

переміщений технологічними або біотехнологічними засобами та які можуть споживатися регулярно у складі щоденного раціону харчування, сприяючи зниженню ризику захворювання, покращенню фізіологічних процесів в організмі та відновленню здоров'я. По-третє, побудована схема моделювання функціональних кондитерських виробів, що передбачає врахування неоднорідності споживчих потреб, дозволить удосконалити процес розробки та практичного впровадження нових кондитерських виробів функціонального призначення.

Вважаємо, що аналогічна схема моделювання може бути застосована і при розробці інших функціональних харчових продуктів. По-четверте, у подальшому отримані результати можуть бути використані для більш глибокого дослідження ринку функціональних харчових продуктів в Україні, кількісного оцінювання ймовірності прийняття позитивного рішення різними категоріями населення щодо вживання того чи іншого функціонального харчового продукту, розробки нових продуктів харчування функціонального призначення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Григоренко, О. До питання моніторингу стану харчування населення України [Текст] / О. Григоренко // Товари і ринки: Міжнар. наук.-практ. журнал. – КНТЕУ. – 2010. – № 2. – С. 118–124.
2. Кузьмінська, О.В. Значення раціонального харчування для підтримки здоров'я молоді: монографія [Текст] / О.В. Кузьмінська, М.С. Червона. – К.: Державний інститут проблем сім'ї та молоді, Український ін-т соціальних досліджень, 2004. – Кн. 4. – 128 с. – (Серія «Формування здорового способу життя молоді» у 14 кн.).
3. Матасар, І.Т. Гігієнічна оцінка стану харчування працездатного населення в сучасних екологічних умовах: Автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.02.01 [Текст] / І.Т. Матасар. – К.: Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця., 2001. – 40 с.
4. Howlett, J. Functional foods: from science to health and claims: Monograph. [Text] / Jonh Howlett. – Belgium: Brussels, ILSI Europe, 2008. – vi+38 p.
5. Poulsen, J. 1999. Danish consumers' attitudes towards functional foods [Text] / J. Poulsen // MAPP working paper, 62; Aarhus School of Business. – 2009. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.mapp.asb.dk/wppdf/wp62.pdf.
6. Шендеров, Б.А. Медицинская микробиология и функциональное питание / Б.А. Шендеров; Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. – М.: Из-во Грант, 2001. – 286 с.
7. Кондратова, И.И. Мучные кондитерские изделия функционального назначения с пищевыми волокнами [Текст] / И.И. Кондратова, К.Н. Гершончик, Д.Н. Болтик, А.А. Шевчук, И.А. Машкова // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2009. – № 1(3). – С. 41–46.
8. Технологія продуктів харчування функціонального призначення: монографія [Текст] / М.І. Пересічний, М.Ф. Кравченко, Д.В. Федорова та ін. / За ред. М.І. Пересічного – К.: Київ. нац. торг. екон. ун-т, 2008. – 718 с.
9. Про внесення змін до Закону України «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини» Закон України від 06.09.2005 № 2809-IV. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/2809-15>.
10. Bagchi, D. Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world [Text] / D. Bagchi. – USA: Academic Press, 2008. – 462 p.
11. Maynard, L.J. Functional foods as a value-added strategy: The commercial potential of cancer-fighting dairy products [Text] / L.J. Maynard, S.T. Franklin // Review of Agricultural Economics. – 2003. – Vol. 25, Issue 2. – P. 316–331.
12. Roberfroid, M.B. Global view on functional foods: European perspectives [Text] / M.B. Roberfroid // British Journal of Nutrition. – 2002. – Vol. 88, Suppl. 2. – P. S133–S138.
13. Бугаец, Н.А. Функциональные пищевые продукты, их лечебное и профилактическое действие [Текст] / Н.А. Бугаец, Е.В. Барашкина, О.А. Корном и др. // Известия вузов. Пищевая технология. – 2004. – № 2–3. – С. 48–50.
14. Капрельяц, Л.В. Функциональные продукты питания: современное состояние и перспективы развития [Текст] / Л.В. Капрельяц // Продукты и ингредиенты. – 2004. – № 1. – С. 22–24.
15. Diplock, A.T. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document [Text] / A.T. Diplock, P.J. Aggett, M. Ashwell, F. Bomet, E.B. Fern, M.B. Roberfroid // British Journal of Nutrition. – 1999. Vol. 81 (Suppl). – P. S1–S27.

Отримано редакцією .08.2013 р.

УДК 615.074;543.426

БЕЛЬТЮКОВА С.В., д-р. хим. наук, профессор, БЫЧКОВА А.А., канд. хим. наук, ассистент

Одесская национальная академия пищевых технологий

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПОЛИФЕНОЛЫ И МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Рассмотрена роль биологически активных веществ в жизнедеятельности человека и производстве пищевых продуктов. Описана классификация, структура исследуемых соединений, а также методы определения фенолов и полифенолов.

Ключевые слова: биологически активные полифенолы, структура, классификация, методы определения.

The role of biologically active substances in human life and food production was considered. The classification, the structure of the compounds and methods for determination of phenols and polyphenols were described.

Keywords: biologically active polyphenols, structure, classification, methods for determination.

Одной из основных причин патологических изменений в человеческом организме, приводящих к преждевременному старению и развитию многих болезней (более 100), в том числе самых опасных, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, является избыточное содержание в биологических жидкостях свободных кислородных радикалов (супероксид-анион, гидроксильный радикал, пергидроксильный радикал и др.) [1]. Пос-

тоянное повышенное содержание в межклеточных и внутриклеточных биологических жидкостях свободных радикалов создает условия для развития оксидантного стресса, выражающегося с биохимической точки зрения в том, что свободные радикалы окисляют стенки сосудов, белки, ДНК, липиды. Радикалы особенно активно взаимодействуют с мембранными липидами, содержащими ненасыщенные связи, и изменяют свойства клеточных

мембран. Наиболее активные свободные радикалы способны разрывать связи в молекуле ДНК, повреждать генетический аппарат клеток, регулирующий их рост, что приводит к онкологическим заболеваниям. Липопротеиды низкой плотности после окисления могут откладываться на стенках сосудов, что вызывает развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [2-6]. От воздействия свободных радикалов здоровый организм защищает естественная антиоксидантная система, содержащая ферментные и неферментные вещества, способные полностью нейтрализовать вредное воздействие радикальных форм кислорода.

Снижение активности естественной антиоксидантной системы человека и, следовательно, возрастание концентрации свободных радикалов в организме связано со многими неблагоприятными факторами: это радиоактивное и ультрафиолетовое облучение, ухудшение экологической обстановки, широкое распространение социальных заболеваний (алкоголизм, курение, наркомания), постоянные стрессы, потребление загрязненной пищи, неконтролируемый прием некоторых лекарственных препаратов. Вредное воздействие свободных радикалов в случае окислительного стресса можно уменьшить за счет регулярного употребления определенных пищевых продуктов и напитков, лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД), обладающих антиоксидантной активностью. Основные природные антиоксиданты – флавоноиды, ароматические гидроксикислоты, антоцианы, витамины С и Е, каротиноиды и др.

Антиоксиданты (АО) – вещества различной химической природы, способные тормозить или устранять неферментативное свободнорадикальное окисление органических соединений различными формами кислорода. Биоантиоксиданты – это, как правило, полифункциональные соединения, антиокислительная функция которых выражена в разной степени. Подавляя свободнорадикальное автоокисление, они регулируют степень влияния окисления на большинство метаболических процессов. В результате воздействия АО создаются условия для обеспечения нормального роста клеток и тканей [7].

Биоантиоксидантами называют вещества, которые в модельных свободнорадикальных процессах окисления проявляют свойства ингибиторов реакций и сохраняют эти свойства при введении их в живой организм. Биоантиоксиданты являются необходимыми компонентами всех тканей и клеток живых организмов, где они в нормальных физиологических концентрациях поддерживают на низком стационарном уровне свободнорадикальные автоокислительные процессы. Расходование и пополнение антиоксидантами в тканях живых организмов сбалансировано.

Антиоксиданты относятся также к важнейшим пищевым добавкам. Биологически активные добавки (БАД) – композиции натуральных или

идентичных натуральным биологически активных веществ, «предназначенных для непосредственного приема с пищей или введения в состав пищевых продуктов», с целью обогащения рациона отдельными пищевыми или биологически активными веществами и их комплексами. К природным компонентам пищи кроме основных веществ, обуславливающих ее биологическую ценность (белки, жиры, углеводы, макро-, микроэлементы и витамины), относятся балластные биологически активные вещества. Биологически активные вещества (БАВ) – это соединения, содержащиеся в растениях, обладающие лечебным действием и тем обуславливающие ценность растительного сырья. Определенные БАВ являются обычно действующими веществами растений, определяющими их терапевтическое воздействие, то есть лечебную направленность. Среди АО, синтезируемых и накапливаемых растениями, известны такие классы природных соединений, как алкалоиды, фенольные соединения и их гликозиды, терпеноиды, полисахариды и др.

С другой стороны, введение АО в сырье и готовую продукцию обеспечивает предупреждение их порчи, снижение потерь, увеличение сроков годности и выпуск высококачественных изделий, сохраняющих в течение достаточно длительного времени характерные особенности, свойственные свежим, полноценным продуктам. Используемые в качестве АО вещества обладают выраженными бактериостатическими, бактерицидными, фунгистатическими и фунгицидными [8, 9] свойствами, причем по механизму действия они существенно различаются между собой. В качестве АО применяют только малотоксичные вещества, введение которых в пищевые продукты в строго регламентированных количествах не оказывает на организм человека нежелательное воздействие. Соединения, вводимые в пищу в качестве добавок, не должны содержать посторонних примесей. Неразрешенные вещества или избыточные количества любых АО могут привести к токсичности пищи, аллергическим реакциям, а также к дисбалансу активных химических веществ в организме. Введение избытка добавок ухудшает качество продуктов вследствие изменения pH, консистенции, вкуса, запаха, цвета и др.

АО поступают в организм человека с пищей весьма длительное время, практически в течение всей жизни, поэтому особенно нежелательны негативные воздействия их избыточных количеств. Недостаточные концентрации АО не обеспечивают сохранения высокого качества сырья и продукции. Эти обстоятельства предопределяют необходимость контроля содержания АО в различных видах пищевого сырья, готовых продуктах и напитках. Только при наличии достаточно простых, чувствительных и надежных методов определения этих добавок и четко организованной системы контроля

возможно производство высококачественной пищевой продукции [10].

Классификация и структура исследуемых фенольных соединений

Одним из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, проявляющих биологическую и антиоксидантную активность, являются полифенолы. Они содержатся в овощах, фруктах, зерне, приправах, а также в вине, зеленом и черном чае, кофе, какао и других продуктах, и обладают противораковым, антибактериальным и противовоспалительным действием, предупреждающим развитие многих заболеваний [11-13]. Содержание отдельных полифенолов в растениях определяет их окраску, аромат цветов, вкус овощей и плодов [14]. Особую ценность представляют биофлавоноиды, обладающие антиканцерогенными, антисклеротическими и антиаллергическими свойствами. По антиоксидантной активности они в десятки раз превосходят витамины С, Е и каротиноиды. Особенно активно природное сочетание биофлавоноидов [15-17]. Основные источники этих антиоксидантов – фрукты, овощи, ягоды, мед, чай, красное вино, растительные масла.

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов БАВ, содержащих ароматические кольца с гидроксильной группой, т.е., особенностью этих соединений является наличие свободного или связанного фенольного гидроксила. В растениях фенольные соединения содержатся в свободном состоянии или в виде гликозидов. Их может быть до 30 % и выше (дубильные вещества). По химической структуре все фенольные соединения делят на 3 основные группы: с одним или двумя ароматическими кольцами и полимерные фенольные соединения.

К соединениям с одним ароматическим кольцом относятся: простые фенолы; кислоты; оксикоричные кислоты и их производные; лигнаны; кумарины, хромоны. К фенолокислотам относятся протокатеховая кислота, оксibenзойная, галловая, салициловая и др. [18]. Хотя галловая (3,4,5-триоксibenзойная) кислота является сильным антиоксидантом, практического применения она не нашла, возможно, из-за плохой растворимости в жирах. Широко используются ее сложные эфиры – галлаты. Этилгаллат в концентрации 0,02- 0,05 % является высокоэффективным антиоксидантом для жиров и жиросодержащих продуктов. В концентрации 0,001 % препарат рекомендуется применять в смеси с лимонной кислотой (0,03 %) для длительного (до года) сохранения соленой сельди [19]. Эфиры галловой кислоты широко применяются в качестве антиоксидантов в пищевой и парфюмерной промышленности. Они обладают высокой активностью против бактерий и вирусов. В последнее время установлено противоопухолевое

и антилучевое действие пропилгаллата и других эфиров галловой кислоты [20, 21]. К этой же группе относятся фенолоспирты и их гликозиды. Они широко распространены в растениях, но считаются сопутствующими веществами, участвующими в лечебном эффекте суммарных препаратов. Содержатся в родиоле розовой и других видах родиолы (золотого корня), которые используются в качестве адаптогенных средств (повышают работоспособность и сопротивляемость организма). К ним относятся также оксикоричные - С₆-С₃-фенилпропаноиды и хлорогеновые кислоты, которые составляют основную часть природных фенольных кислот во многих фруктах и ягодах. К хлорогеновым кислотам относят моно- и диэфиры коричных и хинной кислот. Самые распространенные хлорогеновые кислоты, образованные кофейной и хинной кислотами. Среди них можно выделить три реально встречающихся: 3-кофеилхинная (3-QCA, или неохлорогеновая), 4-кофеилхинная (4-QCA, или криптохлорогеновая) и 5-кофеилхинная (5-QCA), которую чаще всего и называют просто хлорогеновой кислотой [22]. В кристаллическом виде хлорогеновая кислота была впервые выделена из кофейных зерен. Хлорогеновая кислота – 1,3,4,5-тетрагидроксициклогексан карбоновая кислота 3-(3,4-дигидроксициннамат), является стимулятором центральной нервной системы (ЦНС). Экспериментально установлены у хлорогеновой кислоты кофеиноподобное, но более слабое действие, способность усиливать интенсивность белкового обмена в мозговой ткани. **Хлорогеновая кислота ингибирует всасывание глюкозы в организме**, чем способствует регулированию уровня сахара в крови. Кроме стимуляции деятельности ЦНС хлорогеновая кислота способствует изменению тонуса кровеносных сосудов головного мозга и сердца, является одним из лучших средств уменьшения и предупреждения утомления и головной боли [23]. Богатым источником хлорогеновых кислот являются кофейные бобы и для многих потребителей это главный источник [24] фенольных кислот, а также листья эвкоммии вязолистной. Благодаря их высокой концентрации кофе обладает большей антиоксидантной активностью [25] по сравнению с какао, зеленым, черным и травяным чаями [26], колой, пивом, множеством фруктовых соков. Установлено, что основные вещества, входящие в состав кофе, снижают риск развития сахарного диабета [27]. Вместе с кофеином люди потребляют большое количество (от 0,5 до 1 г/сут) хлорогеновой кислоты [28, 29], которая способна подавлять активность фермента печени – глюкозо-6-фосфатазы [30], выполняющей ключевую роль в гомеостатической регуляции концентрации глюкозы в плазме крови [31]. Экспериментально подтвержден кардиопротекторный эффект кофе

[32], регулярное потребление кофе уменьшало формирование камней в желчном пузыре [33]. Зерна сырого кофе содержат примерно 7 - 10 % хлорогеновых кислот. В кофе вида Канифора (Робуста) концентрация их больше (9-11 %), чем в кофе вида Арабика (5,5-8 %). Основную долю хлорогеновых кислот составляют кофеилхинные кислоты (хлорогеновая и нехлорогеновая).

Наиболее восстановленными флавоноидами являются катехины, а наиболее окисленными – флавонолы. Восстановленные соединения (катехины, лейкоантоцианидины) бесцветны, а окисленные окрашены в желто-оранжевые цвета. Флавоноиды встречаются как в свободном состоянии (катехины), так и в виде гликозидов. Большое количество полифенолов содержится в чайном листе и эта группа составляет наиболее ценную часть зеленого чайного листа и представлена в основном катехинами (флавонол-3-олами) и их галловыми эфирами (до 20-25 % от сухой массы) [34]. Чайный лист содержит 7 катехинов: 4 простых: (±)катехин (С), (-)эпикатехин (ЕС), (±)галлокатехин, (-)эпигаллокатехин (EGC); 3 сложных галлированных катехина: (-)эпикатехингаллат (ECG), (-)эпигаллокатехингаллат (EGCG) и (+)галлокатехингаллат. Во всех частях молодого чайного побега по количеству преобладают эпикатехингаллат и эпигаллокатехингаллат [35]. Катехины обладают высокой биологической активностью; в организме человека они регулируют проницаемость капилляров и способствуют повышению упругости их стенок, а также увеличивают биодоступность аскорбиновой кислоты [36, 37]. Поэтому катехины относят к веществам, обладающим Р-витаминной активностью, и их используют при лечении заболеваний, связанных с нарушениями функций капилляров и при отеках.

К настоящему времени известно уже свыше 5000 флавоноидов. Они широко распространены в растительном мире, при этом отличаются исключительным многообразием типов.

В природе особенно широко распространены флавонолы и флаван-3-олы (катехины). Более 50 % растений содержат в листьях и цветках кверцетин, кемферол, мерицетин, рутин. Наиболее известными растениями, содержащими флавоноиды, являются: чай, плоды рябины и шиповника (Р-витаминное действие), боярышник (сердечно-сосудистое действие), пустырник (сердечно-сосудистые неврозы и гипертония), спорыш, горец птичий и другие виды горца (кровоостанавливающее и мочегонное действие), солодка (отхаркивающее, противоаллергическое действие) и др.

Методы определения фенолов и полифенолов.

Основными методами определения полифенолов благодаря наличию в их структуре легко окисляющихся гидроксильных, а также хромофорных групп являются спектроскопические, хроматографические, электрохимические и химические

[38]. Однако, основными методами анализа реальных объектов, содержащих полифенольные соединения, являются хроматографические и химические. Значительно меньшее число работ посвящено определению полифенолов спектроскопическими методами [39].

Хроматографические методы определения.

Тонкослойная и флэш-хроматография были первыми методами разделения и идентификации многих биологически активных соединений растительного происхождения. Эти методы отличаются простотой и дешевизной. Методы высокоэффективной и двумерной тонкослойной хроматографии [40] можно использовать для анализа сложных природных источников фенолов. Наличие легко окисляющихся гидроксильных групп позволяет определять эти соединения хроматографическими и электрофоретическими (ОФ ВЭЖХ с электрохимическим детектором) методами [41-43]. Присутствие хромофорных групп обеспечивает возможность их детектирования спектрофотометрическими методами после хроматографического разделения, включая гибридные варианты (ВЭЖХ-УФ, КЭ-УФ) [44-46].

Наиболее распространенным методом определения полифенолов в растительных и биологических объектах является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) с ультрафиолетовым [14, 47-51] или электрохимическим детектированием (ЭД) [52-54]. Последний детектор характеризуется значительно большей чувствительностью к полифенолам. Например, для эпикатехина чувствительность электрохимического детектора в 90 раз превышает чувствительность спектрофотометрического детектора [53].

К достоинствам метода относятся: высокая селективностью сорбентов, чувствительность и селективность диодно-матричного, ультрафиолетового, флуоресцентного, масс-спектрометрического детекторов и мягкие температурные условия анализа, при которых анализируемые вещества не разлагаются. ВЭЖХ 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.

В последние годы для идентификации фенолов, присутствующих в растительном сырье и продуктах питания, в основном используют метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием или сочетание диодно-матричного и масс-спектрометрического детектирования с различными источниками ионизации. Последний метод особенно ценен при изучении ацилированных флавоноидных гликозидов, содержащихся в растениях, овощах, фруктах в малых количествах.

При определении полифенолов методом ВЭЖХ с УФ-детектором важен выбор оптимальной длины волны детектирования. При детектировании

фенолов чаще всего применяют разные длины волн: 230, 280, 306, 360, 503 нм и др. [55-57]. Так, в спектре поглощения катехинов имеются два максимума при 200 и 280 нм. Интенсивность поглощения при 200 нм максимальна, однако при этой длине волны кроме катехинов могут поглощать и многие другие соединения. Поэтому при анализе сложных объектов в качестве оптимальной длины волны детектирования катехинов используют 275-280 нм [50, 58, 65]. Детектирование при 200 нм часто используют при анализе зеленого чая [59, 60].

Поскольку многие фенолы имеют несколько максимумов поглощения, то для их определения часто применяют одновременное сканирование по нескольким длинам волн – диодно-матричное детектирование [61, 62, 64]. Метод ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием часто используют для определения фенолов, содержащихся в пищевых продуктах и напитках. Его основное преимущество – низкие пределы обнаружения. Например, в работе [63] предел обнаружения катехинов в экстракте зеленого чая составил $0,05 \text{ мг мл}^{-1}$ (детектирование на 205 нм). Гидроксикоричные кислоты детектируют при 320, флавонолы - 370, антоцианины - при 530 нм. С использованием метода ВЭЖХ с УФ-детектированием идентифицированы лютеолин, тимол, рутин, сорбиновая кислота в лекарственном сиропе «Пассифит» [66], а также кверцетин в моче человека. Предел обнаружения составляет 5 нг/мл [67].

Метод ВЭЖХ с флуориметрическим и хемилюминесцентным детектированием используют для определения низких концентраций ($1-10 \text{ нг/мл}$ [68]) полифенолов в растительных объектах [69] и биологических жидкостях человека [68]. Предел детектирования флавоноидов удается понизить, используя электрохимический (ЭД) и флуоресцентный [70] детекторы. Метод ВЭЖХ-ЭД особенно широко применяют для определения следов полифенольных соединений, например, метилированных производных катехинов, содержащихся в чае в очень низкой концентрации (менее 1 % от сухой массы чайного листа).

Сравнение чувствительности разных вариантов детектирования при определении флавоноидов в апельсиновом соке методом ВЭЖХ проведено в [71]. Определение фенольных соединений в продуктах питания и напитках часто проводят на модифицированных силикагелях в обращенно-фазовом варианте, поскольку при этом выше селективность разделения, лучше воспроизводимость результатов, такие колонки имеют более длительный срок службы.

Хроматография с амперометрическим детектированием применяется для оценки антиоксидантной активности продуктов питания, напитков и лекарств [62, 72, 73]. Большинство природных биологически активных фенолов способны окисляться на электроде, поэтому для их определения удобно использовать амперометрический детектор. Он позволяет устанавли-

вать присутствие неизвестных соединений в сложных природных источниках фенолов, тогда как с помощью классических химических методов можно оценить лишь общую антиоксидантную активность образца или активность известного соединения. Кулонометрический детектор использован для качественного и количественного определения фенолов в растительных маслах. 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. В работе [119] обнаружено, что фенольные кислоты и токоферолы имеют максимальный отклик кулонометрического детектора при низких потенциалах ($100-450 \text{ мВ}$), а флавоноиды показывают максимальные отклики в двух интервалах: $0-300$ и $600-900 \text{ мВ}$.

Авторами работы [74] с использованием метода ВЭЖХ 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, например, что 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. Для одновременного определения гидроксидинаматов, кофейной и хлорогеновой кислот, а также катехинов и эпикатехина в моче человека применяли жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием с химической ионизацией при атмосферном давлении. Градуировочные графики линейны в диапазоне $10-100 \text{ нг/мл}$ [75, 76].

Адсорбционную тонкослойную хроматографию (ТСХ) используют для качественного и количественного определения индивидуальных катехинов [77-81]. Как правило, в качестве неподвижной фазы используют силикагель. Описано [40] разделение пяти основных катехинов и кофеина на силикагелевых пластинах с использованием в качестве подвижной фазы системы хлороформ - этилформиат-н-бутанол-муравьиная кислота. Возможность разделения на силикагеле смеси тринадцати полифенолов, в том числе галловой кислоты, катехина и эпикатехина показана в [82]. Оптимизированы [77] условия разделения восьми катехинов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Метод ТСХ применен для люминесцентного определения галловой кислоты (ГК)

в винах и зеленом чае [83]. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид тербия (III) в присутствии триоктилфосфинооксида (ТОФО), что обуславливает появление на хроматографической пластинке сенсibilизированной люминесценции иона лантанида в присутствии ГК.

К преимуществам метода ТСХ можно отнести доступность оборудования, экспрессность анализа. Методы высокоэффективной и двумерной тонкослойной хроматографии можно использовать для анализа сложных природных источников фенолов [84-87]. Методом колоночной хроматографии проведен анализ суммы флавоноидов и антраценпроизводных для сырья [88] и препарата «Зверобой, настойка» [89].

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 [90]. Наиболее информативные данные при анализе природных объектов могут быть получены при совместном использовании всех характеристик. Для идентификации фенольных соединений, определяемых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, проводят сравнение спектральных характеристик (масс-спектров) и индексов удерживания с соответствующими характеристиками стандартных веществ. Например, идентифицировать примеси в дигидрокверцетине в отсутствие стандартных веществ можно, анализируя совместно индексы удерживания и спектральные отношения на разных длинах волн. Возможно использование индексов удерживания в методе мицеллярной электрокинетической хроматографии [91].

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» [92,93]. 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» [94]. По изменениям их состава и количества различают виды растений [95]. Для выявления фальсифицированных лекарственных форм используют сочетание метода «отпечатков пальцев» и хроматографического анализа биологических жидкостей [96].

Электрохимические методы определения

Все полифенольные соединения принадлежат к высоко электродноактивным веществам, которые могут быть легко окислены из-за присутствия большого числа гидроксильных групп в их молекулах. Благодаря этому свойству они легко окисляются на электродах, в связи с чем электрохимические методы широко применяются для их определения [97].

Предложено вольтамперометрическое определение флавонолов в фармпрепаратах, основанное на регистрации высоты волны окисления кверцетина на платиновом электроде на фоне 0,1M H₂SO₄ [98], либо на фоне 0,1M HCl [99]. Определение антиоксидантной активности (АОА) в экстрактах сырья проводят также методами катодной [100-102] и импульсной вольтамперометрии [103].

Амперометрический метод, позволяющий определять содержание всех антиоксидантов в пробе, был успешно применен для установления содержания природных АО в пищевых продуктах, БАДах и винах [104]. Метод обладает высокой селективностью определения только антиоксидантов, т.е. соединений, способных к окислению, другие компоненты, присутствующие в сложных смесях, не мешают их определению. Для анализа не требуется никаких химических реактивов (кроме стандартов), поэтому стоимость измерений очень низкая. Меняя величину приложенного потенциала, можно дифференцировать антиоксиданты по классам. В последнее время широкое распространение получил метод капиллярного электрофореза с ультрафиолетовым детектированием. Предложено [51] определять полифенолы в растительных объектах методом неводного капиллярного электрофореза, что позволяет разделять соединения, плохо растворимые в водных системах. Показано, что в случае неводного буферного электролита селективность разделения полифенолов значительно улучшается. Для определения полифенолов в состав буферного электролита добавляли тетрафторборат тетраэтиламмония [105]. В качестве буферного электролита чаще всего используют боратный [51,106,107] с pH 8,0-9,5, так как бораты взаимодействуют с гидроксильными группами флавоноидов и образуют комплексы, облегчая разделение [108].

В качестве модификатора применяют циклодекстрины. Разделение флавоноидов облепихи проводили в присутствии модификатора – диметил-β-циклодекстрина [109]. Авторы работы [110] методом капиллярного электрофореза разделили антоцианидины в кислой среде. В работе [90] с использованием различных циклодекстринов и их производных проведен анализ лимонного сока и разделена на хиральные изомеры смесь содержащихся в нем четырех флаванон-7-О-гликозидов.

Метод капиллярного электрофореза получает все большее распространение для определения фармакологически важных соединений в растениях [111-

113], для определения фенолов в соках, чае [39, 106, 114], растительных маслах, винах, ягодах. Преимуществами этого метода являются возможность введения образца под давлением в капилляр в разбавленном виде [97], т.е. исключение стадии пробоподготовки, а также проведение экспериментов в более широком диапазоне значений pH, чем в методе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Использование детектора на диодной матрице позволяет идентифицировать неизвестные соединения по спектру поглощения. Так, авторы [115] определяли антиоксидантную активность водорослей, определяя содержание полифенольных и других соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Спектры различных соединений в экстракте водорослей использовали для качественного анализа.

В настоящее время метод капиллярного электрофореза используют как дополнительный к высокоэффективной жидкостной хроматографии при разделении и определении фенолов [116-118]. Одним из распространенных способов обнаружения фенолов является кулонометрическое детектирование. В таком случае, в отличие от амперометрического определения, исследуемые соединения полностью окисляются [98].

Спектроскопические методы определения

В основе спектроскопических методов лежат реакции получения хромофоров (метод Фолина-Кокто, применение HCl-BuOH , ванилина и др.). Однако данные методы не дают информации о количестве и структуре индивидуальных соединений. Среди существующих спектрофотометрических методов определения структурно схожих флавонолов на основе реакции окисления-восстановления следует выделить метод Фолина-Дениса [120], основанный на образовании голубых продуктов окисления фенольных соединений вольфрамовой кислотой в щелочной среде. Однако этот метод позволяет определять только сумму флавонолов и при использовании рекомендованных в методике соотношений компонентов реакции часто выпадает осадок, который приводит к получению заниженных результатов. Полифенолы имеют полосы поглощения в УФ-области, которые используют для определения их общего содержания. Спектрофотометрическая методика [90] качественного анализа растительного сырья предполагает сравнение спектров поглощения водно-спиртовых экстрактов из корневищ сабельника болотного со спектрами поглощения стандартных образцов соответствующих полифенолов. Количественное содержание флавоноидов в этом случае рассчитывают в пересчете на хлорогеновую кислоту. Суммарное содержание флавоноидов определяют спектрофотометрически по реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия. Общую антиоксидантную активность экстрактов цитрусовых оценивают по степени ингибирования флавоноидами аскорбат- и

ферроиндуцированного окисления Твин-80 до малонового альдегида, содержание которого определяют по реакции с тиобарбитуровой кислотой [121-123]. Метод определения полифенолов в чаях основан на ингибировании образования свободных катион-радикалов 2,2'-азино-5ис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоты), раствор имеет голубовато-зеленый цвет. В результате взаимодействия радикалов с катехинами (или экстрактом зеленого чая) раствор обесцвечивается [63]. Уменьшение интенсивности окраски контролируют спектрофотометрически. Описано [40] использование 4-диметиламиноциннамальдегида для определения катехинов в плазме крови человека после употребления зеленого чая. Реагент взаимодействует с катехинами с образованием комплекса зеленого цвета (637 нм). Катехины обычно определяют методом абсолютной градуировки. Точность метода в зависимости от условий эксперимента составляет 0,1-2,0 % [40].

Удобным и простым методом определения танинов является спектрофотометрический метод Фолина-Чокальтеу [123], основанный на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота. Определению танинов этим способом мешают присутствующие в настое восстанавливающие сахара, аскорбиновая кислота, белки и аминокислоты (цистеин и тирозин).

Сравнительная оценка содержания фенольных соединений в чае проведена методами титриметрии, гравиметрии и спектрофотометрии [124, 125]. Наиболее часто используемым является классический метод Левенталя, заключающийся в титровании экстракта чая перманганатом калия в присутствии индигокармина в качестве индикатора [126]; при этом окисляются не только полифенолы, но и другие восстанавливающие вещества. Гравиметрическое определение полифенолов чая разработано Дейсом и состоит в весовом определении продуктов взаимодействия танинов с избытком формальдегида. Основным недостатком этого метода является то, что погрешность метода существенно растет с уменьшением содержания танинов. Поскольку танино-катехиновая смесь представляет собой довольно сложную многокомпонентную систему, эти три метода позволяют оценить общее содержание фенольных компонентов, причем, при определении различными методами получаются несколько отличающиеся результаты [127]. Наибольшие погрешности измерений дает весовой метод определения, меньшие – перманганатометрия, наименьшие – спектрофотометрия. Из рассмотренных трех альтернативных методик определения содержания фенольных соединений в образцах чая: спектрофотометрической (с помощью реактива Фолина-Чокальтеу), перманганатометрического титрования и методом весового определения по Дейсу наиболее чувствительной и специфичной именно к фенольным компонентам настоя считается спектрофотометрия.

Чувствительным методом определения полифенолов является хемилюминесцентный. Для его реализации также используют способность полифенолов легко окисляться [128, 129]. Люминесцентные свойства окси-замещенных флавоноидов изучены в [130]. Благодаря наличию тонкой структуры спектров, фосфоресцентный анализ дает возможность проводить идентификацию оксизамещенных флавоноидов наряду с методами ИК и ЯМР-спектроскопии [131]. Предложена [132] методика определения кверцетина в присутствии аспирин и салициловой кислоты, основанная на регистрации интенсивности люминесценции его комплекса с алюминием. Возбуждение люминесценции осуществляют при $\lambda=445$ нм, регистрируют $I_{\text{люм.}}$ при $\lambda_{\text{изл.}}=490$ нм.

Для установления структуры основных компонентов чая (катехинов, их производных, кофеина, галловой кислоты, глюкозы и др.) используют протонный магнитный резонанс и ядерно-магнитный резонанс на ядрах изотопа углерода ^{13}C [40].

Главный недостаток всех спектроскопических методов – невозможность индивидуального определения компонентов в смеси. Они позволяют определять только общее содержание полифенольных соединений в пробе.

В последнее время нашли применение сорбционно-спектроскопические методы определения полифенольных соединений. Так разработаны методики твердофазного люминесцентного определения флавоноидов (кверцетина, рутина, морина) в растительном сырье и фармацевтических препаратах [133-135, 137]. Известны методики для сорбционно-люминесцентного определения производных фенолкарбоновых кислот – пропилгаллата в пищевых и косметических маслах и хлорогеновой кислоты в зернах кофе [136, 138]. Экспрессное твердофазное определение суммы полифенольных соединений в лекарственном растительном сырье является наиболее актуальной задачей в пищевой и фармацевтической промышленности [139].

Для анализа объектов со сложной матрицей целесообразно применять хроматографические и электрохимические методы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Яшин, А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках [Текст] // Рос. хим. журн. – 2008. – Т. LI, № 2. – С. 130 – 135.
2. Roginsky, V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food [Tekst] / V. Roginsky, E.A. Lissi // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 92. – P. 235 – 254.
3. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities [Tekst] / D.D. Perez, F. Leighton, A. Aspee, C. Aliaga, E. Lissi // Biol. Research. – 2000. – Vol. 33. – P. 71 – 77.
4. N-нитрозоамины и нитриты в мясе и мясопродуктах [Текст] / Г.Ф. Жукова, М.С. Торская, В.И. Родин, С.А. Хотимченко // Вопросы питания. – 1999. – Т. 68, № 4. – С. 24.
5. Иванкин, А.Н. Об экологической безопасности пищевых продуктов [Текст] / А.Н. Иванкин, А.Д. Неклюдов, А.В. Бердутина // Экологические системы и приборы. – 2001. – № 8. – С. 39 – 44.
6. Фильчакова, Н.Н. Проблемы безопасности пищевых продуктов [Текст] / Н.Н. Фильчакова, С.А. Фильчакова, Ю.Н. Тамбовцев // Экологические системы и приборы. – 2001. – № 8. – С. 37 – 39.
7. Будников, Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 7. – С. 678 – 691.
8. Shi S.T. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice [Tekst] / Shi S.T., Wong Z.Y., Smith T.J. // Cancer Res. – 1994. – Vol. 54. – P. 4641 – 4647.
9. Yang, S.C. A receptor for green tea polyphenol EGCG [Tekst] / S.C. Yang // Nature. – 1997. – Vol. 389. – P. 134 – 135.
10. Костюковский, Я.Л. Методы определения химических консервантов и антиоксидантов в пищевых продуктах [Текст] / Я.Л. Костюковский, Д.Б. Меламед // Журн. аналит. химии. – 1989. – Т. 44, № 1. – С. 4 – 44.
11. Yang, T.T.C. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation [Tekst] / T.T.C. Yang, M.W.L. Koo // Atherosclerosis. – 2000. – Vol. 148, № 1. – P. 67-73.
12. Yu, H.N. Effects of Epi-Gallocatechin Gallate on PC-3 Cells Cytoplasm Membrane in the Presence of Cu⁺ / H. N. Yu, J.-J. Yin, S.-R. Shen // Food Chem. – 2006. – Vol. 95. – P. 108 – 115.
13. Complex effects of different green tea catechins on human platelets / G. Lill, S. Voit, K.Schorr, A.-A.Weber // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 546, № 2. – P. 265 – 270.
14. Validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues: comparison with pressurized liquid extraction [Tekst] / R.M. Alonso-Salces, A. Barranco, E.Corta, A.Berrueta, B.Gallo // Talanta. – 2005. – Vol. 65. – P. 654 – 662.
15. Гудковский, В. А. Природные антиоксиданты фруктов и овощей - источник здоровья человека [Текст] // Сб. науч. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1998. – С. 30 – 35.

Повний список літератури у редакції журналу.

Отримано редакцією .08.2013 р.

УДК 664. 856:663.95

ХОМИЧ Г.П., д-р. техн. наук, доцент

ВНЗ УКС «Полтавський університет економіки і торгівлі»

ВПЛИВ ФЕРМЕНТОЛІЗУ НА АРОМАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СОКІВ З ДИКОРΟΣЛОЇ СИРОВИНИ

У статті наведено результати досліджень впливу технології переробки на ароматичні властивості соків з дикорослої сировини: чорної шовковиці, чорниці, бузини чорної та горобини чорноплодної. Проаналізовано кількісний та якісний склад спо-

лук, що формують аромат соків з дикорослої фруктово-ягідної сировини. Встановлено, що попередня обробка м'язги впливає на ароматичні властивості соків, їх максимальний вміст спостерігається у зразках соків, при виробництві яких використовуюва-