

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2024.4.25 EDN: UMWAOS

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ГРЕЧИХИ КРАСНОСТЕБЕЛЬНОЙ (*FAGOPYRUM RUBRICAULIS*)© Митишев А.В.¹, Феднина А.С.¹, Родина О.П.¹, Елистратов Д.Г.², Макарецва М.Г.¹, Курдюков Е.Е.¹¹Пензенский государственный университет, Россия, 440026, Пенза, ул. Красная, 40²ООО «Парафарм», Россия, 198334, Санкт-Петербург, ул. Добровольцев, 62А*Резюме*

Цель. Разработать методики количественного определения суммы флаваноидов в траве гречихи красностебельной. Провести исследования по выбору оптимальных параметров экстрагирования сырья изучаемого растения с целью получения экстрактов с высоким содержанием биологически активных соединений.

Методика. Объектом исследования являлась трава гречихи красностебельной. В процессе извлечения были использованы различные экстрагенты (вода очищенная и этиловый спирт 40%, 70% и 95%). Подтверждение наличия флаваноидов в сырье проводили согласно ГФ XV. Для определения количественного содержания суммы флаваноидов применялся метод спектрофотометрии.

Результаты. Проведенные качественные реакции показали, что все экстракты гречихи красностебельной содержат флаваноиды. Было установлено, что в присутствии алюминия хлорида наблюдался bathochromный сдвиг электронного спектра поглощения экстрактов сырья с максимумом поглощения, аналогичным раствору СО рутин (410 нм). Поэтому, при проведении количественного определения суммы флаваноидов в экстрактах из гречихи красностебельной, в качестве стандартного образца нами был выбран рутин. При исследовании извлечения флаваноидов было обнаружено, что наиболее эффективным экстрагентом является этиловый спирт 40%. Затем были определены временные параметры экстракции, обнаружено, что в течение 30 минут происходит максимальное извлечение флаваноидов из сырья. В ходе статистической обработки данных пяти параллельных измерений выявлено, что содержание суммы флаваноидов, в пересчете на рутин, составляет 9,32-10,71%.

Заключение. Доказано наличие флаваноидов в траве гречихи красностебельной с использованием качественных реакций. Выявлено, что содержание флаваноидов в сырье, при использовании различных экстрагентов, варьируется в интервале от 1,72 до 10,71%. Установлены оптимальные условия (экстрагент – спирт этиловый 40%, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:25; время экстракции 30 минут) максимальной экстракции флаваноидов из травы гречихи красностебельной. Разработана методика количественного определения суммы флаваноидов в пересчете на рутин.

Ключевые слова: трава, *Fagopyrum rubricaulis*, гречиха красностебельная, спектрофотометрия, флаваноиды.

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN RED-STEMMED BUCKWHEAT GRASS (*FAGOPYRUM RUBRICAULIS*)Mitishev A.V.¹, Fednina A.S.¹, Rodina O.P.¹, Elistratov D.G.², Makartseva M.G.¹, Kurdyukov E.E.¹¹Penza State University, 40, Krasnaya St., 440026, Penza, Russia²LLC "Parafarm", 62A, Volontov St., 198334, St.-Petersburg, Russia*Abstract*

Objective. It is to develop methods of quantifying the amount of flavanoids in red-stemmed buckwheat grass. To make research for the selection of optimal parameters for the extraction of the ground part of

raw materials in order to obtain extracts with a high content of biologically active substances.

Methods. The object of the study is the red-stemmed buckwheat grass. Various extractants were used in the extraction process (purified water and ethyl alcohol 40%, 70% and 95%). Confirmation of the presence of flavonoids in the raw materials was carried out according to State Pharmacopoeia XV.

Results. Qualitative reactions have shown that all extracts of red-stem buckwheat contain flavonoids. It was found that aluminum chloride leads to a bathochromic shift in the electronic absorption spectrum of red-stem buckwheat extracts with an absorption maximum similar to a solution of SS rutin (410 nm). Therefore, we selected rutin as the standard sample. It was found that the most effective extractant is ethyl alcohol with a concentration of 40%. Also it was found that the maximum extraction of flavonoids from the raw material takes place within 30 minutes. After statistical processing of data from five parallel measurements, it was revealed that the content of the sum of flavonoids, in terms of rutin, is 9.32-10.71%.

Conclusion. The presence of flavonoids in red-stem buckwheat grass has been proven using qualitative reactions. It was revealed that the content of flavonoids in the raw materials of raw materials, when using various extractants, varies in the range from 1.72 to 10.71%. Optimal parameters have been established (extractant – ethyl alcohol 40%, the ratio of "raw material – extractant" is 1:25; extraction time is 30 minutes) for maximum extraction of flavonoids from the red-stemmed buckwheat herb. A method for quantifying the sum of flavonoids in terms of rutin has been developed.

Keywords: grass, *Fagopyrum rubricaulis*, red-stemmed buckwheat, spectrophotometry, flavonoids.

Введение

В последние десятилетия внимание исследователей сосредоточено на исследовании растений, которые проявляют высокую способность образования вторичных веществ, включая полифенольные соединения, в том числе флавоноиды. Флавоноиды представляют собой класс химических соединений, которые широко распространены в растениях. Многочисленные исследования, проведенные зарубежными и отечественными учеными, показывают, что флавоноиды обладают антимикробными, противовоспалительными, противоаллергическими, антикарциногенными и антигипертензивными эффектами [5, 8, 12].

Одним из перспективных растительных источников, способных накапливать данные соединения, является гречиха красностебельная (*Fagopyrum rubricaulis*) [4]. Согласно данным исследования Ф.Ф. Магафуровой и соавт. (2022), наибольшее содержание флавоноидов наблюдается в цветках и листьях, поэтому в качестве лекарственного сырья целесообразно заготавливать траву [3]. Основным флавоноидом сырья является рутин (витамин Р), содержание его в надземной части варьирует в пределах от 5,39% до 11,2%, в отличие от гречихи посевной (до 4,01%) [6]. В траве гречихи красностебельной также присутствуют кверцетин, изокверцетин, ориентин, витексин и другие [9]. Помимо флавоноидов в надземной части обнаружены фенолпропаноиды (хлорогеновая и кофейная кислоты) и фенолкарбоновые кислоты (протокатеховая, галловая) [10]. Плоды гречихи красностебельной характеризуются высоким содержанием белков, углеводов, жирных и органических кислот [7]. Также, следует отметить, что, согласно данным авторов Т. Sonam и соавт. (2023), сырье богато витаминами группы В и каротиноидами [11]. Минеральный состав представлен солями кальция, меди, железа, фосфора.

Несмотря на значительное количество исследований в области изучения флавоноидов растений, разработка метода количественного определения данных веществ является актуальным. Одним из наиболее простых, точных, быстрых и дешевых методов определения суммы флавоноидов является спектрофотометрия [2]. В связи со сложившейся ситуацией в стране и мире, поиск новых отечественных, экономически выгодных источников рутина и разработка методов количественного определения является перспективным направлением исследований.

Целью настоящего исследования является разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве гречихи красностебельной.

Методика

Материалом для исследования служила собранная в фазу массового цветения и начала плодоношения трава гречихи красностебельной собранная на территории Пензенской области в

Камешкирском районе в августе 2023 г. Траву гречихи красностебельной сушили в сушильных шкафах (ШС-80-02 СПУ) при температуре не выше 40°C, измельчение сырья проводили в лабораторных мельницах (ML-08B, Китай). Извлечение из травы гречихи красностебельной проводилось с помощью экстрагентов: вода и спирт этиловый различных концентраций 40%, 70% и 95%. Для подтверждения наличия флавоноидов были выполнены качественные реакции с экстрактами травы гречихи красностебельной. Экстракты были получены с помощью метода мацерации, в соотношении «сырье-экстрагент» 1:25, в течение 30 мин. при температуре 90°C. Основной специфической реакцией на флавоноиды, является цианидиновая проба: к 1 мл спиртового извлечения травы гречихи красностебельной добавляли порошок магния и концентрированной HCl, появление красного окрашивания свидетельствует о наличии флавоноидов. Реакция с гидроксидом натрия: 1 мл спиртового экстракта травы гречихи красностебельной растворяли в 1 мл 10% NaOH и добавляли несколько капель концентрированной HCl. На присутствие флавоноидов указывало появление желтого окрашивания. Реакция с хлоридом алюминия: к 1 мл спиртового извлечения травы гречихи красностебельной добавляли 2-3 капли 3% спиртового раствора хлорида алюминия, наблюдается реакция комплексообразования и появление желтого окрашивания с яркой зеленой флуоресценцией в УФ-лучах.

Количественное содержание суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-102 (ЗАО «НПКФ Аквилон», Россия). Для количественного определения суммы флавоноидов аналитическую навеску сырья, примерно 1 г травы гречихи красностебельной, помещали в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл и заливали 50 мл экстрагента. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на лабораторных весах, с точностью до 10 мг. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 30 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 мин., закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы колбы. Извлечения фильтровали через бумажный беззольный фильтр (красный). 2 мл извлечения (раствор А) количественно переносили в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл раствора алюминия хлорида 3% в спирте 95% и через 10 мин – 2 капли разведенной уксусной кислоты. Объем раствора доводили до метки экстрагентом и оставляли на 30 мин (раствор Б). В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный при тех же условиях, но без алюминия хлорида.

Приготовление раствора СО (Стандартный образец) рутина: 20 мг (точная навеска) рутина, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, взвешивали и растворяли при нагревании на водяной бане в 50 мл спирта 95%, охлаждали, взвешивали, недостающий объем раствора восполняли спиртом этиловым 95% и перемешивали (раствор А СО рутина). 2 мл раствора СО рутина (раствора) количественно переносили в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл спиртового раствора алюминия хлорида 2% и через 10 мин. – 1 каплю разведенной уксусной кислоты 30%. Объем раствора доводили до метки спиртом этиловым 95% и оставляли на 30 мин (раствор Б СО рутина). В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный при тех же условиях, но без алюминия хлорида.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X), вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где: А – оптическая плотность испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность раствора СО рутина; m₀ – масса СО рутина, г; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %. Валидация методики проведена в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV издания [1].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования, трава гречихи красностебельной подвергалась экстрагированию с использованием четырех различных растворителей. Все экстракты данного растения в своем составе содержали флавоноиды (табл. 1).

Известно, что реакции на флавоноиды основаны на образовании окрашенных комплексных соединений. В качестве основной специфической реакции на флавоноиды использовалась цианидиновая проба. При добавлении порошка магния и концентрированной соляной кислоты к

экстрактам травы гречихи красностебельной, появлялось красное окрашивание, свидетельствующее о наличии флавоноидов. При добавлении гидроксида натрия к экстрактам исследуемого растения наблюдали появление желтого окрашивания. В реакции с хлоридом алюминия: наблюдалась реакция комплексообразования и появление желтого окрашивания с яркой зеленой флуоресценцией в УФ-лучах. Таким образом, все тесты дали положительные результаты, следовательно, все экстракты гречихи красностебельной содержат флавоноиды.

Таблица 1. Результаты качественных реакций на флавоноиды с экстрактами из травы гречихи

Экстракт	Проба Шинода Mg + HCl	NaOH	AlCl ₃
Вода	+	+	+
Спирт этиловый 40%	+++	+++	+++
Спирт этиловый 70%	++	++	++
Спирт этиловый 95%	++	++	++

Примечание: высокая интенсивность окраски (+++), Умеренная интенсивность окраски (++) , Низкая интенсивность окраски (+) и отсутствие (-)

Так как на сегодняшний день состав фенольных соединений травы гречихи красностебельной недостаточно изучен, при разработке методов определяли сумму веществ (флавоноидов) в полученных экстрактах. Разработку методики количественного определения флавоноидов в сырье травы гречихи красностебельной проводили в несколько этапов.

На первом этапе было показано, что спектры поглощения извлечений исследуемого растения имеют максимумы поглощения спектральных кривых при 352 нм, характерных для веществ флавоноидной природы. Следует отметить, что при использовании различных экстрагентов, данные параметры были неизменны. Было установлено, что в присутствии алюминия хлорида наблюдался bathochromный сдвиг электронного спектра поглощения экстрактов травы гречихи красностебельной с максимумом поглощения, аналогичным раствору СО рутин (410 нм) (рис. 1). Поэтому, при проведении количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах из травы гречихи красностебельной, в качестве стандартного образца нами был выбран рутин.

Следующим этапом было проведение эксперимента по определению оптимального экстрагента. При проведении исследования о выделении флавоноидов, было обнаружено, что наиболее полное извлечение данных соединений наблюдалось при использовании этилового спирта с концентрацией 40%. На третьем этапе было определено оптимальное соотношение «сырье-экстрагент» (1:25). Затем были определены временные параметры экстракции, обнаружено, что в течение 30 минут происходит максимальное извлечение флавоноидов из сырья (табл. 2).

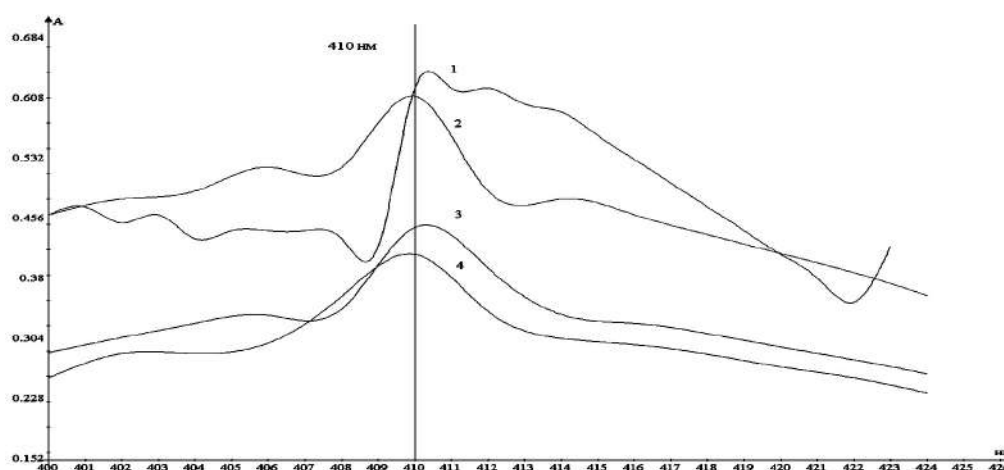


Рис. 1. Спектры поглощения извлечений с добавлением алюминия хлорида (1 – спиртовой раствор рутина; 2 – 40% спиртовое извлечение; 3 – 70% спиртовое извлечение; 4 – 95% спиртовое извлечение)

В ходе статистической обработки данных пяти параллельных измерений выявлено, что содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, составляет 9,32-10,71%. Прецизионность методики (уровень повторяемости) оценивали путем анализа исследуемого образца гречихи красностебельной в 5-кратной повторности (табл. 3).

Таблица 2. Оптимальные показатели экстрагирования суммы флавоноидов из надземной части гречихи красностебельной

Экстрагент	Соотношение «сырье: экстрагент»	Время экстракции, мин	Степень измельчения, мм	Значение оптической плотности, D	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Степень измельчения					
Спирт этиловый 40%	1:25	30	1	0,38	4,95±0,09
Спирт этиловый 40%	1:25	30	2	0,43	5,78±0,10
Спирт этиловый 40%	1:25	30	5	0,31	4,25±0,13
Тип экстрагента					
Вода	1:25	60	2	0,18	1,72±0,01
Спирт этиловый 40%	1:25	60	2	0,61	7,82±0,35
Спирт этиловый 70%	1:25	60	2	0,45	5,71±0,23
Спирт этиловый 95%	1:25	60	2	0,41	5,26±0,31
Время экстракции					
Спирт этиловый 40%	1:25	30	2	0,84	10,71±0,10
Спирт этиловый 40%	1:25	60	2	0,72	9,23±0,25
Спирт этиловый 40%	1:25	90	2	0,75	9,61±0,12
Спирт этиловый 40%	1:25	120	2	0,76	9,67±0,11
Сырье: экстрагент					
Спирт этиловый 40%	1:25	30	2	0,73	9,29±0,32
Спирт этиловый 40%	1:50	30	2	0,49	6,22±0,28
Спирт этиловый 40%	1:100	30	2	0,19	2,44±0,33

Таблица 3. Результаты оценки прецизионности методики количественного определения суммы флавоноидов в надземной части гречихи красностебельной

Метрологические характеристики							
f	X, %	S ²	S	P, %	t (табл.)	ΔX, %	ε, %
5	0,56	0,00017	0,0131	95	2,776	0,079	2,9

Для оценки внутрилабораторной прецизионности количественный анализ спиртового экстракта проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования пятикратно (табл. 4). Выявлено, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более 7,06% при определении суммы флавоноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на рутин. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны и различия между полученными значениями являются случайными.

Таблица 4. Валидационная оценка внутрилабораторной прецизионности методики определения суммы флавоноидов в надземной части гречихи красностебельной

Аналитик 1		Аналитик 2		Метрологические характеристики	
X, %		X, %		Аналитик 1	Аналитик 2
10,02		9,77		X, % = 9,89	X, % = 9,79
10,17		10,52		S ² = 0,2317	S ² = 0,1990
9,1		9,81		S = 0,4814	S = 0,4461
9,82		9,47		ΔX, % = 0,5977	ΔX, % = 0,5539
10,34		9,39		ε, % = 6,04	ε, % = 5,66

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки разработанной нами методики и позволяют предложить ее для количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве гречихи красностебельной в пересчете на рутин.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных качественных реакций, было доказано наличие флавоноидов в экстрактах травы гречихи красностебельной. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах исследуемого растения методом спектрофотометрии, с использованием стандартного образца рутина при аналитической длине волны 410 нм. Определено содержание флавоноидов в пересчете на рутин, в водных и водно-спиртовых экстрактах травы гречихи красностебельной, которое варьировало от 1,72-10,71%. Установлены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из травы гречихи красностебельной: экстрагент-спирт этиловый 40%, соотношение «сырье-экстрагент» 1:25 и продолжительность 30 мин. при температуре 90°C.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям прецизионность (уровень повторяемости), внутрилабораторная прецизионность, правильность в соответствии с ГФ РФ XV издания [1]. На основе результатов валидационной оценки эксперимента можно сделать вывод о возможности использования данной методики для количественного определения содержания флавоноидов в пересчете на рутин, в сырье гречихи красностебельной. Полученные результаты имеют важное значение для дальнейших исследований гречихи красностебельной в качестве потенциального источника биологически активных соединений.

Литература (references)

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации XV издания. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15> [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XV izdaniya. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15> (in Russian)]
2. Лабковская М.В., Куркин В.А., Шмыгарева А.А. и др. Разработка методики количественного определения травы астрагала перепончатого *Astragalus membranaceus* L. // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2022. – Т.21, №4. – С. 225-229. [Labkovskaja M.V., Kurkin V.A., Shmygareva A.A. i dr. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2022. – V.21, N4. – P. 225-229. (in Russian)]
3. Магафурова Ф.Ф., Хуснутдинов В.В. Предварительные результаты селекции на повышение урожайности у гибридных комбинаций гречихи с высоким содержанием рутина // Вестник КрасГАУ. – 2022. – №9. – С. 27-32. [Magafurova F.F., Husnutdinov V.V. *Vestnik KrasGAU*. Bulletin of KrasSAU. – 2022. – N9. – P. 27-32. (in Russian)]
4. Феднина А.С., Макарецва 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. 3-11. – DOI 10.29296/25877313-2023-09-00. [Fednina A.S., Makarceva M.G., Kurdyukov E.E. i dr. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry – 2023. – V.26, N9. – P. 3-11. (in Russian)]
5. Bao T., Wang Y., Sun C., et al. Optimization of flavonoids extraction from Tartary buckwheat rice and analysis of its hypoglycemic activity // Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering. – 2016. V.32, N2. – P. 383-389.
6. Borovaya S.A., Klykov A.G. Some aspects of flavonoid biosynthesis and accumulation in buckwheat plants // Plant Biotechnol. Rep. – 2020. – V.14. – P. 213-225.
7. Hacı 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.
8. He Wei-Ping, Li Jin-Cheng, Wang Gao-Ming. Effect of total flavonoids of buckwheat flower and leaf on myocardial cell apoptosis and Wnt/ β -catenin/PPAR γ pathway in arrhythmic rats // China journal of Chinese materia medica. – 2023. – N48. – P. 220-225.

9. Li J., Yang P., Yang Q., et al. Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using UPLC-ESI-MS/MS // *Molecules*. – 2019. – V.24. – P. 1310.
10. Rui J., Hua-Qiang L., Chang-Ling H. et al. Phytochemical and Pharmacological Profiles of Three *Fagopyrum* Buckwheats // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – V.17. – P. 589.
11. Sonam T., Talat A., Sanjay S. An incisive review on Buckwheat – A potential underutilized millet // *Journal of Drug Research in Ayurvedic Sciences*. – 2023. – V.8. – P. 64-75.
12. Zhong L., Yuji L., Can W. et al. Chemical Profile, Antimicrobial and Antioxidant Activity Assessment of the Crude Extract and Its Main Flavonoids from Tartary Buckwheat Sprouts // *Molecules*. – 2022. – N27. – P. 374.

Информация об авторах

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

Феднина Анастасия Сергеевна – студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: fedninaa@mail.ru

Родина Олеся Петровна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Общая и клиническая фармакология» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет». E-mail: rodina.olesya2010@yandex.ru

Елистратов Дмитрий Геннадьевич – директор ООО «Парафарм». E-mail: DGE117@mail.ru

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2024

Принята к печати 12.12.2024