Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 220–229.
Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2026, no. 3, pp. 220–229.
DOI: 10.14258/jcprm.20260318034

УДК 581.1; 543.422.3

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКИЛРЕЗОРЦИНОЛОВ В ЗЕРНЕ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)*

© ***А.И. Валиева**, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева***

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111, Россия, cell-culture@yandex.ru

Алкилрезорцинолы (АР) – это группа фенольных липидов, локализованных во внешних оболочках зерна пшеницы, они содержатся в цельнозерновых продуктах и оказывают положительное влияние на регуляцию липидного обмена человека. Определение содержания АР в зерне имеет большое значение как при селекции сортов пшеницы для функционального питания, так и при контроле подлинности цельнозерновых продуктов. Спектрофотометрический метод количественного определения АР с использованием диазониевой соли Fast Blue RR отличается простотой и экономичностью, что делает его удобным для анализа большого количества образцов. Однако его применение требует оценки возможного влияния со стороны других фенольных соединений (ФС), присутствующих в зерне. В настоящей работе подобраны оптимальные условия для спектрофотометрического определения АР в цельнозерновой муке (ЦЗМ) мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) краснозерных сортов, содержащих проантоцианидины (ПА). Впервые оценена способность различных ФС зерна пшеницы образовывать окрашенные продукты с Fast Blue RR. Установлено, что катехин, являющийся основной субъединицей ПА пшеницы, взаимодействует с реактивом и при концентрациях выше 5 мкг/мл может влиять на спектрофотометрическое определение АР. Показано, что сопутствующие соединения, экстрагируемые безводным ацетоном из ЦЗМ мягкой яровой пшеницы, в подобранных условиях анализа не оказывают существенного влияния на результаты спектрофотометрического определения АР. Рекомендовано проводить предварительное тестирование растительных экстрактов на содержание свободных катехинов и/или ПА для исключения их возможного влияния на результаты количественной оценки АР. Высокая сходимость данных, полученных при сравнении предложенного метода и ВЭЖХ анализа, подтверждена статистически (коэффициент корреляции $r = 0.955$, $p \leq 0.001$).

Ключевые слова: Triticum aestivum, алкилрезорцинолы, ВЭЖХ, катехин, проантоцианидины, спектрофотометрия, Fast Blue RR.

Для цитирования: Валиева А.И., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Спектрофотометрическое определение алкилрезорцинолов в зерне мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 220–229. https://doi.org/10.14258/jcprm.20260318034.

Введение

Алкилрезорцинолы (АР) – группа фенольных липидов, производных резорцинола, синтезируемых некоторыми растениями [1, 2], а также рядом прокариот [2, 3]. Они обладают широким спектром биологических свойств: в растениях АР играют преимущественно защитную роль, проявляя антибактериальную и фунгицидную активность [1, 4], оказывают положительное влияние на здоровье человека, не проявляя токсического эффекта [1, 5]. В зерне пшеницы АР локализованы в оболочках зерна [6] и могут составлять от 0.16 до 1.43 мг/г сухого веса зерна [5, 7]. Однако при производстве муки первого и высшего сорта большая часть фенольных соединений (ФС), в том числе и все АР, удаляются вместе с внешними оболочками зерна (отрубями). В последние годы производство продуктов из цельнозерновой муки (ЦЗМ) и/или с добавлением отрубей неуклонно растет, поскольку в научной литературе появляется все больше данных о том, что цельнозерновые продукты снижают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения, диабета 2 типа, рака толстой кишки [5, 8]. ФС, в том числе АР играют в этом значимую роль, наибольший вклад АР вносят

*Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20260318034s

** Автор, с которым следует вести переписку.

в регуляцию липидного обмена [1, 8, 9], поэтому для производства функциональных продуктов питания является важным отбор сортов пшеницы с высоким содержанием АР в зерне. Поскольку АР находятся исключительно в оболочках зерна, то их обнаружение может служить маркером цельнозерновой продукции [10] и используется для контроля соответствия цельнозерновых продуктов их заявленному содержанию. В связи с этим разработка новых и/или совершенствование уже используемых методов количественного определения АР в зерне злаков для рутинного анализа является актуальной задачей.

Хроматографические методы определения АР, такие как ГЖХ и ВЭЖХ, позволяют получать точные данные, но требуют существенных затрат времени и ресурсов, и поэтому не могут быть использованы в качестве экспресс-методов. В литературе описаны спектрофотометрические методы, основанные на способности диазониевых солей Fast Blue B · $ZnCl_2$ (далее – Fast Blue B) и Fast Blue RR · ½ $ZnCl_2$ (далее – Fast Blue RR) связываться с АР [11, 12]. Оба метода просты и удобны в исполнении, сравнимы по точности, но второй метод, разработанный Сампиетро с соавт. [11], имеет два несомненных преимущества перед первым – отсутствие светочувствительности образуемых соединений и быструю подготовку проб к измерению. Образование окрашенных соединений в этих методах происходит в результате реакции азосочетания между электрофильным (катион диазония – соль Fast Blue) и нуклеофильным (фенолят-ион) агентами. Реакцию азосочетания проводят в щелочной среде (pH 8–10), поскольку ФС должны быть в состоянии избыточной электронной плотности. Электрон-донорные заместители, такие как гидроксильная группировка, алкильный остаток, увеличивают, а электрон-акцепторные заместители, такие как карбоксильная группировка, уменьшают нуклеофильные свойства ФС. Таким образом, ФС с разной структурой будут в разной степени реагировать с катионом диазония. АР представляют собой амфифильные молекулы, производные резорцина, состоящие из гидрофильного фенольного кольца и гидрофобной алкильной цепи, скелет которой содержит от 13 до 29 атомов углерода. Следует отметить, что молекула АР имеет только электронодонорные заместители: две гидроксильные группировки и алкильный хвост, поэтому быстро и легко вступает в реакцию азосочетания.

При извлечении АР безводными полярными растворителями из зерна пшеницы могут экстрагироваться не только АР, но и другие ФС. При значительной концентрации в экстракте ФС с большим количеством электронодонорных групп они будут вступать в реакцию азосочетания и завышать показатели оптической плотности при спектрофотометрическом измерении. Необходимо отметить, что Сампиетро с соавт. показали, что соль Fast Blue RR реагирует с кверцетином [13], но в то же время авторы статьи не указали, были ли проведены исследования по анализу сопутствующих компонентов в образцах АР, выделенных из объектов исследования. Известно, что в семенной оболочке зерна краснозерных сортов пшеницы содержатся проантоцианидины (ПА), состоящие преимущественно из субъединиц катехина [14]. Для того чтобы оценить влияние ПА при спектрофотометрическом определении содержания АР с помощью Fast Blue RR, необходимо провести количественный анализ ПА в экстракте, полученном из зерна краснозерных сортов. Целью настоящей работы было оптимизировать методику спектрофотометрического определения АР из зерна краснозерных сортов мягкой яровой пшеницы.

Экспериментальная часть

В качестве *объектов исследования* были использованы образцы зерна урожая 2023 года яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): белозерный сорт Arrino, краснозерные сорта Йолдыз и Ситара. Опытные образцы были выращены на полях селекционного севооборота Татарского НИИСХ, как описано ранее [15]. В качестве негативного контроля была использована манная крупа (Мистраль, Россия).

Подготовка образцов. Для получения ЦЗМ зерно размалывали на шаровой мельнице MM400 (Retsch, Германия) при частоте 25 Гц в течение 3 мин. Для выделения АР к 40 мг ЦЗМ добавляли 1.6 мл 100% ацетона и экстрагировали 18 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере OS-200 (Allsheng, Китай) при 180 об./мин. Затем центрифугировали 30 мин при 10000 g, супернатант отбирали, к осадку добавляли 1 мл ацетона и экстрагировали еще 60 мин, центрифугировали, супернатанты объединяли и высушивали в вытяжном шкафу. Осадок растворяли в 200 мкл метанола, обрабатывали ультразвуком (15 сек, 30 кГц, 20 °C), центрифугировали (3 мин, 10000 g). Супернатант использовали для ТСХ и при 4-кратном разведении супернатанта – для спектрофотометрического определения АР. Для ВЭЖХ-анализа АР и для спектрофотометрического определения содержания ПА 500 мг ЦЗМ последовательно экстрагировали 20 и 10 мл ацетона, как описано выше, а высушенный экстракт растворяли в 1 мл метанола.

Определение содержания ПА проводили по методу Li с соавт. [16] с модификациями: к 250 мкл экстракта добавляли 250 мкл метанола и 100 мкл 0.2% DMACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde), приготовленного на метаноле с HCl (конечная концентрация – 3 М). Калибровочную кривую строили по известным концентрациям катехина (1–8 мкг/мл). Через 30 мин измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) в сканирующем режиме в диапазоне от 350 до 750 нм (λ_{max} 630 нм).

Определение содержания алкилрезорцинолов. Рабочий раствор реагента готовили перед измерением из стокового 0.05% раствора Fast Blue RR и 96% этанола в соотношении 1 : 5. Для построения калибровочной кривой использовали орсинол. Для этого аликвоты стокового раствора орсинола, содержащие от 1 до 20 мкг (8.1–161.1 мкМ) вещества, помещали в пробирки и доводили до 60 мкл этанолом. В каждую пробирку добавляли по 540 мкл рабочего раствора соли Fast Blue RR и затем 10 мкл 10% NH_4OH в качестве подщелачивающего реагента, тщательно перемешивали и выдерживали перед измерением 15–30 мин. В эксперименте по определению времени стабильности комплекса орсинол – Fast Blue RR измерения проводили через 5, 15, 30, 60 мин. Образцы измеряли на спектрофотометре LAMBDA 25 в сканирующем режиме в диапазоне от 400 до 600 нм (λ_{max} 483 нм). По значениям оптической плотности при 483 нм были построены калибровочные кривые для орсинола и для катехина.

Для получения спектров поглощения продуктов взаимодействия Fast Blue RR с ФС (орсинол, катехин, кверцетин, апигенин, феруловая и галловая кислоты) была выбрана концентрация орсинола 10 мкг/мл (80.6 мкМ), все остальные ФС использовали в той же молярной концентрации (80.6 мкМ).

Хроматографический анализ АР. Для ТСХ использовали пластины ПТСХ-АФ А-УФ с индикатором УФ-254 (Sorbfil, Россия). 10 мкл супернатанта наносили на стартовую линию в виде полос шириной 4 мм. Разделение веществ проводили в смеси неполярных растворителей $CHCl_3$: EtOAc (85 : 15). ТСХ-пластину просматривали на трансиллюминаторе ТСР-20 МС (Vilbert Lourmat, Франция) при 312 нм. Для проявления пятен АР использовали реакцию азосочетания (реактив №38 по Шталю [17], либо Fast Blue RR).

ВЭЖХ анализ проводили по методу [18] с модификациями. Использовали обращенно-фазную колонку Symmetry® C18 150×4.6 мм, 5 мкм. Исследование проводили на хроматографической системе высокого давления BIORAD BioLogic Duo-Flow с диодно-матричным детектором QuadTec 40. В качестве подвижной фазы использовали: раствор А – mQ, раствор В – метанол, разделение проводили в градиентном режиме: 0–10 мин 90–100% раствора В, 10–30 мин 100% раствор В, 30–33 мин 100–90% раствор В. Скорость подвижной фазы – 0.25 мл/мин. Детекцию АР осуществляли при длине волны 280 нм. Для расчета содержания АР были использованы только пики, фракции которых на ТСХ-пластине показали положительную реакцию на наличие в них резорциновых липидов. Калибровочная кривая была построена по орсинолу.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SigmaPlot методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Значимость отличий определяли, используя критерий Тьюки для множественных сравнений (ANOVA) при уровне $p \leq 0.05$. Коэффициент корреляции был рассчитан по Пирсону при $p \leq 0.05$ с использованием программы OriginPro 2017.

Реактивы. DMACA, Fast Blue RR ½ $ZnCl_2$ salt, орсинол, катехин (Sigma-Aldrich, A.C.S. grade), кверцетин, галловая кислота, феруловая кислота (Serva, Германия), апигенин (Neuroactive Living, ЮАР), ацетон, этанол, метанол, хлороформ, этилацетат (Chemman Мосреактив, Россия, х.ч.), гидроксид аммония (Сигма Тек, Россия, ч.д.а.).

Результаты и их обсуждение

Спектры поглощения диазониевой соли, фенольных соединений и продуктов их взаимодействия. Для получения спектров поглощения чистых веществ в диапазоне 400–600 нм, ФС и диазониевая соль Fast Blue RR были растворены в этаноле; в качестве холостого раствора был использован этанол. Было выявлено, что растворы всех использованных ФС не поглощают при 483 нм (данные не представлены), а реактив Fast Blue RR, растворенный в этаноле, поглощает при 483 нм в пределах погрешности измерения – 0.05 опт. ед. (рис. 1*а*).

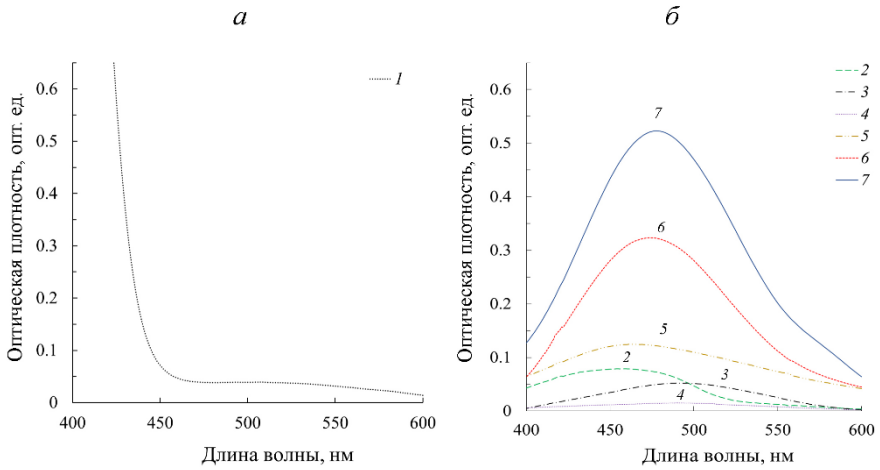


Рис. 1. Спектры поглощения диазониевой соли Fast Blue RR (*а*) и продуктов реакции фенольных соединений (80.6 мкМ) с солью Fast Blue RR (*б*). *1* – Fast Blue RR, *2* – феруловая кислота, *3* – галловая кислота, *4* – апигенин, *5* – кверцетин, *6* – катехин, *7* – орсинол

После смешивания растворов ФС с диазониевой солью Fast Blue RR были сняты спектры поглощения продуктов реакции (рис. 1*б*), холостым раствором в этом случае был спиртовой раствор соли Fast Blue RR. ФС проявили разную способность вступать в реакцию азосочетания. Фенольные кислоты реагировали слабо (рис. 1*б*, кривые *2, 3*), что объясняется наличием в их структуре карбоксильной группировки, уменьшающей нуклеофильные свойства фенольного кольца. Флавоноиды либо не вступали в реакцию азосочетания, как, например, апигенин (рис. 1*б*, кривая *4*), гликозидные производные которого в зерне пшеницы наиболее представлены, либо слабо взаимодействовали с реактивом Fast Blue RR, как кверцетин (рис. 1*б*, кривая *5*). Катехин, являющийся структурной единицей ПА пшеницы [14], активно вступал в реакцию азосочетания (рис. 1*б*, кривая *6*), хотя и в меньшей степени, чем орсинол в той же молярной концентрации (рис. 1*б*, кривая *7*). Следовательно, при существенном содержании в экстракте ПА они будут взаимодействовать с реактивом и мешать точному определению содержания АР, поэтому необходимо оценить возможный вклад ПА в значение оптической плотности.

Оценка влияния примесей ПА на спектрофотометрическое определение АР. Разные классы ФС имеют различное сродство к растворителям, и выбор последнего будет влиять на полноту извлечения целевых ФС и на присутствие в экстракте сопутствующих соединений. АР амфифильны по своей природе, поэтому для их экстракции используют безводные полярные растворители, такие как ацетон, этилацетат, метанол. Безводный ацетон является наиболее часто применяемым растворителем для простой экстракции АР [19], поскольку он экстрагирует меньше сопутствующих веществ. Известно, что ацетон используют для экстракции не только АР, но и ПА. Оптимальным растворителем для ПА является 60–80% ацетон [20], тем не менее показано, что 100% ацетон также может экстрагировать катехин, эпикатехин и процианидины B1, B2, C1 из семян винограда [21]. Поскольку в зерне краснозерных сортов пшеницы содержатся ПА [14], необходимо оценить их присутствие в экстракте, полученном из ЦЗМ с помощью 100% ацетона. Содержание ПА было определено с помощью высокоспецифичного реактива DMACA. В качестве негативного контроля использовали манную крупу, поскольку она производится из эндосперма зерна пшеницы, в которой АР и ПА должны отсутствовать или присутствовать в следовых количествах. Было выявлено, что в экстракте, используемом для спектрофотометрического определения АР, ПА и/или их мономеры с помощью DMACA, не выявляются. Получение более концентрированного экстракта позволило определить их содержание в ЦЗМ: с. Arrino – 3.41±0.07, с. Йолдыз – 6.80±0.15, с. Ситара – 8.23±0.14 мкг/г сухого веса.

Для того чтобы оценить возможный вклад ПА и/или катехина в значение оптической плотности раствора при спектрофотометрическом определении АР с помощью Fast Blue RR, была построена калибровочная кривая для продукта реакции катехина с Fast Blue RR (рис. 1 электронного приложения). На основании максимального содержания ПА в экстракте был выполнен расчет вклада этих соединений в оптическую плотность раствора при измерении АР. Расчеты показали, что вклад ПА в значение оптической плотности находится в пределах погрешности прибора (менее чем 0.01 опт. ед.). Подробный расчет представлен в

таблице электронного приложения. Таким образом, экстракция безводным ацетоном из ЦЗМ не приводит к извлечению ПА в количествах, способных оказывать влияние на точность спектрофотометрического определения АР. Следовательно, коррекция результатов в данном случае не требуется. Вместе с тем следует учитывать, что при концентрациях ПА в экстракте выше 5 мкг/мл возможно завышение показателей оптической плотности раствора, соответственно, содержания АР, поэтому для объектов исследования, содержащих как АР, так и ПА, необходимо оценить содержание ПА в экстракте.

Выявление АР методами хроматографии. ТСХ-анализ удобен в качестве экспресс-метода качественного выявления АР. Окрашивание АР на пластинах ТСХ можно провести либо нитрофенилдиазонийхлоридом (диазотированный нитроанилин – реактив №38 по Шталю), либо диазониевой солью Fast Blue RR, липидную природу вещества можно выявить высокотемпературным прожиганием 30% серной кислотой [19]. Присутствие АР в ЦЗМ было выявлено по гашению свечения флуорофора при 312 нм (рис. 2*а*), образованием окрашенных пятен при реакции азосочетания (рис. 2*б,* рис. 2*а*, *в* электронного приложения) и тестом на липиды (рис. 2*б* электронного приложения). Катехин не мигрировал с подвижной фазой, состоящей из смеси неполярных растворителей, и оставался на стартовой линии, при этом он реагировал с нитрофенилдиазонийхлоридом (рис. 2*б, 1*). В экстрактах единственным прореагировавшим пятном были АР (рис. 2*б, 3*), это указывало на отсутствие в экстрактах детектируемого количества соединений, способных вступать в реакцию азосочетания, что согласуется с данными спектрофотометрического определения ПА (табл. электронного приложения). Следует также подчеркнуть, что в негативном контроле (экстракт из манной крупы) АР были выявлены лишь в следовых количествах, что подтверждалось отсутствием гашения свечения флуорофора в области, соответствующей АР (рис. 2*а, 2*), отсутствием реакции азосочетания на ТСХ пластине (рис. 2*б, 2*) и ВЭЖХ-анализом (рис. 3 электронного приложения).

Следует отметить, что ТСХ-анализ имеет слабую разрешающую способность, так как несколько разных соединений могут мигрировать с близкой скоростью и будут представлены в виде единого пятна. В обзоре Росс с соавт. отмечается, что на ТСХ-пластине разные АР мигрируют единым пятном [22]. Кроме того, можно предположить, что в данном пятне могут находиться и другие соединения, поэтому АР, присутствующие в экстракте, предварительно разделили с помощью обратно-фазной ВЭЖХ (рис. 3*а*); фракции, соответствующие основным пикам, были собраны, высушены, растворены в метаноле и использованы для ТСХ-анализа. Соединения, присутствующие в пиках с 6 по 9, гасили свечение флуорофора при 312 нм (рис. 3*б*), а также реагировали с нитрофенилдиазонийхлоридом (рис. 3*в*). Соединения, присутствующие в пиках с 1 по 5, положительную реакцию с диазотированным нитроанилином не давали (рис. 3*в*), также, как и с диазониевой солью Fast Blue RR (данные не представлены). ВЭЖХ-анализ был проведен для экстрактов из нескольких сортов, на всех хроматограммах присутствовало 4 или более пика, соответствующих соединениям, дающим положительную реакцию на принадлежность к классу резорциновых липидов, время удерживания которых составляло более 13 мин. Таким образом, ТСХ- и ВЭЖХ-анализы экстракта выявили наличие неидентифицированных сопутствующих соединений, которые, однако, не мешали спектрофотометрическому определению содержания АР.

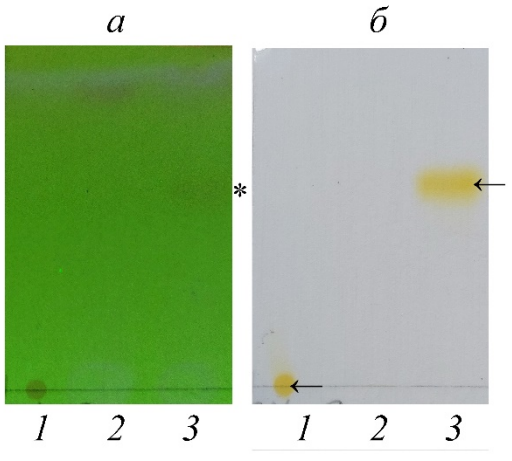


Рис. 2. ТСХ-анализ катехина (*1*), экстракта из манной крупы (*2*), экстракта из ЦЗМ мягкой яровой пшеницы сорта Ситара (*3*): *а* – флуоресценция при 312 нм, *б* – качественная реакция на резорциновые липиды. Стрелкой указана положительная реакция с нитрофенилдиазонийхлоридом, звездочкой – гашение свечения флуорофора АР

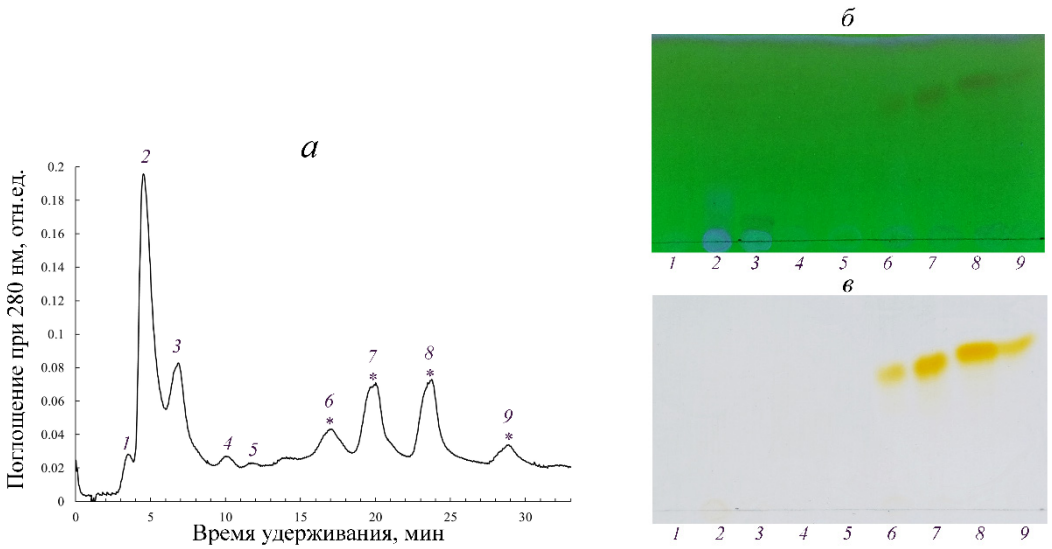


Рис. 3. ВЭЖХ экстракта из ЦЗМ мягкой яровой пшеницы сорта Ситара (*а*) и ТСХ-анализ (*б, в*) фракций, собранных при проведении ВЭЖХ (пики 1–9): флуоресценция при 312 нм (*б*), качественная реакция на резорциновые липиды (*в*). *1–9* – фракции с 1 по 9. Звездочками на хроматограмме (*а*) отмечены фракции, прореагировавшие положительно (*в*)

Подбор оптимального времени для спектрофотометрического измерения алкилрезорцинолов и построение калибровочной кривой. Спектр поглощения продукта реакции орсинола с солью Fast Blue RR в течение получаса оставался сходным (данные не представлены), оптическая плотность раствора комплекса АР с реактивом Fast Blue RR достоверно не изменялась (рис. 4), однако наблюдали тенденцию к снижению значений оптической плотности к 60 мин после добавления реактива, поэтому период от 10 до 30 мин был выбран как оптимальный для спектрофотометрических измерений.

Для диапазона концентраций орсинола, где соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера (от 1 до 16 мкг/мл), была построена калибровочная кривая зависимости поглощения при λ_{max} (483 нм) от концентрации орсинола (рис. 5), на основании которой была построена апроксимирующая прямая (y=0.047x), величина достоверности апроксимации R^2 составила 0.995. В научной литературе содержание АР наиболее часто выражают в мкг/г сухого вещества, следует отметить, что вследствие значимого различия молекулярных масс стандартов и АР необходимо указывать в эквивалентах какого стандарта был сделан расчет (в нашем случае это орсинол).

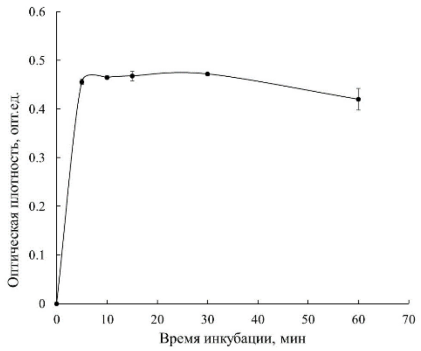


Рис. 4. Значения оптической плотности продукта реакции орсинола (10 мкг/мл) с солью Fast Blue RR при 483 нм через 5, 10, 15, 30 и 60 мин после смешивания компонентов реакционной смеси

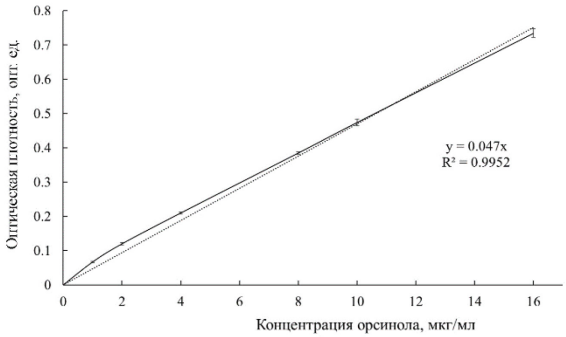


Рис. 5. Калибровочная кривая для определения содержания АР. Пунктирной линией отмечена линия тренда для калибровочной кривой. Коэффициент корреляции и уравнение регрессии представлены на рисунке

Верификация спектрофотометрического метода методом ВЭЖХ. Сравнительный анализ значений содержания АР не выявил существенных различий между данными, полученными спектрофотометрическим и хроматографическим методами (табл.). Было отмечено, что данные по содержанию АР в ЦЗМ всех изученных сортов пшеницы, определенные методом ВЭЖХ, имели большее значение по сравнению с данными, полученными спектрофотометрическим методом. Интересно, что аналогичные результаты были получены при сравнении результатов, полученных с использованием ГХ и спектрофотометрического метода с использованием Fast Blue B [7]. Вероятно, это связано с более высокой чувствительностью ГХ и ВЭЖХ по сравнению со спектрофотометрическим методом.

Между двумя методами была выявлена высокая корреляция ($r=0.955$, $p\leq0.001$, рис. 6). Таким образом, спектрофотометрический метод с использованием диазониевой соли Fast Blue RR может быть применен как быстрый, недорогой и простой в исполнении метод для оценки содержания АР в образцах ЦЗМ.

Содержание АР в зерне мягкой яровой пшеницы, определенное различными методами

Сорт	Содержание АР, мкг-экв. орсинола/г сухого веса	
	Спектрофотометрический метод	ВЭЖХ
Arrino	110.3±2.5	120.8±2.3
Йолдыз	151.7±4.7	176.8±13.0
Ситара	198.2±6.4	218.0±5.7

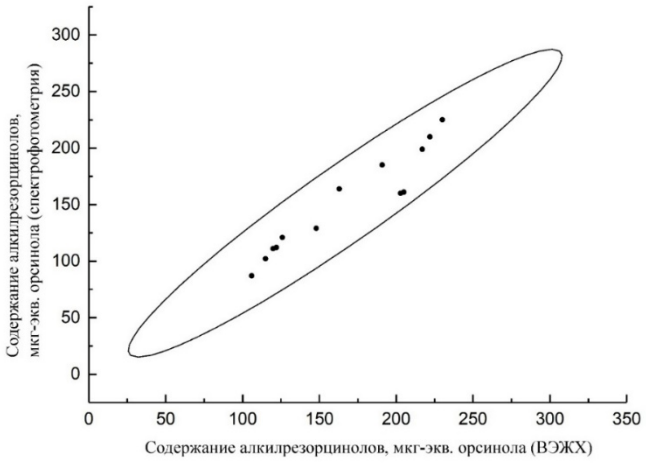


Рис. 6. Корреляция между данными по содержанию АР в ЦЗМ мягкой яровой пшеницы, полученными методом ВЭЖХ (ось абсцисс) и спектрофотометрическим методом (ось ординат)

Заключение

Для выделения АР из зерна мягкой яровой пшеницы используется 100% ацетон, для последующего спектрофотометрического определения АР используют ре-экстрагирование высушенного экстракта безводным метанолом. Такая последовательность является оптимальной для снижения количества сопутствующих соединений, некоторые из них могут влиять на спектрофотометрическое определение АР.

Для обнаружения и количественного анализа АР в зерне и в продуктах питания в качестве экспресс-метода могут быть использованы методы ТСХ и спектрофотометрии, которые основаны на свойствах АР вступать в реакцию азосочетания с солями диазония с образованием окрашенных продуктов. Было подобрано оптимальное время для спектрофотометрических измерений продуктов реакции между АР и солью диазония Fast Blue RR (от 10 до 30 мин), определен диапазон концентраций АР (от 2 до 16 мкг/мл), где соблюдался закон Бугера-Ламберта-Бера. Была выявлена сходимость данных, полученных методами ВЭЖХ и спектрофотометрии.

Установлено, что катехин, входящий в состав ПА семенной оболочки краснозерных сортов или присутствующий в свободной форме в зерне белозерных сортов, может вступать в реакцию азосочетания. В данной статье описана процедура извлечения и определения содержания АР, при которой ПА и их мономеры не оказывают влияния на спектрофотометрическое определение содержания АР. Перед применением данного метода на других объектах или при использовании других экстрагирующих веществ мы рекомендуем проводить анализ на присутствие сопутствующих соединений (примесей) фенольной природы, в первую очередь ПА и свободных катехинов.

Дополнительная информация
В электронном приложении к статье (DOI: https://www.doi.org/10.14258/jcprm.20260318034s) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Благодарности
Авторы благодарят сотрудников лаборатории селекции яровой пшеницы ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН за предоставленные для анализа образцы зерна.

Финансирование
Данная работа выполнена при финансовой поддержке Госзадания Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН.

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. Kozubek A., Tyman J.H.P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity // Chem. Rev. 1999. Vol. 99, no. 1. Pp. 1–26. https://doi.org/10.1021/cr970464o.
2. Zabolotneva A.A., Shatova O.P., Sadova A.A., Shestopalov A.V., Roumiantsev S.A. An overview of alkylresorcinols biological properties and effects // J. Nutr. Metab. 2022. Vol. 2022. Pp. 1–12. https://doi.org/10.1155/2022/4667607.
3. Martins T.P. et al. Chemistry, bioactivity and biosynthesis of cyanobacterial alkylresorcinols // Nat. Prod. Rep. 2019. Vol. 36, no. 10. Pp. 1437–1461.
4. Magnucka E.G., Oksińska M.P., Pietr S.J. The role of resorcinolic lipids of caryopsis surface in the process of cereal infection by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium culmorum* // Applied Sciences. 2022. Vol. 12, no. 15. 7735. https://doi.org/10.3390/app12157735.
5. Kruk J., Aboul-Enein B., Bernstein J., Marchlewicz M. Dietary alkylresorcinols and cancer prevention: a systematic review // Eur Food Res Technol. 2017. Vol. 243, no. 10. Pp. 1693–1710. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2890-6.
6. Landberg R., Kamal-Eldin A., Salmenkallio-Marttila M., Rouau X., Åman P. Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels // Journal of Cereal Science. 2008. Vol. 48, no. 2. Pp. 401–406. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.013.
7. Andersson A.A.M., Kamal-Eldin A., Fraś A., Boros D., Åman P. Alkylresorcinols in wheat varieties in the HEALTHGRAIN Diversity Screen // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56. Pp. 9722–9725. https://doi.org/10.1021/jf8011344.
8. Zabolotneva A.A., Gaponov A.M., Roumiantsev S.A. et al. Alkylresorcinols as new modulators of the metabolic activity of the gut microbiota // IJMS. 2023. Vol. 24, no 18. 14206. https://doi.org/10.3390/ijms241814206.
9. Oishi K., Yamamoto S., Itoh N., Nakao R., Yasumoto Y., Tanaka K., Kikuchi Y., Fukudome S., Okita K., Takano-Ishikawa Y. Wheat alkylresorcinols suppress high-fat, high-sucrose diet-induced obesity and glucose intolerance by increasing insulin sensitivity and cholesterol excretion in male mice // J. Nutr. 2015. Vol. 145, no. 2. Pp. 199–206. https://doi.org/10.3945/jn.114.202754.
10. Landberg R., Marklund M., Kamal-Eldin A., Åman P. An update on alkylresorcinols – Occurrence, bioavailability, bioactivity and utility as biomarkers // J. Funct. Foods. 2014. Vol. 7. Pp. 77–89. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.004.
11. Sampietro D.A., Vattuone M.A., Catalán C.A.N. A new colorimetric method for determination of alkylresorcinols in ground and whole-cereal grains using the diazonium salt Fast Blue RR // Food Chemistry. 2009. Vol. 115, no. 3. Pp. 1170–1174. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.086.
12. Tluscik F., Kozubek A., Mejbaum-Katzenellenbogen W. Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B // Acta Soc. Bot. Pol. 1981. Vol. 50, no. 4. Pp. 645–651.
13. Sampietro D.A., Jimenez C.M., Belizán M.M., Vattuone M.A., Catalán C.A.N. Development and validation of a micromethod for fast quantification of 5-n-alkylresorcinols in grains and whole grain products // Food Chemistry. 2013. Vol. 141, no. 4. Pp. 3546–3551. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.069.
14. Vaughan S.P., Baker J.M., Primavesi L.F. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in the developing wheat seed coat investigated by chemical and RNA-Seq analysis // Plant Direct. 2022. Vol. 6, no. 10. e453. https://doi.org/10.1002/pld3.453.
15. Румянцева Н.И., Валиева А.И., Акулов А.Н., Асхадуллин Дан.Ф., Асхадуллин Дам.Ф., Василова Н.З. Влияние засухи и высоких температур на урожайность и качество зерна фиолетовозерных линий яровой мягкой пшеницы // Биомика. 2021. Т. 13, №3. С. 254–273. https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-17.

16. Li Y.-G., Tanner G., Larkin P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes // J. Sci. Food Agric. 1996. Vol. 70, no. 1. Pp. 89–101. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1%253C89::AID-JSFA470%253E3.0.CO;2-N.
17. Waldi D. Spray reagents for Thin-Layer Chromatography // Thin-Layer Chromatography. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1965. Pp. 483–502.
18. Elder A.S., Coupland J.N., Elias R.J. Effect of alkyl chain length on the antioxidant activity of alkylresorcinol homologues in bulk oils and oil-in-water emulsions // Food Chemistry. 2021. Vol. 346. 128885. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128885.
19. Zarnowski R., Suzuki Y. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains // Journal of Food Composition and Analysis. 2004. Vol. 17, no. 5. Pp. 649–663. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.007.
20. Dey P.M., Harborne J.B. Methods in plant biochemistry. London, San Diego, New York: Academic press, 1989. 565 p.
21. Kallithraka S., Garcia-Viguera C., Bridle P., Bakker J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics // Phytochemical Analysis. 1995. Vol. 6, no 5. Pp. 265–267. https://doi.org/10.1002/pca.2800060509.
22. Ross A.B., Åman P., Andersson R., Kamal-Eldin A. Chromatographic analysis of alkylresorcinols and their metabolites // Journal of Chromatography A. 2004. Vol. 1054, no. 1–2. Pp. 157–164. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.020.

Поступила в редакцию 14 октября 2025 г.

После переработки 19 ноября 2025 г.

Принята к публикации 25 ноября 2025 г.

Valieva A.I.[*], *Akulov A.N., Rumyantseva N.I.* THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ALKYLRESORCINOLS IN GRAIN OF BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, str. Lobachevskogo, 2/31, Kazan, 420111, Russia, cell-culture@yandex.ru

Alkylresorcinols (ARs) are phenolic lipids localized in the outer layers of wheat grains. ARs present in whole-grain products exert beneficial effects on lipid metabolism regulation. The determination of alkylresorcinol (AR) content in grains is crucial for selecting wheat varieties that support functional nutrition and for assessing the quality of whole-grain foods. Spectrophotometric determination of AR content in wheat grains using Fast Blue RR diazonium salt is suitable for rapid, routine analysis. However, its application requires evaluation of potential interference from other phenolic compounds (PCs) present in the grain. In this study the optimal conditions for the spectrophotometric determination of ARs in whole wheat flour (WWF) of red grain bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties containing proanthocyanidins (PAs) were established. For the first time, we evaluated the ability of various wheat grain PCs to form colored complexes with the diazonium salt Fast Blue RR. It was found that catechin, the primary subunit of wheat PAs, reacts with Fast Blue RR and may affect the spectrophotometric determination of ARs when its concentration in the extract exceeds 5 μg/mL. It was shown that co-extracted compounds obtained from wheat grain using anhydrous acetone do not significantly affect the spectrophotometric quantification of ARs under the optimized analytical conditions. It is recommended to perform a preliminary screening of plant extracts for the content of free catechins and/or PAs to avoid potential effects when applying this spectrophotometric method. A strong correlation ($r = 0.955$, $p \leq 0.001$) was observed between the results obtained by HPLC and spectrophotometry for the quantitative analysis of AR in WWF.

Keywords: *Triticum aestivum*, alkylresorcinols, HPLC, catechin, proanthocyanidins, spectrophotometry, Fast Blue RR.

For citing: Valieva A.I., Akulov A.N., Rumyantseva N.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2026, no. 3, pp. 220–229. (in Russ.). https://doi.org/10.14258/jcprm.20260318034.

References

1. Kozubek A., Tyman J.H.P. *Chem. Rev*., 1999, vol. 99, no. 1, pp. 1–26. https://doi.org/10.1021/cr970464o.
2. Zabolotneva A.A., Shatova O.P., Sadova A.A., Shestopalov A.V., Roumiantsev S.A. *J. Nutr. Metab*., 2022, vol. 2022, pp. 1–12. https://doi.org/10.1155/2022/4667607.
3. Martins T.P. et al. *Nat. Prod. Rep*., 2019, vol. 36, no. 10, pp. 1437–1461.
4. Magnucka E.G., Oksińska M.P., Pietr S.J. *Applied Sciences*, 2022, vol. 12, no. 15, 7735. https://doi.org/10.3390/app12157735.
5. Kruk J., Aboul-Enein B., Bernstein J., Marchlewicz M. *Eur Food Res Technol*., 2017, vol. 243, no. 10, pp. 1693–1710. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2890-6.

[*] Corresponding author.

6. Landberg R., Kamal-Eldin A., Salmenkallio-Marttila M., Rouau X., Åman P. *Journal of Cereal Science*, 2008, vol. 48, no. 2, pp. 401–406. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.013.
7. Andersson A.A.M., Kamal-Eldin A., Fraś A., Boros D., Åman P. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 9722–9725. https://doi.org/10.1021/jf8011344.
8. Zabolotneva A.A., Gaponov A.M., Roumiantsev S.A. et al. *IJMS*, 2023, vol. 24, no 18, 14206. https://doi.org/10.3390/ijms241814206.
9. Oishi K., Yamamoto S., Itoh N., Nakao R., Yasumoto Y., Tanaka K., Kikuchi Y., Fukudome S., Okita K., Takano-Ishikawa Y. *J. Nutr.*, 2015, vol. 145, no. 2, pp. 199–206. https://doi.org/10.3945/jn.114.202754.
10. Landberg R., Marklund M., Kamal-Eldin A., Åman P. *J. Funct. Foods*, 2014, vol. 7, pp. 77–89. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.004.
11. Sampietro D.A., Vattuone M.A., Catalán C.A.N. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 3, pp. 1170–1174. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.086.
12. Tluscik F., Kozubek A., Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Soc. Bot. Pol*., 1981, vol. 50, no. 4, pp. 645–651.
13. Sampietro D.A., Jimenez C.M., Belizán M.M., Vattuone M.A., Catalán C.A.N. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 4, pp. 3546–3551. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.069.
14. Vaughan S.P., Baker J.M., Primavesi L.F. et al. *Plant Direct*, 2022, vol. 6, no. 10, e453. https://doi.org/10.1002/pld3.453.
15. Rumyantseva N.I., Valiyeva A.I., Akulov A.N., Askhadullin Dan.F., Askhadullin Dam.F., Vasilova N.Z. *Biomika*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 254–273. https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-17. (in Russ.).
16. Li Y.-G., Tanner G., Larkin P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes // J. Sci. Food Agric. 1996, vol. 70, no. 1, pp. 89–101. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1%253C89::AID-JSFA470%253E3.0.CO;2-N.
17. Waldi D. *Thin-Layer Chromatography*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1965, pp. 483–502.
18. Elder A.S., Coupland J.N., Elias R.J. *Food Chemistry*, 2021, vol. 346, 128885. https://doi.org/10.1016/j.food-chem.2020.128885.
19. Zarnowski R., Suzuki Y. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, vol. 17, no. 5, pp. 649–663. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.007.
20. Dey P.M., Harborne J.B. *Methods in plant biochemistry*. London, San Diego, New York: Academic press, 1989, 565 p.
21. Kallithraka S., Garcia-Viguera C., Bridle P., Bakker J. *Phytochemical Analysis*, 1995, vol. 6, no 5, pp. 265–267. https://doi.org/10.1002/pca.2800060509.
22. Ross A.B., Åman P., Andersson R., Kamal-Eldin A. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, no. 1–2, pp. 157–164. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.020.

Received October 14, 2025

Revised November 19, 2025

Accepted November 25, 2025

Сведения об авторах

Валиева Альфия Исмагильевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник группы «Биология клеток *in vitro*», cell-culture@yandex.ru

Акулов Антон Николаевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы «Биология клеток *in vitro*», akulov_anton@mail.ru

Румянцева Наталья Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая группой «Биология клеток *in vitro*», nat_rumyantseva@mail.ru

Information about authors

Valieva Alfiya Ismagilovna – Candidate of Biological Sciences, Researcher, "Cell Biology *in vitro*" Group, cell-culture@yandex.ru

Akulov Anton Nikolaevich – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, "Cell Biology *in vitro*" Group, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, akulov_anton@mail.ru

Rumyantseva Natalia Ivanovna – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Head of the "Cell Biology *in vitro*" Group, nat_rumyantseva@mail.ru