

УДК 615.07

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2020.60.61.006>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФЛАВОНОВ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ ТРАВЫ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ

**Т.Ш. Нгуен**, аспирант кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет», [nguyenthisen1992@gmail.com](mailto:nguyenthisen1992@gmail.com)

**Г.М. Алексеева**, канд. хим. наук, доцент, зав. кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет», [galina.alexeeva@pharminnotech.com](mailto:galina.alexeeva@pharminnotech.com)

**Ю.Э. Генералова**, химик-аналитик испытательной лаборатории (центра контроля качества лекарственных средств) ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет», [generalova@anchet.pro](mailto:generalova@anchet.pro)

**И.Е. Каухова**, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет», [irina.kaukhova@pharminnotech.com](mailto:irina.kaukhova@pharminnotech.com)

**В.В. Сорокин**, канд. фарм. наук, доцент, зав. кафедрой процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет», [spcra@outlook.com](mailto:spcra@outlook.com)

Клевер луговой, также известный как красный клевер (*Trifolium pratense* L.), является природным источником фитоэстрогенных изофлавоноидов. Цель исследования – изучение качественного и количественного определения индивидуальных изофлавонов в сухом экстракте травы клевера лугового методом ВЭЖХ с целью расширения спектра лекарственных препаратов на основе данной фитосубстанции. В сухом экстракте травы клевера лугового были идентифицированы дайдзеин, генистеин, формонетин, прунетин и биоханин А, определено их содержание  $0,36 \pm 0,01\%$ ,  $0,84 \pm 0,01\%$ ,  $3,02 \pm 0,05\%$ ,  $0,22 \pm 0,01\%$  и  $1,62 \pm 0,03\%$  соответственно. Установленное значительное содержание в сухом экстракте формонетина и биоханина А позволяет рассматривать сухой экстракт клевера лугового как перспективную субстанцию для разработки лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** изофлавоны, сухой экстракт, трава клевера лугового, ВЭЖХ, идентификация, количественное определение

Флавоноиды – один из широко распространенных классов полифенольных веществ в природе. Многочисленные исследования показывают, что препараты, созданные на основе флавоноидов, являются высокоэффективными противоопухолевыми средствами, обладают антиоксидантными свойствами, снижают риск заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Особый интерес в качестве источников соединений флавоноидов представляют растения родов клевера (*Trifolium* L.), которые относятся к семейству бобовых (Fabaceae). В частности – представители видов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), богатые флавоноидами и изофлавоноидами различных групп [1].

В связи с вышеизложенным актуальным является изучение качественного и количественного определения отдельных изофлавонов в сухом экстракте травы клевера лугового методом ВЭЖХ с целью расширения спектра лекарственных средств на основе данной фитосубстанции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения сухого экстракта использовалась трава клевера лугового фирмы ООО «Компания Хорст», Барнаул, приобретенная в аптечной сети.

Технология получения сухого экстракта травы клевера лугового была разработана ранее [2]. Определение содержания отдельных веществ групп изофлавонов проводили на базе кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО СПХФУ методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе HPLC Shimadzu SCL – 10A (Япония), программное обеспечение – «МультиХром» для Windows.

Хроматографические условия: колонка Selectra C18 (250×4,6 мм), заполненная частицами сорбента 5 мкм; подвижная фаза А – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, подвижная фаза В – ацетонитрил; режим градиентного элюирования: линейное изменение подвижной фазы В от 20% до 70% в течение 40 минут. Скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Детектирование проводили с помощью УФ-детектора при длине волны 270 нм. Температура колонки составляла 40°C.

Идентификацию отдельных веществ проводили путем сопоставления времен удерживания пиков, полученных на хроматограммах испытуемых и стандартных растворов. Содержание изофлавонов определили по методу стандарта.

В исследованиях использовали стандартные растворы дайдзеин (CAS №486-66-8, 97,8%, HWI group), генистеин (CAS №446-72-0, 99%, SIAL), формонетин (CAS №485-72-3, 98,6%, Sigma-Aldrich), прунетин (CAS №552-59-0, 98,2%, Sigma), биоханин А (CAS №491-80-5, 97,4%, Sigma).

Исходные стандартные растворы изофлавонов готовили в 80% спирте этиловом. Взвешивали по 0,005 г (точная навеска) стандартных образцов дайдзеина, генистеина,

формонетина, прунетина и биоханина А, помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки 80% спиртом этиловым, растворы перемешивали. При этом получены растворы с содержанием стандартных веществ 0,001 г/мл (исходные растворы).

Стандартные растворы изофлавонов готовили непосредственно перед анализом путем разбавления исходных растворов 80% спиртом этиловым до концентраций 0,0002 г/мл и хранили в течение исследования в темном месте при 4°C.

*Подготовка пробы испытуемого образца.* 0,125 г сухого экстракта (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл 40% спирта этилового, помещали в ультразвуковую баню при 35°C на 10 мин. Затем доводили объем раствора до метки 40% спиртом этиловым, перемешивали и фильтровали (раствор А). Из раствора А переносили 5 мл в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки 40% спиртом этиловым и тщательно перемешивали (испытуемый раствор).

Растворы пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и записывали хроматограммы.

Содержание индивидуальных изофлавонов в сухом экстракте в пересчете на стандарт в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C_{CT} \times S_x \times 25 \times 25 \times P \times 100}{5 \times m \times S_{CT} \times (100 - W)},$$

где  $C_{CT}$  – концентрация стандарта, г/мл;

$S_{CT}$  – площадь пика стандарта, мV/c;

$S_x$  – площадь пика вещества в сухом экстракте, мV/c;

P – содержание вещества в стандартном образце, %;

m – масса сухого экстракта, г;

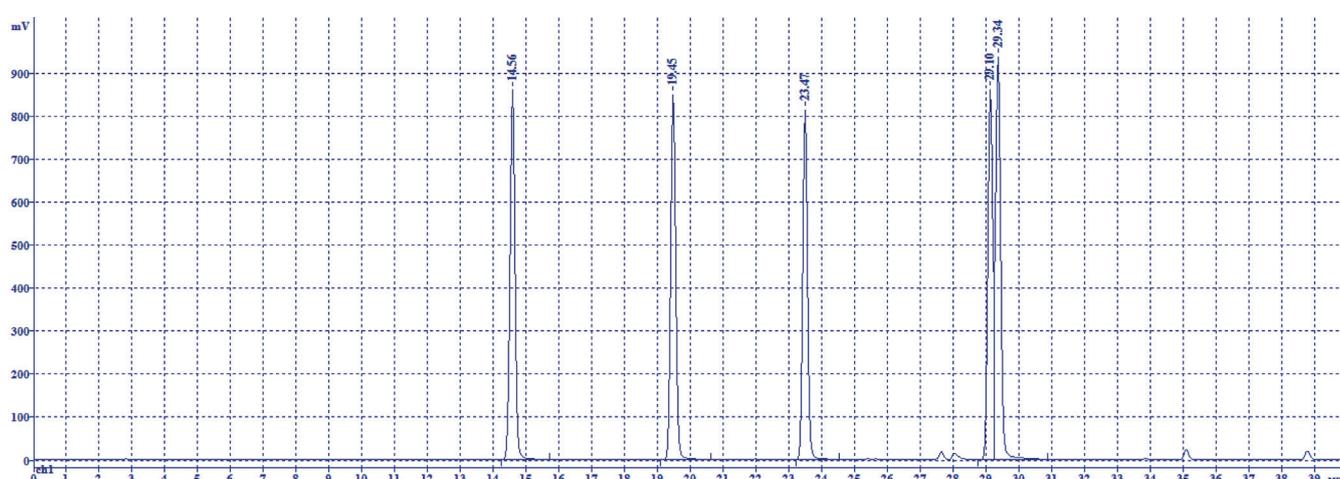
W – потеря в массе при высушивании сухого экстракта, %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

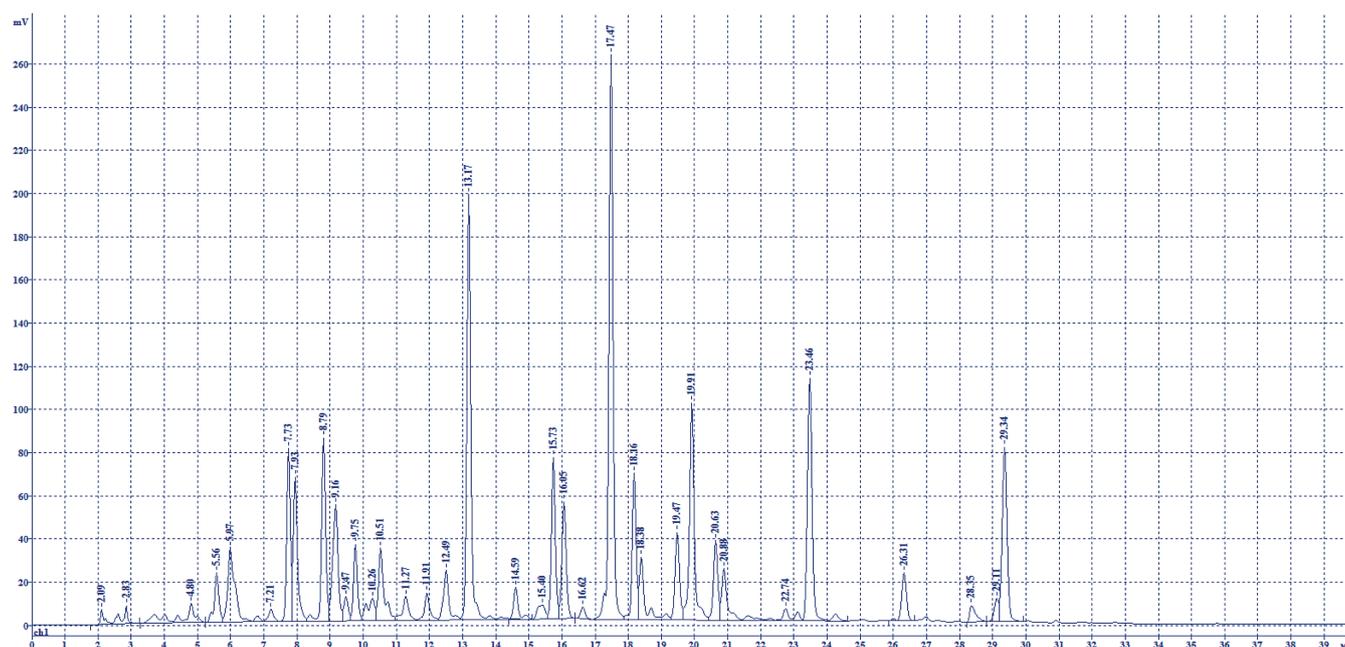
Предложенная методика ВЭЖХ была применена для идентификации и количественного определения пяти изофлавонов в сухом экстракте травы клевера лугового. На рис. 1 и 2 приведены типичные хроматограммы стандартных образцов изофлавонов, а в таблице – результаты их идентификации и определения.

Время удерживания стандартных образцов дайдзеина, генистеина, формонетина,

прунетина и биоханина А в условном анализе составляло 14,56 мин., 19,45 мин., 23,47 мин., 29,10 мин. и 29,34 мин. соответственно (рис. 1). На основании времени удерживания стандартных образцов в исследуемом образце сухого экстракта клевера лугового были идентифицированы: дайдзеин (14,59 мин.), генистеин (19,47 мин.), формонетин (23,46 мин.), прунетин (29,11 мин.) и биоханин А (29,34 мин.) (рис. 2). В результате проведенного исследования определено содержание индивидуальных



**РИС. 1.** Хроматограмма смеси стандартных образцов дайдзеина (0,0002 г/мл), генистеина (0,0002 г/мл), формонетина (0,0002 г/мл), прунетина (0,0002 г/мл) и биоханина А (0,0002 г/мл)



**РИС. 2.** Хроматограмма ВЭЖХ сухого экстракта травы лугового клевера

изофлавонов в сухом экстракте клевера лугового, которое составляло: дайдзеина (0,36±0,01%), генистеина (0,84±0,01%), формонетина (3,02±0,05%), прунетина (0,22±0,01%) и биоханина А (1,62±0,03%) (см. табл.). Предложенная методика воспроизводима, полученные результаты достоверны, приведены метрологические характеристики.

В научных исследованиях установлено, что биоханин А обладает значительным гиполипидемическим эффектом [3]. Показано,

что в клеточной культуре млекопитающих биоханин А уменьшал количество связывания [3Н] бензопирена с ДНК на 37–50% в дозе 25 мкг/мл уменьшал метаболизм [3Н] бензопирена на 54% по сравнению с контрольными культурами [4]. Биоханин А обладает кардиопротекторной, противоопухолевой активностью, антиоксидантными свойствами и противовоспалительным действием [5].

Формонетин обладает потенциальным противораковым действием *in vitro* и *in vivo*.

Таблица

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ИЗОФЛАВОНОВ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ, N=3, F=2, P=95%, T (P, F)=4,30**

№	Наименование вещества	$t_{CT}$ мин.	$t_x$ мин.	$S_{CT}$ mV/c	$S_x$ mV/c	Содержание вещества в сухом экстракте, %	Метрологическая характеристика результатов
1	Дайдзеин	14,56	14,59	9197,614	145,397 149,710 140,837	0,3505 0,3601 0,3601 $\bar{X} = 0,36 \pm 0,01$	$S^2 = 0,000031$ $S = 0,0055$ $S\bar{X} = 0,0032$ $\epsilon, \% = 2,8$
2	Генистеин	19,45	19,47	9153,454	388,630 387,539 380,939	0,8506 0,8462 0,8353 $\bar{X} = 0,84 \pm 0,01$	$S^2 = 0,00015$ $S = 0,012$ $S\bar{X} = 0,0069$ $\epsilon, \% = 1,19$
3	Формонетин	23,47	23,46	8210,147	1145,592 1172,919 1135,778	3,0074 3,0716 2,9863 $\bar{X} = 3,02 \pm 0,05$	$S^2 = 0,0017$ $S = 0,041$ $S\bar{X} = 0,024$ $\epsilon, \% = 1,7$
4	Прунетин	29,10	29,11	8878,792	92,041 95,113 87,596	0,2266 0,2335 0,2123 $\bar{X} = 0,22 \pm 0,01$	$S^2 = 0,00014$ $S = 0,012$ $S = 0,0069$ $\epsilon, \% = 4,6$
5	Биоханин А	29,34	29,34	10426,282	835,150 833,634 806,617	1,6422 1,6353 1,5875 $\bar{X} = 1,62 \pm 0,03$	$S^2 = 0,0012$ $S = 0,035$ $S\bar{X} = 0,020$ $\epsilon, \% = 1,85$

Примечания:  $t_x$  – время удерживания вещества в сухом экстракте, мин.;  $t_{CT}$  – время удерживания стандарта, мин.;  $S_{CT}$  – площадь пика стандарта, mV/сек.;  $S_x$  – площадь пика вещества в сухом экстракте, mV/сек.

При использовании формонетина в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами, такими как бортезомиб, LY2940002, U0126, сунитиниб, эпирубицин, доксорубин, темозоломид и метформин, усиливается противораковый потенциал как формонетина, так и соответствующих лекарств благодаря синергетическому эффекту [6]. Было продемонстрировано нейропротекторное действие формонетина у пациентов с болезнью Альцгеймера как в исследованиях *in vivo*, так и *in vitro* [7]. Кроме того, показано, что формонетин проявляет вазорелаксантную, антиапоптотическую, кардиопротекторную, пролиферативную антиоксидантную, антимикробную и противовоспалительную активности [8].

## ВЫВОДЫ

В сухом экстракте клевера лугового методом ВЭЖХ было обнаружено пять соединений изофлавонов – дайдзеин, генистеин, формонетин, прунетин, биоханин А. Установлено, что наибольшее содержание характерно для изофлавонов – формонетин ( $3,02 \pm 0,05\%$ ) и биоханин А ( $1,62 \pm 0,03\%$ ), что позволяет рассматривать сухой экстракт травы клевера лугового как перспективную субстанцию для разработки лекарственных препаратов.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kucükboyacı N., Ilginer Ö., Torul H., Tamer U., Adigüzel N., Bani B., Köroğlu A. Quantitative determination of isoflavones by HPLC-UV method and antioxidant activity of *Trifolium longidentatum* // *Turk.J. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 11. – №2. – P. 185–194.
2. Нгуен Т.Ш., Каухова И.Е., Сорокин В.В. Оптимизация процесса экстрагирования флавоноидов и изофлавоноидов из травы клевера лугового // Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 22–23 апреля 2019 г. – СПб: Изд-во СПХФУ, 2019. – С. 245–248.
3. Xue Z., Zhang Q., Yu W., Wen H., Hou X., Li D., Kou X. Potential Lipid-Lowering Mechanisms of Biochanin A // *Journal of agricultural and food chemistry.* – 2017. – Vol. 65. – №19. – P. 3842–3850.
4. Cassady J.M., Zennie T.M., Chae Y.H., Ferin M.A., Portuondo N.E., Baird W.M. Use of a mammalian cell culture benzopyrene metabolism assay for the detection of potential anticarcinogens from natural products: inhibition of metabolism by biochanin A, an isoflavone from *Trifolium pratense* L. // *Cancer research.* – 1988. – Vol. 48. – №22. – P. 6257–6261.
5. Sundaresan A., Radhiga T., Deivasigamani B. Biological Activity of Biochanin A: A Review // *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2018. – Vol. 4. – №1. – P. 1–5.
6. Tay K.C., Tan L.T. H., Chan C.K., Hong S.L., Chan K.G., Yap W.H., Pusparajah P., Lee L.H., Goh B.H. Formononetin: A review of its anticancer potentials and mechanisms // *Frontiers in pharmacology.* – 2019. – Vol. 10. – Article 820.
7. Xiao H., Qin X., Wan J., Li R. Pharmacological Targets and the Biological Mechanisms of Formononetin for Alzheimer's Disease: A Network Analysis // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* – 2019. – Vol. 25. – P. 4273–4277.
8. Jiang D., Rasul A., Batool R., Sarfraz I., Husain G., Mateen Tahir M., Quin T., Selamoglu Z., Ali M., Li J., Li X. Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Formononetin // *BioMed research international.* – 2019. – Vol. 2019. – 11 p.

## DETERMINATION OF ISOFLAVONE CONTENT BY HPLC IN DRIED EXTRACT OF TRIFOLIUM PRATENSE L.

**Thi Sen Nguyen, G.M. Alekseeva, Yu.E. Generalova, I.E. Kaukhova, V.V. Sorokin**  
*Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia*

*Clover meadow, also known as red clover (*Trifolium pratense* L.), is a natural source of phytoestrogenic isoflavonoids. The purpose of the study – to study the qualitative and quantitative content of individual isoflavones in the dried extract of red clover grass by HPLC in order to expand the range of medicines based on this phytosubstance. In the dried extract of red clover grass, daidzein, genistein, formononetin, prunetin and biochanin A were identified, their content was determined  $0.36\pm 0.01$ ,  $0.84\pm 0.01$ ,  $3.02\pm 0.05$ ,  $0.22\pm 0.01$  and  $1.62\pm 0.03\%$  respectively. The established significant content in the dried extract of formononetin and biochanin A allows us to consider the dried extract of red clover grass as a promising substance for the development of medicines.*

**Keywords:** isoflavone content, dried extract, red clover grass (*Trifolium pratense* L.), HPLC, identification, quantitative determination