

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 615.322:543.422.3

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2021.1.25

**МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ В СЫРЬЕ МОРИНГИ**

© Курдюков Е.Е., Митишев А.В., Водопьянова О.А., Антропова Н.В., Суханова А.В.

Пензенский государственный университет, Россия, 440026, Пенза, ул. Красная, 40

*Резюме*

**Цель.** Определить содержание суммы фенилпропаноидов в моринги листьях методом спектрофотометрии.

**Методика.** Содержание суммы фенилпропаноидов оценивали методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

**Результаты.** Проведено количественное определение суммы фенилпропаноидов в моринги листьях методом прямой спектрофотометрии. Методом прямой спектрофотометрии в экстрактах из листьев моринги подтверждено наличие фенилпропаноидов, определены аналитические максимумы исследуемых соединений – 290 и 330 нм. Обоснованы оптимальные условия экстракции фенилпропаноидов из сырья данного растения (экстрагент – спирт этиловый 70%; соотношение «сырье – экстрагент» – 1:200; время экстракции – 60 минут; степень измельченности сырья – 1,0 мм.

**Заключение.** Выявлено, что содержание фенилпропаноидов в сырье моринги составляет 3,18%. Полученные результаты позволяют рекомендовать моринги листья как источник фенилпропаноидов наряду с известными лекарственными растениями. Таким образом, целесообразно сделать вывод, что комплекс фенилпропаноидов относится ко второй группе биологически активных соединений моринги листьев.

*Ключевые слова:* *Moringa oleifera*, фенилпропаноиды, спектрофотометрия, количественное определение, хлорогеновая кислота

**METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION THE AMOUNT OF PHENYLPROPANOIDS IN MORINGA RAW MATERIALS**

Kurdjukov E.E., Mitishev A.V., Vodop'yanova O.A., Antropova N.V., Suhanova A.V.

Penza State University, 40, Krasnoj St., 440026, Penza, Russia

*Abstract*

**Objective.** Determine the amount of phenylpropanoids in moringa leaves by spectrophotometry.

**Methods.** The content of phenylpropanoids was estimated by direct spectrophotometry in terms of chlorogenic acid.

**Results.** Quantitative determination of the amount of phenylpropanoids in moringa leaves by direct spectrophotometry. The presence of phenylpropanoids was confirmed by direct spectrophotometry in extracts from moringa leaves, and the analytical maxima of the studied compounds – 290 and 330 nm – were determined. The optimal conditions for the extraction of phenylpropanoids from the raw materials of this plant are justified (extractant-ethyl alcohol 70 %; the ratio of "raw material-extractant" – 1:200; extraction time-60 minutes; the degree of grinding of raw materials-1.0 mm).

**Conclusion.** It was revealed that the content of phenylpropanoids in the raw materials of moringa is 3.18%. The results obtained allow us to recommend moringa leaves as a source of phenylpropanoids

along with well-known medicinal plants. Thus, it is reasonable to conclude that the complex of phenylpropanoids belongs to the second group of biologically active compounds of moringa leaves.

**Keywords:** *Moringa oleifera*, phenylpropanoids, spectrophotometry, quantitative determination, chlorogenic acid

## Введение

Моринга масличная (*Moringa oleifera*) из семейства *Moringaceae* является потенциальным лекарственным растением. Сырье моринги содержит комплекс биологически активных соединений (флавоноиды, фенилпропаноиды, каротиноиды, сапонины). Моринги листья сочетает в себе мочегонный, гипохолестеринемический и ангиогипертензивный эффект, что позволяет использовать при сердечно-сосудистых заболеваниях [12, 13, 17]. В научной литературе имеются разноречивые данные по химическому составу стевии, в том числе не изучено содержание органических кислот [15-17]. Однако их концентрация в одном и том же виде стевии может отличаться в зависимости от ареала произрастания.

Фенилпропаноиды обладают адаптогенной, тонизирующей, антиоксидантной, гепатопротекторной, противовоспалительной и противовирусной активностью. Назначение лекарственных растений с преимущественно антиоксидантным механизмом действия, способных предотвращать гиперлипидпероксидацию, деструкцию мембранных структур клеток и одновременно повышающих естественные возможности антиоксидантных систем организма, является актуальным направлением для разработки лекарственных растительных препаратов [10, 11, 14-16].

Цель исследования – определить содержание суммы фенилпропаноидов в листьях моринги методом спектрофотометрии.

## Методика

В качестве объекта исследования использовали измельченные высушенные листья моринги (упаковки по 100 г) – Marudhar Impex, Индия. Присутствие, в водно-спиртовых извлечениях из сырья, фенилпропаноидов доказывали методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии [1, 3, 5, 6]. На линию старта хроматографической пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ», предварительно активированной в сушильном шкафу при температуре 100-105°C, микропипеткой наносили 0,02 мкл водно-спиртового извлечения из листьев моринги. В качестве веществ-свидетелей на ту же пластинку наносили спиртовой раствор СО цинарозида, спиртовой раствор СО рутина, спиртовой раствор СО кофейной кислоты, спиртовой раствор СО хлорогеновой кислоты, спиртовой раствор СО гиперозида. Пластинку помещали в хроматографическую камеру и хроматографировали восходящим способом в системе хлороформ – этиловый спирт 70% – вода (26:16:3).

Извлечение фенилпропаноидов из листьев моринги проводили путем однократной экстракции спиртом этиловым различной концентрацией при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Оптимальным экстрагентом считался тот, который позволял определить наибольшее количество суммы фенилпропаноидов в исследуемых извлечениях. Регистрировали спектры на спектрофотометре СФ-104 в кювете с толщиной слоя 10 мм (растворитель спирт этиловый).

0,5 г измельченного сырья (точная масса) помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, приливали 100 мл экстрагента спирта этилового различной концентрации (95%, 70%, 40%), присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут с момента закипания экстрагента в колбе. После охлаждения полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Затем в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 1,0 мл полученного фильтрата и доводили объём экстрагентом до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 330 нм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый концентрации 95%, 70% и 40%.

Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту и воздушно-сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 50 \times 100}{497 \times m \times 1,0 \times (100 - W)}$$

где,  $D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $m$  – масса сырья, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), %; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для подтверждения присутствия фенолпропаноидов в изучаемом сырье использовали ТСХ-анализ. Полученные хроматограммы просматривали при дневном свете, в УФ-свете детектировали при  $\lambda=366$  нм и  $\lambda=254$  нм, а также обрабатывали щелочным раствором ДСК и фосфорномolibденовой кислоты (рис.1) [1, 3, 5, 6].

На полученной хроматограмме видно, что в извлечении из листьев моринги обнаруживается зона адсорбции оранжевого цвета  $R_f$  около 0,47 на уровне СО хлорогеновой кислоты, а также зона адсорбции желтого цвета с  $R_f$  около 0,53 на уровне раствора СО рутина. Таким образом, рациональным подходом при проведении качественного анализа листьев моринги и ее препаратов методом тонкослойной хроматографии является использование в качестве веществ-стандартов хлорогеновой кислоты с последующим расчетом значений  $R_f$ .

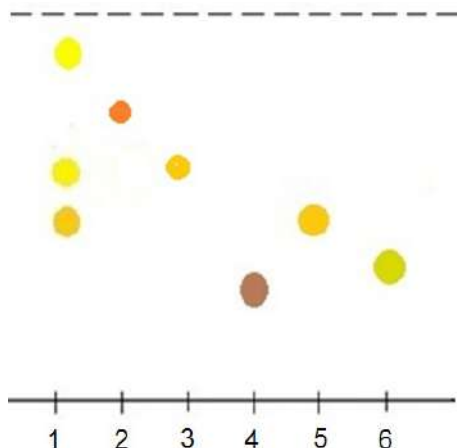


Рис. 1. Схема хроматограммы извлечения из листьев моринги. Система хлороформ – этиловый спирт 70% – вода (26:16:3). Обозначения: 1 – извлечение из листьев моринги (1:200); 2 – СО цинарозида, – СО рутина, 4 – СО кофейной кислоты, 5 – СО хлорогеновой кислоты, 6 – СО гиперозида

Наиболее распространённым методом количественного определения фенолпропаноидов является прямая спектрофотометрия [1-4, 9]. Количественное определение суммы фенолпропаноидов в моринги листьях спектрофотометрическим методом проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту, исходя из спектров извлечения из моринги и хлорогеновой кислоты (рис. 2). Хлорогеновая кислота по спектральным характеристикам близка к фенолпропаноидам листьев моринги и может быть использована в методике количественного анализа в качестве стандарта. Хлорогеновая кислота является сильным антиоксидантом природного происхождения, биологическая роль которой сводится к противодействию воспалительным процессам.

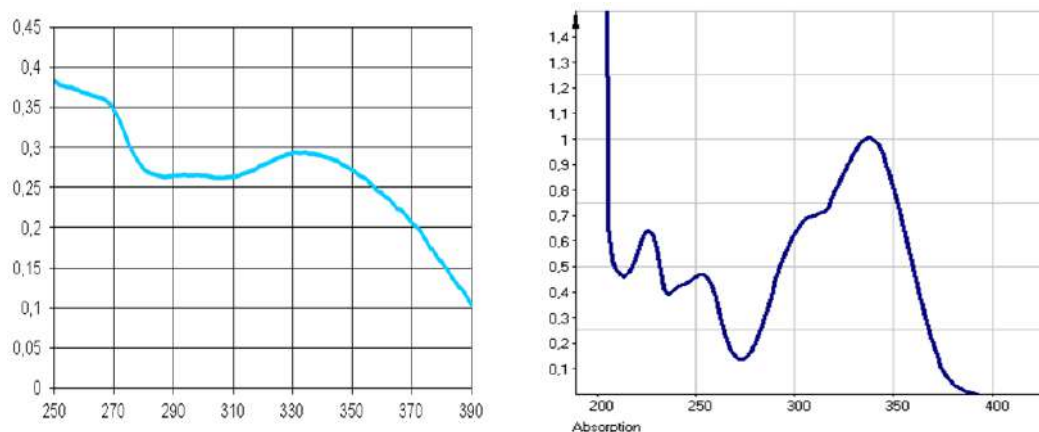


Рис. 2. УФ-спектр извлечения из моринги листьев (1:100) и хлорогеновой кислоты

Для экстракции фенолпропаноидов из листьев моринги целесообразно использование этанола 70%, так как интенсивность пиков в 40% и 95%-ных спиртовых экстрактах меньше, по сравнению 70%, при условии одинаковых навесок и условий экстракции.

Для количественного спектрофотометрического анализа необходим стандарт или величина удельного показателя поглощения фенолпропаноидов. С целью пересчета содержания веществ фенольной природы в извлечении из листьев моринги на хлорогеновую кислоту нами был использован удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при  $\lambda=330$  нм для прямой спектрофотометрии [5-8]. Значение  $E_{1\text{см}}^{1\%}=497$  было включено в формулу расчета, что позволило не использовать СО хлорогеновой кислоты в последующих определениях.

Наличие фенольных соединений в изучаемом растении подтверждается УФ-спектральными характеристиками спиртовых извлечений. Определены максимумы собственного поглощения фенолпропаноидов спиртовых экстрактов из листьев моринги – 290 нм (плечо) и 330 нм (максимум). Следует отметить, что положение максимумов не меняется при использовании в качестве экстрагента этанола 40%, 70% и 95%. Раствор СО хлорогеновой кислоты имеет максимум поглощения при 330 нм и «плечо» при 290 нм. Ввиду близкого расположения максимумов поглощения исследуемого извлечения из сырья моринги и вещества-стандарта хлорогеновой кислоты, одним из целесообразных вариантов стандартизации является прямая спектрофотометрия.

При разработке методики было изучено влияние на выход фенолпропаноидов следующих факторов: степень измельченности сырья, экстрагент, соотношение сырье: экстрагент, длительность и температура экстракции (табл. 1-4).

Зависимость выхода биологически активных соединений из моринги от степени измельченности сырья представлена в табл. 1. Следует отметить, что, по нашим данным, степень измельчения от 0,5 до 2 мм сильного влияния на экстракцию не оказывает. Однако в качестве оптимальной нами выбрана степень измельчения 1 мм.

Таблица 1. Зависимость выхода БАС листьев моринги от степени измельченности сырья

| №п/п | Размер частиц | Содержание суммы фенолпропаноидов                           |  |
|------|---------------|-------------------------------------------------------------|--|
|      |               | в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту |  |
| 1    | 0,5 мм        | 3,04±0,08%                                                  |  |
| 2    | 1 мм          | 3,07±0,07%                                                  |  |
| 3    | 2 мм          | 3,05±0,12%                                                  |  |
| 4    | 3 мм          | 2,99±0,10%                                                  |  |

Проводилось исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья. Изучалось влияние экстрагента на процесс экстракции (табл. 2). При этом спирт этиловый 70% концентрации был выбран в качестве оптимального экстрагента.

Таблица 2. Содержание суммы фенилпропаноидов в высушенных моринги листьях, %

| №п/п | Этанол, % | Содержание суммы фенилпропаноидов, % |
|------|-----------|--------------------------------------|
| 1.   | 40        | 3,01±0,11                            |
| 2.   | 70        | 3,07±0,07                            |
| 3.   | 95        | 2,67±0,08                            |

Результаты исследований по выбору оптимального соотношения «сырье-экстрагент» приведены в табл. 3. Оптимальными параметрами экстракции являются: извлечение 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье-экстрагент» – 1:200.

Таблица 3. Зависимость выхода БАС листьев моринги от соотношения «сырье-экстрагент»

| № п/п | Соотношение «сырье-экстрагент» | Содержание суммы фенилпропаноидов, % |
|-------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 1     | 1:25                           | 3,01±0,10                            |
| 2     | 1:50                           | 3,07±0,07                            |
| 3     | 1:100                          | 3,14±0,08                            |
| 4     | 1:200                          | 3,16±0,09                            |
| 5     | 1:300                          | 2,98±0,07                            |

Нами также изучен вопрос относительно продолжительности экстракции на кипящей водяной бане (табл.4).

Таблица 4. Зависимость выхода БАС листьев моринги от времени настаивания на кипящей водяной бане

| № п/п | Время настаивания на кипящей водяной бане | Содержание суммы фенилпропаноидов, % |
|-------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1     | 30 мин.                                   | 3,12±0,10                            |
| 3     | 60 мин.                                   | 3,16±0,09                            |
| 4     | 90 мин.                                   | 3,14±0,07                            |

Полученные результаты позволяют поставить листья моринги по содержанию фенилпропаноидов в один ряд с известными лекарственными растениями – источниками фенилпропаноидов.

Таблица 5. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в моринги листьях

| ЛРС            | F | $\bar{X}$ | $S^2$  | S       | P, % | t (P, f) | $\Delta \bar{X}$ | E, %    |
|----------------|---|-----------|--------|---------|------|----------|------------------|---------|
| Листья моринги | 5 | 3,18      | 0,0062 | 0,07874 | 95   | 2,776    | ±0,069           | ±3,07 % |

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в сырье моринги методом прямой спектрофотометрии указаны в таблице 5. Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что средняя ошибка определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более ±3,07 % при определении суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

## Заключение

Разработана методика количественного определения суммы фенилпропаноидов (прямая спектрофотометрия), определены параметры УФ-спектра водно-спиртового извлечения из листьев моринги, максимум при  $\lambda=330\pm 2$  нм и «плечо» при  $\lambda=290\pm 2$  нм.

Содержание суммы фенолпропаноидов в сырье, равное 3,18%, достигается применением подобранных условий экстракции: степень измельчения – 1 мм, экстрагент – 70% этанол, соотношение «сырье – экстрагент» 1:200 и экстракцией на кипящей водяной бане в течение 60 мин.

## Литература (references)

1. Андреева В.Ю., Калинкина Г.И., Ли В.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенолоксилов в надземной части зизифоры клиноподиевидной (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) // Химия растительного сырья. – 2019. – №3. – С. 161–168. [Andreeva V.Yu., Kalinkina G.I., Li V.V. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. Chemistry of vegetable raw materials. – 2019. – N3. – P. 161-168. (in Russian)]
2. Иванов В.В., Денисенко О.Н. Полифенольные соединения горца (рейноутрии) сахалинского // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10. – Т.2. – С. 374-377. [Ivanov V.V., Denisenko O.N. *Fundamental'nye issledovaniya*. Basic research. – 2013. – N10., V.2. – P. 374-377. (in Russian)]
3. Косман, В.М. Зенкевич И.Г. Количественное экстракционно-спектрофото-метрическое определение суммарного содержания фенолпропаноидов в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений // Растительные ресурсы. – 2001. – №4. – С. 123-129. [Kosman, V.M. Zenkevich, I.G. *Rastitel'nye resursy*. Plant resources. – 2001. – N4. – P. 123-129. (in Russian)]
4. Курдюков Е.Е., Водопьянова О.А., Митишев А.В. и др. Методика количественного определения суммы фенолпропаноидов в сырье стевии // Химия растительного сырья. – 2020. – №3. – С. 115–121. DOI: 10.14258/jcprm.2020037141. [Kurdyukov E. E., Vodopyanova O. A., Mitishev A.V., Moiseev Ya. P., Semenova E. F. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. Chemistry of vegetable raw materials. – 2020. – N3. – P. 115-121. (in Russian)]
5. Куркин В.А. Фенолпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность // Химия природных соединений. – 2003. – №2. – С. 87-110. [Kurkin V.A. *Himija prirodnih soedinenij*. Chemistry of natural compounds. – 2003. – N2. – P. 87-110. (in Russian)]
6. Куркин В.А., Авдеева Е.В. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенолпропаноиды // Фармация. – 2009. – №1. – Т.57. – С. 51-54. [Kurkin V.A., Avdeeva E.V. *Farmatsiya*. Pharmacy. 2009. – №1. – V.57. – P. 51-54. (in Russian)]
7. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация. Фармация. – 2004. – №52, Т.2. – С.39-41. [Samylina I.A., Balandina I.A. *Farmatsiya*. Pharmacy. – 2004. – №52. – P. 39-41. (in Russian)]
8. Самылина И.А., Куркин В.А., Яковлев Г.П. Научные основы разработки и стандартизации лекарственных растительных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – №1. – С. 41-44. [Samylina I.A., Kurkin V.A., Yakovlev G.P. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya*. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin. – 2016. – №1. – P. 41-44. (in Russian)]
9. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова, А.А. Мальцева, С.А. Каракозова – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. – 2012. – С. 76-77. [Korenskaya I.M., Ivanovskaya N.P., Izmailkova I.E., Maltseva A.A., Karakozova S.A. *Izdatel'sko-poligraficheskij centr Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*. Publishing and Printing Center of Voronezh State University. – 2012. – P. 77-76 (in Russian)]
10. Arabshahi-Delouee S., Aalami M.A., Urooj A., Krishnakantha T.P. Moringa oleifera leaves as an inhibitor of human platelet aggregation. *Pharmaceutical Biology*. – 2009. – N47. – V.8. – P. 734-739.
11. Ashok Kumar N., and Pari, L. Antioxidant action of Moringa oleifera Lam. (drumstick) against antitubercular drugs induced lipid peroxidation in rats. *Journal of Medicinal Food*. – 2003. – N6. – V3. – P. 255-259.
12. Fahey J.W. Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1 // *Trees for Life Journal*. – 2005. – N1. – P. 5.
13. Hussain S., Malik F., Mahmood S. Review: an exposition of medicinal preponderance of Moringa oleifera (Lank.) // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – N27. – V.2. – P. 397-403.
14. Kajihara R., Nakatsu S., Shiono T. et al. Antihypertensive effect of water extracts from leaves of Moringa oleifera Lam. on spontaneously hypertensive rats // *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. – 2008. – N55 – V.4. – P.183-185.
15. Mishra G., Singh P., Verma R. et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of Moringa oleifera plant: an overview // *Scholars Research Library*. – 2011. – N3 – V.2. – P. 141-64.

16. Ndhlala A.R., Mulaudzi R., Ncube B. et al. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars // *Molecules*. – 2014. – N19. – V.7. – P. 10480-10494.
17. Tsaknis J., Lalas, S., Gergis V. et al. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1999. – N47. – V.11. – P. 4495-4499.

### **Информация об авторах**

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

*Митишев Александр Владимирович* – старший преподаватель кафедры «Общая и клиническая фармакология». E-mail: smitishv@mail.ru

*Водопьянова Ольга Александровна* – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Общая и клиническая фармакология» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: ol.vodorjanova@yandex.ru

*Антропова Наталья Викторовна* – старший преподаватель кафедры «Английский язык» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: natali8-8@mail.ru

*Суханова Анна Вадимовна* – студентка ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.