, %	
	1	3.35	
	2	3.36	
	3	3.48	
	4	3.55	
	5	3.64	
	6	3.79	
	Доверительный интервал (P=95%), %	3.53±0.17	
Относительное стандартное отклонение, %	1.98		
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1	Исследователь 2
	1	3.35	2.79
	2	3.36	2.93
	3	3.48	3.10
	4	3.55	3.15
	5	3.64	3.88
	6	3.79	3.37
	Доверительный интервал (P=95%), %	3.37±0.51	
Относительное стандартное отклонение, %	2.85		

менее 2%, листьях вахты трехлистной – не менее 1%, листьях гинкго двулопастного – не менее 0.5% [17].

С помощью полученной методики определяли оптимальные сроки заготовки листьев аронии Мичурина, обеспечивающие максимальное содержание флавоноидов в них (табл. 8).

Таблица 10

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в листьях аронии Мичурина различных сроков заготовки

Фаза сбора	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
Цветение (май)	3.94 ± 0.33
Начало плодоношения (июнь)	4.20 ± 0.12
Техническая зрелость плодов (август)	3.48 ± 0.21
Начало покраснения листьев (сентябрь)	3.47 ± 0.25

Согласно табличным данным, содержание флавоноидов в листьях рябины черноплодной достаточно высоко во все периоды заготовки. Максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии начала плодоношения (июнь) 4.20% ± 0.12%. На дальнейших стадиях содержание флавоноидов снижается, достигая минимума в сентябре. Однако разница между содержанием флавоноидов в листьях аронии Мичурина в августе и сентябре незначительна.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

Отработаны оптимальные условия извлечения флавоноидов из сырья, Изучены и рекомендованы необходимые параметры методики количественного определения. Подтверждено, что методика валидна и может использоваться для определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

С применением разработанной методики определены оптимальные сроки сбора сырья для обеспечения максимального выхода флавоноидов (стадия начала плодоношения, июнь). Установлено, что содержание флавоноидов в листьях составляет 4.20% ± 0.12%, что превышает содержание в некоторых видах фармакопейного сырья.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 11-9. С. 1897-1901. Режим доступа: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=33478> (дата обращения: 14.07.2022).
2. Виноградова, Ю.К. Арония Мичурина: от создания до натурализации. Москва, ГЕОС, 2014, 137 с.
3. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M. // *J Med Food*. 2010. Vol.13. №2, pp.55-69.
4. Peter J. Leonard, Mark H. Brand, Bryan A. Connolly, Samuel G. Obae // *HortScience*. 2019. №48 (5), pp. 520-524.
5. Mark H. Brand, Bryan A. Connolly, Lanfang H. Levine, Jeffrey T. Richards, Stacey M. Shine, Lashelle

E. Spencer // *Scientia Horticulturae*. 2017. Vol. 224, pp. 332-342

6. Skvortsov A.K., Maitulina Y.K // *Bull. MOIP, Otd. Biol.* 1983. Vol. 88. №3, pp.88-96.

7. Persson-Hovmalm H.A., Jeppsson N., Bartish I. V. // *Hereditas*. 2004. Vol.141, pp. 301–312.

8. Куклина А.Г. // *Лесохозяйственная информация*. 2015. №2. С. 46-56.

9. Дейнека В.И., Третьяков М.Ю., Олейниц Е.Ю, Павлов А.А., Дейнека Л.А., Блинова И.П., Манохина Л.А // *Химия растительного сырья*. 2019. №2. С. 161-167.

10. Ji Eun Lee, Gon-Sup Kim, Semin Park Yun-Hi Kim, Man-Bae Kim, Won Sup Lee, Sung Woo Jeong, Soo Jung Lee, Jong Sung Jin, Sung Chul Shin // *Food Chemistry*. 2014. Vol. 146, pp. 1–5.

11. Pirvu, L., Panteli M., Rasit I. // *Agriculture and agricultural science procedia*. 2015. №6, pp. 593-600.

12. Szopa, A., Kokotkiewicz A., Kubica P. // *Eur Food Res Technol*. 2017. №243, pp. 1645–1657.

13. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z., Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. // *Food and Chemical Toxicology*. 2018. Vol. 121, pp. 458-466.

14. Пугачева О.В., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств», сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, 31 марта – 2 апреля 2022 г., Воронеж, 2022, с. 429-433.

15. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Воропаева С.С. // *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2014. №1. С. 138-144.

16. Кутателадзе Г.Р., Федосеева Л.М. // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019. №2. С. 80-86.

17. Потанина А.П., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. // *Башкирский химический журнал*. 2013. № 3. С. 60-62.

18. Мартынов А.М., Даргаева Т.Д. // *Acta Biomedica Scientifica*. 2017. №1. С. 79-83.

19. Коновалов Д.А., Коновалова Д.С. // *Научные ведомости. Серия: Медицина. Фармация*. 2012. №16. С. 156-159.

20. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения 10.07.2022).

*Воронежский государственный университет*

*\*Пугачева О. В., аспирант 3-го года, преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии*

*E-mail: pugachevaov1@yandex.ru*

*Брежнева Т. А., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии*

*E-mail: t\_brezhneva@mail.ru*

*Сливкин А. И., д.ф.н., проф., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии*

*E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Voronezh State University*

*\*Pugacheva O. V., postgraduate student, assistant professor, Dept. of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology*

*E-mail: pugachevaov1@yandex.ru*

*Brezhneva T. A., PhD., associate professor, Dept. of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology*

*E-mail: t\_brezhneva@mail.ru*

*Slivkin A. I., PhD., DSci., Full Professor, Dept. of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology*

*E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS IN ARONIA MICHURINA LEAVES**

**O.V. Pugacheva, T.A. Brezhneva, A.I. Slivkin**

*Voronezh State University*

**Abstract.** Medicinal plants containing flavonoids are used in medical practice due to their wide range of pharmacological action. For this reason, the search for new sources of this group of biologically active substances (BAS) is relevant.

One of the perspective raw materials containing flavonoids is Aronia Michurina, also known as black chokeberry, but until now there was no method for quantitative determination of flavonoid content in raw material.

The aim of this work was to develop and further validate a spectrophotometric technique for quantitative determination of the amount of flavonoids in Michurin chokeberry leaves.

The dried leaves of Michurin chokeberry variety "Mulatka" collected in Tambov region in 2021 were used as an object of the study; air-shadow drying. Raw materials were collected at four stages of plant development: the phase of flowering, the phase of the start of fruiting, the phase of technical maturity of fruits, and the phase of the beginning of leaf reddening.

It was found that the optimal extractant to provide the maximum yield of flavonoids from Black chokeberry leaves is ethyl alcohol 60% with the ratio of raw material to the extractant 1:50 and extraction within 90 minutes. Particles of the raw material must pass through a sieve with a diameter of 1 mm. The reactions of complexation should be carried out with 6% aluminum chloride solution in a ratio of 1:3, for 80 minutes.

The flavonoid content in terms of rutin in the studied leaves was  $3.53\% \pm 0.17\%$ . The validation of the developed method was carried out. It was confirmed that the limits of the acceptance criteria of the validation characteristics were not exceeded. The method's specificity was confirmed by the increase in the maximum absorbance when adding a standard solution of rutin to the extract under study. The average opening percentage when the standard sample was added was 100.63%. The correlation coefficient  $r \geq 0.99$  confirmed the linearity of the technique. The relative standard deviation in determining the convergence was 1.98% and the interlaboratory precision was 2.85%, which does not exceed 2% and 5%, respectively.

The method is valid according to the above-mentioned indicators and can be used for the determination of flavonoids in Michurin chokeberry leaves.

Using the developed technique, it was found that the optimal time for harvesting chokeberry leaves to obtain the maximum yield of flavonoids is the phase of the beginning of fruiting of the plant.

**Keywords:** Aronia mitschurinii, black chokeberry, flavonoids, rutin, quantification, differential spectrophotometry, validation.

## REFERENCES

1. Kurkin V.A., Kurkina A.V., Avdeeva E.V. Fundamental'nye issledovaniya, 2013, № 11-9, S. 1897-1901. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=33478> (accessed 14 July 2022).
2. Vinogradova, Yu.K. Aroniya Michurina: ot sozdaniya do naturalizatsii? Moskva, GEOS, 2014, 137 s.
3. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M., J Med Food, 2010, Vol.13, №2, pp. 55-69. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062.
4. Peter J. Leonard, Mark H. Brand, Bryan A. Connolly, Samuel G. Obae, HortScience, 2019, №48 (5), pp. 520-524. DOI: 10.21273/HORTSCI.48.5.520
5. Mark H. Brand, Bryan A. Connolly, Lanfang H. Levine, Jeffrey T. Richards, Stacey M. Shine, Lashelle E. Spencer, Scientia Horticulturae, 2017, Vol. 224, pp. 332-342 DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.021
6. Skvortsov A.K., Maitulina Y.K., Bull. MOIP, Otd. Biol., 1983, Vol. 88, №3, pp.88-96.
7. Persson-Hovmalm H.A., Jeppsson N., Bartish I. V., Hereditas, 2004, Vol.141, pp. 301-312. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2004.01772.x
8. Kuklina A.G., Lesokhozyaistvennaya informatsiya, 2015, №2, pp. 46-56.
9. Deineka V.I., Tret'yakov M.Yu., Oleinits E.Yu, Pavlov A.A., Deineka L.A., Blinova I.P., Manokhina L.A, Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2019, №2, pp.161-167.
10. Ji Eun Lee, Gon-Sup Kim, Semin Park Yun-Hi Kim, Man-Bae Kim, Won Sup Lee, Sung Woo Jeong, Soo Jung Lee, Jong Sung Jin, Sung Chul Shin, Food Chemistry, 2014, Vol. 146, pp. 1-5. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.029.
11. Pirvu, L., Panteli M., Rasit I., Agriculture and agricultural science procedia, 2015, №6, pp. 593-600. DOI: 10.1016/j.aaspro.2015.08.095
12. Szopa, A., Kokotkiewicz A., Kubica P., Eur Food Res Technol, 2017, №243, pp. 1645-1657. DOI: 10.1007/s00217-017-2872-8
13. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z., Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. , Food and Chemical Toxicology, 2018, Vol. 121, pp. 458-466. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.045>.
14. Pugacheva O.V., Brezhneva T.A., Slivkin A.I., Putii formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Aktual'nye voprosy razrabotki i issledovaniya novykh lekarstvennykh sredstv, sbornik trudov 8-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii, Voronezh, 2022, c. 429-433.

15. Trineeva O.V., Slivkin A.I., Voropaeva S.S., Vestnik VGU, seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2014, №1, pp. 138-144.
16. Kutateladze G.R., Fedoseeva L.M., Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv, 2019, V.8, №2, pp. 80-86
17. Potanina A.P., Khasanova S.R., Kudashkina N.V., Bashkirskii khimicheskii zhurnal, 2013, № 3, pp. 60-62.
18. Martynov A.M., Dargaeva T.D., Acta Biomedica Scientifica, 2017, №1, pp. 79-83.
19. Konovalov D.A., Konovalova D.S., Nauchnye vedomosti. Seriya: Meditsina. Farmatsiya, 2012, №16, pp. 156-159.
20. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. XIV izdanie. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 10 July 2022).