

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2025.4.26 EDN: OKRJAV

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ В ТРАВЕ *FAGOPYRUM RUBRICAULIS*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**© Митищев А.В.¹, Макарцева М.Г.¹, Погодина В.С.¹, Полякова Е.В.², Хишова О.М.³,
Курдюков Е.Е.¹**¹Пензенский государственный университет, Россия, 440026, Пенза, ул. Красная, 40²Пензенский государственный аграрный университет, Россия, 440014, Пенза, ул. Ботаническая, 30³Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Белоруссия, 210009, Витебск, пр-т Фрунзе, 27*Резюме***Цель.** Идентификация и количественное определение суммарного содержания фенилпропаноидов в сырье гречихи красностебельной (*Fagopyrum rubricaulis*).**Методика.** Сырьем для получения экстрактов являлась гречихи красностебельной трава, заготовленная на территории производственных полей компании ООО «Парафарм» в Камешкирском районе Пензенской области в период массового цветения (26.07.24-01.08.24). В качестве экстрагента использовали этанол различной концентрации – 40%, 70% и 95%. Идентификацию проводили с помощью тонкослойной хроматографии. Суммарное содержание фенилпропаноидов в сырье гречихи определяли методом дифференциальной спектрофотометрии.**Результаты.** По результатам качественной идентификации с помощью тонкослойной хроматографии водно-спиртовые экстракты гречихи содержали фенилпропаноиды. Пики поглощения экстрактов наблюдались при длине волны 330 нм, что соответствовало максимуму поглощения раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты. Исходя из полученных данных, количественное определение суммарного содержания фенилпропаноидов проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту. Определены оптимальные параметры экстракции: в качестве растворителя использовался 40%-ный этиловый спирт, соотношение «сырье - экстрагент» составило 1:50; время экстракции 30 мин., кратность экстракции – однократная.**Заключение.** Доказано наличие фенилпропаноидов в траве гречихи красностебельной с использованием ТСХ. С помощью методики была проанализирована биологически активная добавка к пище «Гречиха красностебельная. Кулясово & Мамадыш» производства ООО «Парафарм» (Серия: 0424). Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту варьировало от 2.67 ± 0.07 - 2.98 ± 0.12 %. Полученные результаты указывают на то, что данная методика может быть использована для стандартизации лекарственного сырья гречихи красностебельной.**Ключевые слова:** гречиха красностебельная, *Fagopyrum rubricaulis*, спектрофотометрический метод, фенилпропаноиды, хлорогеновая кислота**DETERMINATION OF THE TOTAL CONTENT OF PHENYLPROPANOIDS
IN THE GRASS *FAGOPYRUM RUBRICAULIS*, GROWING IN THE PENZA REGION**
Mitishev A.V.¹, Makartseva M.G.¹, Pogodina V.S.¹, Polyakova E.V.², Hishova O.M.³,
Kurdyukov E.E.¹¹Penza State University, 40, Krasnaya St., 440026, Penza, Russia²Penza State Agrarian University, 30, Botanicheskaya St., 440014, Penza, Russia³Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, 210009, Frunze Av., 27, Vitebsk,
Republic of Belarus*Abstract***Objective.** Identification and quantification of the total content of phenylpropanoids in the raw materials of red-stem buckwheat (*Fagopyrum rubricaulis*).**Methods.** The raw material for obtaining extracts was red-stemmed buckwheat grass harvested on the territory of the production fields of Parafarm LLC in the Kameshkirsky district of the Penza region during

the mass flowering period (07.26.24-08.01.24). Ethanol of various concentrations (40%, 70% and 95%) was used as an extractant. Identification was carried out using thin-layer chromatography. The total content of phenylpropanoids in buckwheat raw materials was determined by differential spectrophotometry.

Results. According to the results of qualitative identification using thin-layer chromatography, water-alcohol buckwheat extracts contained phenylpropanoids. Absorption peaks of the extracts were observed at a wavelength of 330 nm, which corresponded to the maximum absorption of the solution of the standard sample of chlorogenic acid. Based on the data obtained, the quantitative determination of the total content of phenylpropanoids was carried out in terms of chlorogenic acid. Optimal extraction parameters were determined: 40% ethyl alcohol was used as a solvent, the ratio of "raw material - extractant" was 1:50; extraction time was 30 minutes, the extraction rate was one time.

Conclusion. The presence of phenylpropanoids in red-stem buckwheat grass has been proven using TLC. The biologically active food additive "Red-stem buckwheat" was analyzed using the technique. Kulyasovo & Mamadysh" produced by Parafarm LLC (Series: 0424). The amount of phenylpropanoids in terms of chlorogenic acid ranged from 2.67 ± 0.07 - $2.98 \pm 0.12\%$. The results obtained indicate that this technique can be used to standardize medicinal raw materials of red-stem buckwheat.

Keywords: red-stem buckwheat, *Fagopyrum rubricaulis*, differential spectrophotometric method, phenylpropanoids, chlorogenic acid

Введение

На территории Российской Федерации широко культивируются растения, характеризующиеся активным синтезом вторичных метаболитов, в частности, полифенольных соединений, обладающих широким спектром действия [1, 8]. Одним из перспективных растений является гречиха красностебельная (*Fagopyrum rubricaulis*), семейство гречишные (*Polygonaceae*). Согласно данным исследований, в надземной части гречихи красностебельной содержатся флавоноиды (рутин, кверцетин, изокверцетин и др.), фенилпропаноиды (хлорогеновая и кофейная кислоты), фенолкарбоновые (протокатеховая и галловая), органические кислоты, каротиноиды, белки, витамины группы В [10-11]. Кроме того, в сырье гречихи сорта Башкирская красностебельная обнаружены флаванолы и проантоцианидины [12]. Экстракты гречихи оказывают анти-, кардиопротективное, адаптогенное, антиоксидантное, противовоспалительное, антибактериальное, гипогликемическое действие [14]. Широкий спектр фармакологических эффектов характеризует гречиху красностебельную как перспективный источник сырья для разработки лекарственных средств, но для этого необходимо определить нормируемые показатели и разработать методы количественного определения биологически активных соединений.

Основная проблема при количественном определении фенилпропаноидов в сырье гречихи красностебельной заключается в содержании разных классов полифенольных соединений. Они имеют сходные полосы поглощения в ультрафиолетовой области спектра, что затрудняет их идентификацию методом прямой спектрофотометрии. [3, 4, 9]. Для получения достоверного результата необходимо использовать модификации спектрофотометрического метода: предварительная твердофазная экстракция [13], хромато-спектрофотометрия [4], экстракционная спектрофотометрия, метод Фирордта в спектрофотометрии и спектрофотометрия с использованием реактива Арнова [5, 7]. При анализе известных модификаций в научной литературе было обнаружено, что предварительная твердофазная экстракция является одним из доступных, простых, быстрых и дешевых методов предварительной очистки суммарного извлечения.

Цель исследования – идентификация, и количественное определение суммарного содержания фенилпропаноидов в надземной части гречихи красностебельной.

Методика

Материалом для исследования служила собранная в фазу массового цветения и начала плодоношения гречихи красностебельной трава. Сбор проходил в Камешкирском районе Пензенской области в период с 26.07.24 по 01.08.24. Траву гречихи красностебельной сушили в сушильных шкафах (ШС-80-02 СПУ) при температуре не превышающей 40°C. Сыре измельчали на лабораторных мельницах (ML-08B, Китай). Экстракцию фенилпропаноидов из травы гречихи

краснотебельной проводили с использованием этилового спирта различных концентраций (40%, 70% и 95%). Процесс экстракции проводился методом макерации при температуре 90°C. Наличие фенилпропаноидов в водно-спиртовых экстрактах было подтверждено с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах марки «Sorbifil» ПТСХ-П-В-УФ (Россия). Элюирование проводили с использованием системы н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2). После полного высыхания детекцию проводили с использованием 1%-ного раствора хлорида железа(III).

Для разработки метода количественного определения содержания фенилпропаноидов в траве гречихи краснотебельной был использован спектрофотометрический метод с предварительной твердофазной очисткой. Для твердофазной очистки использовали нейтральный оксид алюминия (Al_2O_3). Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-102 (ЗАО «НПКФ Аквилон», Россия). Для расчета суммарного содержания фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье гречихи краснотебельной использовали удельный показатель поглощения при 330 ± 2 нм равный 497 [6].

Статистическая обработка результатов исследования и валидация методики проводились в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методов» и ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания [2] с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2019.

Результаты исследования и их обсуждение

В экстрактах гречихи краснотебельной методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) было обнаружено несколько зон адсорбции со значениями Rf 0,28-0,82. После высыхания зона с Rf 0,28 при просмотре в ультрафиолетовом свете имела голубое окрашивание при 365 нм и светло-коричневое при 254 нм, а зоны адсорбции от 0,41-0,82 имели желто-коричневый цвет (предположительно флавоноиды). После обработки пластины 1% раствором железа хлорида (III) пятно с Rf 0,28 окрашивалось в светло-зеленый цвет, что соответствовало величине Rf и окраске стандартного образца хлорогеновой кислоты.

Анализ результатов, полученных прямой УФ-спектрометрией извлечений гречихи краснотебельной травы, показал наличие максимума поглощения в виде плеча при длине волны 330-350 нм. Учитывая, что максимум поглощения в диапазоне 330-350 нм имеют не только фенилпропаноиды, но и другие фенольные соединения, в частности флавоноиды, необходима предварительная пробоподготовка извлечений. Для снижения влияния флавоноидов на спектральные характеристики извлечений проводили очистку через слой алюминия оксида. Как видно на рис. 1, пики спектра поглощения очищенного экстракта гречихи краснотебельной соответствуют максимуму поглощения СО хлорогеновой кислотой. Поэтому при количественном определении суммы фенилпропаноидов в экстрактах травы гречихи краснотебельной пересчет производили на хлорогеновую кислоту.

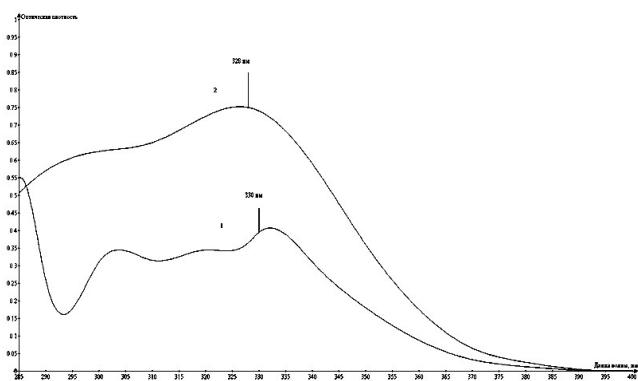


Рис. 1. Электронные спектры стандартного образца хлорогеновой кислоты (2) и 40% спиртового извлечения из надземной части *Fagopyrum rubricaulis* после очистки через слой алюминия оксида (1)

На начальных этапах разработки методики количественного определения фенилпропаноидов были определены оптимальные условия экстрагирования сырья гречихи красностебельной. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оптимальные параметры экстракции гречихи красностебельной травы

Исследуемый параметр извлечения	Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту, %		
	1	2	3
Степень измельчения, мм	1,62±0,10	1,75±0,05	1,69±0,21
Экстрагент	Спирт этиловый		
	40%	70%	95%
	2,81±0,09	2,14±0,12	1,62±0,09
Соотношение «сырье-экстрагент»	1:25	1:50	1:100
	2,18±0,13	2,39±0,05	2,30±0,11
Время экстракции, мин	30	60	90
	2,98±0,16	2,71±0,10	2,55±0,09

В результате пяти параллельных определений установлено среднее значение ($X_{ср}=2,75\%$), стандартное отклонение ($S=0,08$), дисперсия ($S_2=0,007$), полуширина доверительного интервала ($\Delta X=0,06$). Погрешность единичного определения ($\epsilon, \%$) суммы фенилпропаноидов с доверительной вероятностью ($P, \%$) 95% в сырье гречихи красностебельной составила $\pm 2,18\%$.

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи РФ XV издания по показателям: специфичность, линейность, прецизионность. Специфичность методики оценивали по соответствуанию максимумов поглощения экстракта из гречихи красностебельной травы и раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты (рис. 1). Линейность методики определяли для серии аналитических проб с концентрацией фенилпропаноидов от 16 до 74 мг/мл). По полученным данным построили график зависимости значений оптической плотности раствора извлечения от концентрации хлорогеновой кислоты, а затем рассчитали уравнение линейной регрессии (рис. 3). Коэффициент корреляции составил 0,9873.

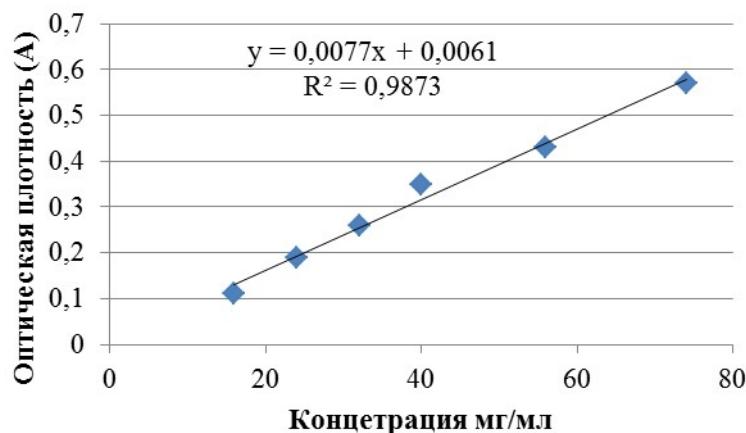


Рис. 3. Зависимость значений оптической плотности проб от содержания суммы фенилпропаноидов в гречихе красностебельной траве

Прецизионность методики (уровень повторяемости) оценивали путем анализа исследуемого образца гречихи красностебельной в 5-кратной повторности при одинаковых условиях. Согласно полученным результатам среднее значение составило 2,84%, ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,44\%$.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности количественный анализ спиртового экстракта проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования пятикратно (табл. 3). Выявлено, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более 2,2% при определении суммы фенилпропаноидов методом

спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны и различия между полученными значениями являются случайными.

Таблица 3. Валидационная оценка внутрилабораторной прецизионности методики определения суммы фенилпропаноидов в гречихи красностебельной траве ($P=95$; $n=5$)

Аналитик 1		Аналитик 2	
C, %	Метрологические характеристики	C, %	
2,79	$X, \% = 2,83$	$X, \% = 2,71$	2,62
2,72	$S^2 = 0,0050$	$S^2 = 0,0045$	2,68
2,88	$S = 0,0709$	$S = 0,0672$	2,74
2,85	$\Delta X, \% = 0,0621$	$\Delta X, \% = 0,0589$	2,80
2,89	$\varepsilon, \% = 2,19 \%$	$\varepsilon, \% = 2,17$	2,70

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки разработанной нами методики и позволяют предложить ее для количественного определения суммарного содержания фенилпропаноидов в гречихи красностебельной траве в пересчете на хлорогеновую кислоту. С помощью разработанной методики была проанализирована биологически активная добавка к пище «Гречиха красностебельная. Кулясово & Мамадыш» производства ООО «Парафарм» (Серия: 0424). Содержание суммы фенилпропаноидов, в пересчете на хлорогеновую кислоту, варьировало от $2,62 \pm 0,14$ - $2,98 \pm 0,16\%$.

Заключение

С помощью тонкослойной хроматографии были идентифицированы фенилпропаноиды в экстрактах гречихи красностебельной. Разработан метод количественного определения суммы фенилпропаноидов методом дифференциальной спектрофотометрии после твердофазной очистки с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты (497) при 330 нм. Определено содержание фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту в водно-спиртовых экстрактах гречихи красностебельной: от $2,62 \pm 0,14\%$ до $2,98 \pm 0,16\%$. Установлены оптимальные параметры экстракции фенилпропаноидов из травы гречихи красностебельной: экстрагент – спирт этиловый 40%; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; продолжительность – 30 мин.; температура – 90°C.

Проведена валидационная оценка разработанной методики. На основании результатов валидационной оценки эксперимента можно сделать вывод, что данный метод может быть использован для количественного определения содержания фенилпропаноидов в сырье гречихи красностебельной в пересчете на хлорогеновую кислоту. Полученные результаты имеют важное значение для дальнейших исследований гречихи красностебельной в качестве потенциального источника биологически активных соединений.

Литература (references)

1. Березина Е.В., Рыбин Д.А., Сухова А.А. и др. Сравнительный анализ содержания фенольных соединений в тканях и клетках голубики щитковой *Vaccinium corymbosum* в условиях *in vivo* и *in vitro* // Химия растительного сырья. – 2024. – № 3. – С. 129-137. [Berezina E.V., Rybin D.A., Suhova A.A. i dr. *Himija rastitel'nogo syr'ja. Chemistry of plant raw materials.* – 2024. – N3. – P. 129-137. (in Russian)]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. - URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/?PAGEN_1=5 [Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii HV izdanija. - URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/?PAGEN_1=5 (in Russian)]
3. Денисенко Т.А., Вишниkin А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу // Аналитика и контроль. – 2015. – Т.19, №4. – С. 373–380. [Denisenko T.A., Vishnkin A.B., Cyganok L.P. *Analitika i kontrol'. Analytics and control.* – 2015. – V.19, N4. – P. 373–380. (in Russian)]

4. Компанцева Е.В., Айрапетова А.Ю., Саушкина А.С. Определение гидроксикоричных кислот в растительном сырье спектрофотометрическим методом. Часть 1. Прямая спектрофотометрия (обзор) // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2024. – Т.14, №2. – С. 181-195. [Kompanceva E.V., Ajrapetova A.Ju., Saushkina A.S. // *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. Reguljatornye issledovanija i jekspertiza lekarstvennyh sredstv*. Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical devices. Regulatory research and expertise of medicines. – 2024. – V.14, N2. – P. 181-195. (in Russian)]
5. Компанцева Е.В., Саушкина А.С., Айрапетова А.Ю. Определение гидроксикоричных кислот в растительном сырье спектрофотометрическим методом Часть 2. Определение гидроксикоричных кислот в присутствии полифенольных соединений (обзор) // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2024. – Т. 14, №2. – С. 196–206. [Kompanceva E.V., Saushkina A.S., Ajrapetova A.Ju. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. Reguljatornye issledovanija i jekspertiza lekarstvennyh sredstv*. Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical devices. Regulatory research and expertise of medicines. – 2024. – V.14, N2. – P. 196–206. (in Russian)]
6. Курдюков Е.Е., Правдинцева О.Е., Семенова Е.Ф. Сравнительный анализ отечественного и импортного сырья стевии по содержанию суммы фенилпропаноидов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2023. – Т.22, №2. – С. 230-234. [Kurdjukov E.E., Pravdivceva O.E., Semenova E.F. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoy akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2023. – V.22, N2. – P. 230-234. (in Russian)]
7. Лавшук В.В. Лукашов Р.И. Влияние ультразвука на эффективность экстракции гидроксикоричных кислот из одуванчика лекарственного корней // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. – №4. – С. 199–203. [Lavshuk V.V, Lukashov R.I. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. Bulletin of the Bashkir State Medical University. – 2019. – N4. – P. 199–203. (in Russian)]
8. Феднина А.С., Макарцева М.Г., Курдюков Е.Е. и др. Современное состояние исследований химического состава некоторых представителей рода *Fagopyrum* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т.26, №9. – С. 27-32. [Fednina A.S., Makarceva M.G., Kurdjukov E.E. i dr. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmacevticheskoy himii. Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. – 2023. – V.26, N9. – P. 27-32. (in Russian)]
9. Шейхмагомедова П.А., Попова О.И. Идентификация фенольных соединений и разработка методики количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в траве фацелии пижмолистной (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т.25, №12. – С. 44-50. [Shejhmagomedova P.A., Popova O.I. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoy i farmacevticheskoy himii. Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. – 2022. – V.25, N12. – P. 44-50. (in Russian)]
10. Babu Subhash, Yadav Gulab, Singh Raghavendra. Production technology and multifarious uses of buckwheat (*Fagopyrum* spp.): A review // Indian Journal of Agronomy. – 2019. – V.63. – P. 415-427.
11. Haci Y., Yabancı N., Çağdaş M. Buckwheat: A Useful Food and Its Effects on Human Health // Current Nutrition & Food Science. – 2020. – V.16. – P. 29-34.
12. Li J., Yang P., Yang Q. Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using UPLC-ESI-MS/MS // Molecules. – 2019. – V.24. – P. 1310.
13. Maráková K., Renner B.J., Thomas S.L. at all. Solid phase extraction as sample pretreatment method for top-down quantitative analysis of low molecular weight proteins from biological samples using liquid chromatography - triple quadrupole mass spectrometry // Anal Chim Acta. – 2023. – V.5. – P. 35-41.
14. Rui J., Hua-Qiang L., Chang-Ling H. Phytochemical and Pharmacological Profiles of Three *Fagopyrum* Buckwheats // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – V.17. – P. 589.

Информация об авторах

Митишиев Александр Владимирович – старший преподаватель кафедры «Общая и клиническая фармакология» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: span2361@rambler.ru

Макарцева Марина Геннадьевна – студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: makartsevamm@mail.ru

Погодина Валерия Сергеевна – студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: lerapogodina25@gmail.com

Полякова Елена Валерьевна – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедры «Биология, биологические технологии и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный аграрный университет». E-mail: bio_vetsan@pgau.ru

Хишиова Ольга Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедры «Фармацевтических технологий с курсом ФПК и ПК» УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». E-mail: olg.khishova@yandex.ru

Курдюков Евгений Евгеньевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры «Общая и клиническая фармакология» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Работа финансировалась за счёт средств гранта Российского научного фонда, проект № 24-25-20155.

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.03.2025

Принята к печати 28.11.2025