

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ
РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Магистерская диссертация
обучающегося по направлению подготовки 04.04.01 Химия. очной формы
обучения, группы 07001640
Олейниц Елены Юрьевны

Научный руководитель
д.х.н., профессор
Дейнека В.И.

Рецензент
Заведующий лабораторией
селекции декоративных культур
НОЦ «Ботанический сад НИУ
«БелГУ», к.б.н.
Третьяков М.Ю

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 7 |
| 1.1 Фенольные кислоты и их классификация | 7 |
| 1.2 Методы определения фенольных кислот | 10 |
| 1.2.1 ТСХ..... | 11 |
| 1.2.2 Капиллярный электрофорез..... | 12 |
| 1.2.3 Хроматографические методы | 12 |
| 1.3 Антиоксидантная активность фенольных кислот и их источников | 13 |
| 1.4 Методы определения антиоксидантной активности (АОА) фенольных соединений..... | 16 |
| II ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 20 |
| 2.1 Объекты исследования | 20 |
| 2.2 Методика разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ..... | 20 |
| 2.3 Методика очистки хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции | 22 |
| 2.4 Методика определения фенольных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ..... | 23 |
| 2.5 Методика определения АОА по реактиву Фолина-Чокальтеу | 24 |
| 2.6 Методика определения АОА по гашению свободных радикалов дифенилпикрилгидразилом (DPPH)..... | 26 |
| III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ | 27 |
| 3.1 Разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ..... | 27 |
| 3.2 Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции..... | 31 |
| 3.3 Определение фенольных соединений в растительных объектах..... | 36 |
| 3.3.1 Определение антоцианов в лепестках цветков гибискуса суданского и гибискуса розы китайской | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Определение антоцианов и других фенольных соединений растительного материала Иван-чая..... | 37 |
| 3.4 Сопоставление АОА настоев растительных объектов..... | 39 |
| 3.4.1 Определение АОА настоев иван-чая | 39 |
| 3.4.2 Определение АОА настоев из растений семейства мальвовые (Malvaceae)..... | 41 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 43 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 44 |

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, природные фенольные соединения являются важнейшими вторичными метаболитами, которые в растительной продукции отвечают не только за антиоксидантную активность (АОА), но и за ряд других не менее важных функций. Одним из представителей фенольных соединений является кофейная кислота. Исследования показывают, что кофейная кислота обладает биологически активными свойствами, поэтому тормозит развитие канцерогенеза, а также проявляет иммуномодулирующую и противовоспалительную активность.

Фрагменты, входящие в структуры халконов, антоцианов, флавоноидов, а именно гидроксильные группы, обеспечивают фенольным соединениям антиоксидантные свойства. Известно, что вещества, содержащие орто-ОН-группы, обладают более высокой АОА по сравнению с теми веществами, у которых данный фрагмент отсутствует.

Роль фенольных кислот в суммарной АОА растительных объектов и продуктов на их основе может в значительной степени определяться такими фенольными кислотами, как кофейная кислота и ее сложные эфиры, например, хлорогеновая, цикоревая, кафтаровая и розмариновая кислоты. Все они имеют орто-ОН-группы, которые обуславливают высокую АОА.

Существует множество работ, посвященных исследованию хлорогеновой кислоты, однако в ряде случаев хлорогеновая кислота рассматривается как обобщенное название продуктов этерификации хинной кислоты замещенными коричневыми кислотами. При этом даже среди моноэфиров кофейной кислоты может быть 4 изомера, из которых отмечают 3 реально встречающихся: 3-кофеилхинная, 4-кофеилхинная и 5-кофеилхинная (хлорогеновая) кислоты. Стоит отметить, что в некоторых работах нумерацию атомов С в хинной кислоте проводят в другом направлении, поэтому хлорогеновая кислота в них - 3CQA, что вносит

определенную путаницу. Этому разночтению можно избежать в случае указания авторами графической формулы вещества.

По литературным данным хлорогеновая кислота рассматривается как регулятор ростовых процессов, как защитный фактор по отношению к некоторым микроорганизмам, а также наряду с кофейной обладает гепатопротекторной и нейропротекторной способностью [1]. Хлорогеновые (как и кофейная) кислоты являются сильными антиоксидантами [2,3,4]. Благодаря высокой концентрации хлорогеновых кислот кофе обладает большей антиоксидантной активностью [5 – 7] нежели какао, зеленый, черный и травяные чаи, а также фруктовые соки [8]. Поскольку в радикале кофейной кислоты содержится пара орто-ОН-групп, она обладает антиоксидантным действием. Для любителей кофе этот напиток является основным источником антиоксидантов.

Еще одной особенностью публикаций по разделению хлорогеновых кислот является тот факт, что порядок элюирования 3CQA, 4CQA и 5CQA с использованием метода обращенно-фазовой хроматографии не одинаков для различных условий [9-21].

По этим причинам экстракция, очистка и концентрирование ХК являются важными технологическими операциями в производственных схемах и при их определении в исходном растительном материале, а определение АОА растительных объектов и продуктов на их основе (таких как кофе, чай и соки) – одно из приоритетных направлений в изучении фенольных соединений.

В связи с этим **целью настоящей работы** является разработка и усовершенствование методов определения фенольных кислот на основе исследования хлорогеновых кислот и других фенольных соединений.

Для достижения поставленной цели на данном этапе предполагается решение следующих **задач**:

- 1) Определение условий разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

- 2) Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции.
- 3) Оценка содержания фенольных соединений в избранных объектах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ
- 4) Оценка содержания фенольных соединений в избранных объектах по методу Фолина-Чокальтеу.
- 5) Оценка антирадикальной активности в этих же объектах по гашению свободных радикалов DPPH.

I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фенольные кислоты и их классификация

Фенольные соединения – вещества ароматического класса соединений, содержащие одну и более гидроксильных групп, соединенных непосредственно с бензольным кольцом. В зависимости от количества атомов гидроксила в молекуле различают фенолы и полифенолы.

Для фенольных соединений характерно образование гликозидов, метилирование и метоксилирование. Благодаря наличию гидроксильных и карбоксильных групп обуславливается способность фенольных соединений связываться с органическими кислотами, сахарами, алкалоидами и растительными амидами.

Многообразие свойств обеспечивает наличие огромного количества фенольных соединений, известных в настоящее время. В связи с этим фенольные соединения имеют обширную классификацию.

Что касается природных фенольных соединений, то ни для кого не секрет, что они являются важнейшими вторичными метаболитами, которые в растительной продукции отвечают не только за антиоксидантную активность, но и за ряд других не менее важных функций. Классификации природных фенолов разнообразны, однако в их основе лежит биогенетический принцип, поэтому их можно разбить на несколько групп, которые бы отвечали современным представлениям о биосинтезе:

- соединения C_6 - ряда — простые фенолы;
- соединения C_6 — C_1 - ряда — производные бензойной кислоты (фенольные кислоты);
- соединения C_6 — C_2 - ряда — фенолоспирты и фенилуксусные кислоты;

- соединения $C_6—C_3$ - ряда — производные фенилпропана (оксикоричные кислоты и спирты); и т.д.

Особый интерес представляют фенольные кислоты. Данные соединения хорошо растворимы в горячей воде, но сравнительно плохо растворяются в холодной воде. Также стоит отметить, что рост числа фенольных гидроксиллов увеличивает растворимость фенольных кислот.

Фенольные кислоты подразделяются на два класса: гидроксibenзойные кислоты и гидроксикоричные кислоты, которые образуются благодаря бензойной кислоты и коричной кислоты, соответственно. Тривиальные названия некоторых фенольных кислот [22] представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1.

Некоторые природные фенольные кислоты

Фенольные кислоты — это кристаллические соединения, мало растворимые в воде и хорошо — в спирте, а также в других органических растворителях [23].

Фенольные кислоты являются промежуточными соединениями в цепи биосинтеза фенольных соединений, которые накапливаются во фруктах и овощах (антоцианы, лигнин, танины) [24, 25]. Они широко распространены в таких продуктах питания как: фрукты, овощи, кофе, вино, соки, чай и даже оливковое масло. Причем данные вещества могут встречаться как в индивидуальном состоянии, так и в виде эфиров с некоторыми карбоновыми водорастворимыми кислотами, сахарами, и липидами [26-28].

Одним из представителей этого класса является кофейная кислота (3,4-диоксикоричная кислота) — двухатомный фенол, ароматическое органическое соединение. Так как она является промежуточным продуктом в биосинтезе лигнина, то содержится во всех растениях.

Исследования показывают, что кофейная кислота обладает биологически активными свойствами, поэтому, тормозит канцерогенез, также проявляет иммуномодулирующую и противовоспалительную активность.

Особый интерес представляют эфиры фенольных и не фенольных соединений. Примеры таких соединений: хлорогеновая, цикориевая, кафтаровая, розмариновая кислоты.

Хлорогеновые кислоты синтезируются во многих растениях [29, 30]. В ряде случаев хлорогеновая кислота рассматривается как обобщенное название продуктов этерификации хинной кислоты замещенными коричневыми кислотами (рис.1.1).

Как уже отмечалось ранее, наличие в структуре *орто*-гидроксильных групп [31], обуславливает высокую антиоксидантную активность хлорогеновых кислот, что и определяет интерес к данным соединениям и к их источникам [32]. Однако существуют серьезные разночтения в названиях этих соединений не только в отечественной, но и в иностранной литературе [33, 34].

Рис. 1.1. Реакция этерификации хинной кислоты

Во-первых, под хлорогеновыми кислотами в широком смысле понимают не одно соединение, а группу эфиров хинной кислоты с замещенными коричневыми кислотами, хотя во множестве публикаций под хлорогеновой кислотой имеют ввиду 5-кофеоилхинную кислоту (5CQA). Во-вторых, по правилам ИЮПАК [35] нумерацию атомов углерода в хинной кислоте следует проводить согласно представленному варианту на рис.1.2.

Рис.1.2. Нумерация атомов углерода в хлорогеновой кислоте, принятая ИЮПАК

Однако в ряде публикаций нумерация атомов углерода осуществляется в обратном порядке. Так известнейший поставщик реактивов, – фирма SIGMA-ALDRICH, 5-кофеоилхинной кислоте присваивает название 3-*O*-

(*trans*-3,4-dihydroxycinnamoyl)-D-quinic acid, *trans*-3-*O*-caffeoylquinic acid (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c3878?lang=en®ion=RU>) (рис.1.3.) что, возможно, и является причиной путаницы.

Рис. 1.3. Структура хлорогеновой кислоты по версии фирмы SIGMA-ALDRICH

Среди монокофеоилхинных кислот должно существовать 4 изомера 1CQA, 3CQA, 4CQA и 5CQA (рис. 1.4.). Однако в природе существует три реально встречающихся изомера. Они обычно обнаруживаются в растениях, но не всегда вместе. Благодаря этому изомеры хлорогеновой кислоты получили специфические названия 3CQA – неохлорогеновая кислота, 4CQA – криптохлорогеновая, а за 5CQA (за самой распространенной в природе) оставлено название просто хлорогеновая. Имеются сведения об обнаружении 1CQA [33], для которой предложено название псевдохлорогеновая. 3CQA, 4CQA и 5CQA одновременно синтезируются в семенах кофе (в зеленом кофе – до 14% в пересчете на сухой материал [34]), сохраняются в обжаренных семенах, правда к ним при жарке добавляется группа лактонов [35].

1.2 Методы определения фенольных кислот

Вследствие хорошей растворимости фенольных кислот в воде, они легко экстрагируются, однако на ряду с ними экстрагируются и другие сопутствующие вещества, что затрудняет их определение и последующее разделение самих кислот на индивидуальные вещества. В связи с этим существует много методов обнаружения и определения фенольных кислот в растительных объектах.

1.2.1 ТСХ

Достаточно быстрым и распространенным методом определения фенольных кислот в различных растительных материалах, а также лекарственных экстрактах является ТСХ [36, 37]. В большинстве случаев в качестве неподвижной фазы используют силикагель или целлюлозу в элюентах, содержащих толуол, диоксан или бензол и полярные органические модификаторы (ацетон, бутанол, этанол или уксусная кислота). Пятна фенольных кислот на пластине обнаруживают в УФ свете (350–365 нм или 250–260 нм). Также для определения фенольных кислот используют двухмерную ТСХ [38]. Этот вариант отличается от предыдущего тем, что в отличие от одномерной ТСХ в двухмерной ТСХ используют два направления элюирования (рис. 1.5.).

1.2.2 Капиллярный электрофорез

Для определения фенольных кислот также используют метод капиллярного электрофореза. При этом (с целью увеличения степени ионизации кислот), применяют щелочные, фосфатный или боратный буферы, капилляры с внутренним диаметром 50 – 100 мкм при напряжении 10-30 кВ. Для дальнейшего определения разделенных ионов используют спектрофотометрические или масс-спектрометрические детекторы [39].

Так как все фенольные кислоты имеют схожую структуру, то для их разделения при анализе методом капиллярного зонного электрофореза в буферный электролит требуется добавка циклодекстрина [40] или органического растворителя [41].

1.2.3 Хроматографические методы

Еще одним методом определения фенольных кислот является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ). Однако стоит заметить, что данный метод не пользуется большой популярностью как, например, ВЭЖХ, так как для хроматографирование в условиях ГЖХ требует наличия термически устойчивых производных. Для детектирования в газовой хроматографии применяют пламенно-ионизационный или масс-спектрометрический детекторы.

Как уже отмечалось ранее, наиболее распространенным методом определения фенольных кислот является ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте. Данный метод предпочтительнее других в основном благодаря его высокой чувствительности и селективности. В работе с фенольными кислотами может быть использована ОФ ВЭЖХ как в градиентном режиме, так и в изократическом. Различием этих двух режимов является то, что в случае последнего в течение всего процесса разделения состав подвижной фазы и остальные условия хроматографирования остаются постоянными, тогда как в градиентном режиме могут изменяться такие параметры, как:

состав подвижной фазы, температуры разделения, скорость потока подвижной фазы. Помимо различных режимов в ОФ ВЭЖХ могут быть использованы различные стационарные фазы, начиная от C2 и заканчивая C18, которая является наиболее часто используемой.

Для обнаружения и количественного определения фенольных кислот используют УФ детекторы [41, 42], так как большинство производных бензойных кислот имеют максимум поглощения от 246–262 нм (исключение представляют собой галловая и сиреневая кислоты с максимумом поглощением в 271 и 275 нм, соответственно). Коричные кислоты поглощают в двух диапазонах: 225–235 и 290–330 нм. Для этих же целей также используются флуоресцентное, диодно-матричное и масс-спектрометрическое детектирования [43-47].

Особенностью разделения фенольных кислот, и не только, является обращение порядка элюирования при изменении состава подвижной фазы. Это явление довольно часто встречается в обращенно-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ), хотя разделение изомеров в методе не характерно. В случае изомерных хлорогеновых кислот во всех работах удерживание 3CQA всегда существенно меньше, чем 4CQA и 5CQA. При этом времена удерживания в большем числе опубликованных работ возрастают в ряду: 3CQA < 5CQA < 4CQA. Но в некоторых исследованиях указывается иная последовательность: 3CQA < 4CQA < 5CQA, и при этом известны работы, в которых 4CQA и 5CQA не разделяются, что указывает на необходимость оценки селективности разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ.

1.3 Антиоксидантная активность фенольных кислот и их источников

Тема свободных радикалов и реакционноспособных кислородсодержащих частиц продолжает привлекать повышенное внимание со стороны научного сообщества и все в большей степени заинтересовывает широкую общественность. Потребляемая нами пища и состояние

окружающей среды оказывают существенное влияние на биологическое производство свободных радикалов. Свободным радикалом считается химическое соединение, имеющее один или более неспаренных электронов, образованное в результате либо потери, либо приобретения одного электрона. Электрон, занимающий в единственном числе молекулярную или атомную орбиталь, называется неспаренным. Высокая реакционная способность радикалов приводит в физиологических условиях к ускорению процессов окисления, разрушающих молекулярную основу клетки, и вызывает в результате многочисленные патологические состояния.

Соединения, способные связывать содержащие неспаренные электроны частицы с образованием менее активных или вовсе неактивных радикалов, называют антиоксидантами. Установленным фактом является то, что наличие в структуре гидроксильных групп, особенно в *орто* положении, обуславливает антиоксидантную активность веществ. Такие фенольные соединения, как производные бензойной (рис. 1.6) и коричных кислот содержат в своей структуре гидроксильные группы (рис. 1.7), (также см. табл. 1.1) что указывает на их способность проявлять антирадикальную активность.

Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние, поэтому антиоксиданты и исследование антиокислительных свойств соединений в последнее время получили широкое распространение. Наиболее перспективными источниками антиоксидантов считаются растительные объекты.

Для любителей кофе этот напиток является прекрасным источником антиоксидантов. По результатам исследования в нашей лаборатории в зеленом кофе хлорогеновой кислоты содержится порядка 12 г/ 100г напитка. Однако это не единственный объект, содержащий хлорогеновые кислоты и другие фенольные соединения.

К примеру, чай Матэ в сравнении с кофе обладает большей АОА. Мате

готовят из высушенных измельченных листьев и молодых побегов падуба парагвайского (*Ilex paraguariensis*). Данный напиток содержит дубильные вещества, пантотеновую кислоту, бета-каротин, витамины группы В, витамины Е, С, Р, ксантиновые алколоиды, натрий, серу, калий, магний, железо, марганец и медь. Кроме того в мате обнаружено уникальное вещество матеин. Это безопасный природный стимулятор, который по воздействию можно сравнивать с кофеином. Матеин способен повышать общий тонус, при этом не учащая сердцебиение и не вызывая перевозбуждение [48].

Еще одним набирающим популярность напитком является Иван-чай. Иван-чай узколистый (кипрей узколистый, копорский чай) – многолетнее растение, имеющее два латинских названия *Chamerion angustifolium* и *Epilobium angustifolium* из семейства кипрейные (*Onagraceae*). Типовой вид рода иван-чай (*Chamerion*) во многих классификациях включают в состав рода Кипрей (*Epilobium*) [49, 50]. Произрастает по всему Северному полушарию, и в том числе на территории России: чаще в полосе хвойных лесов европейской части и в Сибири. В России в XIX веке иван-чай производили в больших количествах, импортируя его во многие страны, включая Англию. В настоящее время интерес к почти забытому напитку возродился – появились много производителей, предлагающих как сушеное сырье, так и ферментированный материал для приготовления целебных напитков.

Обычно отмечают, что благодаря высокому содержанию витамина С и большому количеству важнейших микроэлементов иван-чай обладает антиоксидантной активностью и противовоспалительными свойствами, препятствует ослаблению иммунитета, поддерживает здоровое пищеварение, а также оказывает профилактическое действие при онкологических заболеваниях [51].

Напиток из иван-чая получают путем заваривания растительного

материала в горячей воде, при котором происходит экстракция водорастворимых соединений. Многочисленные исследования показали, что данный растительный материал богат биологически активными соединениями [52, 53]. Считается, что именно экстрагируемые из растительного материала фенольные соединения отвечают за высокий терапевтический потенциал растения [52, 54, 55]. При этом существуют расхождения в информации о типе фенольных соединений, которые накапливаются в растении.

Так, например, в работе [56] методом ВЭЖХ в пяти коммерчески приобретенных образцах сухих экстрактов из надземной части растения были обнаружены аскорбиновая, галловая, протокатеховая и эллаговая кислоты, гиперозид (кверцетин-3-галактозид), кемпферол-3-глюкозид и октилгаллат. Содержание галловой кислоты составляет от 4.46 до 9.34 мг/г, гиперозида - от 2.82 до 3.53 мг/г, эллаговой кислоты от 0.59 до 1.18 мг/г и октилгаллата от 0.08 до 0.15 мг/г.

В другой работе [57], используя ТСХ, авторами в лиофилизированном экстракте были найдены 9.76 % гидроксикоричных кислот (неохлорогеновая, хлорогеновая, кофейная, розмариновая и *пара*-кумаровая), 11.92 % флавоноидов в пересчете на рутин (рутин, лютеолин, апигенин, изокверцетин и гиперозид) и 24.23 % таннинов в пересчете на пирогаллол и 20.3 % фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту.

1.4 Методы определения антиоксидантной активности (АОА) фенольных соединений

Как было ранее сказано, фенольные соединения обладают антиоксидантной активностью, поэтому содержащие их продукты являются объектами многих исследований. Следовательно, разработка методов определения АОА – одно из востребованных направлений в изучении фенольных соединений.

Для определения АОА используется большое количество разных методов, основанных на химических и физико-химических методах, которые преимущественно основаны на прямом или косвенном измерении полноты и скорости реакции [58].

Методы определения АОА основываются на потреблении кислорода, образовании продуктов окисления или на поглощении (или связывании) свободных радикалов.

Существуют спектрофотометрические методы определения АОА с помощью реактива Фентона, основанного на окислительно-восстановительной реакции Fe(III)/Fe(II), и с использованием реактива Фолина-Чокальтеу. Метод Фолина-Чокальтеу в биологии используется для условного количественного определения флавоноидов, но на самом деле основные компоненты реактива (гетерополисоединения молибдена и вольфрама) меняют окраску на синюю под действием любых восстановителей, а восстановители являются наиболее мощными антиоксидантами. Фенолы легко окисляются с образованием радикала, способным реагировать с молибдатом с образованием оксида молибдена MoO^{4+} , имеющего максимум поглощения при 700-750 нм [59]. Еще одним удобным и достаточно простым методом оценки антирадикальной активности является гашение свободных радикалов дифенипикрилгидроксидом (DPPH) (рис. 1.8).

Данный метод основан на обесцвечивании радикалов DPPH, а в качестве меры АОА используют концентрацию вещества, в некоторых стандартных условиях восстанавливающую половину свободных радикалов до бесцветного продукта [60]. Однако используя данный метод, необходимо учитывать и кинетическую составляющую [61]. В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии.

Методы исследования общей антиокислительной активности (АОА) различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, а результаты должны быть интерпретированы с осторожностью.

По способам регистрации проявляемой антиокислительной активности можно разделить методы на волюмометрические, фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические и ряд более специфических.

Другие используемые методы: по восстановлению антиоксидантами железа: (ferric reducing/antioxidant power-FRAP) [62] - позволяют прямое определение низкомолекулярных антиоксидантов. При низких рН восстановление Fe(III)-трипиридилтриазинового комплекса в Fe(II)-комплекс сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности антиоксидантов подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Этот метод отличается простотой, быстротой и небольшими затратами при исполнении.

Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам («Oxygen Radical Absorption Capacity»-ORAC) [63] основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия антиоксидантов.

Определение АОА по методу TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) основано на оценке общего восстановительного эффекта индивидуальных низкомолекулярных антиоксидантов, как гидрофильных, так и гидрофобных. Оно дает информацию о типах антиоксидантов и их концентрациях без точного качественного различия. Эти методы основаны изначально на оценке изменения окраски, в сравнении со стандартным соединением - Trolox.

Метод, основанный на поглощении кислородных радикалов (ORAC), - относительно простой и чувствительный, но длительный по времени (около 95 мин на определение) и требует наличия флуоресцентного детектора. Считается, что существует шесть наиболее вредных кислородных реакционноспособных частиц: пероксидные (ROO) и гидроксильный (OH) радикалы, супероксид-ион (O_2^-), синглетный кислород (1O_2), перекись водорода H_2O_2 и пероксинитрит ($OONO^{\cdot}$). Данный метод пригоден лишь для измерения АОА пока только против пероксидного и гидроксильного радикалов.

II ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

В работе в качестве объектов исследования были использованы 5-кофеоилхинная кислота (Chlorogenic acid hemihydrate, Aldrich); смесь трех изомерных кислот (3CQA, 4CQA и 5CQA), выделенная из экстракта зерен зеленого кофе, β -циклодекстрин (Китай); два фруктовых сока (вишневый и яблочный), три образца растворимого кофе и один – смеси растворимого с молотым, и напиток матэ.

Растительными объектами исследования оценки АОА являлись: зеленый чай, каркаде (сушеные лепестки бутонов гибискуса суданского), сухие цветки гибискуса розы китайской, иван-чай (Карелия, Алтай) – его цветки и надземная часть.

2.2 Методика разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В работе использовали 5-кофеоилхинную кислоту (Chlorogenic acid hemihydrate, Aldrich). Смесь трех изомерных кислот (3CQA, 4CQA и 5CQA) была выделена из экстракта зерен зеленого кофе. Для этого экстракт, полученный настаиванием размолотых зерен в 0.1 М водном растворе HCl, очищали на насадочных картриджах Диапак C18 (БиоХимМак СТ, Москва), пропуская 20 мл экстракта через два последовательно соединенных картриджа (для исключения проскока 3CQA). Сумму кислот реэкстрагировали, пропуская через картриджи 4 мл экстрагента (10 об.% ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в воде). Все три изомерные кислоты имели малоразличимые УФ-спектры (λ_{max} 325 – 326 нм) и идентичные масс-спектры ($m/z = 353.0$ для отрицательно заряженных ионов). Подтверждение правильности отнесения пика 3CQA было получено сопоставлением времен удерживания кислоты из смеси и основной

фенольной кислоты сока вишни [64]. Отнесение пика 4CQA было выполнено сопоставлением времен удерживания с литературными данными [65].

При определении хлорогеновых кислот в образцах растворимого кофе навески кофе растворяли стартовой в подвижной фазе и фильтровали через насадочный фильтр Phenex с диаметром пор 0.45 мкм. Экстракт «чая» мате получали настаиванием измельченного материала в том же растворителе с последующим отделением растительного остатка фильтрованием через насадочный фильтр. Образцы сока разбавляли тем же растворителем в соотношении 1:1 по объему.

Мертвое время колонки определяли по удерживанию щавелевой кислоты, характеризующейся меньшим значением параметра липофильности ($CLogP = -1.19 \pm 0.58$) по сравнению с урацилом ($CLogP = -0.71 \pm 0.29$). $CLogP$ были рассчитаны в программе ChemSketch 12.0.

Исследование хроматографического поведения хлорогеновых кислот проводили в изократических режимах с использованием хроматографической системы Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами на хроматографических колонках: K18 – 4.6×100 мм Kromasil 100-5C18 (5 мкм); K8 – 4.6×100 мм Kromasil 100-5C8 (5 мкм), K4 - 4.6×100 мм Kromasil 100-5C4 (5 мкм); 2K18 – 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18 (5 мкм); S18 – 4.6×150 мм Symmetry C18 (3.5 мкм); R18 - 4.6×150 мм Reprosil-Pur 5C18-AQ; 1Д18 – 4.6×250 мм Диасфер-110-5C18; 2Д18 – 4.0×100 мм Диасфер-110-5C18 и N18 – 4.0×250 мм Nucleosil RP-C18. Масс-спектры записывали в режиме ионизации электрораспылением при сканировании отрицательно заряженных ионов.

Определение хлорогеновых кислот в образцах растворимого кофе, напитка (чая) мате, в вишневом и яблочном соках осуществляли в градиентном режиме на колонке K18, защищенной предколонкой (4.6 × 10 мм, Kromasil 100-5C18). Подвижные фазы: А – 10 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде, Б - 40 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

Режим элюирования: 0 мин – 0 % Б, 10 мин – 0 % Б, 20 мин – 100 % Б, 21 мин – 0 % Б, 30 мин – 0 % Б. Хроматограммы записывали при 325 нм.

2.3 Методика очистки хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции

Зерна зеленого кофе измельчали на бытовой кофемолке, затем навеску массой 1.010 ± 0.010 г заливали 100 мл кипящей воды и настаивали в течение 10 мин при периодическом перемешивании. После охлаждения до комнатной температуры настой отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр.

Полученный экстракт смешивали с 0.1М водным раствором HCl в соотношении 3:7 (по объему) для спектрофотометрического анализа.

Концентрирование хлорогеновых кислот осуществляли методом твердофазной экстракции на насадочных картриджах (на концентрирующих патронах) ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Москва, РФ). Для этого патрон активировали, пропуская 5 – 7 мл ацетона со скоростью 2 – 3 капли в секунду, затем кондиционировали, пропуская 15 – 20 мл 0.1 М водного раствора HCl. Сорбцию осуществляли на первом этапе, пропуская экстракт порциями по 2 мл со скоростью 2 – 3 капли в секунду, собирая элюат в отдельные емкости для последующего исследования элюата спектрофотометрическим и хроматографическим методами. Для десорбции в меньшем объеме готовили экстрагенты на основе ацетонитрила и муравьиной кислоты, содержащие втрое большую концентрацию ацетонитрила по сравнению с элюентом, используемым при последующем определении кислот методом ВЭЖХ, но перед ВЭЖХ для исключения артефактов элюаты разбавляли в три раза водой.

Для записи хроматограмм использовали хроматографическую систему Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хлорогеновые кислоты разделяли на хроматографической колонке 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18 с предколонкой 10×4.0 мм, заполненной таким же сорбентом.

Подвижные фазы на основе ацетонитрила: А - 8 об. % CH_3CN и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде, Б - 40 об. % CH_3CN и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде. Режим градиента: 0 мин – 0 % Б, 12 мин – 0 % Б, 22 мин – 100% Б, 23 мин – 0 % Б, 33 мин – 0 % Б.: на основе метанола: А - 16 об. % CH_3OH и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде, Б - 32 об. % CH_3CN и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде. Режим градиента: 0 мин – 0 % Б, 20 мин – 0 % Б, 30 мин – 100% Б, 31 мин – 0 % Б, 40 мин – 0 % Б. Скорость подачи подвижной фазы во всех случаях составляла 0.8 мл/мин. Хроматограммы записывали при длине волны – 325 нм.

Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали в программном продукте ChemStation 32. Дополнительно программы и весь набор данных обрабатывали в MSExcel.

2.4 Методика определения фенольных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Напитки для исследования готовили настаиванием 1 г растительного материала в 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 70°C.

Перед хроматографированием водные экстракты подкисляли до pH 1 и очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Москва). Для этого патроны активировали, пропуская 5 мл ацетона, кондиционировали, пропуская 15 мл 0.1 М водного раствора соляной кислоты. После сорбции с патронов вещества десорбировали 2 мл раствора, содержащего 30 об% муравьиной кислоты, 30 об.% ацетонитрила и 40 об.% дистиллированной воды. Экстракт разбавляли в три раза дистиллированной водой.

Качественный состав антоцианов и флавоноидов определяли на хроматографе Agilent Infinity 1200 с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Хроматографическую колонку (150 × 2.1 мм) Kromasil 100-5C18 использовали при температуре термостата 40°C. Все разделения проводили в режиме градиентного элюирования.

- Элюент А: 10 об.% муравьиной кислоты, 6 об.% ацетонитрила в дистиллированной воде.
- Элюент Б: 10 об.% муравьиной кислоты, 20 об.% ацетонитрила в дистиллированной воде; расход подвижной фазы 0.2 мл/мин.

Для записи хроматограмм использовали две длины волны диодно-матричного детектора: 360 нм для детектирования флавоноидов и 515 нм для детектирования антоцианов. При масс-спектрометрическом исследовании использовали режим ионизации электрораспылением со сканированием положительных ионов (для определения антоцианинов) или со сканированием отрицательных ионов (для определения флавоноидов).

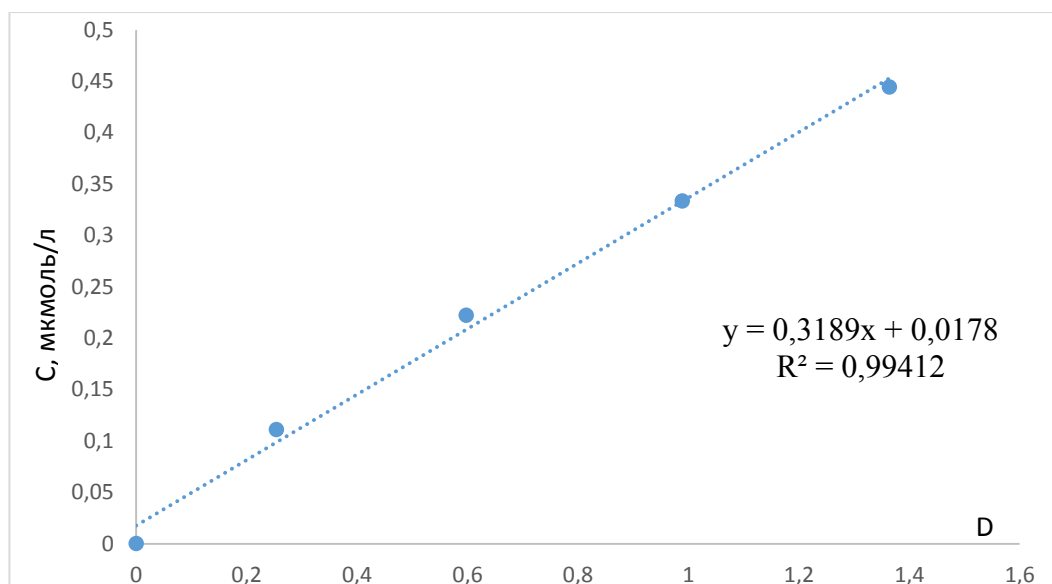
Количественный уровень содержания антоцианов определяли дифференциальным спектрофотометрическим методом и выражали в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид [66].

2.5 Методика определения АОА по реактиву Фолина-Чокальтеу

Навеску чая (0.100 ± 0.005 г) заваривали в течение 10 мин в 100 мл дистиллированной воды при температуре 90°C на водяной бане. Для отделения от твердого остатка экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр.

В качестве вещества сравнения при определении антиоксидантной активности использовали кофейную кислоту. Для этого навеску кофейной кислоты массой 0,004 г растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл.

Для построения калибровочного графика (рис. 2.1) готовили серию растворов: в колбы на 5 мл вносили 1 мл 10% раствора соды, соответственно объем кофейной кислоты (0.10, 0.15 и 0.20 мл) и 0.20 мл реактива Фолина-Чокальтеу.



Для определения антирадикальной активности по методу Фолина-Чокальтеу в колбы вместимостью 5 мл вносили:

- а) 1 мл 10% раствора соды
- б) 0.10 мл экстракта образца
- в) 0.20 мл реактива Фолина-Чеокальтеу

Готовые растворы перемешивали, выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Доводили дистиллированной водой до метки, перемешивали.

Оптическую плотность растворов измеряли при 760 нм на спектрофотометре SHIMADZU UV-2550 в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

По градуировочному графику (см. рис. 2.1) определяли эквивалент кофейной кислоты. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле (2.1):

$$AOA = \frac{X}{C \cdot M}, \text{ моль/Г} \quad (2.1)$$

где: X – эквивалент аскорбиновой кислоты, г/дм³ напитка;

C – концентрация чая в исследуемом растворе, г/дм³;

M – молярная масса аскорбиновой кислоты, г/моль.

2.6 Методика определения АОА по гашению свободных радикалов дифенилпикрилгидразилом (DPPH)

Напитки для исследования готовили настаиванием 1 г растительного сырья в 100 мл дистиллированной воды при температуре 90⁰С на водяной бане. Для отделения от твердого остатка экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр.

В качестве вещества сравнения при определении антиоксидантной активности использовали аскорбиновую кислоту. Для этого навеску кофейной кислоты массой 0,004 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Для приготовления раствора DPPH навеску (9,5 – 10 мг) растворяли в 250 мл этанола.

Далее для построения градуировочной зависимости брали 4 мерные колбы на 5 мл, добавляли в каждую колбу сначала по 4 мл спиртового раствора DPPH, затем кофейную кислоту объемом 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 мл, соответственно, после чего доводили объем в колбе до метки этанолом.

Параллельно для определения АОА экстрактов брали в мерные колбы объемом 5 мл, вносили сначала по 4 мл спиртового раствора DPPH, затем экстракты объемом 0,050, 0,075, 0,100, 0,150 мл, соответственно, после чего доводили объем в мерной колбе до метки этанолом.

Каждый раз смеси перемешивали встряхиванием и выдерживали в течение 40 мин при комнатной температуре вне доступа прямого солнечного света. По истечению времени снимали оптическую плотность на спектрофотометре SHIMADZU UV-2550 в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 520 нм.

Полученные данные наносили на график и искомую величину определяли по графику методом интерполяции. Антиоксидантную активность по методу DPPH определяли сравнением оптической плотности полученных растворов при ее падении до 50% по сравнению с раствором сравнения.

III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Для дифференциации распределительного и адсорбционного (гидрофобного выталкивания на поверхность) механизмов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ удобно воспользоваться сопоставлением удерживания сорбатов на силикагелях (желательно одной марки) с различной длиной привитого углеводородного радикала. Для веществ, удерживающихся предпочтительно по механизму распределения, удерживание сильно зависит от объема привитой фазы, резко уменьшаясь в ряду фаз $t_R(C18) \gg t_R(C8) \gg t_R(C4)$ [67].

По предложенному в [68] подходу для каждого из изомеров по данным для нескольких различных составов подвижных фаз определяют зависимость удерживания по уравнениям типа:

где i – исследуемый изомер (5CQA, 4 CQA или 3CQA),

x – тип обращенной фазы.

Абсолютные времена удерживания 5CQA на трех стационарных фазах C18, C8 и C4 в элюенте состава 10 об. % ацетонитрила и 1 об. % муравьиной кислоты в воде практически совпадают. При этом в элюентах с меньшей элюирующей силой удерживание оказывается немногим большим на C18 фазе, уменьшаясь последовательно при переходе к C8 и C4 фазам. В элюентах же с большей элюирующей силой ситуация обратна указанной выше. Однако по логарифмам факторов удерживания (из-за различия в мертвых объемах) при переходе от C18 фазы к C8 и далее к C4 удерживание всех трех изомеров несколько уменьшается (табл. 3.1). Общая тенденция – уменьшение наклонов линий трендов от C18 к C4 фазе, но это уменьшение не сопоставимо с изменениями для веществ, удерживающихся по механизму

распределения [68]. Следовательно, большое число гидроксильных групп в структурах хлорогеновых кислот препятствует их полному свободному проникновению вглубь привитой фазы. Это указывает на то, что механизм удерживания ближе к гидрофобному выталкиванию на поверхность сорбента.

Анализ селективности разделения изомеров удобнее проводить по картам разделения [69] (рис. 3.1). Для построения таких карт в нескольких составах подвижных фаз определяют удерживание изомерных хлорогеновых кислот и исследуют зависимость удерживания каждого из изомеров относительно одного, выбранного в качестве реперного соединения. В качестве реперного соединения удобно выбрать 5CQA, как наиболее часто встречающийся в природе изомер. Уравнения относительного удерживания имеют вид.

Анализируя карту разделения можно утверждать, что для всех исследованных составов подвижных фаз системы «вода – ацетонитрил – муравьиная кислота» и всех использованных в данном случае стационарных фаз порядок элюирования хлорогеновых кислот оставался постоянным: $t_R(3CQA) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA)$. И хотя наклон линии тренда на карте разделения для 4CQA немногим меньше, чем для 5CQA, обращение порядка элюирования этих двух веществ не может произойти за счет изменения состава подвижной фазы, как для изократических, так и для градиентных режимов. При этом переход от C18 к C4 фазе (что соответствует большей доступности полярных групп сорбента) приводит к лишь небольшому уменьшению степени разделения пары изомеров 4CQA и 5CQA.

Замена ацетонитрила на метанол и ее влияние на селективность разделения изомерных хлорогеновых кислот может представлять интерес, поскольку при этом исключаются π -взаимодействия «сорбат – подвижная фаза». Но такая замена в нашем случае привела только к относительному уменьшению удерживания 3CQA при незначительных изменениях в

селективности разделения пары 4CQA и 5CQA не только для C18-фазы (табл. 3.1), но и для остальных фаз. Судя по корреляционным зависимостям удерживания по уравнению (3.1), механизм сорбции хлорогеновых кислот также не изменился при замене ацетонитрила на метанол.

Наконец, исследование удерживания изомерных хлорогеновых кислот, выполненное при замене муравьиной кислоты на ортофосфорную, также не привело к заметным изменениям селективности их разделения. Таким образом, для изменения селективности разделения хлорогеновых кислот необходимо использование стационарных обращенных фаз со специфическими свойствами.

На рис. 3.2 представлена карта разделения хлорогеновых кислот на стационарных фазах Kromasil 100-5C18 (K2), Symmetry C18 (S18) и Reprosil-Pur C18-AQ (R18). Удерживание ХК на стационарных фазах 2K18 и S18 было близким по абсолютной величине при всех составах подвижной фазы системы «ацетонитрил – уксусная кислота – вода», и еще меньше различий наблюдалось на линиях трендов относительного удерживания. Но для стационарной фазы R18 удерживание 4CQA и 3CQA заметно уменьшилось, затрудняя разделение пары изомеров 4CQA и 5CQA. Стационарная фаза R18 (по сведениям производителей) отличается устойчивостью к коллапсу за счет специфического гидрофильного эндкеппинга, и эта особенность фазы привела к изменению селективности разделения изомерных ХК.

Предполагая, что именно свойства подложки, а не привитой фазы, определяют селективность разделения ХК, мы выполнили эксперимент по разделению ХК на двух стационарных фазах одного производителя, различие в которых могло быть связано с изменением остаточной активности силанольных групп. Для этого была взята новая колонка, заполненная фазой Диасфер-110-C18 (2K18), и колонка с той же стационарной фазой (2K18), но находившаяся в длительном употреблении, включая определение антоцианов, выполнявшееся при высокой концентрации муравьиной кислоты (10 об.%), которая способствует гидролизу привитых групп. И,

действительно, селективность разделения пары 4CQA и 5CQA заметно уменьшилась. Более того, при использовании стационарной фазы Nucleosil RP-C18 (колонка находилась в длительном использовании) было найдено обращение порядка элюирования изомеров указанной пары (рис. 3.3).

Повышенная активность остаточных силанольных групп в стационарных фазах с измененной селективностью разделения 4CQA и 5CQA была подтверждена тестом по ранее предложенной методике [70], где исследуется корреляция между удерживанием *n*-толуидина (*nT*) относительно *n*-крезола (*nK*) в элюентах, содержащих 20 – 40 об. % ацетонитрила в водном растворе с 0.001 М фосфатным буфером с pH = 7.

Для фазы N18 удерживание *n*-толуидина оказалось даже большим по сравнению с удерживанием *n*-крезола, и повышенная активность фазы 2Д18 (по сравнению с новой фазой 1Д18) оказалась также весьма заметной (рис. 3.4).

Наконец, с использованием селективной для разделения изомерных хлорогеновых кислот стационарной фазы K18, нами было выполнено исследование нескольких объектов, включая два фруктовых сока (вишневый и яблочный), три образца растворимого кофе и один – смеси растворимого с молотым, и напиток мате, табл.3. В результате было установлено, что вишневый сок является прекрасным образцом, в котором основная хлорогеновая кислота – 3CQA, в яблочном соке этот изомер практически отсутствовал, но 5CQA была с небольшой примесью 4CQA (табл. 3.2).

Для надежного количественного определения хлорогеновых кислот в растительных объектах был использован градиентный режим: на первом изократическом отрезке разделялись изомерные хлорогеновые кислоты. Такой режим был использован для устранения влияния сольватохромного эффекта на электронные спектры веществ при использовании одного стандартного образца – 5CQA, вместо трех изомеров [71]. На втором отрезке использовали быстрый градиент для удаления с колонки веществ с большим удерживанием. В исследованных образцах кофе были обнаружили все три

изомерные хлорогеновые кислоты, хотя и в различных соотношениях. Они же были найдены и в напитке мате, который по высокому содержанию хлорогеновых кислот скорее напоминает кофе, а не чай, основные компоненты которого – производные флаванолов [72]. В яблочном и в вишневом соках детектируется 5CQA, но в вишневом соке также велика доля 3CQA; этой кислоты практически нет в яблочном соке, но 5CQA дополнена небольшой долей 4CQA.

3.2 Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции

Экстракция хлорогеновых кислот проблем не вызывает, поскольку они легко растворимы в воде, поэтому основная проблема – очистка ХК от сопутствующих экстрактивных веществ. В работе [73] были сопоставлены пять способов очистки и концентрирования ХК из кофе, включавшие, в том числе, и твердофазную экстракцию (ТФЭ) на C18 Sep-Pak картриджах 51910 (Millipore Waters). При этом было установлено, что лучший результат достигается при экстракции ХК метанолом (метод М+) с последующим отделением от коллоидных частиц добавлением специального реагента (Carrez reagent), содержащего ацетат цинка, ледяную уксусную кислоту и раствор гексацианоферрата (II) калия. Согласно представленным данным по методу М+ массовая доля хлорогеновых кислот в исходном материале оказалась более чем в три раза выше, чем по методу ТФЭ. К сожалению, в работе не исследовали все необходимые параметры для определения причин неэффективности метода ТФЭ. В работе [74] сообщали о хорошей сорбируемости ХК на полиамидном сорбенте с последующей реэкстракцией методом флэш-хроматографии. Известно использование C18 картриджей [75] для удаления сопутствующих липофильных веществ из экстракта ХК в 80%-ном метаноле. В работе [76] для выделения фенольных соединений из яблочного сока использовали два C18 картриджа: первый из них, кондиционированный при $pH = 7.0$, затем сорбировали фенольные вещества не кислотного типа, а из элюата после подкисления сорбировали ХК на

втором картридже, кондиционированном при $pH = 1$. В работе [77] сопоставлена эффективность нескольких различных сорбентов в ТФЭ:

а) OASIS HLB - гидрофильно-гидрофобно сбалансированного сополимера N-винилпирролидона и дивинилбензола;

б) «обычного» обращенно-фазового химически модифицированного силикагеля, Sep-Pak C18;

в) сильного катионообменника, AccBond SAX;

г) аминофазы, AccBond Amino.

В результате авторы пришли к выводу о том, что картриджи C18 и OASIS не только ускоряют, но и упрощают очистку экстрактов с полифенольными соединениями. Активированный уголь был успешно использован для сорбции ХК при $pH = 3$ при $60^{\circ}C$ с последующей экстракцией ХК 98%-ным этанолом [78]. В работе [79] для твердофазной экстракции использовали насадочные картриджи (концентрирующие патроны) ДИАПАК С 18 и ДИАПАК С (заполнен сверхсшитым полистиролом) и при этом было показано, что проскок галловой и кофейной кислот наблюдается довольно быстро.

В обращенно-фазовой хроматографии сорбция веществ усиливается при росте их липофильности. Однако, наиболее часто используемое в качестве параметра липофильности расчетное значение коэффициента распределения веществ в системе октанол-1 – вода, $CLogP$ [80], для хлорогеновых кислот практически бесполезно, поскольку удерживание изомерных хлорогеновых кислот в широком диапазоне pH растет в ряду $3CQA < 5CQA < 4CQA$ (рис. 3.5), что никак не коррелирует с $CLogP$, рассчитанным, например, по программе Molinspiration (-0.45, -0.45 и -0.67, соответственно).

При этом, несомненно, то, что липофильность ХК возрастает при подавлении диссоциации карбоксильной группы. Расчет по программе MarvinSketch (ChemAxon) молекул изомерных ХК приводит к оценке pK карбоксильной группы на уровне 3.33 – 3.39. Корректность расчетного

показателя в целом подтверждена экспериментально - по наиболее быстрому изменению удерживания изомерных хлорогеновых кислот в диапазоне рН от 3 до 4 (рис. 3.6).

Распределение различно заряженных частиц хлорогеновых кислот, рассчитанное той же программой «MarvinSketch», указывает на существование незаряженной частицы (с полностью подавленной диссоциацией карбоксильной группы), по крайней мере, до рН = 0 (при рН = 2 доля ионизированной ХК меньше 5 %). Следовательно, для сорбции при твердофазной экстракции лучше использовать низкие рН (0 – 1), а при ВЭЖХ воспользоваться возможно более кислыми элюентами в пределах диапазона стабильности стационарной фазы (например, с рН около 2.5, при которой доля анионной формы находится в пределах 10 %).

По полученным результатам можно утверждать, что константа Генри (для сорбции при малой степени заполнения поверхности сорбента, характерной для ВЭЖХ разбавленных растворов аналитов) при рН = 2 для сорбции 5-кофеоилхинной (5CQA) кислоты немногим меньше (в 1.2 раза), чем для 4-кофеоилхинной кислоты (4CQA), но более, чем в 2 раза (в 2.1 раза) больше, чем для 3-кофеоилхинной кислоты (3CQA). Следовательно, особые проблемы могут возникнуть при сорбции 3CQA. Увеличение рН от 2 до 5 уменьшает константу Генри для сорбции 5CQA более чем в 4 раза (4.25 раза), поэтому сорбцию следует проводить из сильнокислых растворов, подкисляя при необходимости экстракт минеральной кислотой перед ТФЭ.

Сорбцию хлорогеновых кислот исследовали на примере экстракта зеленого кофе с относительно высоким содержанием 3CQA и 4CQA. Экстракт (0.225 г/л суммы всех хлорогеновых кислот) вручную пропускали через подготовленный картридж, собирая для анализа элюат порциями по 2 мл. Результаты спектрофотометрического анализа порций элюата представлены на рис. 3.7.

Проскок хлорогеновых кислот начинается уже после сорбции 10 мл экстракта (т.е. после сорбции 2.25 мг суммы ХК). Следовательно, для получения репрезентативных результатов последующего определения суммы ХК можно сорбировать не более 10 мл экстракта с указанной выше концентрацией. При ВЭЖХ определении ХК в тех же порциях элюата было установлено, что, начиная с 10 мл, наблюдается проскок 3СQA, в то время как для 5СQA и 4СQA до проскока этих соединений можно произвести сорбцию из примерно в два с половиной раза большего объема экстракта.

Однако, результат может сильно зависеть не только от концентрации суммы ХК, но и от присутствия в экстракте других соединений, способных вытеснять ХК из сорбционного слоя. Нами для контроля эффективности сорбции компонентов экстракта предложен вариант ТФЭ, при котором экстракт пропускается через два последовательно соединенных патрона. В таком случае элюат из первого патрона (рис. 3.8) можно использовать для количественного определения соотношения между количествами компонентов экстракта, если они не обнаруживаются в элюате со второго патрона. Отметим, что процесс сорбции в таком случае реализуется без лишних усилий.

Для реэкстракции нами разработана процедура, по которой ХК с картриджа элюируют раствором, содержащим 30 об. % ацетонитрила и 3 об. % муравьиной кислоты в воде. Спектрофотометрический контроль элюатов порциями по 0.5 мл показывает, что для практически полной десорбции ХК необходимо удалить в слив первые 0.5 мл реэкстракта, собирая отдельно следующие 2 мл, что обеспечивает реэкстракцию около 98,5 % исходных хлорогеновых кислот (рис. 3.9). Перед введением образца в хроматографическую систему следует разбавить реэкстракт в два раза дистиллированной водой, что обеспечивает повышение концентрации ХК в пробе в 2.5 раза.

Указанное выше разбавление необходимо для исключения появления артефактных пиков [81]. В этом отношении можно остановиться на выводах работы [73] о том, что метанольный экстракт кофе может быть напрямую введен в хроматографическую систему при определении хлорогеновых кислот. Это, по меньшей мере, странно, если учесть, что используется растворитель пробы, обладающий значительно большей элюирующей силой по сравнению с подвижной фазой. Для контроля влияния растворителя пробы на характер получаемых хроматограмм был выполнен эксперимент, в котором одинаковое количество экстракта разбавляли растворами А (1 об.% НСООН в воде) и Б (1 об.% НСООН в метаноле или ацетонитриле), записывая затем хроматограммы с разным объемом введенной пробы (от 5 до 15 мкл).

При вводе образца экстракта, содержавшего даже не 100, а лишь 60 об.% метанола «вынос» веществ оказался более чем заметен, - наблюдается характерное для такого случая раздвоение пиков (рис. 3.10), тогда как для образца, растворенного в 1 об. % растворе НСООН в воде, были получены нормальные пики. При увеличении объема вводимой пробы раздвоение превращается в сложную сумму уширенных пиков с уменьшенными временами удерживания, из чего следует, что не только чисто метанольный экстракт вводить в хроматографическую систему не следует, но и серьезного превышения концентрации метанола в растворителе пробы по сравнению с подвижной фазой следует избегать.

Результаты исследования образцов проб, полученных с использованием ацетонитрила оказались похожими на приведенные выше, но им было уделено более пристальное внимание из-за более частого использования именно ацетонитрила в качестве компонента подвижной фазы, по крайней мере в нашей лаборатории. В табл. 3.3 представлены данные о параметрах пиков 5CQA, записанных для двух растворов, один из которых не содержал ацетонитрила вообще (случай I), а во втором (случай II) объемная доля ацетонитрила составила 80 %.

В случае I при увеличении объема пробы в ряду 5 – 10 – 15 мкл высота пика увеличивалась практически точно в соответствующее число раз, а высота на половине ширины практически не изменялась, что говорит о приемлемости такого варианта введения пробы. В случае II вынос вещества (см. рис. 3.10) был заметен – и по непропорциональному росту площадей пика 5CQA, и по существенному уширению пика, хотя при введении пробы объемом 5 мкл наблюдалось лишь незначительное уширение пика. Возможно, найденные различия для двух элюентных систем связаны с особенностями сольватации стационарной фазы и аналитов метанолом или ацетонитрилом, но выяснение причин такого эффекта требует дополнительных исследований.

3.3 Определение фенольных соединений в растительных объектах

3.3.1 Определение антоцианов в лепестках цветков гибискуса суданского и гибискуса розы китайской

В плане поиска нетрадиционных источников антоцианов нами были исследованы цветки популярного в России растения розы китайской – близкого родственника гибискуса суданского, из которого готовят знаменитый чай каркаде, известный также и как «напиток Клеопатры». Каркаде полезен благодаря присутствию в нем двух основных антоцианов: 3-самбубиозидов дельфинидина и цианидина. Напиток, полученный из цветков розы китайской, также богат антоцианами, основным из которых является цианидин-3-глюкозид.

Однако исследуя антоцианы цветков гибискуса розы китайской, на хроматограмме обнаруживается только один основной пик (рис. 3.11).

Его электронный спектр ($\lambda_{\max} = 517$ нм, рис. 3.12) практически полностью совпадает со спектром цианидин-3-софроза и цианидин-3-глюкозида (оба вещества имеют близкие электронные спектры), записанного в тех же условиях. Сохранение параметров спектров при добавлении

глюкозидного радикала к другому глюкозидному в положении 3 цианидина удивительно, поскольку для других углеводов добавка радикала приводит к батохромному сдвигу полосы абсорбции на 1 – 1.5 нм. Но по сопоставлению с удерживанием цианидин-3-глюкозида из экстракта плодов черной смородины (антоциановый комплекс образован 3-глюкозидами и 3-рутинозидами дельфинидина и цианидина) можно сделать вывод о принадлежности пика к цианидин-3-софорозиду, что подтверждается сохроматографированием образца с экстрактом плодов обычной вишни, содержащей в том числе и цианидин-3-софорозид.

Для подтверждения такой гипотезы был записан масс-спектр соединения, записанный в режиме ионизации электрораспылением, представленный на рис. 3.13.

И действительно, отношения масса-заряд, равное 611.3 соответствует цианидин-3-дигексозиду, при этом при напряжении на фрагменторе, равном 150 В, обнаруживается и сигнал агликона – цианидина ($M/z = 287.1$).

Таким образом, основной компонент антоцианового комплекса цветков гибискуса розы китайской – цианидин-3-софорозид, что согласуется с известными литературными данными, полученными для растений, выращенных в других регионах мира на других сортах растений.

3.3.2 Определение антоцианов и других фенольных соединений растительного материала Иван-чая

Хроматограмма и хроматографические параметры экстракта сушеных цветков иван-чая представлены на рис. 3.14. и в табл. 3.4. Основным компонентом экстракта является мальвидин-3,5-диглюкозид, на долю которого приходится около 68.3 % от суммы площадей пиков. В меньших количествах содержится пеонидин-3,5-диглюкозид (13.2 %) и 3,5-диглюкозиды остальных основных антоцианидинов: дельфинидина (2.0 %), цианидина (6.3 %) и петунидина (2.8 %). В качестве сопутствующих антоцианов детектируются 3-глюкозиды этих же антоцианидинов (но на

хроматограмме не виден петунидин-3-глюкозида, не разделяющийся с основным компонентом). Запись в градиентном режиме показывает полное отсутствие ацилированных антоцианов.

Количественное определение антоцианов, выполненное спектрофотометрическим методом, позволило установить, что общее содержание антоцианов в сушеных цветках составляет 0.083 ± 0.008 г на 100 г сухого материала. Это не является высоким показателем, но с учетом известной высокой антиоксидантной активности антоцианов [82] и их хорошей растворимости пренебрегать их вкладом в суммарный антиоксидантный эффект настоя не стоит.

Разделение флавоноидов водных настоев иван-чая проводилось в условиях градиентного элюирования в том же элюентном режиме, который был использован при определении антоцианов, но при детектировании при иной длине волны (350 нм) (рис. 3.15). Стоит отметить, что при масс-спектрометрическом детектировании антоцианов целесообразнее использовать сканирование положительно заряженных ионов, уже существующих в виде флавилиевых форм в анализируемых образцах. При этом в случае флавоноидов удобнее использовать сканирование отрицательно заряженных ионов из-за наличия в этих соединениях легко ионизируемых гидроксильных групп.

Для напитков, приготовленных из растительных материалов со значительно различающимся географическим происхождением (иван-чай из Карелии – хроматограмма Б на рис. 3.15; иван-чай с Алтая – хроматограмма В на рис. 3.15), получены мало различимые хроматографические профили. Основной компонент по данным масс-спектрометрии является глюкуронидным производным кверцетина, – в соответствии с литературными данными этому веществу приписано строение – кверцетин-3-глюкуронид. На долю этого соединения приходится 62.7 и 58.7 % от суммы площадей пиков для иван-чая из Карелии и Алтая, соответственно. Расчет при градуировке отклика детектора по рутину, показал, что при заварке в

настой переходят 3.4 и 4.0 г (из 100 г растительного материала) кверцетин-3-глюкуронида для иван-чая из Карелии и Алтая, соответственно.

На хроматограмме детектируются также большая группа других веществ, из которых наиболее важными (после кверцетин-3-глюкуронида) можно считать: мирицетин-3-рамнозид (3.7 %), гиперозид (кверцетин-3-галактозид, 4.8 %), авикулярин (кверцетин-3-арабинофуранозид, 4.4 %) и кверцетин-3-рамнозид (10.8 %). В скобках приведены доли площадей пиков веществ для образца из Алтая. Указанные соединения могут быть использованы в качестве характеристических метчиков иван-чая для установления подлинности растительного материала. Отметим также, что рутин (кверцетин-3-рутинозид), который был указан в качестве одного из важных компонентов иван-чая [57], практически отсутствовал в исследованных образцах (табл. 3.5).

3.4 Сопоставление АОА настоев растительных объектов

3.4.1 Определение АОА настоев иван-чая

Метод Фолина-Чокальтеу принят в мировой практике для оценки суммарного содержания флавоноидов [83]. Метод основан на восстановлении соединений молибдена в состоянии VI до молибденовой сини (молибден V). А т.к. гетерополимолибдаты способны легко восстанавливаться под действием различных восстановителей (например, аскорбиновой кислоты), то на самом деле с помощью реактива Фолина-Чокальтеу можно определять восстановительную активность соединений, т.е. наиболее активную составляющую АОА.

Известно, что среди фенольных соединений вещества, которые содержат в своей структуре орто-гидроксильные группы, обладают большим восстановительным потенциалом [84]. В соответствие с данными, полученными с использованием ВЭЖХ, основные фенольные соединения напитка иван-чай являются гликозидами кверцетина (I, рис. 3.16),

содержащего в кольце В две орто-гидроксильные группы, что должно обеспечить им высокую антиоксидантную активность. При этом в качестве вещества сравнения в работе использовали кофейную кислоту (II, рис. 3.16), также содержащую две орто-гидроксильные группы в структуре.

Оказалось, что в пересчете на кофейную кислоту наиболее активная часть АОА примерно одинакова для иван-чая из Карелии и Алтая и составляет 5.1 – 5.8 г кофейной кислоты на 100 г растительного материала. Это лишь примерно в полтора раза меньше, чем у зеленого чая Ахмад (8.1 – 8.5 г/ 100 г). При этом в настоях иван-чая полностью отсутствует кофеин, что дает ему определенное преимущество в сравнении с такими тонизирующими напитками, как кофе. Отметим, что для сушеных лепестков цветков, содержащих в значительной концентрации антоцианы - сильнейшие восстановители класса флавоноидов, - по данному методу получена еще большая АОА: 8.5 – 8.9 г кофейной кислоты на 100 г. В связи с этим можно рекомендовать добавление высушенных цветков в травяные сборы иван-чая с целью повышения АОА напитка не только производителям, но и потребителям.

При использовании метода гашения свободных радикалов дифенилпикрилгидразида найдено, что АОА иван-чая оказалась немногим меньше по сравнению с определенной первым методом: 4.4 – 4.9 г кофейной кислоты на 100 г растительного материала, а зеленому чаю (15 – 16 г/100 г) уступала уже более значительно. Эта информация указывает на более длинную цепочку превращений катехинов зеленого чая под действием DPPH, в которой каждый новый продукт окисления также способен гасить свободные радикалы, как и его предшественник [85].

3.4.2 Определение АОА настоев из растений семейства мальвовые (Malvaceae)

Многие растения семейства мальвовые (Malvaceae) широко используются в качестве декоративных растений благодаря яркой окраске цветков. При этом окраска цветков от красных до черных указывает на биосинтез антоцианов, поэтому цветки некоторых из них можно отнести к нетрадиционным, не употребляемым в пищу источникам антоцианов. Были определены антоциановые комплексы цветков гибискуса розы китайской (I) *Hibiscus rosa-chinensis* и гибискуса суданского (II) *Hibiscus sabdariffa*, известного также как напиток каркаде. Для напитков, приготовленных из данных двух видов гибискусов, также были сопоставлены антиоксидантные свойства и уровень накопления антоцианов.

В итоге было установлено, что в напитках концентрация антоцианов составила $(4.8 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$ и $(3.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ моль/л, для напитков из I и II, соответственно. Это полностью соответствует изменению антиоксидантной активности напитков, измеренной реактивом Фолина-Чокальтеу: т.е. их восстановительная активность, выраженная в г аскорбиновой кислоты (АК) /л напитка (0.025 ± 0.002 и $0,013 \pm 0.002$ для напитков I и II, соответственно) пропорциональны концентрации антоцианов, как основных фенольных водорастворимых антиоксидантов. Такая тенденция сохраняется и при определении АОА по методу гашения свободных радикалов дифенилпикрилгидразилом (DPPH). АОА снижается более, чем вдвое при переходе от зеленого чая к напитку из лепестков цветков гибискуса-розы китайской (от 0.23 ± 0.05 до 0.10 ± 0.02 г АК/л), а при дальнейшем переходе к напитку каркаде также снижается, но уже не столь откровенно - до 0.08 ± 0.01 г АК/л.

Впрочем, в напитке каркаде, судя по соотношению найденных показателей, имеются еще вещества, вносящие заметный вклад в суммарную антиоксидантную активность.

Таким образом, поиск новых источников антиоксидантов среди обычных и привычных растений может привести к обнаружению новых и эффективных растительных материалов, а иван-чай (цветки и надземная часть растения) и некоторые представители семейства мальвовые могут быть рекомендованы в качестве сырья для приготовления антиоксидантных напитков, содержащих антоцианы и другие фенольные соединения как основные антиоксиданты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- При исследовании удерживания изомерных хлорогеновых кислот (3CQA, 4CQA и 5CQA) на нескольких обращенных стационарных фазах Установлено, что механизм удерживания близок к механизму гидрофобного выталкивания на поверхность.
- Показано, что изменение селективности разделения хлорогеновых кислот и порядок элюирования зависит от активности остаточных силанольных групп сорбента.
- Определено содержание изомерных хлорогеновых кислот в нескольких объектах: в двух фруктовых соках (вишневый и яблочный), в трех образцах растворимого кофе и в смеси растворимого с молотым, и в напитке мате.
- Исследована возможность использования патронов ДИАПАК C18 для очистки и концентрирования высокогидрофильных хлорогеновых кислот. Показано, что для сорбции необходимо использовать экстракты, подкисленные до pH 1 и ниже. При этом наименьшим удерживанием характеризуется 3-кофеилхинная (неохлорогеновая) кислота.
- Предложен простой способ экстракции с контролем проскока с использованием двух последовательно соединенных картриджей. В итоге разработан способ очистки и концентрирования ХК в 2.5 раза.
- Методом ВЭЖХ со масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим детектированием определены антоциановый состав экстрактов сушеных цветков *Epilobium angustifolium* и флавоноидный состав экстрактов цветков и надземной части растения.
- Двумя методами (Фолина-Чокальтеу и по гашению свободных радикалов дифенилпикрилгидразила) определена антиоксидантная активность настоев иван-чая и лепестков цветков гибискуса – розы китайской. Обращено внимание на определяющую роль антоцианов в суммарной антиоксидантной активности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chkhikvishvili I. D., Kharebava G. I. Chicoric and Chlorogenic Acids in Plant Species from Georgia// Applied Biochemistry and Microbiology. 2001. V. 37. №. 2. P. 188–191.
2. Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L. C., Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans// Journal of Nutrition. 2007. V.137. P. 2196–2201.
3. Farah A., Monteiro M., Donangelo C. M., Lafay S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans// Journal of Nutrition. 2008.V.138. P. 2309–2315.
4. Yu B.-S., Yan X.-P., Xiong J., Xin Q. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Forsythin and Arctiin in Chinese Traditional Medicines Preparation by Reversed Phase-HPLC // Chemical and Pharmaceutical Bulletin – 2003. V.51(4). P. 421—424.
5. Svilaas A., Sakhi A., Andersen L., Svilaas T., Strom E., Jacobs D., Ose Jr., Blomhoff R. Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine, and Vegetables Are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans // Journal of Nutrition. 2004. V. 134. P. 562-567.
6. Clifford M.N. Chlorogenic acid and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. V. 80. P. 1033-1043.
7. Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans // Journal of Nutrition. 2000. V. 131. P. 66-71.
8. Richelle M. Tavazzi I., Offord E. Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001.V.49. P. 3438-3442.

9. Stalmach A., Mullen W., Nagai C., Crozier F. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee // *Braz. J. Plant Physiol.* V.18(1). P.253-262.
10. Trugo L.C., Macrae R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees // *Analyst*, 1984. V. 109. P.263-266.
11. Bennat C., Engelhardt U.H., Kiehne A., Wirries F.-M., Maier H.G. HPLC Analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee // *Z Lebensm Unters Forsch* 1994.V. 199. P.17-21.
12. Ky C.-L., Noiro M., Hamon S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Cofea* sp.) // *J. Agric. Food Chem.* 1997. V. 45. P. 786-790.
13. Kohno Y.-i., Fujita K. Analysis of chlorogenic acids and total phenols in coffee beans // *Bunseki Kagaku*. 2016. V. 65. P. 331-334.
14. Shan Y., Jin X., Cheng Y., Yan W. Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors // *International journal of food properties* 2017, V. 20. №. 9. P2028–2040.
15. Tfouni S.A.V., Carreiro L.B., Teles C.R.A., Furlani R.P.Z., Cipolli K.M.V.A., Camargo M.C.R. Caffeine and chlorogenic acids intake from coffee brew: influence of roasting degree and brewing procedure // *International Journal of Food Science and Technology* 2014. V. 49. P. 747–752.
16. Craig A.P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts // *Talanta* 2016. V. 154, P.481–485.
17. Jeon J.-S., Kim H.-T., Jeong I.-H., Hong S.-R., Oh M.-S., Park K.-H., Shim J.-H., AbdEl-Aty A.M. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017. V.1064. P.115-123.
18. Schrader K., Kiehne A., Engelhardt U.H., Maier H.G. Determination of Chlorogenic Acids with Lactones in Roasted Coffee // *J Sci Food Agric* 1996, V. 71, P. 392-398.

19. Farah A., de Paulis T., Trugo L.C., Martin P.M. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 1505-1513.
20. Yilmaz P.K., Kolak U. SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee // J Chromatogr Sci. 2017. 55. P. 712.
21. Perrone D., Farah A., Donangelo C.M., de Paulis T., Martin P.R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars // Food Chemistry 106 (2008) 859–867.
22. Федосеева Л.М. Предварительное изучение некоторых фенольных соединений сбора на основе листьев бадана толстолистного // Приоритеты фармацевтической науки и практики: Материалы заочной международной конференции. Москва. 2006. 330с.
23. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. 272с.
24. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., L. Jime'nez Polyphenols: food sources and bioavailability// Am J Clin Nutr. 2004. V.79. P.727–747.
25. Herrmann, K.: Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods// Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 1989. V. 28. P. 315-347.
26. Clifford M.N. Review Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden// Journal of the Science of Food and Agriculture 1999. V.79. P. 362-372.
27. Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. //Crit Rev Food Sci Nutr. 1989. V. 28. P. 315–347.
28. Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространенность, пищевые источники, биодоступность // Вопросы питания. 2008. Т.77, №1. С. 4-19.

29. Lallemand L.A., Zubieta C., Lee S.G., Wang Y., Acajjaoui S., Timmins J., McSweeney S., Jez J.M., McCarthy J.G., McCarthy A.A. A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee // *Plant Physiology*. 2012, V. 160. P. 249–260.
30. Upadhyay R., Rao L.J.M.: An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013. V. 53. P. 968-984.
31. Yuzhen C., Huizhi X., Jie Z. Structure-Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation // *Chemical and Biomolecular Engineering Faculty Research*. 2015. V. 15. P. 616-618.
32. Marques V., Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions // *Food Chemistry*, 2009. V.113. P.1370–1376.
33. Дейнека В.И., Хлебников В.А., Сорокопудов В.Н., Анисимович И.П. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae // *Химия растительного сырья*. 2008. № 1. С. 57-61.
34. Kremr D., Bajer T., Bajerová P., Surmová S., Ventura K. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review // *Quim.Nova*. 2016. V.39 P.530-533.
35. Farah A., Donangelo C.M. Phenolic compounds in coffee // *Braz. J. Plant Physiol*. 2006. V.18(1). P.23-36.
36. Ragazzi E., Veronese, G. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. // *J.Chromatogr*. 1973. V.77. P. 369–375.
37. Schulz J.M., Herrmann, K. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. I. Sample preparation and thin-layer chromatography. *J. Chromatogr*. 1980. V. 195. P. 85–94.
38. Hawryl M.A., Hawryl A., Soczewinski E. Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropylbonded polar stationary phase for

separation of phenolic compounds from the flowers of *Sambucus nigra* L.// *J. Planar Chromatogr.* 2002. V. 15. P. 4–10.

39. Конева М.С., Бугаец Н.А., Бугаец И.А.. Фенольные соединения и антиоксидантная активность сока из ростков пшеницы // *Научные труды КубГТУ.* 2016. № 14. С. 847-853.

40. Lu Y., Breadmore M. C. Fast analysis of phenolic acids by electrokinetic supercharging-nonaqueous capillary electrophoresis// *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 2140–2144.

41. Kvasnička F., Čopíková J., Ševčík R., Krátká J., Syntytsia A., Voldřich M. Determination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC//*Cent. Eur. J. Chem.* 2008. V.6(3). P. 410–418.

43. Puodzhyunene G., Yanulis V., Barsteigene Z., Kamandulis M., Sladkovsk R., Solich P Quantitative assessment of content of phenolic acids in the medicinal herb showy tick trefoil// *Journal Pharmaceutical Chemistry.* 2009. V. 43, №. 4. P. 195-197.

44. Zgorka G., Dawka S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations// *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. V.24. P. 1065–1072.

45. Robbins R.J., Bean S. R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids//*Journal of Chromatography A.* 2004. V.1038. P. 97–105.

46. Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Levetsovitou Z. Determination of phenolic acids in wine by HPLC with a microbore column// *J. Chromatogr. A.* 1995. V.695. P. 229-235.

47. Schieber A., Keller P., Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography// *Journal of Chromatography A.* 2001. V.910. P. 265–273.

48. Головкин Б. Н., Руденская Р. Н., Трофимова И. А., Шретер А. И. Биологически активные вещества растительного происхождения. М.: Наука, 2001. 368 с.
49. Орлов В.П., Митина Е.В. // *Russian Agricultural Science Review*. 2015. Т.5. № 5. С. 171-173.
50. Царев В.Н., Базарнова Н.Г., Дубенский М.М. // *Химия растительного сырья*. 2016. №4. С. 15-26.
51. Олейниц Е.Ю., Озер П.С., Дейнека В.И., Блинова И.П. Иван-чай как источник антиоксидантов // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием*. – Барнаул, 2017. – С. 208-209.
52. Бушуева Р.Г., Сыроешкин А.В., Максимова Т.В., Скальный А.В. Кипрей узколистный – перспективный источник биологически активных соединений // *Микроэлементы в медицине*. 2016. Т.17, №2. С. 15-23.
53. Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M.T. Therapeutic Potential of Polyphenols from *Epilobium Angustifolium* (Fireweed) // *Phytother. Res*. 2016. V.30, No.8. P. 1287-1297.
54. Cando D., Morcuende D., Ultera M., Estévez M. Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobiumhirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein car-bonylation and discoloration of beef patties // *Eur. Food Res. Technol*. 2014. V.238. P. 741-751.
55. Pirvu L., Nicorescu V., Hlevka C., Udeanu D.I., Nicorescu I. Antimicrobial and synergistic activity of some whole and selective *Epilobium hirsutum* // *Farmacia*, 2015. V. 93. P. 690-695.
56. Shikov A.N., Poltanov E.A., Damien Dorman H.J. Makarov V.G., Tikhonov V.P., Hiltunen R. Chemical Composition and in Vitro Antioxidant Evaluation of Commercial Water-Soluble Willow Herb (*Epilobium angustifolium* L.) Extracts // *J. Agric. Food Chem*. 2006. V.54. P. 3617-3624.

57. Feshchenko H., Oleshchuk O., Lukanyuk M. Feshchenko B.M. Investigation of phenolic compounds content in *Chamerion angustifolium* L. herb freeze-dried extract // *Pharma Innovation J.* 2017. V.6, No.3. P. 40-43.
58. Яшин, Я.И. Проблема определения содержания антиоксидантов / Я.И. Яшин, А.Я.Яшин // *Метрология.* 2009. № 8 (69). С. 50–53.
59. Макарова Н.В., Зюзина А.В. Исследование антиоксидантной активности яблок различных сортов по методам FRAP и FIC // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология.* 2011. № 5-6. С.24-25.
60. Анисимович И.П., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Фролов П.А., Мясников П.А. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая // *Научные ведомости. Серия Естественные науки.* 2010.№ 9 (80).Выпуск 11. С.104-110.
61. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. A hrocedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols // *J. Sci. Food Agric.* 1998. V.76. P. 270-276.
62. Benzie I.F., Strain J.J: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // *Analytical Biochemistry.* 1996. V. 239. P. 70–76.
63. Cao G. H., Alessio H. M. Cutler R. G. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants // *Free Radicals In Biology And Medicine.* 1993. V. 3. №14. P. 303–311.
64. Möller B., Herrmann K. Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruits // *Phytochem.* 1983. V. 22. P. 477.
65. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 2900.
67. Kohno Y.-i., Fujita K. Analysis of chlorogenic acids and total phenols in coffee beans // *Bunseki Kagaku.* 2016. V. 65. P. 331.
68. Дейнека В.И. «Распределение или адсорбция» как основная дилемма ОФ ВЭЖХ // *Журнал физической химии.* 2008. Т. 82. С. 1028.

69. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // Ж. физ. химии. 2006. Т.80. №3. С. 511-516.
70. Дейнека В.И. Новый метод оценки влияния остаточных силанольных групп на суммарное удерживание в обращено-фазовой ВЭЖХ. // Журнал аналитическая химии 2007. Т.62. №7. С. 740-744.
71. Shan Y., Jin X., Cheng Y., Yan W. Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors // Interbat. J. Food Prop. 2017. V. 20. P. 2028.
72. Мареева Д.О., Цюпко Т.Г., Милевская В.В., Темердашев А.З. Определение галловой кислоты, катехина, эпикатехина и кофеина в экстрактах черного чая // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. С. 323.
73. Ky C.-L., Noiro M., Hamon S. / Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997. V. 45. P. 786-790.
74. Zhao W., Chen Y., Li S., Dai K. et al. // African Journal of Biotechnology. 2015. V. 14. P. 1731-1736.
75. Li Z., Wang L., Yang G., Shi H., et al. // Journal of Chromatographic Science. 2003. V. 41. P. 36-40.
76. Suárez B., Picinelli A., Mangas J.J. // Journal of Chromatography. 1996. V. 727. P. 203-209.
77. Zhang X., Liu W., Xu Y., Yang L., et al. // Chemical Research in Chinese Universities. 2011. V. 27. P. 550–556.
78. Suárez-Quiroz M.L., Campos A.A., Alfaro G.V., González-Ríos O. et al. // Journal of Food Composition and Analysis. 2014. V. 33. P. 55–58.
79. Темердашев З.А., Милевская В.В., Киселева Н.В., Верниковская Н.А. и др. // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. С. 211-218.
80. Hanai T., Tran C., Hubert J. // Journal of Separation Science. 1981. V. 4. P. 454–460.
81. Дейнека В.И., Сидоров А.Н., Дейнека Л.А., Тыняная И.И. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. №3. С. 384-389.

82. Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons // J. Agric. Food Chem. 2003. V.51, №.3. P. 628-633.

83. Everette J.D., Bryant Q.M., Green A.M., Abbey Y.A., Wangila G.W., Walker R.B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010. V.58. P. 8139 - 8144.

84. Makris D.P., Rossiter J.T. Comparison of Quercetin and a Non-Orthohydroxy Flavonol as Antioxidants by Competing in Vitro Oxidation Reactions // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. V.49. P. 3370-3377.

85. Анисимович И.П., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Фролов П.А., Мясникова П.А. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естеств. науки. 2010. Т.9. №.11. С. 104 – 111.