

Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии

М.В.Кочетова, Е.Н.Семенистая, О.Г.Ларионов, А.А.Ревина

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский просп., 31, факс (495) 952–0065

Рассмотрены хроматографические методы определения биологически активных фенолов и полифенолов. Проведено сравнение различных способов пробоподготовки и детектирования. Показаны преимущества метода высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием при определении антиоксидантов. Проанализированы литературные данные по определению биологически активных фенолов и полифенолов, опубликованные в период с 1995 по 2005 год.
Библиография — 270 ссылок.

Оглавление

I. Введение	88
II. Общая характеристика биологически активных фенолов и полифенолов	88
III. Пробоподготовка образцов	90
IV. Хроматографическое определение фенолов и полифенолов в различных объектах	92

I. Введение

За последнее десятилетие резко возросло число публикаций, посвященных хроматографическим исследованиям природных и синтетических биологически активных соединений.^{1–8} Особое внимание исследователи уделяют изучению антиоксидантной активности, в частности, соединений фенольной и полифенольной природы. Ухудшение экологической обстановки и увеличение числа стрессовых ситуаций приводят к снижению защитных сил организма современного человека. Это, в свою очередь, повышает риск возникновения патологических состояний (сердечно-сосудистых заболеваний, различных воспалительных процессов, атеросклероза и т.п.). Изучение активных форм и механизмов действия *in vitro* и *in vivo* природных и синтетических биологически активных соединений — актуальная проблема, связанная с сохранением здоровья людей.

Фенольные и полифенольные соединения обладают широким спектром биологической активности: они оказы-

вают антиоксидантное,^{9–11} противовоспалительное,¹² противоопухолевое,¹³ капилляроукрепляющее^{14,15} действие, а также являются гепатопротекторами.¹⁶ Они способны образовывать хелатные комплексы с металлами. Такие комплексы могут проявлять как антиоксидантную, так и прооксидантную[†] активность.^{17–19} Это обуславливает применение биологически активных соединений в медицине, фармакологии, биохимии, пищевой промышленности. Несмотря на широкое использование полифенольных соединений в качестве антиоксидантов, механизмы их действия *in vitro* и *in vivo*, а также случаи проявления данными соединениями свойств прооксидантов²⁰ все еще остаются не до конца выясненными. Это связано, с одной стороны, с существованием большого числа природных производных этих соединений и многообразием их окисленных форм, с другой — со сложностью составов экстрактов, из которых выделяют и определяют эти соединения. Поэтому при анализе биологически активных соединений необходима информация об их превращениях на всех этапах пробоподготовки.

В данном обзоре рассмотрены работы, посвященные хроматографическим методам определения биологически активных соединений фенольной и полифенольной природы, опубликованные за последние 10 лет. Акцент сделан на наиболее часто используемых методиках.

II. Общая характеристика биологически активных фенолов и полифенолов

Фенольные соединения — один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, проявляющих биологическую активность. Их отличительная

М.С.Кочетова. Кандидат химических наук, младший научный сотрудник ИФЭХ РАН. Телефон: (495)952–0065, e-mail: marie_k@bk.ru

Е.Н.Семенистая. Аспирант того же института.

Телефон: (495)952–0065, e-mail: EN_Semenistaya@mail.ru

О.Г.Ларионов. Доктор химических наук, главный научный сотрудник того же института. Телефон: (495)952–0065, e-mail: kolom@phs.ac.ru

А.А.Ревина. Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник того же института. Телефон: (495)955–0017, e-mail: revina_33@mail.ru

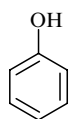
Область научных интересов авторов: хроматография, адсорбция, радиохимия, разделение хиральных изомеров биологически активных соединений.

Дата поступления 13 февраля 2006 г.

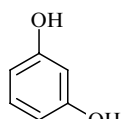
[†] Под прооксидантной активностью какого-либо соединения обычно понимают увеличение выхода активных кислород-центрированных радикалов в его присутствии.

особенность связана с наличием свободной или связанной OH-группы как заместителя в бензольном ядре.

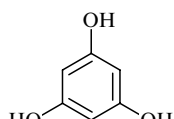
Простые производные бензола



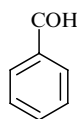
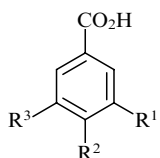
Фенол



Резорцин

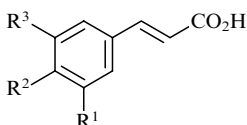


Флороглицин

n-Гидрокси-
бензальдегид

Фенолокислоты

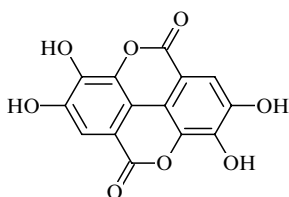
Ванилиновая кислота: $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$; галловая кислота: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{OH}$; сиреневая кислота: $R^2 = R^3 = \text{OMe}$, $R^1 = \text{OH}$; протокатеховая кислота: $R^1 = R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$.



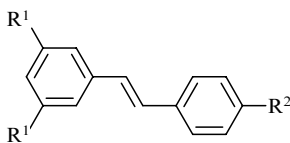
Гидроксикоричные кислоты

Коричная кислота: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$, n -кумаровая кислота: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$; кофейная кислота: $R^1 = R^3 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$; феруловая кислота: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{OMe}$; синаповая кислота: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = R^3 = \text{OMe}$.

Ароматические соединения, содержащие два и более неконденсированных ароматических кольца



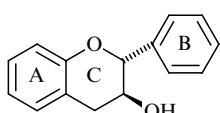
Эллаговая кислота



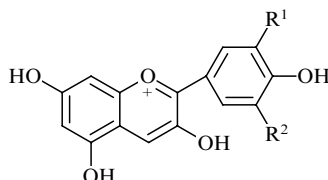
Стильбены

Стильбен: $R^1 = R^2 = \text{H}$; n -гидроксистильбен: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$; 3,5,4'-тригидроксистильбен (резвератрол): $R^1 = R^2 = \text{OH}$.

Флавоноиды (арилбензо[*b*]пираны) и кумарины

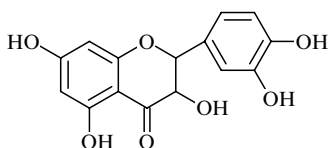


(+) -Катехин

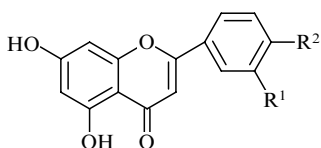


Антоцианидины

Пеларгонидин: $R^1 = R^2 = \text{H}$; цианидин: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$; дельфинидин: $R^1 = R^2 = \text{OH}$; мальвидин: $R^1 = R^2 = \text{OMe}$; петунидин: $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{OH}$.

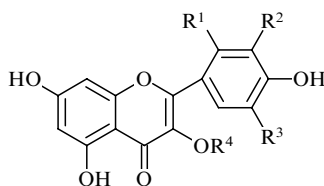


Таксифоллин (дигидрокверцетин)



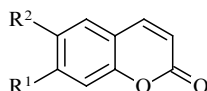
Флавоны

Хризин: $R^1 = R^2 = \text{H}$; апигенин: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$; лютеолин: $R^1 = R^2 = \text{OH}$.



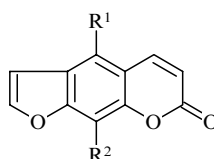
Флавонолы

Кемпферол: $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$; морин: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$; кверцетин: $R^1 = R^3 = R^4 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$; мирицетин: $R^1 = R^4 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{OH}$; кверцитрин (рамнозид кверцетина): $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^4 = \alpha\text{-L-Rhap}$; рутин (рутинозид кверцетина): $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^4 = \beta\text{-D-Glcp-(6}\leftarrow\text{1)}\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}$.



Кумарины

Эскулетин: $R^1 = R^2 = \text{OH}$, умбеллиферон: $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$.



Фурукумарины

Бергаптен: $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{H}$; ксантотоксин: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OMe}$; изопимпинеллин: $R^1 = R^2 = \text{OMe}$.

Фенолы содержатся почти во всех растениях в виде гликозидов или в свободном состоянии в количестве от 0.1 до 7%.²¹

Фенолоспирты и их гликозиды способствуют повышению работоспособности человека и сопротивляемости его организма к неблагоприятным воздействиям. Гидроксикоричные кислоты (n -кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая) в различных комбинациях, в свободном виде или в форме гликозидов и сложных эфиров содержатся во многих растениях²² и плодах.^{23,24} В природе наиболее распространены кофейная кислота и ее производные (хлорогеновая и ее изомеры), оказывающие противовоспалительное и желчегонное действие. Хлорогеновая кислота в больших количествах присутствует в зернах кофе, листьях черники обыкновенной, арники горной, ромашки лекарственной и др. Феруловая кислота входит в состав стенок клеток растений.²⁵ Совместно кофейная, хлорогеновая, феруловая, кумаровая кислоты оказывают гипотензивный эффект, усиливают функцию почек, стимулируют антиоксидантную функцию печени. Гидроксикоричные кислоты содержатся также в эхинаеце, корнях лопуха, боярышнике, реве.

Эллаговой кислотой богаты многие овощи и фрукты, особенно малина, клубника, гранаты. Стильбены содержатся в основном в древесине различных видов деревьев (сосны, эвкалипта и др.).

Катехины обнаружены во многих фруктах²⁶ (яблоках, персиках, абрикосах, айве, сливах) и ягодах (вишне, землянике, смородине, малине, крыжовнике, бруснике). Большое количество катехинов содержится в молодых побегах чайного куста²⁷ (до 20–25% от сухой массы) и акации катеху (отсюда название этих соединений), в винограде (главным образом в косточках и кожуре),²⁸ бобах какао.²⁹ Катехины обладают высокой биологической активностью; в организме человека они регулируют проницаемость капилляров и способствуют повышению упругости их стенок, а также увеличивают биодоступность аскорбиновой кислоты. Поэтому катехины относят к веществам, обладающим Р-витаминной активностью, и их используют при лечении заболеваний, связанных с нарушениями функций капилляров и при отеках.³⁰

В клеточных вакуолях многих цветов и фруктов локализованы такие пигменты, как антоцианидины и антоцианины (в виде олигомерных и полимерных форм (проантоцианидинов) или комплексов с металлами, белками, полисахаридами), придающие растениям яркую окраску.^{31,32} Проантоцианидины найдены в большинстве фруктов,³³ овощей,³⁴ в листьях многих растений. Основным источником их получения в промышленном масштабе являются косточки и кожура винограда, кора приморской сосны. В медицине их используют для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и снижения уровня холестерина в крови.³⁵ Проводятся исследования противоопухолевой активности антоцианидинов.³⁶ Нестабильность антоцианидинов, а также структурное разнообразие осложняют их качественный анализ.

Флавонолы (дигидрофлавонолы) содержатся главным образом в древесине хвойных (сосны, лиственницы, кедра) и некоторых лиственных (эвкалипта, бука, вишни) деревьев. Флаваноны встречаются в citrusовых. Гесперетин и его гликозид гесперидин содержатся в мякоти апельсина, лимона и цитрона, гликозид нарингин придает горьковатый вкус грейфрутам, эридиктиол содержится в лимонах.^{37,38}

Флавонолы наряду с флаванами относятся к желтым пигментам,³⁹ которые наиболее широко (практически повсеместно) распространены в растениях.⁴⁰ Особенно часто встречаются такие представители этих соединений, как кемпферол, кверцетин, мирицетин и их многочисленные производные. Одним из интересных биологически активных полифенолов, которому в последние годы посвящено много работ, является 3,5,4'-тригидроксистильбен (*транс*-резвератрол), входящий в состав красного вина. Обнаружено,⁴¹ что *транс*-резвератрол защищает липиды мембран от перекисидного окисления; при этом он менее эффективно, чем флавоноиды, поглощает свободные радикалы, но является наиболее эффективным хелатирующим агентом по отношению к ионам меди.

Кумарины также широко распространены в природе.^{42–44} Они содержатся в растениях семейств зонтичных, бобовых, рутовых, причем концентрируются преимущественно в корнях и плодах.⁴⁵ Доступность и легкость химической модификации кумаринов позволяет использовать их для создания препаратов медицинского назначения.⁴⁶ Производное мептазинола, созданное на основе кумарина, легче усваивается организмом, чем исходный препарат,⁴⁷ а производное кумарина с *транс*-резвератролом более эффективно как сосудорасширяющий агент по сравнению с *транс*-резвератролом.⁴⁸ Кумарины используют как антикоагулянты,⁴⁹ они проявляют бактерицидную,⁵⁰ фунгицидную⁵¹ и противоопухолевую⁵² активность.

К настоящему времени зависимость между антиоксидантной активностью и химической структурой полифенолов еще до конца не выяснена. Хроматографические методы позволяют изучать взаимосвязь между строением фенолов и некоторыми их свойствами.⁵³ Для этого используют моделирование удерживания в различных вариантах хроматографии,^{54–56} а также расчетные методы.⁵⁷ Однако уже установлено,⁵⁸ что антиоксидантная активность полифенолов возрастает в следующих случаях:

- а) при наличии двойной связи в положениях 2, 3 в гетероциклическом кольце, поскольку, видимо, при этом возможна делокализация электронов между кольцами А и В (см. формулу (+)-катехина), а следовательно, стабилизация образующегося арилоксилированного радикала;
- б) при наличии в кольце В гидроксильных групп в положениях 2 и 4, поскольку это, видимо, также способствует стабилизации образующегося радикала;
- в) при переходе от гликозидов полифенолов к агликонам, так как углеводные остатки в гликозидах способствуют существенному снижению антиоксидантной активности;

г) при наличии свободной фенольной гидроксильной группы.

Известно,^{59–65} что благодаря регулярному употреблению в пищу богатых полифенолами овощей, фруктов, красного вина, шоколада и т.п. наблюдается значительное снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний.

В зависимости от вида и концентрации инициатора свободных радикалов полифенолы могут вести себя и как антиоксиданты, и как прооксиданты.^{66–69} Сложность для понимания и объяснения двойственности в поведении полифенолов заключается в том, что, несмотря на значительное количество данных о высокой биологической активности, накопленных в последние годы, вопросы, касающиеся механизма их действия и существования в активных формах *in vitro* и *in vivo*, все еще открыты. Поэтому актуальна разработка методик определения фенолов и полифенолов в различных объектах с использованием разных методов анализа, в том числе и хроматографических.

III. Пробоподготовка образцов

Важной проблемой, с которой часто сталкиваются исследователи при изучении сложных смесей, является необходимость извлечения определяемых веществ из природных источников и тщательной предварительной очистки экстрактов различных образцов перед их анализом.

Стратегия определения биологически активных соединений в растениях зависит от природы и структуры исследуемого соединения, объекта анализа (образца), целей анализа и не может быть полностью унифицирована. Можно выделить следующие основные этапы исследования: экстракция веществ из образца, очистка экстракта от сопутствующих продуктов, разделение и идентификация.

1. Экстракция веществ из природных источников

Как правило, источником биологически активных соединений является растительное сырье. Поэтому первоочередная задача исследователя — максимальное извлечение из сырья целевых веществ, желательное в нативном виде. Для этого обычно используют методы жидкостной или сверхкритической флюидной экстракции, иногда — экстракцию паром под давлением. Предпочтение отдают методам экстракции, позволяющим провести предварительную очистку экстракта от отсутствующих веществ.

Растительный материал измельчают и обезжиривают петролевым эфиром, гексаном или хлороформом. Если необходимо выделить конкретное соединение или группу веществ из сложного образца, используют последовательную экстракцию растворителями возрастающей полярности (гексан, этиловый эфир, этилацетат, бутанол, водно-спиртовые смеси).⁷⁰ В простых случаях проводят одноступенчатую экстракцию метанолом^{71,72} или дихлорметаном.⁷³ Пинело с соавт.⁷⁴ для полного извлечения биологически активных фенолов из скорлупы миндаля и опилок сосны использовал этанол, а полифенолы селективно экстрагировал метанолом. Авторы работы⁷⁵ экстрагировали фенолы из стеблей, цветов и оболочки плодов индийского бобовника 90%-ным метанолом, а из листьев — 90%-ным этанолом. Для предварительного разделения флавоноидов растительных экстрактов используют препаративную тонкослойную хроматографию или препаративную обращенно-фазовую хроматографию.⁷⁶ Для выделения полифенолов из растительного материала чаще всего применяют 80%-ный этанол. Чистоту полученных фракций проверяют с помощью тонкослойной хроматографии.^{77–79}

Экстракцию и разделение антоцианинов и антоцианидинов проводят в кислой среде, чтобы избежать разрушения

неацилированных форм. Кроме того, при $\text{pH} < 2$ антоцианины дают наиболее стабильную резонансную форму — флавилиевый катион. Эффективность извлечения антоцианинов из листьев суккулента рода граптопеталум (*Graptopetalum paraguayense*) водой и водно-этанольными смесями при разных температурах изучена в работе⁸⁰. Найдено, что наибольшую антиоксидантную активность проявлял 50%-ный этанольный экстракт (экстракция в течение 3 ч, при 75°C). Смесь воды, ацетонитрила и муравьиной (1:1:0.1) (см.⁸¹) или трифторуксусной кислоты (1:1:0.5) (см.⁸²) использовали для выделения антоцианинов из лепестков растений семейства лилейных. Возможна также экстракция водой⁸³ или метанолом⁸⁴ с добавлением кислоты, однако время экстракции при этом составит 12–16 ч. Более эффективны смеси вода–метанол–органическая кислота. Такие экстрагенты использовали при выделении антоцианидинов декоративных растений.^{85–87} Эффективность экстракции увеличивается при использовании ультразвуковой ванны или магнитной мешалки.

Пробоподготовка процианидинов имеет свои особенности. Данные вещества легко образуют комплексы с металлами, полисахаридами, белками, что затрудняет их извлечение с использованием твердых сорбентов. Экстракция процианидинов из оболочек семян и мякоти плодов осложнена тем, что в процессе созревания плодов происходит окисление данных соединений. При этом образуются комплексы процианидин–полисахарид, за счет чего уменьшается растворимость процианидинов.⁸⁸

Рор с соавт.⁸⁹ предложил метод количественного определения процианидинов (трех димеров и одного тримера эпикатехина) в листьях и цветах боярышника методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для наиболее полной экстракции олигомерных процианидинов (выход 99%) был использован 70%-ный водный ацетон. Однако при выпаривании ацетона могут произойти полимеризация и осаждение целевых веществ. Авторы работ^{90,91} проводили экстракцию водным метанолом (7:3). Для получения экстрактов из листьев оливкового дерева, боярышника, орегано использовали метанол.⁹² Описан процесс извлечения процианидинов из коры кошачьего когтя (*Uncaria tomentosa*) водой при кипячении.⁹³ Для разрушения гликозидов флавоноидов и антоцианидинов проводят кислотный гидролиз при ~90°C в течение нескольких часов. Изучено воздействие добавки кислоты при экстракции на антиоксидантную активность экстрактов растений.⁹⁴ Отмечено, что за некоторыми исключениями такая активность повышается.

Эффективность извлечения методом жидкостной экстракции возрастает при увеличении давления. Папагианнопулос с соавт.⁹⁵ идентифицировал 41 полифенольное соединение в водно-ацетоновом экстракте цератонии, полученном таким методом. Варьируя температуру и давление, удалось селективно извлечь биологически активные фенолы водой из розмарина⁹⁶ и других растений.⁹⁷ При совместном использовании методов твердофазной экстракции и высокоэффективной жидкостной хроматографии удалось автоматизировать процесс определения процианидинов в союде.⁹⁸

С помощью метода сверхкритической флюидной экстракции можно значительно повысить эффективность извлечения лабильных соединений из биологических матриц. Как правило, используют сверхкритический диоксид углерода. Так как полярность CO_2 невелика, к нему нередко добавляют полярный модификатор. Влияние температуры, давления и добавки полярного растворителя на кинетику экстракции масла имбиря и его антиоксидантные свойства исследовано в работе⁹⁹. Эффективность сверхкритической флюидной экстракции фенолов из листьев оливкового дерева

возросла после добавления метанола к сверхкритическому CO_2 .¹⁰⁰ Термодинамическое моделирование растворимости кверцетина в сверхкритическом CO_2 в присутствии этанола проведено авторами работы¹⁰¹. Предложена схема широкомащштабной сверхкритической флюидной экстракции масла розмарина с последующим анализом фракций методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.¹⁰² Сообщалось¹⁰³ о применении сверхкритического CO_2 для фракционирования растительных экстрактов. Новые методы экстракции, такие как сверхкритическая флюидная экстракция и автоматическая туннельная твердофазная микроэкстракция, описаны в работе¹⁰⁴. Проведено сравнение степени извлечения полифенолов из косточек винограда методами жидкостно-жидкостной, твердофазной и сверхкритической флюидной экстракции.¹⁰⁵ Наиболее высокие степени извлечения получены с помощью последнего метода, возможно, благодаря тому, что образец находился в атмосфере диоксида углерода и был защищен от воздействия света. В данном случае сводятся к минимуму процессы разложения таких малоустойчивых соединений, как катехины.

Сравнение эффективности экстракции веществ из природных источников методами жидкостно-жидкостной, твердофазной экстракции и экстракции под давлением с использованием различных растворителей проведено в работе¹⁰⁶.

В обычных объектах исследования — растениях, ягодах, фруктах, овощах — содержатся разнообразные фенолы и полифенолы. Однако при экстракции, выделении и очистке зачастую происходят значительные потери этих соединений. Поэтому правильный выбор метода пробоподготовки исследуемых образцов является одним из ключевых моментов при качественном и количественном анализе сложных многокомпонентных систем.^{107, 108}

2. Методы очистки и концентрирования экстрактов

В литературе описаны^{109, 110} различные способы экстракции и очистки фенолов из сложных смесей: сверхкритическая флюидная экстракция, полупрепаративная высокоэффективная жидкостная хроматография, высокоскоростная противоточная жидкостная хроматография, экстракция перегретыми растворителями. Наиболее распространенными методами очистки и концентрирования полифенолов являются жидкостно-жидкостная и твердофазная экстракция.^{111–120}

Для правильной оценки количества фенольных соединений необходимо учитывать их возможные изменения. Особенно это актуально при анализе напитков и продуктов питания. В процессе их производства фенолы, содержащиеся в исходном сырье, претерпевают различные превращения.

Авторами работы¹²¹ изучено влияние разных технологий производства вина на состав фенолов и антиоксидантные свойства красного вина сортов Spatburgurder (Pinot Noir) и Cabernet Franc: ферментация кожуры винограда, нагревание сусла и сочетание этих технологий. Наиболее высокие концентрации антоцианов, флаван-3-олов, флавонолов и стильбенов определены в красном вине, приготовленном при сочетании технологий. Более низкие концентрации биологически активных соединений обнаружены в вине, приготовленном в условиях нагревания сусла; наиболее низкое содержание антоцианов установлено в вине, приготовленном в условиях ферментативной обработки кожуры. Показано,¹²² что процесс ферментации при производстве вина из ягод черной смородины и вишни вызывает снижение содержания общей полифенольной фракции на ~25%.

При экстракции фенольных соединений из грейпфрутового и апельсинового соков¹²³ и сухих листьев зеленого чая,¹²⁴ достаточно полное извлечение достигнуто методом жидкостно-жидкостной экстракции при многократном

Таблица 1. Элюенты, используемые при фракционировании и разделении экстрактов.

Фенолы	Тонкослойная, препаративная колоночная хроматография
Процианидины	MeOH, ацетон – вода, этилацетат – HOAc – H ₂ O
Антоцианы	Bu ⁿ OH – HOAc – H ₂ O (4 : 5 : 1); Bu ⁿ OH – 2 N HCl (1 : 1), 1% HCl, HOAc – HCl – H ₂ O (15 : 3 : 82)
Антоцианидины	HOAc – HCl – H ₂ O (30 : 3 : 10); HCO ₂ H – HCl – H ₂ O (5 : 2 : 3)
Фенольные кислоты	Bu ⁿ OH – HOAc – H ₂ O (4 : 5 : 1); EtAc – HOAc – H ₂ O (3 : 1 : 1); EtOH – H ₂ O – NH ₄ OH (16 : 3 : 1); толуол – HOAc – H ₂ O (40 : 10 : 5)

Примечание. В методе высокоэффективной жидкостной хроматографии в качестве элюентов используют смеси: органический растворитель (метанол, ацетонитрил, этанол) – вода – кислота (HCl, уксусная, трифторуксусная, муравьиная, фосфорная) либо органический растворитель — кислота.

экстрагировании водно-метанольными и подкисленными метанольными растворами. Однако твердофазная экстракция¹²⁵ обеспечивает большую степень извлечения фенолов и полифенолов из различных образцов, чем жидкостно-жидкостная. Основные элюенты для фракционирования и разделения экстрактов представлены в табл. 1.

IV. Хроматографическое определение фенолов и полифенолов в различных объектах

1. Определение в растительных материалах

Для определения фенолов в объектах с большим числом компонентов (сложных смесях) чаще всего используют хроматографию и капиллярный электрофорез. Из-за термической и химической лабильности большинства определяемых соединений применяют тонкослойную хроматографию, высокоэффективный вариант этого метода, капиллярный электрофорез и высокоэффективную жидкостную хроматографию. Тонкослойная и флэш-хроматография были первыми методами разделения многих биологически активных соединений растительного происхождения. Эти методы отличаются простотой и дешевизной. Методы высокоэффективной и двумерной тонкослойной хроматографии можно использовать для анализа сложных природных источников фенолов.

Экстракты растений не требуют тщательной очистки методом тонкослойной хроматографии. Примерами таких анализов являются качественное и количественное определение флавоноидов в экстракте пассифлоры (*Passiflora coerulea*)¹²⁶ и бука.¹²⁷ Флавоноиды детектировали при облучении УФ-светом,¹²⁸ процианидины и антоцианы — визуализировали при распылении 5%-ного раствора ванилина в смеси этанол – HCl (4 : 1).¹²⁹ Агликоны и гликозиды детектировали в УФ-свете и затем визуализировали при опрыскивании раствором H₂SO₄ и нагревании.¹³⁰ Сканирующую денситометрию использовали при анализе растительных пигментов.¹³¹ Одновременное разделение и детектирование соединений с антиоксидантными свойствами проводили на пластинках с нанесенными на них в качестве индикаторов 1,1-дифенилпикрилгидразидом¹³² и наночастицами серебра.¹³³

Газовая хроматография ограничено применяется для анализа природных биологически активных соединений

из-за необходимости дериватизации фенолов в метил- или триметилсилилпроизводные. Тем не менее такие работы проводят. Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием определены фенольные кислоты из экстракта кориандра,¹³⁴ основные флавоноиды и их гликозиды из древесины ивы,¹³⁵ фенолы в масле полыни.¹³⁶ Фиамегос с соавт.¹³⁷ разработал методику одновременной экстракции и дериватизации для определения флавоноидов и фенольных кислот в растительных экстрактах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Наиболее часто для определения фенолов используют высокоэффективную жидкостную хроматографию. Это объясняется следующими достоинствами метода: высокой селективностью сорбентов, чувствительностью и селективностью диодно-матричного, ультрафиолетового, флуоресцентного, масс-спектрометрического детекторов и мягкими температурными условиями анализа, при которых анализируемые вещества не разлагаются. Высокоэффективную жидкостную хроматографию на обращенно-фазовых колонках с бинарными системами растворителей и диодно-матричным детектором используют как для рутинных анализов, так и для исследования сложных по составу экстрактов растений. Предел детектирования флавоноидов удастся понизить, используя электрохимический и флуоресцентный¹³⁸ детекторы. Примеры систем растворителей и колонок для этого вида хроматографии экстрактов растений приведены в табл. 2.

Хроматография с амперометрическим детектированием применяется для оценки антиоксидантной активности продуктов питания, напитков и лекарств.^{149,150} Большинство природных биологически активных фенолов способны окисляться на электроде, поэтому для их определения удобно использовать амперометрический детектор. Он позволяет устанавливать присутствие неизвестных соединений в сложных природных источниках фенолов, тогда как с помощью классических химических методов¹⁵¹ можно оценить лишь общую антиоксидантную активность образца или активность известного соединения.

Трудности, возникающие при определении фенолов хроматографическими методами, в основном связаны (помимо необходимости предварительной очистки экстрактов перед введением в колонку) с отсутствием необходимых стандартов из-за огромного разнообразия природных форм этих соединений. Поэтому иногда при анализе сложных растительных экстрактов используют, так называемый fingerprint-метод идентификации — «метод отпечатков пальцев».^{152,153} Эти «отпечатки» являются специфическими для каждого вида растений и могут быть использованы при определении источника происхождения растительного сырья. Вторичные метаболиты, в том числе фенольные кислоты и флавоноиды, применяют как химические маркеры в «отпечатках».¹⁵⁴ По изменениям их состава и количества различают виды растений.¹⁵⁵ Для выявления фальсифицированных лекарственных форм используют сочетание метода «отпечатков пальцев» и хроматографического анализа биологических жидкостей.¹⁵⁶

Количественное и качественное определения проантоцианидинов и их производных проводят различными методами,¹⁵⁷ но главным образом применяют хроматографию и спектрометрию.

В основе спектрометрических методов лежат реакции получения хромофоров (метод Фолина – Кокто, применение HCl – BuOH, ванилина и др.). Однако данные методы не дают информации о количестве и структуре олигомеров с различной степенью полимеризации. Спектрометрия используется для определения общего количества процианидинов в сложных образцах,⁹³ но в последнее время она вытесняется масс-

Таблица 2. Результаты анализов экстрактов некоторых флавоноидов в растительных образцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Образец	Идентифицированные соединения	Экстрагент	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Ссылки
Красный клевер	11 флавоноидов	Этанол, метанол; кислотный гидролиз	HP ODS Hypersil	H ₂ O/AcOH – MeOH	УФ-МС	139
Страстоцвет (<i>Passiflora incarnata</i>)	10 флавоноидов	«Сухой» экстракт	LiChrospher RP-18	H ₂ O – THF – MeCN – Pr ⁱ OH	УФ-МС	140
Ладанник (<i>Cistus ladanifer</i>)	8 флавоноидов	Хлороформ, метанол	LiChrosorb RP-18	0.1 M NH ₄ Ac в H ₂ O – THF – MeCN – Pr ⁱ OH	УФ-МС	141
Наземная часть зверобоя (<i>Hypericum perforatum</i> , сушо Св. Джона)	16 фенольных соединений	Метанол	TP 544 RP-18	H ₂ O/H ₃ PO ₄ – MeCN – MeOH	УФ-МС	142
Орегано, тмин, укроп	Флавоноиды, метоксифлавоноиды	Метанол – вода (62.5%)	Phenomenex RP C ₁₈	H ₂ O/HCO ₂ H – MeOH	УФ, МС-МС	143
Кора лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина	21 флавоноид	Этилацетат	ТСХ: силикагель, ВЭЖХ: сепарон C ₁₈	H ₂ O/AcOH – MeCN	УФ, ИК, ЯМР	144
Наземная часть растения рода <i>Gnidia</i> (<i>Gnidia socotrana</i>)	Производное флавонона и кумарина	Этанол, гептан, этилацетат, <i>n</i> -бутанол	RP 18	MeOH; H ₂ O/AcOH – MeCN	УФ, УФ-МС	145
Циклопия	8 флавоноидов, разделены два изомера	Метанол	Phenomenex Synergy MAX-RP C ₁₂	H ₂ O/AcOH – MeCN – THF	Электрохимический детектор	146
Вероника (<i>Veronica thymoides</i>)	Ацилированные флавоноиды и гликозиды	Метанол, петролейный эфир	Полиамидная колонка для флэш-хроматографии, ТСХ: силикагель	MeOH – CHCl ₃ , MeOH – H ₂ O	Флуоресцентный детектор	147
Бразильская сосна	6 флавоноидов	Метанол – вода, гексан	Phenomenex Synergy C18	MeOH – CHCl ₃ /HCO ₂ H	DAD, МС	148

Примечание. Приняты следующие обозначения: УФ-МС — сочетание УФ- и масс-спектрометрического детектирования, МС-МС — тандемная масс-спектрометрия, ТСХ — тонкослойная хроматография, DAD — диодно-матричное детектирование (Diode Array Detector).

спектрометрией. Методы гель-хроматографии,¹⁵⁸ тонкослойной и колоночной хроматографии используют для выделения фракций антоцианов и процианидинов и разделения их по степени полимеризации.^{92–94} Разделить смесь индивидуальных процианидинов (от мономеров до тримеров) можно методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.^{99, 159} Метод, предложенный в работе⁹¹, позволил разделить олигомеры эпикатехина в экстракте листьев боярышника от мономеров до гексамеров и выделить неизвестные ранее тримеры и пентамер с использованием полиамидной колонки и элюента на основе ацетонитрила.

Метод капиллярного электрофореза получает все большее распространение для определения фармакологически важных соединений в растениях.^{160–162} При определении *транс*-резвератрола был использован боратный буфер (рН 8–11), так как бораты образуют комплексы с гидроксильными группами флавоноидов, облегчая разделение.¹⁶³ Разделение флавоноидов облепихи проводили в присутствии модификатора — диметил-β-циклодекстрина.¹⁶⁴ Авторы работы¹⁶⁵ методом капиллярного электрофореза разделили антоцианины в кислой среде.

Разделить нейтральные молекулы в электрическом поле можно методом мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии. Варьируя концентрацию мицеллообразователя (как правило, додецилсульфата), изменяют селективность системы. Используют различные модификаторы: при определении флавоноидов, фенольных кислот и

альдегидов — метанол,¹⁶⁶ флавоноидов и иридоидов — бутан-1-ол,¹⁶⁷ кумаринов — ацетонитрил.¹⁶⁸ Недостатками метода являются меньшая, чем в высокоэффективной жидкостной хроматографии, чувствительность и воспроизводимость результатов.

2. Определение в напитках и продуктах питания

Для детектирования фенолов чаще всего применяют спектрофотометрический метод с использованием разных длин волн: 230, 280, 360, 503 нм и др. В некоторых исследованиях при изучении отдельных групп флавоноидов была использована только одна длина волны: для катехинов — 280 нм,^{169–173} для антоцианов — 520 нм.^{174–178} В других работах при определении фенолов применяли детектирование на длинах волн: 280, 306, 360 нм.^{179–184} Поскольку многие фенолы имеют несколько максимумов поглощения, то для их определения часто применяют одновременное сканирование по нескольким длинам волн — диодно-матричное детектирование.^{185–190} Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием часто используют для определения фенолов, содержащихся в пищевых продуктах и напитках. Его основное преимущество — низкие пределы обнаружения. Например, в работе¹⁹¹ предел обнаружения катехинов в экстракте зеленого чая составил 0.05 мг · мл^{–1} (детектирование на 205 нм). Примеры использования диодно-матричного детектирования при определении фенолов и полифенолов в

Таблица 3. Результаты определения антиоксидантов фенольной и полифенольной природы во фруктах, овощах и напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Объект	Идентифицированные соединения	Детектор	Определенные концентрации	Ссылки
Яблоки, виноград, фасоль	(+)-Катехин, (-)-эпикатехин, 3 производных катехина	DAD	0.1–3.9 мг на 1 кг — —	192
Сок грейпфрута	Нарингин	DAD 280 нм	2.5 мг · л ⁻¹	193
Ягоды винограда	<i>транс</i> -Резвератрол, рутин, кверцетин, кверцитрин	DAD 306 нм	4.5–10.1 мг на 100 г, — 0.16–0.45 мг на 100 г —	194
Болгарские вина, 11 сортов	Кверцетин, мирицетин, морин, кемпферол	DAD 360 нм	Максимальное содержание суммы флавонолов в сорте Melnic: 12.2–16.9 мг · л ⁻¹	195
Зеленый и черный чай	16 фенольных соединений, в том числе (-)-эпигаллокатехин	DAD 205 нм	2.84 мг · г ⁻¹ (черный чай), (23.46–36.53) мг · г ⁻¹ (зеленый чай)	196–199
Соки и напитки	21 фенольное соединение, в том числе: кверцетин (-)-хининовая кислота	DAD 215 нм	0.03 мг · л ⁻¹ 12.5 мг · л ⁻¹	200

экстрактах фруктов, овощей и напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии приведены в табл. 3.

Определение фенольных соединений в продуктах питания и напитках часто проводят на модифицированных силикагелях в обращенно-фазовом варианте, поскольку при разделении на обращенно-фазовых колонках выше селективность разделения, лучше воспроизводимость результатов, а также такие колонки имеют более длительный срок службы. Некоторые типы модифицированных силикагелей, наиболее часто используемые при анализе фенолов в различных объектах, представлены в табл. 4.

Для повышения чувствительности и селективности определения фенольных кислот и альдегидов используют одно-временное диодно-матричное и флуоресцентное детектирование. Чтобы обеспечить максимальную чувствительность анализа, флуоресцентный детектор должен быть запрограммирован во времени по оптимальным длинам волн возбуждения и флуоресценции для группы фенолов со схожими спектральными характеристиками. Для составления оптимальной программы детектирования сложного образца представляет интерес использование статистических мульти-вариантных методов.¹⁸⁸ После оптимизации всех индиви-

Таблица 4. Характеристики некоторых обращенно-фазовых колонок, используемых при анализе фенольных соединений в различных объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Объект	Колонка			Время и режим элюирования	Идентифицированные соединения	Ссылки
	тип сорбента	размеры, колонки, мм	диаметр зерна сорбента, мкм			
Соки (яблочный и мультифруктовый)	Shim-Pack VP-ODS	250 × 4.6	5	80 мин, градиентный	31 фенол	201
Клюква	XDR C ₁₈	150 × 4.6	5	47 мин, градиентный	13 фенолов	202
Яблоки, груши	Nucleosil 120 C ₁₈	250 × 4.6	5	25 мин, градиентный	5 фенолов	203
Зеленый и черный чай, 8 сортов	PartiSphere 5 C ₁₈	110 × 4.6	3	27 мин, градиентный	15 фенолов	191
Шоколад, 11 сортов	Hypersil ODS	250 × 4.6	5	30 мин, изократический	9 фенолов	173
Грейпфрут, апельсин	μ-Bondapak C ₁₈	250 × 4.6	5	20 мин, изократический	3 фенола	204
Белое вино, 11 сортов	Alltima	100 × 4.6	3	20 мин, изократический	4 фенола	205
Ягоды винограда	Hypersil ODS	150 × 4.6	5	25 мин, градиентный	4 фенола	206
Красное и белое вино, 5 сортов	Nova-Pak C ₁₈	150 × 3.9	4	34 мин, градиентный	17 фенолов	207
Лук, соя	Hypersil 120	125 × 4.6	3	30 мин, градиентный	5 фенолов	208
Зеленый чай	YMC-Pack ODS-AQ	150 × 4.6	5	50 мин, изократический	6 фенолов	209
Апельсиновый сок	Luna	150 × 2.0	3	15 мин, градиентный	10 флавоноидов	181
Цедра лимона	Nova Pak C ₁₈	150 × 4.6	5	60 мин, градиентный	7 флавоноидов	210
Вино ^а	Spherisorb ODS 2	250 × 4.6	3	55 мин, градиентный	17 фенолов	211
Концентраты апельсинового и грейпфрутового соков	Alltech C ₁₈	250 × 4.6	5	30 мин, изократический	3 гликозида флавоноидов	123
Французское вино ^б	Nucleosil 100 C ₁₈	250 × 4.0	5	75 мин, градиентный	1 фенол	212
Семена льна	Sperisorb S-ODS	250 × 4.0	5	50 мин, изократический	6 фенолов	213
Чечевица, бобы	Nucleosil 120 C ₁₈	250 × 4.6	5	20 мин, градиентный	5 фенолов	214

^а Марка вина не уточнена. ^б По 5 сортов красного и белого вина.

Таблица 5. Пределы обнаружения и результаты количественного определения флавоноидов в апельсиновом соке, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с разными детекторами.¹⁸⁶

Соединение	Детектор		
	УФ	масс-спектрометр	электрохимический
<i>Пределы детектирования (мкг на 1 мл) некоторых флавоноидов</i>			
Кверцетин	0.15	0.2	0.3
Нарирутин	0.2	0.1	1.0
Эриоцитрин	0.2	0.08	0.5
Гесперидин	0.3	0.1	0.5
Нарингин	0.25	0.15	1.0
<i>Содержание (мг на 100 г) флавоноидов, детектированных в соке</i>			
Кверцетин	1.34 ± 0.15	0.90 ± 0.03	1.18 ± 0.11
Нарирутин	5.10 ± 0.17	5.4 ± 0.2	5.0 ± 0.6
Эриоцитрин	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	—
Гесперидин	73 ± 7	78.9 ± 0.4	79.3 ± 0.5
Нарингин	2.6 ± 0.3	0.14 ± 0.0	—

дуальных параметров анализа предел детектирования для *транс*-резвератрола с использованием флуоресцентного детектора составил 0.003 мг·л⁻¹, а для диодно-матричного — на порядок выше — 0.02 мг·л⁻¹ (см.¹⁸⁷).

В работе²¹⁵ проведено сравнение чувствительности разных вариантов детектирования при определении флавоноидов в апельсиновом соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пределы детектирования и концентрации некоторых флавоноидов, обнаруженных в апельсиновом соке, представлены в табл. 5. Видно, что высокая воспроизводимость и возможность количественного определения флавоноидов на низком уровне были характерны для всех методов детектирования.

Часто исследуемые соединения имеют широкий диапазон полярности, поэтому для их анализа необходимо использовать градиентный режим элюирования или несколько подвижных фаз при изократическом элюировании. В работе¹²² для определения антоцианов, флаван-3-олов, флавонолов, фенольных кислот в болгарских винах трех сортов был использован изократический режим, а при определении стильбенов в этих же сортах вин — градиентный режим элюирования. В некоторых случаях практически отсутствовала стадия пробоподготовки образца. При анализе изомеров *транс*-резвератрола в красном вине образец непосредственно (минуя стадию пробоподготовки) вводили в хроматографическую колонку и выделяли фракции каждого из исследуемых стильбенов с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.²¹⁶ Далее эти фракции анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.[‡]

Одним из распространенных способов обнаружения фенолов является кулонометрическое детектирование. В таком случае, в отличие от амперометрического определения, исследуемые соединения полностью окисляются. Кулонометрический детектор использован для качествен-

ного и количественного определения фенолов в растительных маслах.¹⁹⁵ Преимуществами этого детектора являются простота конструкции и возможность одновременного совместного определения элюирующихся веществ, имеющих разные окислительные потенциалы. Этот детектор обладает более низким пределом обнаружения по сравнению с УФ-детектором и более высокой селективностью при использовании для количественных определений биологически активных фенолов в растительных экстрактах. Однако его недостатками являются загрязнение электрода продуктами окисления и как следствие изменение характеристик электрода, зависимость сигнала от расхода элюента, а также ограниченные возможности использования в градиентном режиме элюирования.²¹⁸ В работе²¹⁹ обнаружено, что фенольные кислоты и токоферолы имеют максимальный отклик кулонометрического детектора при низких потенциалах (100–450 мВ), а флавоноиды показывают максимальные отклики в двух интервалах: 0–300 и 600–900 мВ.

При исследовании сложных природных объектов с использованием любого хроматографического метода важной стадией является идентификация разделяемых компонентов. Эту задачу решают путем сравнения времен удерживания, спектральных данных и/или индексов удерживания стандартных (реперных) соединений с аналогичными параметрами исследуемых веществ. Наиболее информативные данные при анализе природных объектов могут быть получены при совместном использовании всех характеристик.²²⁰ Для идентификации фенольных соединений, определяемых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, проводят сравнение спектральных характеристик (масс-спектров)²²¹ и индексов удерживания^{222, 223} с соответствующими характеристиками стандартных веществ. Идентифицировать примеси в дигидрокверцетине в отсутствие стандартных веществ²²⁴ можно, анализируя совместно индексы удерживания и спектральные отношения на разных длинах волн. Возможно использование индексов удерживания в методе мицеллярной электрокинетической хроматографии.²²⁵

В последние годы для идентификации фенолов, присутствующих в растительном сырье и продуктах питания, в основном используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием^{226–230} или сочетание диодно-матричного и масс-спектрометрического детектирования с различными источниками ионизации.^{231–234} Последний метод особенно ценен при изучении ацилированных флавоноидных гликозидов, содержащихся в растениях, овощах, фруктах в малых количествах.

Авторами работы²³⁵ с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с химической ионизацией при атмосферном давлении качественно и количественно охарактеризованы экстракты около 40 разновидностей фруктов и овощей. Выделены и идентифицированы 7 флавоноидов. Обнаружено, что, например, в исследуемых яблоках содержится до 2 мг кверцетина на 100 г массы образца, а в петрушке — до 185 мг апигенина на 100 г массы образца.

При исследовании флавоноидов во многих пряных растениях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором с ионизацией электрораспылением (Electrospray Ionization) показана¹⁴³ возможность определения молекулярных масс агликона и гликозида.

Капиллярный электрофорез начинают активно использовать для определения фенолов в соках, чае, растительных маслах, винах, ягодах.^{236–241} Преимуществами этого метода являются возможность введения образца под давлением в капилляр в разбавленном виде,²⁴² т.е. исключение стадии пробоподготовки, а также проведение экспериментов при более широком диапазоне изменения значений pH,^{243, 244}

[‡] Оригинальная методика анализа гидрофобных образцов, включающая прямой ввод жиров растительного и животного происхождения в колонку, описана в работе²¹⁷. Методика может быть применена для определения биологически активных соединений в растительных маслах.

чем в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В обзоре²⁴⁵ приведен интересный пример использования капиллярного электрофореза для разделения шести диастереомерных флаванон-7-*O*-гликозидов. Разделение было проведено при pH 10 в фосфатном буфере с добавлением к фоновому электролиту хиральных соединений — различных циклодекстринов и их производных. В выбранных условиях проведен анализ лимонного сока и разделена на хиральные изомеры смесь содержащихся в нем четырех флаванон-7-*O*-гликозидов.

В настоящее время метод капиллярного электрофореза используют как дополнительный к высокоэффективной жидкостной хроматографии при разделении и определении фенолов.

3. Определение в биологических жидкостях

Анализ биологических жидкостей (крови, мочи) проводят на наличие антиоксидантов, а также с целью оценки биодоступности этих соединений (после приема различных пищевых продуктов), изучения их метаболизма и влияния на здоровье человека. Практически во всех подобных исследованиях применяют методы высокоэффективной жидкостной хромато-

графии и капиллярного электрофореза. Обзору применений капиллярного электрофореза, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием, для анализа антиоксидантов, метаболитов, токсинов посвящена работа²⁴⁵. В данном обзоре мы подробнее остановимся на методе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Процесс экстракции флавоноидов из биологических жидкостей достаточно прост. Пробу центрифугируют с целью удаления белков и других высокомолекулярных примесей, проводят твердофазную экстракцию и извлечение метанолом, этанолом, этилацетатом. При необходимости осуществляют ферментативный или кислотный гидролиз. В работе²⁴⁶ проведено сравнение способов пробоподготовки образцов крови. Показано, что добавление антикоагулянтов заметно не влияет на точность анализа, а наилучшим стабилизатором является 1%-ная аскорбиновая кислота в смеси с ортофосфорной кислотой (10 мкл · мл⁻¹). Образцы рекомендуются хранить при -20°C.

Первыми флавоноидами, количественно определенными в моче человека, были изофлавоны. К настоящему времени разработаны методы рутинного анализа крови и мочи человека на наличие даидзеина, эквола в количествах 120 нг · мл⁻¹ (см.²⁴⁷) с использованием метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с

Таблица 6. Характеристики некоторых методов определения биологически активных фенолов в различных образцах.

Образец	Идентифицированные соединения	Экстрагент	Гидролиз	Метод ^a	Предел детектирования, нг · мл ⁻¹	Ссылки
Кровь, сыворотка и плазма крови человека, моча крысы	(+)-Катехин, кверцетин, <i>транс</i> -резерватол	Этилацетат	См. ^b	ГХ-МС	0.01	261
Кровь, моча человека	Кверцетин и его гликозиды	Водный метанол	HCl–метанол, 5 ч (кровь), 8 ч (моча)	ВЭЖХ, флуоресцентный детектор	—	262
Плазма крови крысы	Кверцетин	Предварительная очистка на колонне C ₁₈ , экстракция смесью толуол–CH ₂ Cl ₂	Аскорбиновая кислота + β-глюкуронидаза	ВЭЖХ, электрохимический детектор	0.63	263
Моча, кровь крысы	Флавоноиды, фенилалкильные кислоты	Вода, метанол, фракционирование (SPE C ₁₈)	HCl–метанол, 45 мин	ОФ ВЭЖХ-УФ (C ₈ , C ₁₈)	—	264
Плазма крови человека	Нарингин, нарингенин	Этанол, фракционирование (Sep-Pak, C ₁₈ , 80% метанол)	—	ОФ ВЭЖХ-УФ (C ₁₈)	2	265
Плазма крови человека	Катехин, эпикатехин, 3 производных	Этилацетат	HCl–метанол, 30 мин	ОФ ВЭЖХ-УФ (C ₁₈)	—	266
Моча человека	Апигенин, акацетин	Добавка 2 М NaAc + 10%-ной аскорбиновой кислоты	β-Глюкуронидаза + арилсульфатаза, 60 мин	ОФ ВЭЖХ-УФ с переключением колонок (C ₈ , C ₁₈)	10–70	267
Плазма крови человека	Нарингенин, гесперетин	ТФЭ на картридже C ₁₈	β-Глюкуронидаза + арилсульфатаза, 18 ч	ВЭЖХ-УФ, C ₈	10	268
Кровь, моча, ткани крысы	Смесь 8 катехинов	Метанол–этилацетат–дитионит натрия (2 : 1 : 3)	β-Глюкуронидаза + арилсульфатаза, 45 мин	ОФ ВЭЖХ, электрохимический детектор (C ₁₈)	5	269
Сыворотка крови человека	6 фенольных кислот и альдегидов	Муравьиная кислота–ацетон–вода (4 : 140 : 56)	—	ВЭЖХ-МС (C ₁₈)	8	270

Примечание. Принятые следующие обозначения: ГХ-МС — газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, ОФ ВЭЖХ-УФ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием, ТФЭ — твердофазная экстракция, ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием, ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

^a В скобках указан углеводородный сорбент. ^b Перед анализом проводили модификацию образца бис(триметилсилил)трифторацетамидом.

УФ-детектированием. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектором более чувствителен: он позволяет определять даидзеин, генистеин, эквол на уровне $1-2 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (см.²⁴⁸). Идентификация метаболитов изофлавонов в сыворотке крови и тканях внутренних органов крыс при их минимальном содержании $10-20 \text{ пг} \cdot \text{мл}^{-1}$ осуществлялась методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.²⁴⁹ Быстрый метод определения изофлавонов в моче с помощью иммунофлуоресцентного анализа предложил Уехара с соавт.²⁵⁰ Метод чувствителен ($0.1 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$), воспроизводим (среднеквадратическое отклонение — $2-10\%$ между сериями анализов), однако, как и метод газовой хроматографии с таким же детектированием, дорогой и трудоемкий.

Для определения общего количества кверцетина и его метаболитов в биологических образцах применяют метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием,²⁵¹⁻²⁵⁴ а также другие методы, например, варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии — с масс-спектрометрическим,²⁵² УФ- (см.^{255, 256}), аффинно-хроматографическим,²⁵⁷ флуоресцентным и электрохимическим^{258, 259} детектированием. Предложены методы газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором для определения кверцетина и его конъюгатов в моче и плазме крови человека в концентрациях до $10 \text{ пг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (см.²⁶⁰). Характеристики некоторых методов определения кверцетина и других биологически активных фенолов приведены в табл. 6.

Таким образом, в настоящее время метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с различными способами детектирования (чаще всего, диодно-матричным или масс-спектрометрическим) является одним из наиболее эффективных для разделения и идентификации биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах.

Литература

1. A. Alanko, A. Ruitta, P. Holm, I. Mucha, T. Metsa-Ketela. *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 193 (1999)
2. W. Deng, X. Fang, J. Wu. *Radiat. Phys. Chem.*, **50**, 271 (1997)
3. A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Ronina, F. Castelli. *Free Radical Biol. Med.*, **19**, 481 (1995)
4. Q. Guo, B. Zhao, M. Li, S. Shen, W. Xin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1304**, 210 (1996)
5. J. Jodoin, M. Demeule, R. Beliveau. *Biochim. Biophys. Acta*, **1542**, 149 (2002)
6. А.А. Семенов. *Очерк химии природных соединений*. Наука, Новосибирск, 2000
7. J.-M. Kong, L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia, R. Brouillard. *Phytochemistry*, **64**, 923 (2003)
8. C. A. Williams, R. J. Grayer. *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 539 (2004)
9. А.А. Ревина, О.Г. Ларионов, М.В. Кочетова, Т.К. Луцук, Г.И. Эль-Регистан. *Изв. АН. Сер. хим.*, **11**, 2257 (2003)
10. А.А. Ревина. Автореф. дис. д-ра хим. наук. ИФХ РАН, Москва, 1995
11. А.А. Ревина. In *The IIIrd International Symposium on Colourants*. Princeton, USA, 1998. P. 278
12. E. Middleton Jr., C. Kandaswami, T. C. Theoharides. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673 (2000)
13. H. Nishino, M. Murakoshi, X. Y. Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Ohsaka, Y. Satomi, K. Jinno. *Oncology*, **69**, 38 (2005)
14. M. N. Diaz, B. Frei, J. A. Vita, J. F. Keaney. *New Engl. J. Med.*, **337**, 408 (1997)
15. K. J. Joshipura, F. B. Hu, J. E. Manson, M. J. Stampfer, E. B. Rimm, F. E. Speizer, G. Colditz, A. Ascherio, B. Rosner, D. Spiegelman, W. C. Willett. *Ann. Intern. Med.*, **134**, 1106 (2001)
16. P. Vitaglione, F. Morisco, N. Caporaso, V. Fogliano. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **44**, 575 (2004)
17. M. M. Silva, M. R. Santos, G. Caroco, R. Rocha, G. Justino, L. Mira. *Free Radical Res.*, **36**, 1219 (2002)
18. А.А. Ревина, П.М. Зайцев, Д.М. Федулов, Г.А. Желтухина, В.Е. Небольсин. *Журн. физ. химии*, **77**, 364 (2003)
19. L. Mira, M. T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. H. Florêncio, K. R. Jennings. *Free Radical Res.*, **36**, 1199 (2002)
20. G. Galati, P. J. O'Brien. *Free Radical Biol. Med.*, **37**, 287 (2004)
21. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572 (2002)
22. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke. *Life Sci.*, **74**, 2157 (2004)
23. Y.-Y. Soong, P. J. Barlow. *Food Chem.*, **88**, 411 (2004)
24. M. Nacz, F. Shahidi. *J. Chromatogr., A*, **1054**, 95 (2004)
25. S. Mathew, T. E. Abraham. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **4**, 59 (2004)
26. J.-B. Ruidavets, P.-L. Teissedre, J. Ferrieres, S. Carando, G. Bougard, J.-C. Cabanis. *Atherosclerosis (Shannon, Irel.)*, **153**, 107 (2000)
27. J. Peterson, J. Dwyer, S. Bhagwat, D. Haytowitz, J. Holden, A. L. Eldridge, G. Beecher, J. Aladesanmi. *J. Food Compos. Anal.*, **18**, 487 (2005)
28. S. Tsanova-Savova, F. Ribarova, M. Gerova. *J. Food Compos. Anal.*, **18**, 691 (2005)
29. M. Arlorio, J. D. Coisson, F. Travaglia, F. Varsaldi, G. Miglio, G. Lombardi, A. Martelli. *Food Res. Int.*, **38**, 1009 (2005)
30. G. Lill, S. Voit, K. Schror, A.-A. Weber. *FEBS Lett.*, **546**, 265 (2003)
31. K. Takeda, A. Osakabe, S. Saito, D. Furuyama, A. Tomita, Y. Kojima, M. Yamadera, M. Sakuta. *Phytochemistry*, **66**, 1607 (2005)
32. A. M. González-Paramás, F. L. da Silva, P. Martín-López, G. Macz-Pop, S. González-Manzano, C. Alcalde-Eon, J. J. Pérez-Alonso, M. T. Escribano-Bailón, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. *Food Chem.*, **94**, 428 (2006)
33. N. P. Seeram, R. A. Momin, M. G. Nair, L. D. Bourquin. *Phytomedicine*, **8**, 362 (2001)
34. A. F. Vinha, F. Ferreres, B. M. Silva, P. Valentão, A. Gonçalves, J. A. Pereira, M. B. Oliveira, R. M. Seabra, P. B. Andrade. *Food Chem.*, **89**, 561 (2005)
35. F. Galvano, L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N. C. Battistini, B. Tavazzi, G. Galvano. *J. Nutr. Biochem.*, **15**, 2 (2004)
36. D. Cooke, W. P. Steward, A. J. Gescher, T. Marczylo. *Eur. J. Cancer*, **41**, 1931 (2005)
37. D. Di Majo, M. Giammanco, M. La Guardia, E. Tripoli, S. Giammanco, E. Finotti. *Food Res. Int.*, **38**, 1161 (2005)
38. M. A. Anagnostopoulou, P. Kefalas, V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, D. Boskou. *Food Chem.*, **94**, 19 (2006)
39. R. E. Asenstorfer, Y. Wang, D. J. Mares. *J. Cereal Sci.*, **43**, 108 (2006)
40. S. A. Aherne, N. M. O'Brien. *Nutrition*, **18**, 75 (2002)
41. E. M. Marinova, N. V. Yanishlieva, I. R. Totseva. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 145 (2002)
42. С.А. Матасова, Н.А. Митина, Г.Л. Рыжова, Д.О. Жуганов, К.А. Дычко. *Химия растительного сырья*, (2), 119 (1999)
43. В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина. *Химия растительного сырья*, (2), 79 (2000)
44. K.-H. Lee, H.-B. Chai, P. A. Tamez, J. M. Pezzuto, G. A. Cordell, K. K. Win, M. Ti-Wa. *Phytochemistry*, **64**, 535 (2004)
45. P. Zhou, Y. Takaishi, H. Duan, B. Chen, G. Honda, M. Itoh, Y. Takeda, O. K. O. K. Kodzhimatov, K.-H. Lee. *Phytochemistry*, **53**, 689 (2000)
46. D. Voora, H. L. McLeod, C. Eby, B. F. Gage. *Pharmacogenomics*, **6**, 503 (2005)
47. O. Xie, X. Wang, X. Wang, Z. Jiang, Z. Qiu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4953 (2005)
48. S. Vilar, E. Quezada, L. Santana, E. Uriarte, M. Yanez, N. Fraiz, C. Alcade, E. Cano, F. Orallo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 257 (2006)
49. I. Manolov, N. Danchev. *Eur. J. Med. Chem.*, **30**, 717 (1995)
50. A. M. El-Sayed, O. A. Abd-Allah. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **170**, 75 (2001)
51. A. M. El-Agrody, M. S. Abd El-Latif, N. A. El-Hady, A. H. Fakery, A. H. Bdair. *Molecules*, **6**, 519 (2001)
52. Z. M. Nofal, M. I. El-Zahar, S. S. Abd El-Karim. *Molecules*, **5**, 99 (2000)

53. M.H.Abraham, J.M.R.Gola, R.Kumarsingh, J.E.Cometto-Muniz, W.S.Cain. *J. Chromatogr., B*, **745**, 103 (2000)
54. T.Hanai. *J. Chromatogr., A*, **1027**, 279 (2004)
55. N.Sanli, G.Fonrodona, J.Barbosa, G.A.Özkan, J.L.Beltran. *Anal. Chim. Acta*, **537**, 53 (2005)
56. J.K.Törnblom, T.F.W.Bureyko, C.D.MacKinnon. *J. Chromatogr., A*, **1095**, 68 (2005)
57. R.M.Smith. *J. Chromatogr., A*, **656**, 381 (1993)
58. C.A.Rice-Evans, N.J.Miller, G.Paganda. *Free Radical Biol. Med.*, **20**, 933 (1996)
59. P.A.Morrissey, K.M.O'Brien. *Int. Dairy J.*, **8**, 463 (1998)
60. M.Sato, D.Bagchi, A.Tosaki, D.K.Das. *Free Radical Biol. Med.*, **31**, 729 (2001)
61. L.Fremont, L.Belguendouz, M.T.Gozzelino, A.Linard. *Atherosclerosis (Shannon, Irel.)*, **134**, 202 (1997)
62. C.Casalini, M.Lodovici, C.Briani, G.Paganelli, S.Remy, V.Cheyrier, P.Dolara. *Eur. J. Nutr.*, **38**, 190 (1999)
63. M.Bergman, L.Varshavsky, H.E.Gottlieb, S.Grossman. *Phytochemistry*, **58**, 143 (2001)
64. S.V.Nigdikar, A.N.Howard. *Atherosclerosis (Shannon, Irel.)*, **134**, 203 (1997)
65. K.Robards. *J. Chromatogr., A*, **1000**, 657 (2003)
66. E.Sergedienne, K.Jonsson, H.Szymusiak, B.Tyrakowska, I.Rietjens, N.Cenas. *FEBS Lett.*, **462**, 392 (1999)
67. D.Metodiewa, A.K.Jaiswal, N.Cenas, E.Dickancaite, J.Segura-Aguilar. *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 107 (1999)
68. O.Dangles, C.Dufour, G.Fargeix. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1215 (2000)
69. S.Auriol, H.Ohshima, Y.Yoshie, I.Gilibert. *Free Radical Biol. Med.*, **25**, 1057 (1998)
70. O.M.Palomino, P.Gomes-Serranillos, E.Carretero, A.J.Villar. *J. Chromatogr., A*, **731**, 103 (1996)
71. R.Aqino, S.Morelli, M.R.Lauro, S.Abdo, A.Satija, A.Tomaino. *J. Nat. Prod.*, **64**, 1019 (2001)
72. C.Poullain, E.Girard-Valenciennes, J.Smadja. *J. Ethnopharmacol.*, **95**, 19 (2004)
73. J.-H.Liu, S.Zschocke, R.Bauer. *Phytochemistry*, **49**, 211 (1998)
74. M.Pinelo, M.Rubilar, J.Sineiro, M.J.Nunez. *Food Chem.*, **85**, 267 (2004)
75. P.Siddhuraju, P.S.Mohan, K.Becker. *Food Chem.*, **79**, 61 (2002)
76. U.Hohl, B.Neubert, H.Pforte, I.Schönhof, H.Bohm. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 205 (2001)
77. J.F.Stevens, M.Ivancic, V.L.Hsu, M.L.Deinzer. *Phytochemistry*, **44**, 1575 (1997)
78. R.Aquino, A.Cáceres, S.Morelli, L.Rastrelli. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1773 (2002)
79. L.M.Sokmen, M.Angelova, E.Krumova, S.Pashova, S.Ivancheva, A.Sokmen, J.Serkedjieva. *Life Sci.*, **76**, 2981 (2005)
80. E.Walther, Y.-C.Chung, S.-J.Chen, C.-K.Hsu, C.-T.Chang, S.-T.Chou. *Food Chem.*, **91**, 419 (2005)
81. В.И.Дейнека, А.М.Григорьев. *Журн. аналит. химии*, **59**, 305 (2004)
82. R.Norbaek, T.Kondo. *Phytochemistry*, **50**, 1181 (1999)
83. K.Toki, N.Saito, T.Honda. *Phytochemistry*, **48**, 729 (1998)
84. E.Pale, M.Nacro, M.Vanhaelen, R.Vanhaelen-Fastré, R.Ottinger. *Phytochemistry*, **48**, 1433 (1998)
85. F.Tatsuzawa, N.Saito, H.Seki, R.Hara, M.Yokoi, T.Honda. *Phytochemistry*, **45**, 173 (1997)
86. N.Saito, F.Tatsuzawa, A.Nishiyama, M.Yokoi, A.Shigihara, T.Honda. *Phytochemistry*, **38**, 1027 (1995)
87. F.Tatsuzawa, N.Saito, M.Yokoi, A.Shigihara, T.Honda. *Phytochemistry*, **49**, 869 (1998)
88. M.A.S.Marles, H.Ray, M.Y.Gruber. *Phytochemistry*, **64**, 367 (2003)
89. G.E.Rohr, B.Mier, O.Sticher. *J. Chromatogr., A*, **835**, 59 (1999)
90. U.Svedstrom, H.Vuorela, R.Konstiainen, I.Laasko, R.Hiltunen. *J. Chromatogr., A*, **968**, 53 (2002)
91. U.Svedstrom, H.Vuorela, R.Konstiainen, J.Tuominen, J.Kokkonen, J.-P.Rauha, I.Laasko, R.Hiltunen. *Phytochemistry*, **60**, 821 (2002)
92. M.Skerget, P.Kotnik, M.Hadolin, A.R.Hra, M.Simonic, Z.Knez. *Food Chem.*, **89**, 191 (2005)
93. C.Goncalves, T.Dinis, M.T.Batista. *Phytochemistry*, **66**, 89 (2005)
94. M.Kosar, H.J.D.Dorman, R.Hiltunen. *Food Chem.*, **91** (3), 525 (2005)
95. M.Papagiannopoulos, H.R.Wollseifen, A.Mellenthin, B.Haber, R.Galesa. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3784 (2004)
96. E.Ibanez, A.Kubatova, F.J.Senorans, S.Cavero, G.Reglero, S.B.Hawthorne. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 375 (2003)
97. E.S.Ong, S.M.Len. *Anal. Chim. Acta*, **482**, 81 (2003)
98. M.Papagiannopoulos, B.Zimmermann, A.Mellenthin, M.Krappe, G.Maio, R.Galensa. *J. Chromatogr., A*, **958**, 9 (2002)
99. K.C.Zancan, M.O.M.Marques, A.J.Petenate, M.A.A.Meireles. *J. Supercrit. Fluids*, **24**, 57 (2002)
100. F.Le Floch, M.T.Tena, A.Rios, M.Valcarcel. *Talanta*, **46**, 1123 (1998)
101. A.Chafer, T.Fornari, A.Berna, R.P.Stateva. *J. Supercrit. Fluids*, **32**, 89 (2004)
102. F.J.Senorans, E.Ibanez, S.Cavero, J.Tabera, G.Reglero. *J. Chromatogr., A*, **870**, 491 (2000)
103. B.-J.Wang, C.-T.Liu, C.-Y.Tseng, Z.-R.Yu. *LWT — Food Sci. Technol.*, **38**, 281 (2005)
104. J.Wu, W.Xie, J.Pawliszyn. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **125**, 2216 (2000)
105. L.T.Taylor, M.Palma. *J. Chromatogr., A*, **849**, 117 (1999)
106. M.Bonoli, E.Marconi, M.F.Caboni. *J. Chromatogr., A*, **1057**, 1 (2004)
107. D.Tura. *J. Chromatogr., A*, **975**, 71 (2002)
108. M.Antolovich, P.Prenzler, K.Robards, D.Ryan. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **125**, 989 (2000)
109. L.-J.Chen, D.E.Games, J.Jones. *J. Chromatogr., A*, **988**, 95 (2003)
110. Y.Shibusawa, A.Yanagida, A.Ito, Kichihashi, H.Shindo, Y.Ito. *J. Chromatogr., A*, **886**, 65 (2000)
111. M.Palma, Z.Pineiro, C.G.Baroso. *J. Chromatogr., A*, **921**, 69 (2001)
112. P.Swatsitang, G.Tucker, K.Robards, D.Jardine. *Anal. Chim. Acta*, **417**, 231 (2000)
113. R.Slimestad, A.Marston, K.Hostettmann. *J. Chromatogr., A*, **719**, 438 (1996)
114. A.Degenhardt, P.Winterhalter. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 277 (2001)
115. L.S.Hutabarat, H.Greenfield, M.Mulholland. *J. Chromatogr., A*, **886**, 55 (2000)
116. N.Nakatani, H.Kikuzaki, J.Hikida, M.Ohba, O.Inami, I.Tamura. *Phytochemistry*, **38**, 755 (1995)
117. A.L.Davis, J.R.Lewis, Y.Cai, C.Powell, A.P.Davis, J.P.G.Wilkins, P.Pudney, M.N.Clifford. *Phytochemistry*, **46**, 1397 (1997)
118. A.Garsia, M.Brenes, P.Garsia, C.Romero, A.Garrido. *Eur. Food Res. Technol.*, **216**, 520 (2003)
119. D.Matejicek, B.Klejdus, O.Mikes, D.Sterbova, V.Kuban. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 340 (2003)
120. D.A.Guillen, C.G.Barroso, J.A.Perez-Bustamante. *J. Chromatogr., A*, **730**, 39 (1996)
121. M.Netzel, G.Strass, I.Bitsch, R.Konitz, M.Christmann, R.Bitsch. *J. Food Eng.*, **56**, 223 (2003)
122. A.Czyzowska, E.Pogorzelski. *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 148 (2002)
123. W.E.Bronner, G.Rbeeher. *J. Chromatogr., A*, **705**, 247 (1995)
124. Y.Zuo, H.Chen, Y.Deng. *Talanta*, **57**, 307 (2002)
125. B.Suarez, A.Picinelli, J.J.Mangas. *J. Chromatogr., A*, **727**, 203 (1996)
126. E.Pastene, M.Montes, M.Vega. *J. Planar. Chromatogr. — Mod. TLC*, **10**, 362 (1997)
127. E.Wollenweber, J.F.Stevens, M.Dorr, A.C.Rozefelds. *Phytochemistry*, **62**, 1125 (2003)
128. M.Watanabe, Y.Ohshita, T.Tsushida. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1039 (1997)
129. C.W.Beninger, G.L.Hosfield, M.G.Nair. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2906 (1998)
130. Y.Ju, J.N.Sacalis, C.C.Still. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3785 (1998)
131. S.Cobzas, G.Cimpan, N.Olah, S.Gocan. *J. Planar. Chromatogr. — Mod. TLC*, **12**, 26 (1999)

132. M.A.Hawryl, E.Soczewinsky, T.H.Dzido. *J. Chromatogr., A*, **886**, 75 (2000)
133. О.Г.Ларионов, А.А.Ревина, О.Г.Татаурова, А.Ю.Будунова. *Сорбц. хроматогр. процессы*, **3** (1), 19 (2003)
134. E.A.Melo, J.M.Filho, N.B.Guera. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **38**, 15 (2005)
135. S.P.Pohjamo, J.E.Hemming, S.M.Willfor, M.H.T.Reunanen, B.R.Holmbom. *Phytochemistry*, **63**, 165 (2003)
136. L.Khaled, F.El-Massry, A.H.El-Ghorab, A.Farouk. *Food Chem.*, **79**, 331 (2002)
137. Y.C.Fiamegos, C.G.Nanos, J.Vervoort, C.D.Stalikas. *J. Chromatogr., A*, **1041**, 11 (2004)
138. M.Lopez, F.Martinez, C.Del Valle, M.Ferrit, R.Luque. *Talanta*, **60**, 609 (2003)
139. X.He, L.Lin, L.Lian. *J. Chromatogr., A*, **755**, 127 (1996)
140. A.Raffaelli, G.Moneti, V.Mercati, E.Toja. *J. Chromatogr., A*, **777**, 223 (1997)
141. N.Chaves, J.J.Rios, C.Gutierrez, J.C.Escudero, J.M.Olias. *J. Chromatogr., A*, **799**, 111 (1998)
142. M.Brolis, B.Gabetta, N.Fuzzati, R.Pace, F.Panzeri, F.Peterlongo. *J. Chromatogr., A*, **825**, 9 (1998)
143. U.Justesen. *J. Chromatogr., A*, **902**, 369 (2000)
144. С.З.Иванова, Т.Е.Федорова, Н.В.Иванова, С.В.Федоров, Л.А.Остроухова, Ю.А.Малков, В.А.Бабкин. *Химия растит. сырья*, (4), 5 (2002)
145. K.Franke, A.Porzel, J.Schmidt. *Phytochemistry*, **61**, 873 (1996)
146. E.Jourbet, F.Otto, S.Gruner. *Eur. Food Res. Technol.*, **216**, 270 (2003)
147. I.Saracoglu, M.Varel, U.S.Harput, A.Nagatsu. *Phytochemistry*, **65**, 2379 (2004)
148. L.F.Yamaguchi, D.G.Vassao, J.Kato, P.Di Mascio. *Phytochemistry*, **66**, 2238 (2005)
149. В.М.Мисин, Л.А.Гончаров, Е.В.Майоров, Я.И.Яшин, Е.И.Короткова, А.В.Иванова, Р.Р.Фархутдинов. В кн. *Биотехнология-2005: Восьмой Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов*. Пушино, 2005. С. 58
150. А.Я.Яшин, Я.И.Яшин. *Рос. хим. журн.*, **66** (4), 109 (2002)
151. M.Antolovich, P.D.Prenzler, E.Mc Donald, K.Robards. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **127**, 183 (2002)
152. Н.Г.Горячева, М.В.Кочетова, Е.Ф.Шаненко, А.А.Ревина, О.Г.Ларионов. *Пиво и жизнь*, **37**, 27 (2003)
153. V.Katalinic. *J. Chromatogr., A*, **775**, 359 (1997)
154. P.Drasar, J.Moravcova. *J. Chromatogr., B*, **812**, 3 (2004)
155. R.F.Viera, R.J.Grayer, A.J.Paton. *Phytochemistry*, **63**, 555 (2003)
156. J.-lan Zhang, M.Cui, Y.He, H.-Yu, D.-Guo. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**, 1029 (2005)
157. P.Schofield, D.M.Mbugua, A.N.Pell. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **91**, 21 (2001)
158. A.Yanagida, T.Shoji, Y.Shibusawa. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **56**, 311 (2003)
159. T.Fuleki, J.M.Ricardo da Silva. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1156 (1997)
160. Y.Cao, Q.Chu, J.Ye. *J. Chromatogr., B*, **812**, 231 (2004)
161. H.-B.Li, Y.Jiang, F.Chen. *J. Chromatogr., B*, **812**, 277 (2004)
162. I.Molnar-Perli, Z.Fuzfai. *J. Chromatogr., A*, **1073**, 201 (2005)
163. M.Vahner, M.Koel. *J. Chromatogr., A*, **990**, 225 (2005)
164. M.-E.Yue, T.-F.Jiang, Y.-P.Shi. *Talanta*, **62**, 695 (2004)
165. V.Bicard, A.Fougerousse, R.Brouillard. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **22**, 541 (1999)
166. M.A.Rodriguez-Delgado, M.L.Perez, R.Corbella, G.Gonzalez, F.J.G.Montelongo. *J. Chromatogr., A*, **871**, 427 (2000)
167. H.Y.Cheung, W.P.Lai, M.S.Cheung, F.M.Leung, D.J.Hood, W.F.Fong. *J. Chromatogr., A*, **989**, 303 (2003)
168. W.Ketai, L.Huitao, C.Xingguo, Z.Yunkun, H.Zhide. *Talanta*, **54**, 753 (2001)
169. C.del Mar Verde Mendez, M.P.Forster, M.A.Rodriguez-Delgado, E.M.Rodriguez-Rodriguez, C.D.Romero. *Eur. Food Res. Technol.*, **217**, 287 (2003)
170. A.Escarpa, M.C.Gonzalez. *J. Chromatogr., A*, **897**, 161 (2000)
171. A.Escarpa, M.C.Gonzalez. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 439 (2001)
172. G.N.Magoma, F.N.Washira, M.Obanda, M.Imbuga, S.G.Agong. *Genet. Resour. Crop Evol.*, **47**, 107 (2000)
173. O.Tokusoglu, M.Kemal Unal. *Eur. Food Res. Technol.*, **215**, 340 (2002)
174. H.Morais, C.Ramos, E.Forgacs, T.Cserhati, J.Oliviera. *J. Chromatogr., B*, **770**, 297 (2002)
175. B.Berente, D.De la Calle Garca, M.Reichenbacher, K.Danzer. *J. Chromatogr., A*, **871**, 95 (2000)
176. E.Mataix, M.D.Luque de Castro. *J. Chromatogr., A*, **910**, 255 (2001)
177. B.Berente, M.M.Reichenbacher, K.Danzer. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **371**, 68 (2001)
178. N.Terahara, Y.Takede, A.Nesumi, T.Honda. *Phytochemistry*, **56**, 359 (2001)
179. M.Lopez, F.Marhnez, C.Del Valle, C.Orte, M.Miro. *J. Chromatogr., A*, **922**, 359 (2001)
180. R.M.Alonso-Salces, S.Guyot, C.Herrero, L.A.Berrueta, J.F.Drilleau, B.Gallo, F.Vicente. *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 464 (2004)
181. M.Materska, S.Piacente, A.Stochmal, C.Pizza, W.Oleszek, I.Perucka. *Phytochemistry*, **63**, 893 (2003)
182. Y.Amakura, M.Okada, S.Tsuji, Y.Tonogai. *J. Chromatogr., A*, **891**, 183 (2000)
183. F.M.Pirisi, A.Angioni, P.Cabras, V.L.Garau, M.T.S.di Teulada, M.K.dos Santos, G.Bandino. *J. Chromatogr., A*, **768**, 207 (1997)
184. A.Schieber, P.Keller, R.Carle. *J. Chromatogr., A*, **910**, 265 (2001)
185. E.Revilla, J.-M.Ryan. *J. Chromatogr., A*, **881**, 461 (2000)
186. R.Tsao, R.Yang. *J. Chromatogr., A*, **1018**, 29 (2003)
187. I.Arozarena, A.Casp, R.Marin, M.Navarro. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 108 (2000)
188. A.Pena-Neira, T.Hernandez, C.Garcia-Vallejo, I.Estrella, J.A.Suarez. *Eur. Food Res. Technol.*, **210**, 445 (2000)
189. C.Inocencio, D.Rivera, F.Alcouraz, F.A.Tomas-Barberau. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 70 (2000)
190. M.C.Gonzalez, A.Escarpa. *J. Chromatogr., A*, **830**, 301 (1999)
191. B.-L.Lee, C.-N.Ong. *J. Chromatogr., A*, **881**, 439 (2000)
192. Y.Amakura, M.Okada, S.Tsuji, Y.Tonogai. *J. Chromatogr., A*, **896**, 87 (2000)
193. D.A.Guillen, C.G.Barroso, J.A.Perez-Bustamante. *J. Chromatogr., A*, **724**, 117 (1996)
194. M.Fiorini. *J. Chromatogr., A*, **692**, 213 (1995)
195. A.Cert, W.Moreda, M.C.Perez-Camino. *J. Chromatogr., A*, **881**, 131 (2000)
196. A.M.van Nederkassel, M.Daszykowski, D.L.Massart, Y.V.Heyden. *J. Chromatogr., A*, **1096**, 117 (2005)
197. C.Chilla, D.A.Guillen, C.G.Barroso, J.A.Perez-Bustamante. *J. Chromatogr., A*, **750**, 209 (1996)
198. A.Crozier, E.Jensen, M.E.J.Lean, M.S.McDonald. *J. Chromatogr., A*, **761**, 315 (1997)
199. A.Escarpa, M.C.Gonzalez. *J. Chromatogr., A*, **823**, 331 (1998)
200. M.Lores, C.M.Garcia, R.Cela. *J. Chromatogr., A*, **683**, 31 (1994)
201. G.Shui, L.P.Leong. *J. Chromatogr., A*, **977**, 89 (2002)
202. H.Chen, Y.Zuo, Y.Deng. *J. Chromatogr., A*, **913**, 387 (2001)
203. A.Escarpa, M.C.Gonzalez. *Anal. Chim. Acta*, **427**, 119 (2001)
204. A.Ortuno, I.Reynaldo, M.D.Fuster, J.Botia, D.G.Puig, I.Porras, A.G.Lidon, F.Sabater, J.A.Del-Rio. *Sci. Hortic.*, **68**, 231 (1997)
205. S.Tsanova-Savova, F.Ribarova. *J. Food Compos. Anal.*, **15**, 639 (2002)
206. O.Palomino, M.P.Gomez-Serranillos, K.Slowing, E.Carretero, A.Vilar. *J. Chromatogr., A*, **870**, 449 (2000)
207. M.A.Rodriguez-Delgado, S.Malovana, J.P.Perez, T.Borges, F.J.G.Motelongo. *J. Chromatogr., A*, **912**, 249 (2001)
208. W.Andlauer, M.J.Martena, P.Furst. *J. Chromatogr., A*, **849**, 341 (1999)
209. A.Ogawa, H.Arai, H.Tanizawa, T.Miyahara, T.Toyo'oka. *Anal. Chim. Acta*, **383**, 221 (1999)
210. A.Baldy, R.T.Rosen, E.K.Fukuda C.-T.Ho. *J. Chromatogr., A*, **718**, 89 (1995)
211. S.Perez-Magarino, I.Revilla, M.L.Gonzalez-SanJose, S.Beltran. *J. Chromatogr., A*, **847**, 75 (1999)

212. G.Deffieux, J.C.Cabanis, P.Waffo-Tegu, S.Carando, P.L.Teissedre, J.M.Merillon. *J. Chromatogr., A*, **849**, 617 (1999)
213. T.Kraushofer, G.Sontag. *Eur. Food Res. Technol.*, **215**, 529 (2002)
214. A.Escarpa, M.D.Morales, M.C.Gonzalez. *Anal. Chim. Acta*, **460**, 61 (2002)
215. M.Careri, L.Elvi, A.Mangia, M.Musci. *J. Chromatogr., A*, **881**, 449 (2000)
216. D.M.Goldberg, N.E.Karumanchiri, Y.Yan, E.P.Diamandis, G.J.Soleas. *J. Chromatogr., A*, **708**, 89 (1995)
217. J.F.Noguera-Ort, G.Ramis-Ramos, R.M.Villanueva-Camanas. *Anal. Chim. Acta*, **402**, 81 (1999)
218. В.В.Бражников. *Детекторы для хроматографии*. Машиностроение, Москва, 1992
219. M.N.Peyrat-Maillard, S.Bonnely, C.Berset. *Talanta*, **51**, 709 (2000)
220. М.В.Кочетова, А.А.Ревина, О.Г.Ларионов. *Сорбц. хроматограф. процессы*, (3), 12 (2003)
221. X.-G.He. *J. Chromatogr., A*, **880**, 203 (2000)
222. В.М.Косман, И.Г.Зенкевич, Н.Ф.Комиссаренко. *Растит. ресурсы*, **33** (3), 32 (1997)
223. В.М.Косман, И.Г.Зенкевич. *Растит. ресурсы*, **33** (2), 14 (1997)
224. И.Г.Зенкевич, В.М.Косман. *Журн. аналит. химии*, **60**, 837 (2005)
225. P.G.Muijselaar. *J. Chromatogr., A*, **780**, 117 (1997)
226. S.Guyot, T.Dococ, J.-M.Souquet, M.Moutounet, J.-F.Drilleau. *Phytochemistry*, **44**, 351 (1997)
227. G.Shui, L.P.Leong. *J. Chromatogr., A*, **1022**, 67 (2004)
228. M.Careri, P.Lombardi, A.Cappiello, G.Famiglini, F.Mangani, C.Mucchino. *J. Chromatogr., A*, **855**, 515 (1999)
229. F.Sanchez-Rabaneda, O.Jauregui, R.M.Lamuela-Raventos, J.Bastida, F.Viladomat, C.Codina. *J. Chromatogr., A*, **1008**, 57 (2003)
230. G.K.Poon. *J. Chromatogr., A*, **794**, 63 (1998)
231. J.Bakker, P.Bridle, T.Honda, H.Kuwano, N.Saito, N.Terahara, C.F.Timberlake. *Phytochemistry*, **44**, 1375 (1997)
232. G.J.Soleas, E.P.Diamandis, G.Tomlinson, D.M.Goldberg. *Atherosclerosis (Shannon, Irel.)*, **134**, 207 (1997)
233. I.Revilla, S.Beltran, S.Perez-Magarino, M.L.Gonzalez-SanJose. *J. Chromatogr., A*, **847**, 83 (1999)
234. G.Stecher, C.W.Huck, M.Popp, G.K.Bonn. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **371**, 73 (2001)
235. P.Knuthsen, U.Jistesen, T.Leth. *J. Chromatogr., A*, **799**, 101 (1998)
236. J.Sadecka, J.Polonsky. *J. Chromatogr., A*, **880**, 243 (2000)
237. G.Cartoni, F.Coccioli, R.Jasionowska. *J. Chromatogr., A*, **709**, 209 (1995)
238. M.Bonoli, M.Montanucci, T.G.Toschi, G.Lercker. *J. Chromatogr., A*, **1011**, 163 (2003)
239. R.Saenz-Lopez, P.Fernandez-Zurbano, M.T.Tena. *J. Chromatogr., A*, **990**, 247 (2003)
240. D.B.Gomis, N.F.Palomino, J.J.M.Alonso. *Anal. Chim. Acta*, **426**, 111 (2001)
241. X.Gu, Q.Chu, M.O'Dwyer, M.Zeece. *J. Chromatogr., A*, **881**, 471 (2000)
242. M.R.Bronze, L.F.V.Boas, A.P.Belchior. *J. Chromatogr., A*, **768**, 143 (1997)
243. C.T.da Costa, S.A.Margolis, D.Horton, B.C.Nelson. *J. Chromatogr., A*, **799**, 321 (1998)
244. N.Gel-Moreto, R.Streich, R.Galensa. *J. Chromatogr., A*, **925**, 279 (2001)
245. M.T.Galceran, L.Puignou. *TrAC — Trends Anal. Chem.*, **24**, 743 (2005)
246. M.V.Martinez-Ortega, M.C.Garcia-Parrilla, A.M.Trancoso. *Anal. Chim. Acta*, **502**, 49 (2004)
247. Y.Zhang, G.Wang, T.T.Song, P.A.Murphy, S.Hendrich. *J. Nutr.*, **129**, 957 (1999)
248. P.H.Gamache, I.N.Acworth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**, 274 (1998)
249. S.Heinonen, K.Wahala, H.Adlercreutz. *Anal. Biochem.*, **274**, 211 (1999)
250. M.Uehara, O.Lapcik, R.Hampl, N.Al-Maharik, T.Makela, K.Wahala, H.Mikola, H.Adlercreutz. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **72**, 273 (2000)
251. J.Wittig, M.Herderich, E.U.Stewart, A.Crozier. *J. Chromatogr., B*, **753**, 237 (2001)
252. A.J.Day, F.Mellon, D.Barron, G.Sarrazin, M.R.Morgan, G.Williamson. *Free Radical Res.*, **35**, 941 (2001)
253. W.Mullen, R.C.Hartley, A.Crozier. *J. Chromatogr., A*, **1007**, 21 (2003)
254. L.Wang, M.E.Morris. *J. Chromatogr., B*, **821**, 194 (2005)
255. F.M.Wang, T.W.Yao, S.Zeng. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 317 (2003)
256. S.E.Nielsen, L.O.Dragsred. *J. Chromatogr., B*, **707**, 81 (1998)
257. D.Bongartz, A.Hesse. *J. Chromatogr., B*, **673**, 223 (1995)
258. C.Manach, C.Morand, V.Crespy, C.Demigne, O.Textier, F.Regerat, C.Remesy. *FEBS Lett.*, **426**, 331 (1998)
259. W.Mullen, B.A.Graf, S.T.Caldwell, R.C.Hartley, G.G.Duthie, C.A.Edwards, M.E.Lean, A.Crozier. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6902 (2002)
260. D.G.Watson, E.J.Oliviera. *J. Chromatogr., B*, **723**, 203 (1999)
261. G.J.Soleas, J.Yan, D.M.Goldberg. *J. Chromatogr., B*, **757**, 161 (2001)
262. P.C.P.Hollman, J.M.P.van Trijp, M.Buysman, M.Gaag, M.Mengellers, J.de Vries, M.Katan. *FEBS Lett.*, **418**, 152 (1997)
263. I.Erlund, G.Alfthan, H.Siren, K.Arinemi, A.Aro. *J. Chromatogr., B*, **727**, 179 (1999)
264. P.G.Pietta, C.Gardana, P.L.Mauri, R.Maffei-Facino, M.Carini. *J. Chromatogr., B*, **673**, 75 (1995)
265. K.Ishii, T.Furuta, Y.Kasuya. *J. Chromatogr., B*, **683**, 225 (1996)
266. G.Maiani, M.Stefani, M.Salucci, E.Azzini, A.Ferro-Luzzi. *J. Chromatogr., B*, **692**, 211 (1997)
267. S.E.Nielsen, L.O.Dragsted. *J. Chromatogr., B*, **713**, 379 (1998)
268. F.I.Kanaze, E.Kokkalou, M.Georgarakis, I.Niipas. *J. Chromatogr., B*, **801**, 363 (2004)
269. F.O.Chu, C.C.Wang, M.S.Rogers, K.W.Choy, C.P.Pang. *J. Chromatogr., B*, **810**, 187 (2004)
270. X.L.Chen Yu, Y.Cai, G.Liu, J.Jia, Y.Wang. *J. Chromatogr., B*, **820**, 41 (2005)

DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PHENOLS AND POLYPHENOLS IN VARIOUS OBJECTS BY CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

M.V.Kochetova, E.N.Semenistaya, O.G.Larionov, A.A.Revina

A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences
31, Leninsky prosp., 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)952-0065

Chromatographic techniques for determination of biologically active phenols and polyphenols are considered. Various methods for sample preparation and detection are compared. The advantages of high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection for determination of antioxidants are demonstrated. Data on determination of biologically active phenols and polyphenols published in the period from 1995 to 2005 are analysed.

Bibliography — 270 references.

Received 13th February 2006