Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 210–219.
Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2026, no. 3, pp. 210–219.
DOI: 10.14258/jcprm.20260317311

УДК 615.322 (571.15)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ И ИЗОФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ И ЦВЕТКАХ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В АЛТАЙСКОМ КРАЕ

© ***Т.Н. Пензина, Л.Е. Кудрикова*, М.А. Биндюк, К.С. Лоор***

Алтайский государственный медицинский университет, пр. Ленина, 40, Барнаул, 656038, Россия, lek212@mail.ru

В официальной медицине используется трава клевера лугового. Известно, что основными действующими веществами клевера являются флавоноиды и изофлавоноиды. Анализ литературы показал, что разработаны методики, позволяющие индивидуально определять флавоноиды и изофлавоноиды при совместном присутствии. Цель работы – апробировать методику селективного количественного определения флавоноидов и изофлавоноидов в надземной части клевера лугового.

Исследованию подвергали водно-спиртовые извлечения травы и цветков клевера лугового, произрастающего на территории Алтайского края. При использовании ВЭЖХ было установлено, что в извлечениях содержатся флавоноиды – преимущественно монозиды кверцетина, кемпферола, изорамнетина и изофлавоноиды – гликозиды формононетина и биоханина А. Количественное содержание флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии, основанном на образовании комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом. Изофлавоноиды определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 260 нм. Анализ спектральных характеристик веществ, входящих в состав извлечений, показал, что при 260 нм поглощают также и флавоноиды (например, гиперозид имеет три максимума поглощения, один из которых находится при 260±2 нм). Чтобы избежать ошибки при определении изофлавоноидов, вначале определяли содержание флавоноидов и рассчитывали их вклад в оптическую плотность при длине волны 260 нм, который затем вычитали из общей оптической плотности. В результате содержание флавоноидов в траве и цветках клевера лугового составило 0.98±0.02 и 1.59±0.05% соответственно, содержание изофлавоноидов в траве – 4.25±0.14%, в цветках – 3.19±0.14%. Относительная погрешность методики не превышает 4.41%, что позволяет рекомендовать ее к дальнейшей разработке и использованию.

Ключевые слова: клевер луговой, *Trifolium pratense*, флавоноиды, изофлавоноиды, спектрофотометрия, ВЭЖХ, количественное определение.

Для цитирования: Пензина Т.Н., Кудрикова Л.Е., Биндюк М.А., Лоор К.С. Определение флавоноидов и изофлавоноидов в траве и цветках клевера лугового, произрастающего в Алтайском крае // Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 210–219. https://doi.org/10.14258/jcprm.20260317311.

Введение

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) из семейства бобовых (*Fabaceae*) – вполне обычное растение для Алтайского края, встречается на территории всех районов [1]. Клевер растет на суходольных и умеренно влажных лугах, опушках, полянах, по обочинам дорог, окраинам полей [1, 2].

Клевер луговой – ценное кормовое растение и медонос. Издавна цветки и траву клевера лугового (в виде настоя и отвара) используют в народной медицине как отхаркивающее, мочегонное и антисептическое средство, отвар корней – при воспалении яичников и как противоопухолевое средство [2, 3]. Свежие листья и соцветия используют наружно как ранозаживляющее, гемостатическое средство при заболеваниях кожи, ожогах, язвах [2, 4]. Заслуживает особого внимания применение клевера в коррекции климактерического синдрома в качестве эстрогеноподобного средства [5–7]. В последнее время наблюдается большой интерес к клеверу как к ценному источнику биоактивных соединений, используемых для разработки БАД к пище [8–10].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Официнальным лекарственным сырьем является клевера лугового трава [11]. Известно, что трава клевера лугового оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, отхаркивающее, мочегонное, потогонное, антиатеросклеротическое, гипотензивное, антиаритмическое, эстрогеноподобное, антибактериальное действие [3, 10, 12–15]. Трава клевера содержит богатый комплекс биологически активных веществ (БАВ): флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и их производные, кумарины, сапонины, витамины С, В, Е, К, каротиноиды, дубильные вещества, жирное масло, эфирное масло, высшие жирные кислоты, микроэлементы [2, 12, 15–17].

Учитывая, что флавоноиды играют существенную роль в фармакологических свойствах травы клевера лугового, стандартизацию сырья целесообразно проводить по содержанию флавоноидов. Наиболее распространенными методами анализа БАВ клевера лугового являются спектрофотометрические и хроматографические методы [11, 18–20]. Метод ВЭЖХ используется для идентификации и определения количественного содержания индивидуальных веществ в сравнении со стандартными веществами. Поскольку фармакотерапевтическая ценность растительного сырья связана не с одним активным веществом, а с группой соединений, нормировать качество сырья следует по группе БАВ [21]. Но ВЭЖХ не позволяет определить количественное содержание какой-либо группы БАВ из-за большого разнообразия действующих веществ растительного сырья и, следовательно, необходимости использовать широкий набор дорогостоящих стандартных веществ. Спектрофотометрический метод анализа позволяет решить проблему определения количественного содержания групп БАВ.

Большинство существующих методик определения содержания групп БАВ (например, флавоноидов) в растительных объектах не учитывают влияние других групп веществ на результаты количественного определения [22–24]. Анализ литературных данных показал, что разработаны методики, позволяющие более точно определять содержание группы БАВ в растительном сырье с учетом влияния другой группы веществ на результаты анализа [21].

Цель работы – апробировать методику спектрофотометрического селективного определения флавоноидов и изофлавоноидов при их совместном присутствии в траве и цветках клевера лугового.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали траву и цветки *Trifolium pratense* L. (syn.: *Trifolium borysthenicum* Gruner, *T. bracteatum* Schousb., *T. lenkoranicum* (Grossh.) Roskov, *T. pratense* var. *lenkoranicum* Grossh., *T. ukrainicum* Opperman [25]), которые заготавливали в фазу цветения в Калманском районе Алтайского края в июле-августе 2023 года и сушили воздушно-теневым способом.

Готовили водно-спиртовые экстракты травы и цветков клевера лугового в соотношении 1 : 100 и их исследовали. Экстракцию проводили с помощью спирта этилового 40%, так как предварительными опытами было установлено, что данный экстрагент позволяет максимально извлекать сумму БАВ надземной части клевера. Извлекали БАВ из травы и цветков трехкратно при нагревании на водяной бане по методике, описанной Е.А. Антиповой с соавт. [26], используя в качестве экстрагента спирт этиловый 40% (раствор А).

Для более глубокого изучения состава фенольных соединений клевера лугового, а также для выбора стандартов для расчета количественного содержания БАВ проводили кислотный гидролиз полученных извлечений по методике: по 10 мл полученных водно-спиртовых извлечений (раствор А) помещали в конические колбы, прибавляли по 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1.5 ч. После охлаждения гидролизаты экстрагировали диэтиловым эфиром трижды по 20 мл. Эфирные фракции объединяли и упаривали досуха на водяной бане при температуре 40 °С, сухие остатки растворяли в 5 мл спирта этилового 96%. Кислую водную фазу после извлечения эфиром нейтрализовали гидрокарбонатом натрия до pH 5–7, фильтровали и также использовали для исследования.

Качественный состав водно-спиртовых извлечений и продуктов гидролиза исследовали методом ВЭЖХ с помощью микроколоночного жидкостного хроматографа «МилиХром А-02» («ЭкоНова», Новосибирск, Россия) с хроматографической колонкой 2.0×75 мм и сорбентом NucleoSIL-120-5-C18, размер частиц 5 мкм, элюент А – раствор трифторуксусной кислоты 0.01%, элюент Б – ацетонитрил. Осуществляли градиентное элюирование (Б: 5–63% за 35 мин), скорость подачи элюента – 100 мкл/мин, объем анализируемой пробы – 2 мкл, детектор – многолучевой спектрофотометр. Регистрацию веществ на хроматограммах проводили при длинах волн 220, 254, 268, 300, 324, 360 нм, запись УФ-спектров выполняли в режиме остановки потока элюента. Идентифицировали вещества по временам удерживания (t_R) и УФ-спектрам поглощения,

определяя длину волны в максимумах поглощения (λ_{max}), результаты сравнивали с соответствующими показателями стандартных образцов «Sigma-Aldrich».

Количественное определение флавоноидов и изофлавоноидов выполняли с помощью спектрофотометра «Shimadzu UV-1240 mini» (Япония).

Определение флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии по следующей методике: 2 мл извлечений из травы и цветков клевера лугового (раствор А) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 0.2 мл уксусной кислоты разведенной, 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 96% и доводили объем спиртом этиловым 96% до метки (раствор Б), оставляли на 40 мин при комнатной температуре для образования комплекса. Затем измеряли оптическую плотность раствора Б с помощью спектрофотометра в максимуме поглощения при длине волны 410±5 нм в 1-см кварцевой кювете. Раствором сравнения служил раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0.2 мл уксусной кислоты разведенной, доведенный спиртом этиловым 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Количественное содержание суммы флавоноидов определяли в пересчете на гиперозид, используя удельный коэффициент поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380 [27].

Количественное содержание суммы изофлавоноидов определяли спектрофотометрическим методом, основанном на собственном поглощении УФ света веществами: 1 мл раствора А разбавляли спиртом этиловым 96% до объема 25 мл в мерной колбе и перемешивали (раствор В). Оптическую плотность полученного раствора измеряли в максимуме поглощения изофлавоноидов при длине волны 260 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 96%. Расчет содержания суммы изофлавоноидов проводили в пересчете наononин, используя величину удельного коэффициента поглощения ononина, равного 763 при длине волны 260 нм [24], и учитывая вклад флавоноидов, находящихся в пробе, в общую оптическую плотность извлечений [21].

Обсуждение результатов

При изучении хроматограмм водно-спиртовых извлечений травы и цветков клевера лугового (рис. 1 и 2), а также УФ-спектров пиков веществ, измеренных в режиме остановки потока элюента, определили, что химический состав травы и цветков одинаков, однако, количественное соотношение компонентов БАВ в объектах исследования различается.

Было установлено, что пики 1 и 2 с временами удерживания 13 и 14 мин соответствуют гидроксикоричным кислотам (характерные спектры поглощения), из них достоверно идентифицирована кофейная кислота (t_R =13), пики 3, 4, 5, 6 – гликозидам кверцетина и кемпферола (гиперозид, кверцитрин и др.). Пики веществ 7–14 были отнесены к группе изофлавоноидов по характерным УФ-спектрам с максимумами поглощения при длине волны 250 и 260 нм, среди которых идентифицированы формононетин (№13, t_R=27.2 мин) и биоханин А (№14, t_R=31.5 мин).

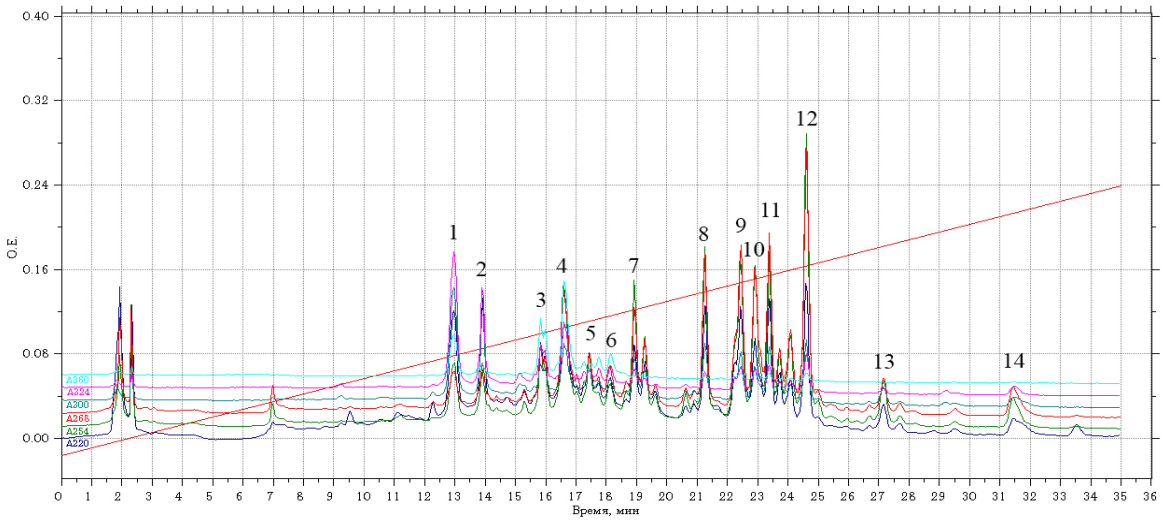


Рис. 1. Хроматограмма водно-спиртового извлечения травы клевера лугового: гидроксикоричные кислоты (1–2), флавоноиды (3–6), изофлавоноиды (7–14)

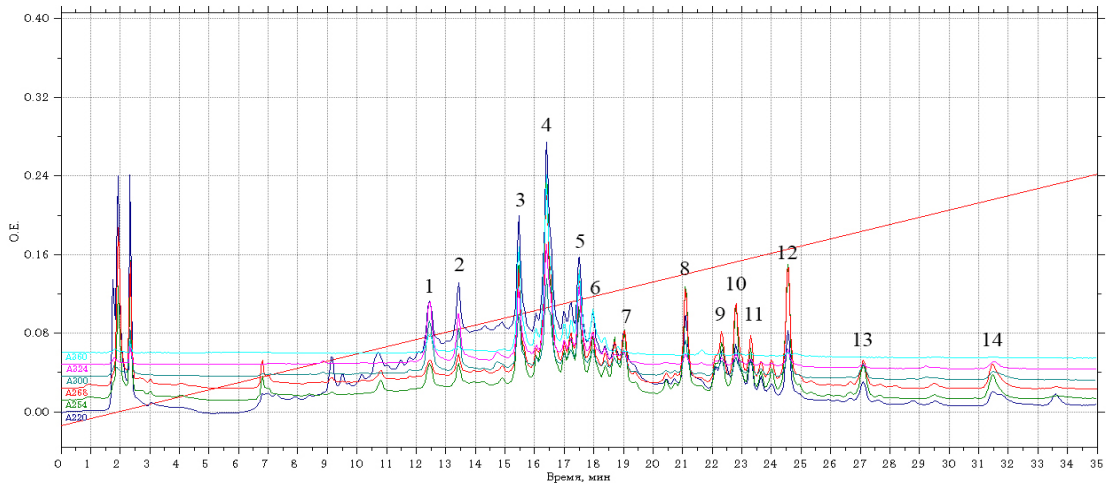


Рис. 2. Хроматограмма водно-спиртового извлечения цветков клевера лугового: гидроксикоричные кислоты (1–2), флавоноиды (3–6), изофлавоноиды (7–14)

Изучение продуктов гидролиза травы и цветков клевера лугового методом ВЭЖХ показало, что времена удерживания БАВ увеличились. Это объясняется тем, что образовавшиеся агликоны флавоноидов, утратив сахарные остатки, характеризуются меньшей полярностью и большим сродством к неподвижной жидкой фазе хроматографической системы. Идентификацию продуктов гидролиза проводили, используя времена удерживания и спектральные характеристики исследуемых веществ в сравнении со стандартными образцами (табл. 1). При исследовании водной фазы после извлечения продуктов гидролиза пиков веществ не было обнаружено.

Таким образом, фенольные соединения клевера лугового представлены гликозидными формами эуфлавоноидов (собственно флавоноидов) и изофлавоноидов. Флавоноиды являются преимущественно монозидами кверцетина (гиперозид, кверцитрин), кемпферола и изорамнетина, изофлавоноиды – гликозидами формононетина и биоханина А.

Следовательно, при определении количественного содержания флавоноидов в траве и цветках клевера лугового в качестве стандарта для определения флавоноидов рационально выбрать гиперозид (кверцетин-3-О-β-D-галактопиранозид) – монозид кверцетина, а стандартом изофлавоноидов – ононин (формононетин-7-О-β-D-глюкопиранозид), который является монозидом формононентина.

При изучении спектральных характеристик водно-спиртовых извлечений травы и цветков клевера лугового в УФ области (рис. 3) обнаружено, что максимумы поглощения находятся при λ_{max} 260±2 нм, плечо извлечения из травы – в диапазоне 310–340 нм, плечо извлечения из цветков – при 320–370 нм. Для выяснения природы полученных спектральных характеристик водно-спиртовых извлечений на том же рисунке приведены спектры поглощения стандартов: кофейной кислоты и гиперозида. Максимум поглощения при 260 нм появляется в первую очередь благодаря присутствию изофлавоноидов, плечо извлечения из травы (310–340 нм) и плечо извлечения из цветков (320–370 нм) объясняется присутствием флавоноидов и фенолокислот, причем в извлечении из травы в большем количестве содержатся фенолокислоты, а в извлечении из цветков – флавоноиды. Изучая спектр поглощения гиперозида, следует отметить, что в представленном диапазоне он имеет два максимума поглощения, один из которых также находится при 260±2 нм, то есть величина оптической плотности извлечения в этой области складывается из оптической плотности, обусловленной присутствием и флавоноидов, и изофлавоноидов. Таким образом, при количественном определении изофлавоноидов методом прямой спектрофотометрии возможно получение завышенных результатов. Чтобы избежать ошибки при определении изофлавоноидов, необходимо учитывать вклад флавоноидов в общую оптическую плотность при длине волны 260 нм. Фенолокислоты клевера лугового (кофейная кислота и др.) в отличие от флавоноидов большого влияния на оптическую плотность в этой области не оказывают, т.к. практически не поглощают при 260 нм.

Количественное содержание флавоноидов определяли методом, описанным А.А. Сорокиной с соавт. [28]. Комплекс флавоноидов с алюминия хлоридом водно-спиртовых извлечений травы и цветков клевера лугового имеет максимум, лежащий в области 410±5 нм (рис. 4). Расчет содержания суммы флавоноидов в объектах исследования проводили в пересчете на гиперозид, используя удельный коэффициент поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом, равный 380 [27].

Таблица 1. Идентификация продуктов гидролиза травы и цветков клевера лугового

№	t_R, мин	λ_{max}, нм	Название вещества
1	20.7	250, 310	Дайдзеин
2	21.7	205, 255	Кверцетин
3	24.9	195, 265	Кемпферол
4	25.3	202, 255	Изорамнетин
5	27.2	195, 250	Формононетин
6	31.7	197, 260	Биоханин А

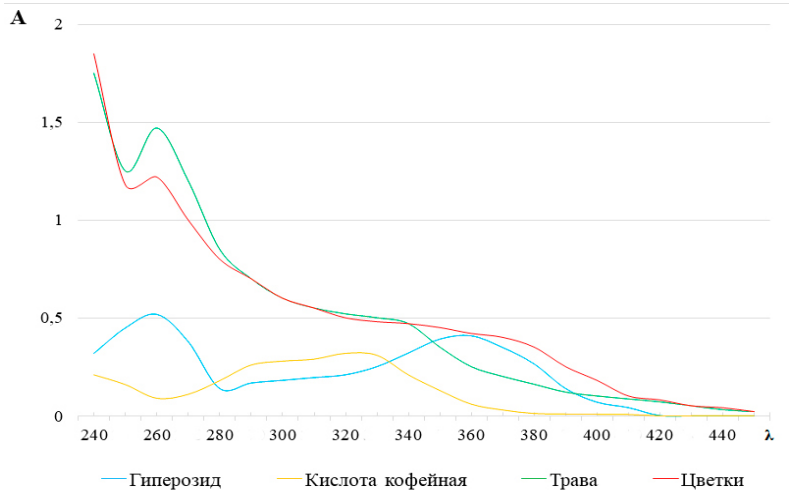


Рис. 3. УФ-спектры поглощения водно-спиртовых извлечений клевера лугового и стандартных образцов гиперозида и кофейной кислоты

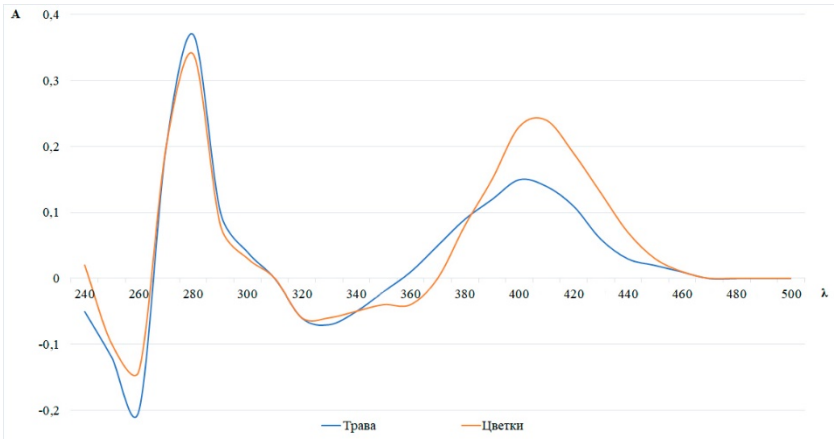


Рис. 4. Дифференциальные спектры травы и цветков клевера полевого

Затем готовили растворы, разбавляя 1 мл водно-спиртовых извлечений травы и цветков клевера спиртом этиловым 96% до объема 25 мл, измеряли оптическую плотность при длине волны 260 нм, которая складывалась из поглощения флавоноидов и изофлавоноидов. Рассчитывали величину вклада флавоноидов в общую оптическую плотность: концентрация флавоноидов известна, удельный коэффициент поглощения гиперозида при 260 нм известен и равен 472 [21]. Величину вклада вычитали из общей оптической плотности, разницу использовали для расчета количественного содержания суммы изофлавоноидов, которую определяли в пересчете наononин по удельному коэффициенту поглощения, равному 763 [24].

Методика, позволяющая индивидуально определять флавоноиды и изофлавоноиды при совместном присутствии в извлечениях травы и цветков клевера лугового, выполнялась следующим образом.

1. Сумму флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии, количественное содержание флавоноидов в процентах (X) расчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где X – содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно-сухом сырье в %; A – оптическая плотность раствора Б при 410 нм; m – навеска сырья, г; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный коэффициент поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380; W – влажность сырья, %.

2. Расчет оптической плотности (A_2) вклада флавоноидов в общую оптическую плотность извлечения при длине волны 260 нм по удельному коэффициенту поглощения гиперозида при этой длине волны по формуле:

$$A_2 = \frac{X \cdot m \cdot 1 \cdot A_{1см}^{1\%} \cdot (100 - W)}{100 \cdot 25 \cdot 100},$$

где A_2 – оптическая плотность суммы флавоноидов при длине волны 260 нм в растворе, приготовленном для определения изофлавоноидов; X – содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье в %; m – навеска сырья, г; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный коэффициент поглощения гиперозида при длине волны 260 нм, равный 472; W – влажность сырья, %.

3. Определение суммы изофлавоноидов (X_1) спектрофотометрическим методом, расчет количественного содержания изофлавоноидов в процентах проводили по формуле:

$$X_1 = \frac{(A_1 - A_2) \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1см}^{1\%} \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где X_1 – содержание суммы изофлавоноидов в пересчете на ононин в абсолютно сухом сырье в %; A_1 – оптическая плотность раствора В при 260 нм; A_2 – оптическая плотность флавоноидов при длине волны 260 нм; m – навеска сырья, г; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный коэффициент поглощения ононина при длине волны 260 нм, равный 763; W – влажность сырья, %.

Результаты количественного определения флавоноидов и изофлавоноидов при совместном присутствии в траве и цветках клевера лугового и метрологические характеристики методики их селективного количественного определения представлены в таблице 2.

Таким образом, из полученных данных следует, что при использовании методики спектрофотометрического селективного определения содержание флавоноидов в траве и цветках клевера лугового, произрастающего в Алтайском крае, в пересчете на абсолютно-сухое сырье составило 0.98±0.02% и 1.59±0.05% соответственно, содержание изофлавоноидов в траве – 4.25±0.14%, цветках – 3.19±0.14%.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики селективного количественного определения флавоноидов и изофлавоноидов в траве и цветках клевера лугового

Сырье/БАВ	N	f	$\bar{x}$	S^2	S	S_x	P, %	t (P,f)	Δx	ε, %
Трава, флавоноиды	6	5	0.98	0.0003	0.0169	0.0069	95	2.57	0.02	1.80
Трава, изофлавоноиды	6	5	4.25	0.0171	0.1308	0.0534	95	2.57	0.14	3.23
Цветки, флавоноиды	6	5	1.59	0.0019	0.0438	0.0179	95	2.57	0.05	2.89
Цветки, изофлавоноиды	6	5	3.19	0.0180	0.1342	0.0548	95	2.57	0.14	4.41

Выводы

1. Апробирована методика спектрофотометрического селективного определения совместно присутствующих флавоноидов и изофлавоноидов в траве и цветках клевера лугового.

2. Установлено, что содержание флавоноидов в траве и цветках клевера лугового в перечете на абсолютно-сухое сырье составило 0.98±0.02% и 1.59±0.05% соответственно, содержание изофлавоноидов в траве – 4.25±0.14%, в цветках – 3.19±0.14%.

3. Относительная погрешность апробированной методики находится в диапазоне 1.80–4.41%, что позволяет рекомендовать ее к дальнейшей разработке и использованию для количественного определения флавоноидов и изофлавоноидов в траве и цветках клевера лугового.

Финансирование
Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Алтайского государственного медицинского университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов
Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ
Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы предоставите соответствующие ссылки на автора(ов), источник и Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Красноборов И.М., Ломоносова М.Н., Шауло Д.Н. и др. Определитель растений Алтайского края. Новосибирск, 2003. 634 с.
2. Мазнев Н.И. Энциклопедия лекарственных растений. 3-е изд., испр. и доп. М., 2004. 496 с.
3. Большая российская энциклопедия 2004–2017. [Электронный ресурс]. URL: https://old.bigenc.ru/biology/text/2623427?ysclid=lx0dfl86xn673575125.
4. Путырский И., Прохоров В. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. М., 2000. 656 с.
5. Марьин А.А., Танцерева И.Г., Большаков В.В., Коломиец Н.Э. Лекарственные растения в коррекции климактерических расстройств // Фундаментальная и клиническая медицина. 2019. Т. 4, №1. С. 80–89. https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-80-90.
6. Beck V., Rohr U., Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? // The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2005. Vol. 94, no. 5. Pp. 499–518. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.038.
7. Lipovac M., Chedraui P., Gruenhut C., Gocan A., Kurz C., Neuber B., Imhof M. Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women // Obstetrics and gynecology international. 2011. Vol. 2011. Pp. 1–6. https://doi.org/10.1155/2011/949302.
8. Booth N.L., Piersen C.E., Banuvar S., Geller S.E., Shulman L.P., Farnsworth N.R. Clinical studies of red clover (Trifolium pratense) dietary supplements in menopause: a literature review // Menopause. 2006. Vol. 13, no. 2. Pp. 251–264. https://doi.org/10.1097/01.gme.0000198297.40269.f7.
9. Lukaczer D., Darland G., Tripp M., Liska D., Lerman R.H., Schiltz B., Bland J.S. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: a pilot trial // Altern Ther Health Med. 2005. Vol. 11(5). Pp. 60–65.
10. Кубасова Е.Д., Крылов И.А., Кубасов Р.В., Суханов А.Е., Незговоров Д.В., Коробицын А.П., Грошилин В.С., Сафроненко А.В., Дергоусова Т.Г., Грошилин С.М., Линченко С.Н. Перспективы использования растительного сырья клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) в фармацевтической практике // Экология человека. 2024. Т. 31, №3. С. 179–190. https://doi.org/10.17816/humeco634190.
11. ФС.2.5.0116. Клевера трава. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-15/klevera-trava/?vers=6078&ysclid=m4twfd3qsj535222815.
12. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae – Apiaceae / отв. ред. А.Л. Буданцев. СПб.; М., 2010. 601 с.
13. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. М., 2005. 887 с.
14. Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Schwartsova H., Vojinovic-Miloradov M. Antioxidant profile of *Trifolium pratense* L. // Molecules. 2012. Vol. 17, no. 9. Pp. 11156–11172. https://doi.org/10.3390/molecules170911156.
15. Kolodziejczyk-Czepas J. *Trifolium species* derived substances and extracts-biological activity and prospects for medicinal applications // J. Ethnopharmacol. 2012. Vol. 143, no. 1. Pp. 14–23. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.048.
16. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hidrangeaceae-Haloragaceae. Л., 1987. 326 с.
17. Tava A., Peciob Ł., Stochmalb A., Pecetti L. Clovamide and Flavonoids from Leaves of *Trifolium pratense* and *T. pratense* subsp. nivale Grown in Italy // Natural Product Communications. 2015. Vol. 10 (6). Pp. 933–936.
18. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium* L. Структурное разнообразие и биологическая активность // Химия растительного сырья. 2017. №3. С. 39–53. https://doi.org/10.14258/jcprm.2017031646.
19. Темердашев З.А., Чубукина Т.К., Виницкая Е.А. и др. Оценка содержания изофлавоноидов в клевере луговом (*Trifolium pratense* L.) из семейства Бобовые (Fabaceae) в условиях экстракции различными способами // Журнал аналитической химии. 2021. Т. 76, №9. С. 819–831. https://doi.org/10.31857/S0044450221090115.
20. Lin L.-Z., He X.-G., Lindenmaier M., Yang J., Cleary M., Qiu S.-X., Cordell G.A. LC-ESI-MS study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*) // Journal of agricultural and food chemistry. 2000. Vol. 48, no. 2. Pp. 354–365. https://doi.org/10.1021/jf991002+.

21. Сампиев А.М., Давитавян Н.А. Количественное определение флавоноидов, изофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот в траве стальника полевого // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43, №7. С. 25–31. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2009-43-7-25-31.
22. Нгуен Тхи Шен. Разработка технологии лекарственного средства с фитосубстанцией из клевера лугового травы: дис. ... канд. фарм. наук. СПб, 2020. 150 с.
23. Андреева В.Ю., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э., Полуэктова Т.В., Исайкина Н.В. Методика определения изофлавоноидов в траве клевера лугового // Фармация. 2012. №8. С. 5–7.
24. ФС.2.5.0094.18. Стальника полевого корни. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/stalnika-polevogo-korni-ononis-arvensis-radices/?ysclid=m4wswfutiz557829010.
25. Московский цифровой гербарий / ред. А.П. Серегин. М., 2025.
26. Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е., Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Чепрасова М.Ю., Харнутова Е.П. Оценка содержания полифенолов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх в сравнении с интактными растениями // Химия растительного сырья. 2019. №2. С. 239–250. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019024291.
27. ФС.2.5.0061.18. Боярышника плоды. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/boyaryshnika-plody-crataegi-fructus/?ysclid=m4wtc0e1gk327447561.
28. Сорокина А.А., Марахова А.И., Станищевский Я.М., Ковалева Т.Ю. Фотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: монография. М., 2015. 155 с.

Поступила в редакцию 2 мая 2025 г.

После переработки 25 июня 2025 г.

Принята к публикации 26 мая 2026 г.

Penzina T.N., Kudrikova L.E.[*], *Bindyuk M.A., Loor K.S.* DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND ISOFLAVONOIDS IN THE HERB AND FLOWERS OF RED CLOVER GROWING IN THE ALTAI REGION

Altai State Medical University, ave. Lenina, 40, Barnaul, 656038, Russia, lek212@mail.ru

In official medicine, the herb of red clover is used. It is known that the main active substances of clover are: flavonoids and isoflavonoids. Analysis of the literature showed that methods have been developed that allow for the individual determination of flavonoids and isoflavonoids when present together. The purpose of the work: to test the method of selective quantitative determination of flavonoids and isoflavonoids in the above-ground part of red clover.

The study was conducted on aqueous-alcoholic extracts of the herb and flowers of red clover growing in the Altai Territory. Using HPLC, it was found that the extracts contained flavonoids - primarily monosides of quercetin, kaempferol, isorhamnetin and isoflavonoids – glycosides of formononetin and biochanin A. The quantitative content of flavonoids was determined by differential spectrophotometry based on the formation of a complex of flavonoids with aluminum chloride. Isoflavonoids were determined by direct spectrophotometry at a wavelength of 260 nm. Analysis of the spectral characteristics of the substances included in the extracts showed that flavonoids also absorb at 260 nm (for example, hyperoside has three absorption maxima, one of which is at 260±2 nm). To avoid errors in determining isoflavonoids, the flavonoid content was first determined and their contribution to the optical density at a wavelength of 260 nm was calculated, which was then subtracted from the total optical density. As a result, the flavonoid content in the herb and flowers of red clover was 0.98±0.02 and 1.59±0.05%, respectively, the isoflavonoid content in the herb was 4.25±0.14%, and in the flowers it was 3.19±0.14%. The relative error of the method does not exceed 4.41%, which allows us to recommend it for further development and use.

Keywords: red clover, *Trifolium pratense*, flavonoids, isoflavonoids, spectrophotometry, HPLC, quantitative determination.

For citing: Penzina T.N., Kudrikova L.E., Bindyuk M.A., Loor K.S. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2026, no. 3, pp. 210–219. (in Russ.). https://doi.org/10.14258/jcprm.20260317311.

[*] Corresponding author.

References

1. Krasnoborov I.M., Lomonosova M.N., Shaulo D.N. i dr. *Opredelitel' rasteniy Altayskogo kraya*. [Identification Guide to the Plants of Altai Krai]. Novosibirsk, 2003, 634 p. (in Russ.).
2. Maznev N.I. *Entsiklopediya lekarstvennykh rasteniy. 3-ye izd., ispr. i dop*. [Encyclopedia of Medicinal Plants. 3rd ed., revised and expanded]. Moscow, 2004, 496 p. (in Russ.).
3. *Bol'shaya rossiyskaya entsiklopediya 2004–2017*. [Great Russian Encyclopedia 2004–2017]. URL: https://old.bigenc.ru/biology/text/2623427?ysclid=lx0dfl86xn673575125. (in Russ.).
4. Putyrskiy I., Prokhorov V. *Universal'naya entsiklopediya lekarstvennykh rasteniy*. [Universal Encyclopedia of Medicinal Plants]. Moscow, 2000, 656 p. (in Russ.).
5. Mar'in A.A., Tantsereva I.G., Bol'shakov V.V., Kolomiyets N.E. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 80–89. https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-80-90. (in Russ.).
6. Beck V., Rohr U., Jungbauer A. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2005, vol. 94, no. 5, pp. 499–518. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.038.
7. Lipovac M., Chedraui P., Gruenhut C., Gocan A., Kurz C., Neuber B., Imhof M. *Obstetrics and gynecology international*, 2011, vol. 2011, pp. 1–6. https://doi.org/10.1155/2011/949302.
8. Booth N.L., Piersen C.E., Banuvar S., Geller S.E., Shulman L.P., Farnsworth N.R. *Menopause*, 2006, vol. 13, no. 2, pp. 251–264. https://doi.org/10.1097/01.gme.0000198297.40269.f7.
9. Lukaczer D., Darland G., Tripp M., Liska D., Lerman R.H., Schiltz B., Bland J.S. *Altern Ther Health Med*., 2005, vol. 11(5), pp. 60–65.
10. Kubasova Ye.D., Krylov I.A., Kubasov R.V., Sukhanov A.Ye., Nezgovorov D.V., Korobitsyn A.P., Groshilin V.S., Safronenko A.V., Dergousova T.G., Groshilin S.M., Linchenko S.N. *Ekologiya cheloveka*, 2024, vol. 31, no. 3, pp. 179–190. https://doi.org/10.17816/humeco634190. (in Russ.).
11. *FS.2.5.0116. Klevera trava*. [FS.2.5.0116. Clover herb]. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-15/klevera-trava/?vers=6078&ysclid=m4twfd3qsj535222815. (in Russ.).
12. *Rastitel'nyye resursy Rossii: Dikorastushchiye tsvetkovyye rasteniya, ikh komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. T. 3. Semeystva Fabaceae – Apiaceae* [Plant Resources of Russia: Wild-Growing Flowering Plants, Their Composition and Biological Activity. Vol. 3. Families Fabaceae – Apiaceae], ed. A.L. Budantsev. St. Petersburg; Moscow, 2010, 601 p. (in Russ.).
13. K'osev P.A. *Polnyy spravochnik lekarstvennykh rasteniy*. [Complete Handbook of Medicinal Plants]. Moscow, 2005, 887 p. (in Russ.).
14. Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Schwartsova H., Vojinovic-Miloradov M. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 9, pp. 11156–11172. https://doi.org/10.3390/molecules170911156.
15. Kolodziejczyk-Czepas J. *J. Ethnopharmacol*., 2012, vol. 143, no. 1, pp. 14–23. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.048.
16. *Rastitel'nyye resursy SSSR: Tsvetkovyye rasteniya, ikh khimicheskiy sostav, ispol'zovaniye; Semeystva Hidrangeaceae-Haloragaceae*. [Plant Resources of the USSR: Flowering Plants, Their Chemical Composition and Uses; Families Hydrangeaceae–Haloragaceae]. Leningrad, 1987, 326 p. (in Russ.).
17. Tava A., Peciob Ł., Stochmalb A., Pecetti L. *Natural Product Communications*, 2015, vol. 10 (6), pp. 933–936.
18. Drenin A.A., Botirov E.Kh. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 3, pp. 39–53. https://doi.org/10.14258/jcprm.2017031646. (in Russ.).
19. Temerdashev Z.A., Chubukina T.K., Vinitskaya Ye.A. i dr. *Zhurnal analiticheskoy khimii*, 2021, vol. 76, no. 9, pp. 819–831. https://doi.org/10.31857/S0044450221090115. (in Russ.).
20. Lin L.-Z., He X.-G., Lindenmaier M., Yang J., Cleary M., Qiu S.-X., Cordell G.A. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, vol. 48, no. 2, pp. 354–365. https://doi.org/10.1021/jf991002+.
21. Sampiyev A.M., Davitavyan N.A. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2009, vol. 43, no. 7, pp. 25–31. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2009-43-7-25-31. (in Russ.).
22. Nguyen Tkhi Shen. *Razrabotka tekhnologii lekarstvennogo sredstva s fitosubstantsiyey iz klevera lugovogo travy: dis. ... kand. farm. nauk*. [Development of the technology for a medicinal product containing a phytosubstance from red clover herb: Diss. ... Cand. Pharm. Sci.]. St. Petersburg, 2020, 150 p. (in Russ.).
23. Andreyeva V.Yu., Kalinkina G.I., Kolomiyets N.E., Poluektova T.V., Isaykina N.V. *Farmatsiya*, 2012, no. 8, pp. 5–7. (in Russ.).
24. *FS.2.5.0094.18. Stal'nika polevogo korni*. [FS.2.5.0094.18. Field restharrow roots]. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/stalnika-polevogo-korni-ononis-arvensis-radices/?ysclid=m4wswfutiz557829010. (in Russ.).
25. *Moskovskiy tsifrovoy gerbariy* [Moscow Digital Herbarium], ed. A.P. Seregin. Moscow, 2025. (in Russ.).
26. Antipova Ye.A., Kudrikova L.Ye., Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Cheprasova M.Yu., Kharnutova Ye.P. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 239–250. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019024291. (in Russ.).
27. *FS.2.5.0061.18. Boyaryshnika plody*. [FS.2.5.0061.18. Hawthorn fruit]. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/boyaryshnika-plody-crataegi-fructus/?ysclid=m4wtc0e1gk327447561. (in Russ.).

28. Sorokina A.A., Marakhova A.I., Stanishchevskiy Ya.M., Kovaleva T.Yu. *Fotometricheskiye metody v analize lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i preparatov na yego osnove: monografiya*. [Photometric methods in the analysis of medicinal plant materials and preparations based on them: a monograph]. Moscow, 2015, 155 p. (in Russ.).

Received May 2, 2025

Revised June 25, 2025

Accepted May 26, 2026

Сведения об авторах

Пензина Тамара Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармации, penzina.tamara@yandex.ru

Кудрикова Людмила Евдокимовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации, lek212@mail.ru

Биндюк Мария Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации, mariyabin@yandex.ru

Лоор Карина Сергеевна – ординатор, karina-loor.2000@mail.ru

Information about authors

Penzina Tamara Nikolaevna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Pharmacy, penzina.tamara@yandex.ru

Kudrikova Lyudmila Evdokimovna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Department of Pharmacy, lek212@mail.ru

Bindyuk Maria Alexandrovna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Department of Pharmacy, mariyabin@yandex.ru

Loor Karina Sergeevna – Medical Resident, karina-loor.2000@mail.ru