



## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ АНТИОКСИДАНТОВ РАСТЕНИЙ СУБТРОПИЧЕСКИХ КУЛЬТУР

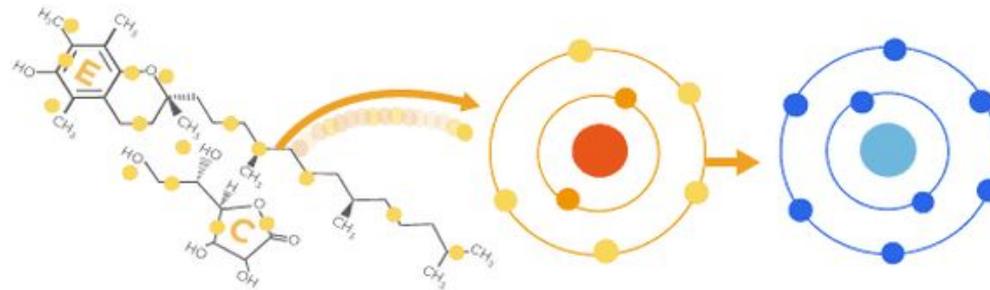


**Руководители Бессонова Елена Андреевна,  
к.х.н., доц. кафедры органической химии, ИХ ФГБОУ ВО СПбГУ**

**Кравченко Анастасия Витальевна  
Аспирант кафедры органической химии, ИХ ФГБОУ ВО СПбГУ  
Образовательный центр «Сириус», 2020**



## Антиоксиданты



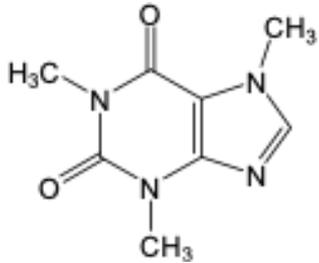
Окислительный стресс



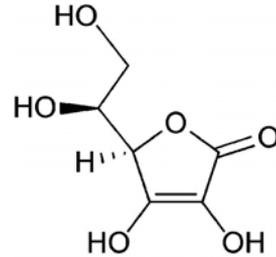


# ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

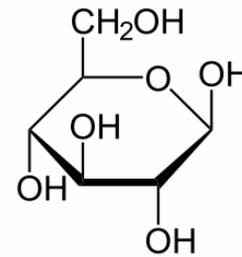
## Алкалоиды



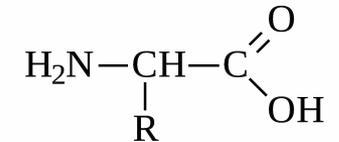
## Витамины



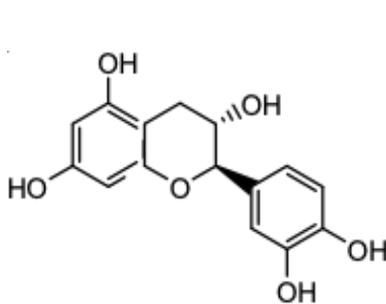
## Сахара



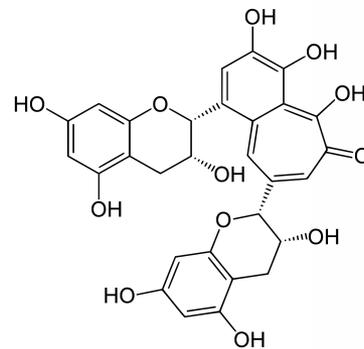
## Аминокислоты



## Полифенольные соединения

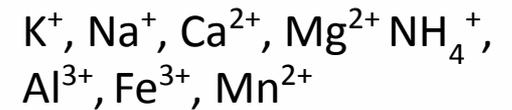


Катехины

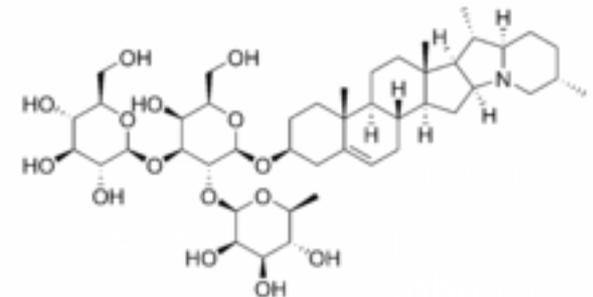


Теафлавины

## Макро- и микроэлементы



## Сапонины



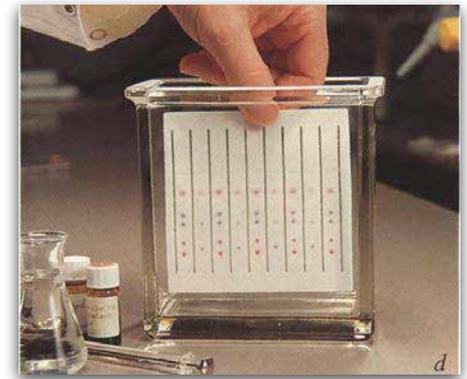


- Краснодарские чаи
- Селекционные чаи
- Цитрусовые

- Метод ТСХ

Что?

Как?



- Экспрессность
- Одновременный анализ нескольких образцов
- Простота и легкость проведения хроматографического эксперимента
- Быстрая смена растворителей
- Низкая стоимость оборудования для ТСХ



**Разработка экспрессного варианта определения полифенолов и аминокислот в чае и в цитрусовых культурах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии с целью получения хроматографических профилей антиоксидантов**



# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ





# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ

01



Поиск условий разделения



Отбор образцов и экстракция

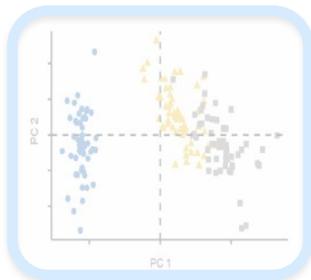
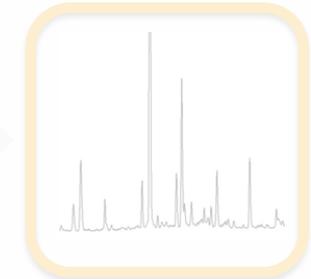


02

03



Получение хроматографических профилей



Хемометрическая обработка



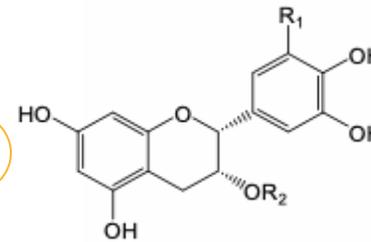
04





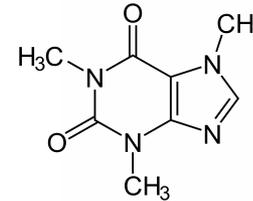
Аналиты

Катехины

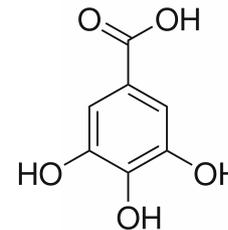


(-)-Эпикатехин (ЭК) ( $R_1 = R_2 = H$ )  
 (-)- Эпигаллокатехин (ЭГК) ( $R_1 = OH$ ,  
 $R_2 = H$ )  
 (-)-Эпикатехин галлат (ЭКГ)  
 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = 3,4,5$ -  
 тригидроксибензоил)  
 (-)-Эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ)  
 ( $R_1 = OH$ ,  $R_2 = 3,4,5$ -  
 тригидроксибензоил)

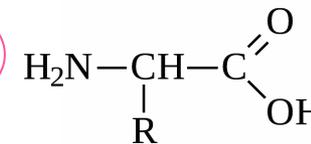
Кофеин



Галловая кислота



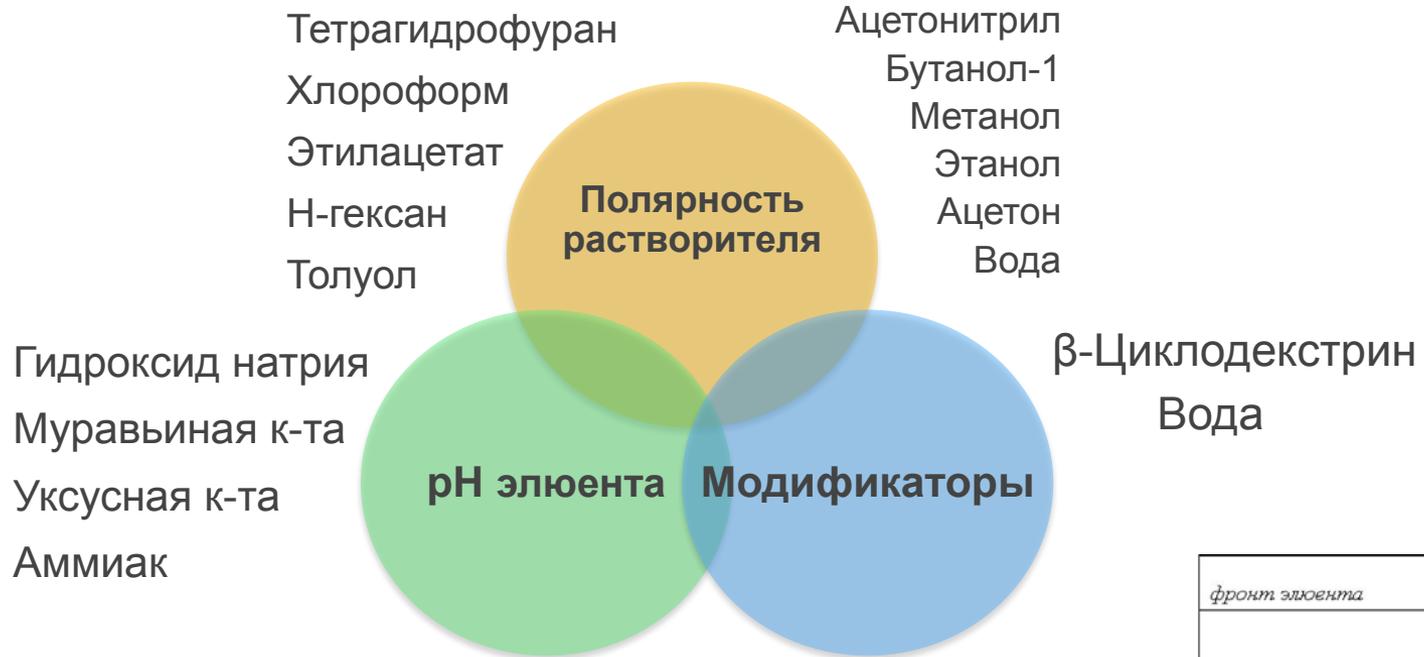
Аминокислоты



$R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_2C(O)NH_2$ ,  
 $R_3 = CH_2CH_2C(O)NH_2$ ,  $R_4 = CH_2OH$ ,  
 $R_5 = CH_3$ ,  $R_6 = CH(OH)CH_3$ ,  
 $R_7 = CH_2CH_2C(O)NHCH_2CH_3$

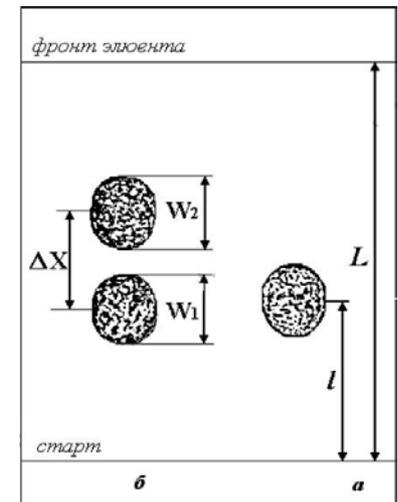


# ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ В УСЛОВИЯХ ВЭТСХ



**Эффективность:**  $N = 16 \left( \frac{l}{w} \right)^2$   $W$  - ширина пятна зоны пробы  
 $l$  - путь, пройденный аналитом

**Фактор селективности  
разделения:**  $\alpha = \frac{1-R_{f1}}{1-R_{f2}}$





## ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ МЕТОДОМ ВЭТСХ

### Полифенолы

Подвижная фаза	Фото пластинки	Caf	EGCG	EGC	ECG	GCG	EC	GC	GA
Толуол / ацетон / мур.к-та / H <sub>2</sub> O 9 : 9 : 2 : 0.8 *		0,65	0,29	0,41	0,33	0,32	0,43	0,32	0,49
Гексан / этилацетат / мур.к-та / H <sub>2</sub> O 4 : 5 : 1 : 0.5 *		0,31	0,41	0,47	0,52	0,45	0,59	0,50	0,71

**Условия:**  
Пластины ПТСХ-П-В-УФ «Sorbfil»

Величины R<sub>f</sub>

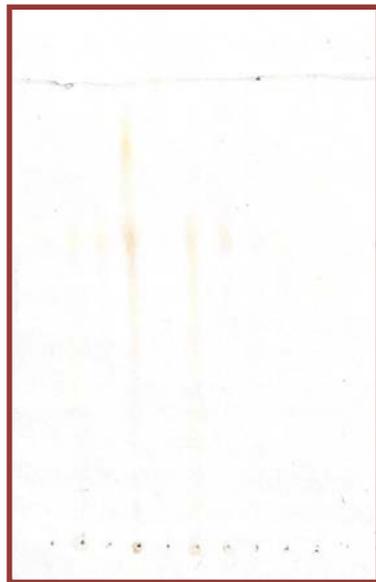
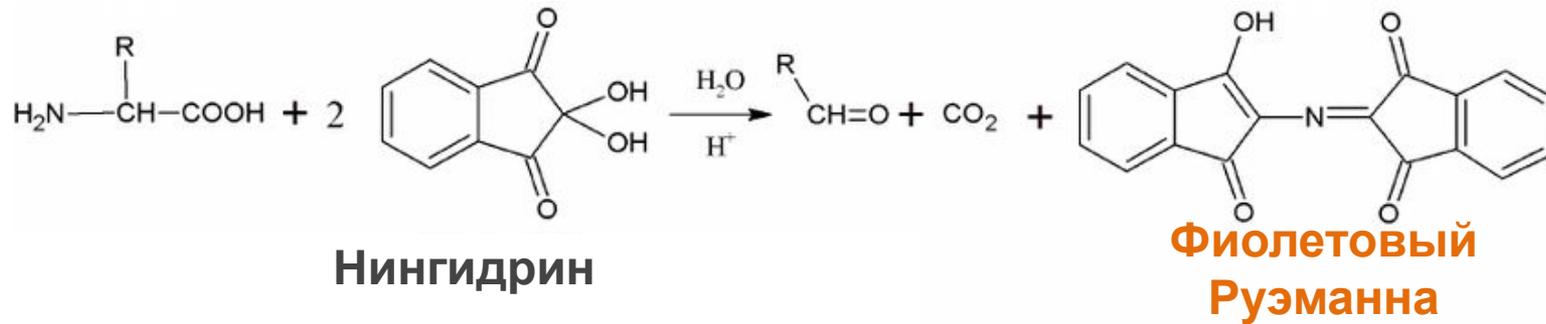
### Аминокислоты

Подвижная фаза	Фото пластинки	Tea	Gly	Glu	Ala	Ser	Tre	Asp
Бутанол / H <sub>2</sub> O / укс.к-та / ацетон 7 : 4 : 2 : 7 *		0,62	0,52	0,62	0,58	0,56	0,6	0,48
Бутанол / H <sub>2</sub> O / укс.к-та / ТГФ 3 : 2 : 1 : 0.5 *		0,66	0,45	0,52	0,55	0,43	0,51	0,36

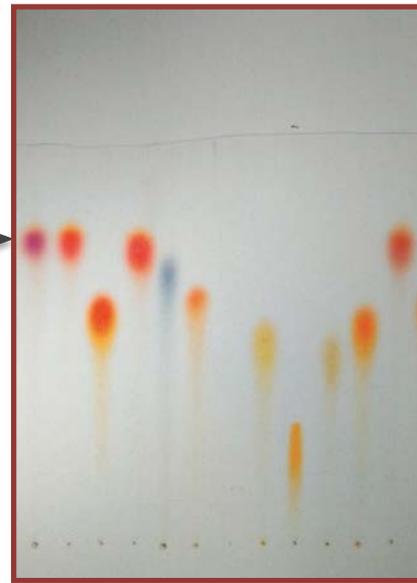
\* Соотношение по объему



## КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА АМИНОКИСЛОТЫ



Опрыскивание  
нингидрином,  
 $t^{\circ}$





# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ





## Аминокислоты:

$H_2O$ , 0,1M HCl, 50%  $CH_3OH$   
80°C,  
УЗ 20 мин



## Полифенолы:

0,5 - 1,5

Масса 0,75 мг,  $CH_3OH$  50%,  
80°C, УЗ, объем пробы 1 мкл  
80°C, УЗ 20 мин

0,5 - 3 µl

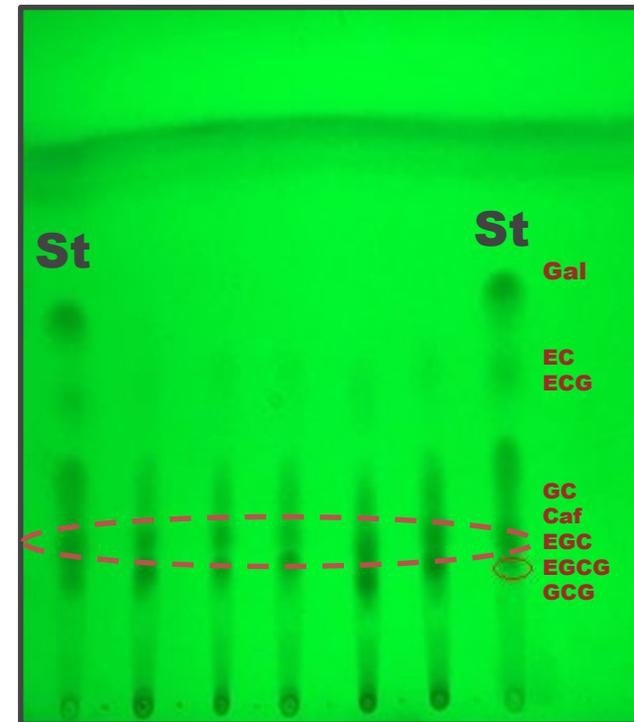
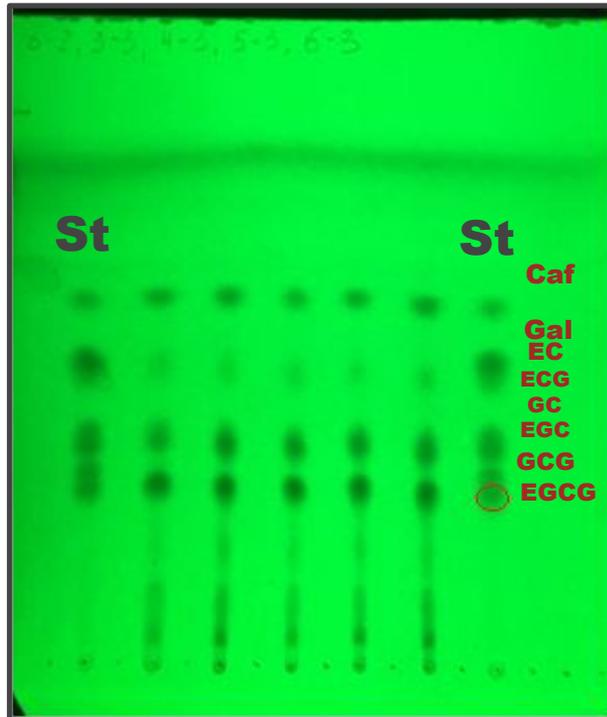


# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЧАЕ

Система 1

Образцы чая

Система 2



Образцы чая

Толуол /Ацетон/Муравьиная к-та/Вода  
5 : 4 : 1 : 0,4 (по объёму)

Образцы чая

Этилацетат/Гексан/Муравьиная к-та/Вода 5,5 :  
4 : 0,5 : 0,2 (по объёму)

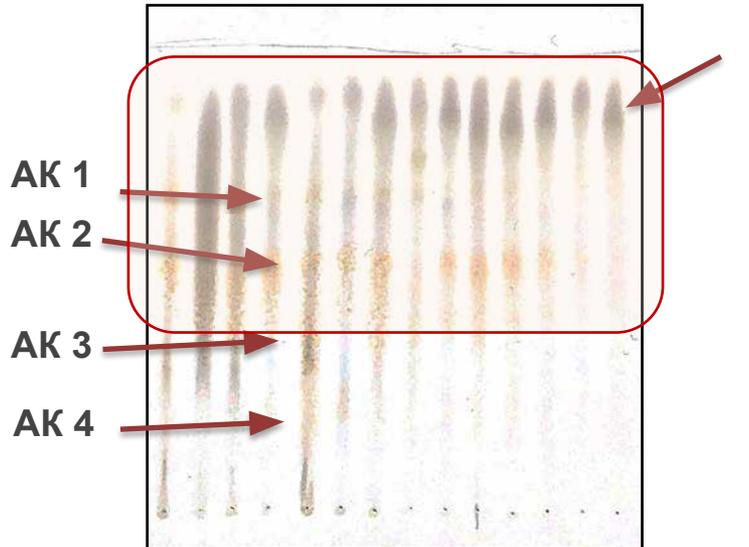


# ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ЧАЕ

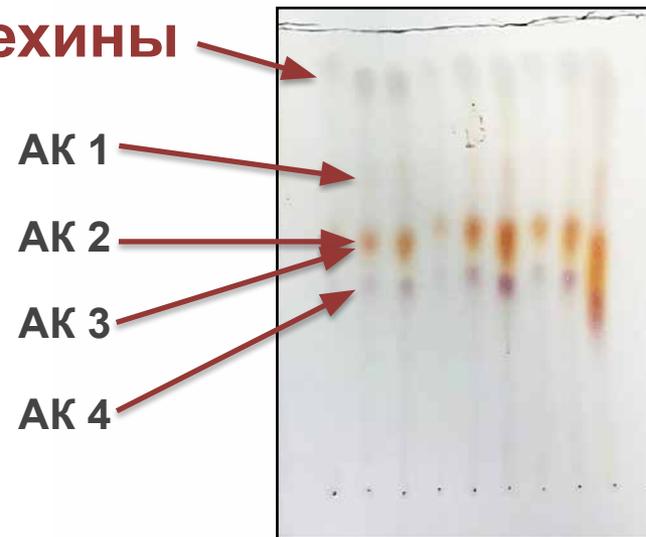
Система 1

Образцы чая

Система 2



Подвижная фаза:  
Бутанол/Вода/Уксусная к-та (лед.)/ТГФ  
3 : 2 : 1 : 0,5 (по объёму)



Подвижная фаза:  
Бутанол/Ацетон/Уксусная к-та (лед.)/Вода  
7 : 7 : 2 : 4 (по объёму)

😊 Селективность разделения лучше

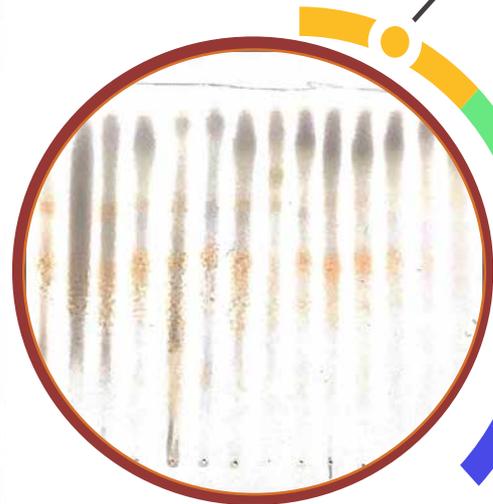
☹ Определению мешают полифенолы

😊 Полифенолы не мешают определению

☹ Селективность разделения хуже



# ИСКЛЮЧЕНИЕ МЕШАЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ



Уменьшение влияния  
полифенолов

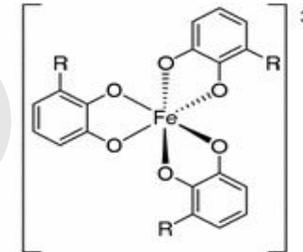
01

Комплекс с  $\beta$ ЦД



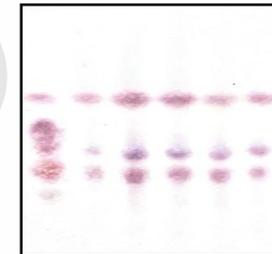
02

Комплекс с  $Fe^{3+}$



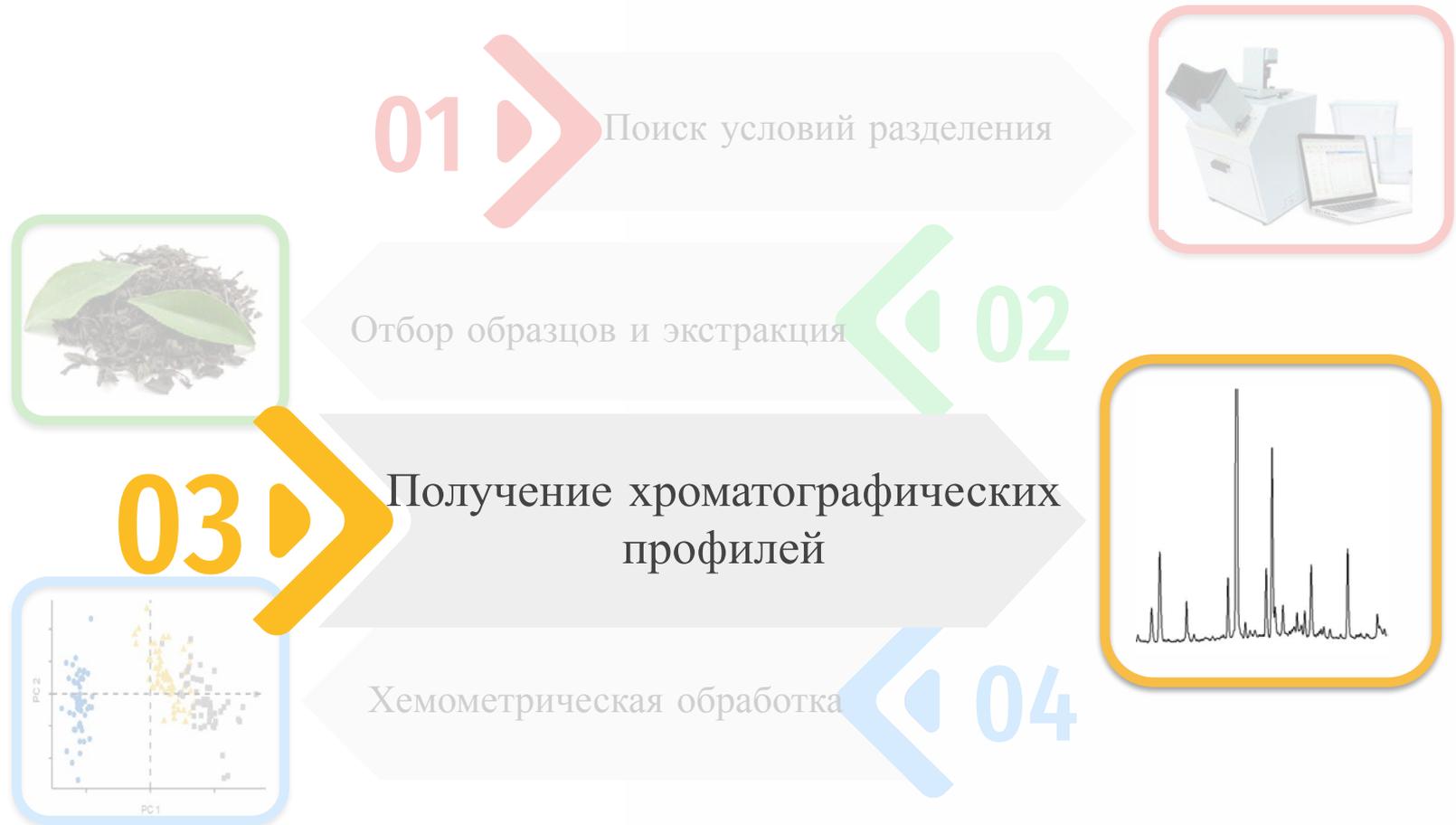
03

Пластинки с  
н.ф. целлюлозой





# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ





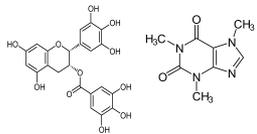
## Краснодарские чай

- “Века”
- Бирюзовый чай
- Белый чай
- Золотой чай
- Зеленый чай
- Габа
- Колхида
- Красный чай

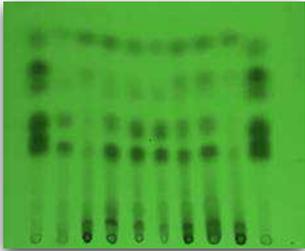


## Селекционные чай

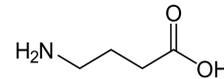
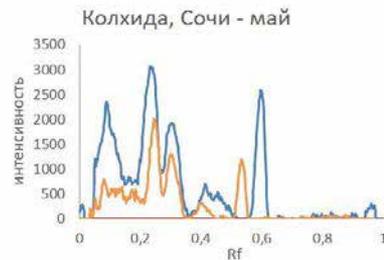
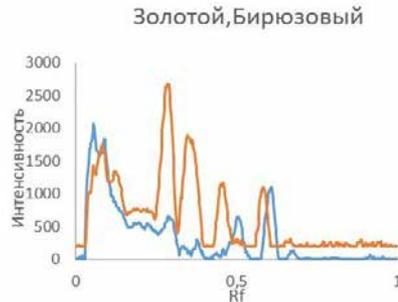
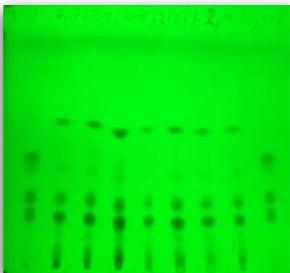
- *cv. Kolchida*
- *cv. Sochi*
- *mf. № 3823*
- *mf. № 2264*
- *mf. № 582*
- *mf. № 855*



### Ферментированные чай



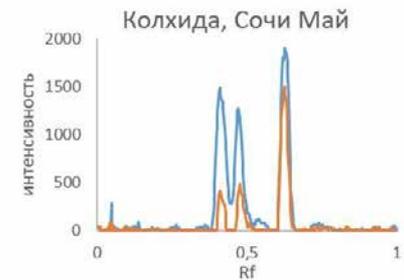
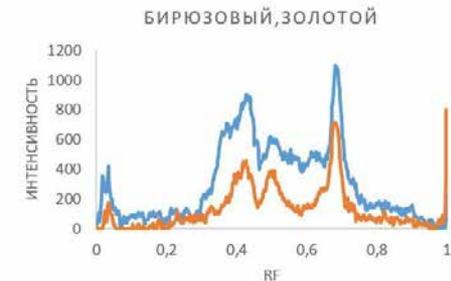
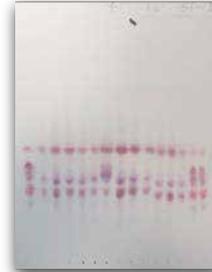
### Селекционные чай



### Ферментированные чай

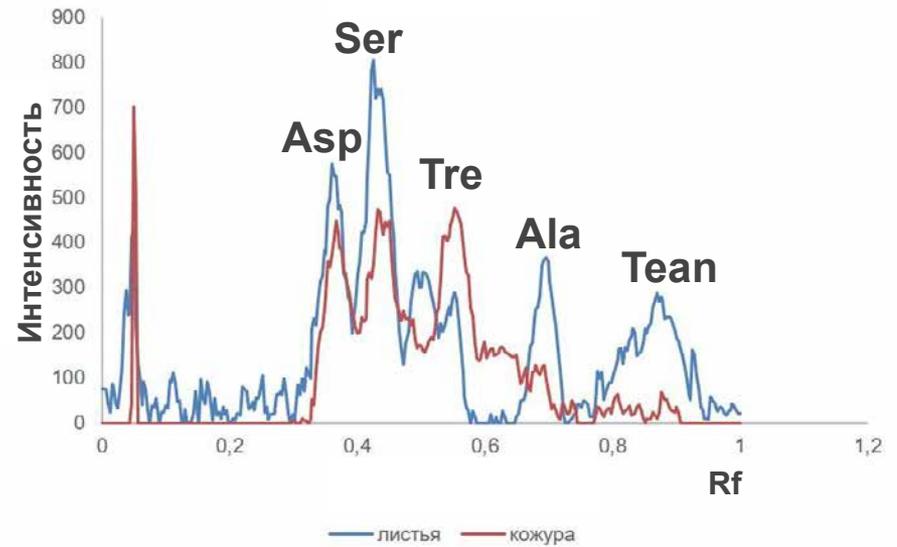
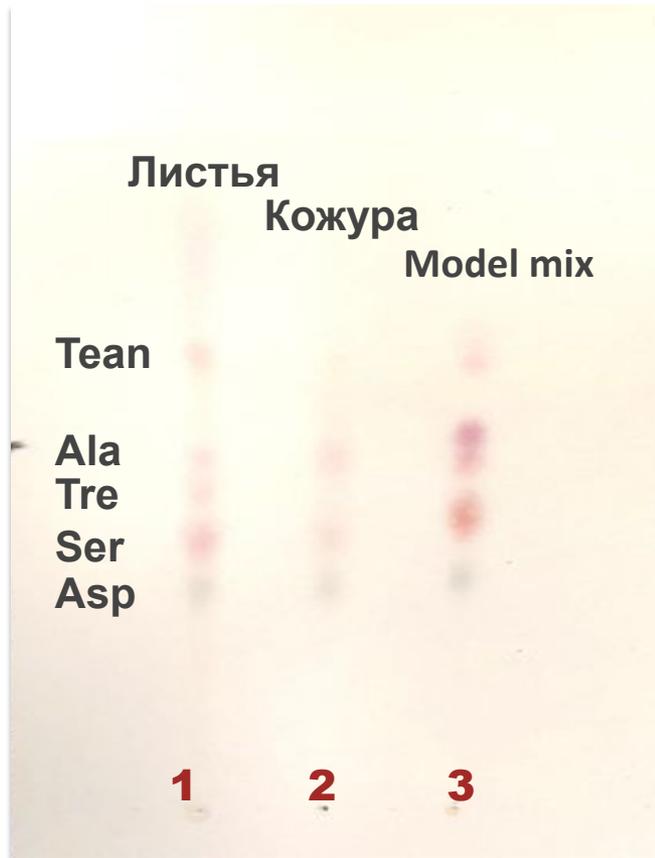


### Селекционные чай





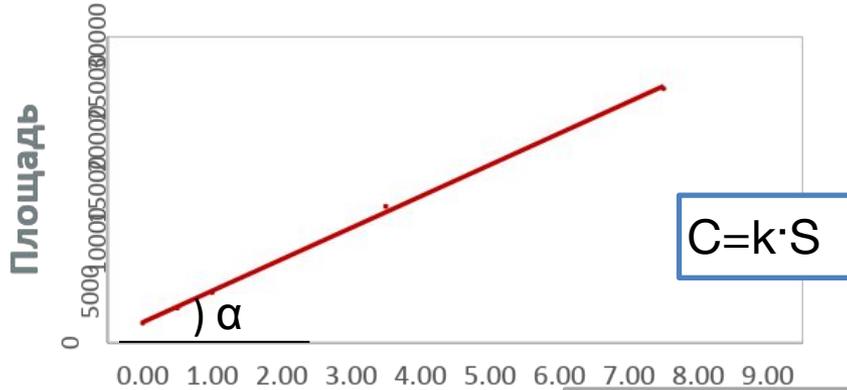
# ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЦИТРУСОВЫХ АМИНОКИСЛОТЫ





# ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ДЛЯ ПОЛИФЕНОЛОВ И АМИНОКИСЛОТ

Эпигаллокатехин

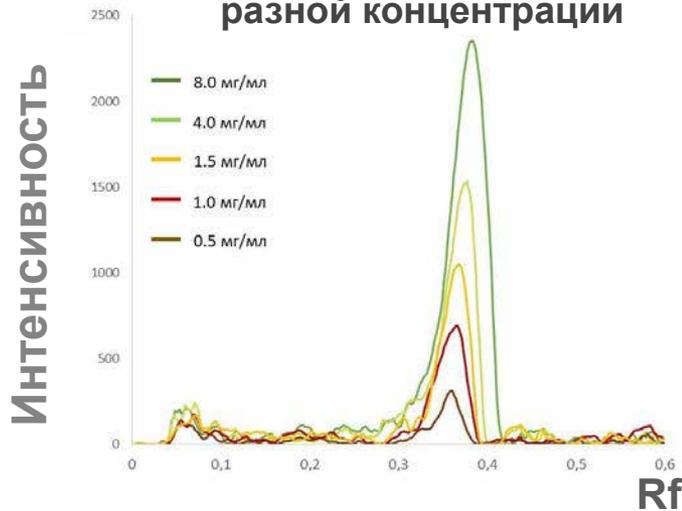


Концентрация, м

ПО (катехины) = 0,2 – 0,3 мг/мл

ПО (аминокислоты) = 0,01 - 0,10 мг/мл

Хроматограмма растворов стандарта ЭГК  
разной концентрации

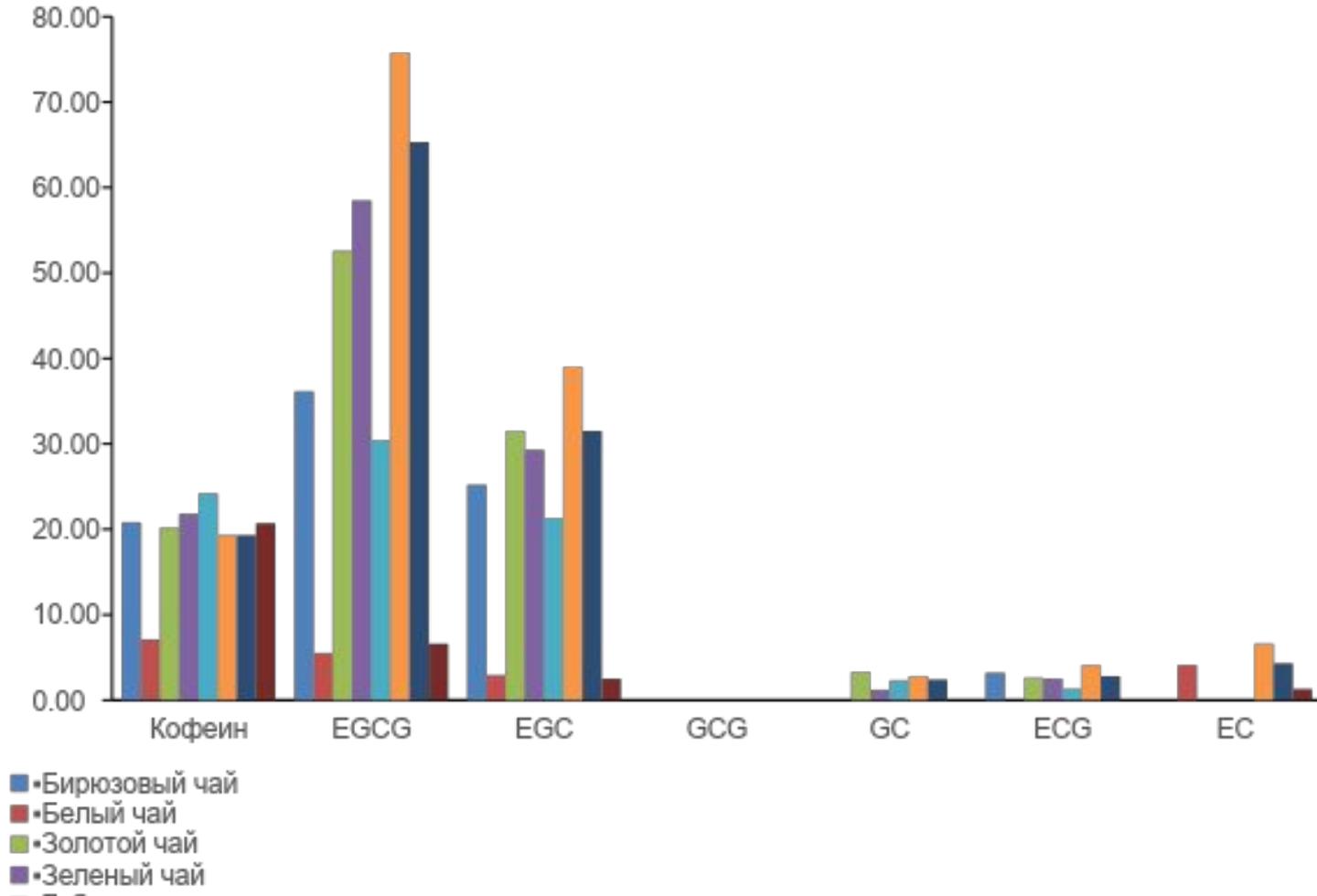


	R <sup>2</sup>	k	ПО, мг/мл
ПОЛИФЕНОЛЫ			
Caf*	0,95	6443	0,17
GA*	0,97	16567	0,05
EGCG*	0,96	7341	0,20
		168	
КИСЛОТЫ			
Ser	0,98	65011	0,01-0,10
Asp	0,91	61518	
Glu	0,98	56182	
Gly	0,94	30213	
Tean	0,98	14613	
Ala	0,90	71681	
Tre	0,93	81595	



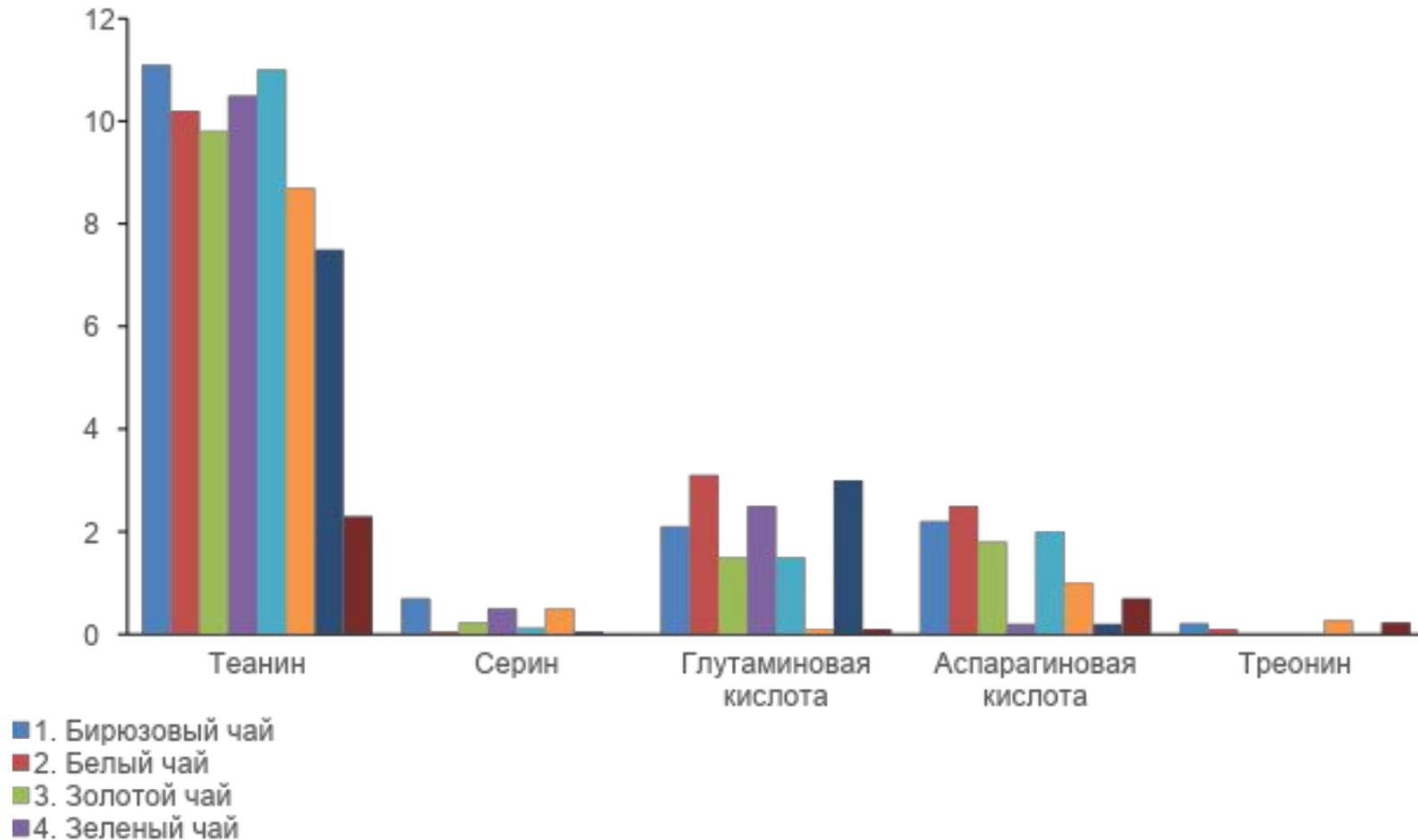
## СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ И АМИНОКИСЛОТ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫЙ СОРТАХ ЧАЯ

### Полифенолы





## Аминокислоты





# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАБОТЫ

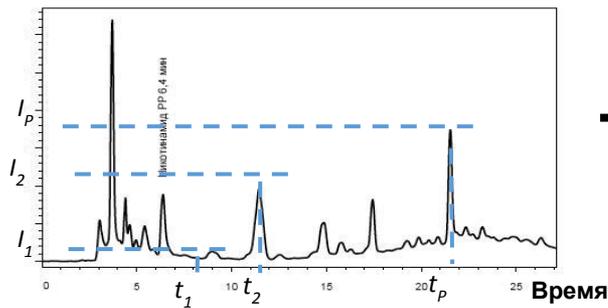




# ХЕМОМЕТРИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

## Метод главных компонент (МГК)

### I шаг: построение матрицы данных



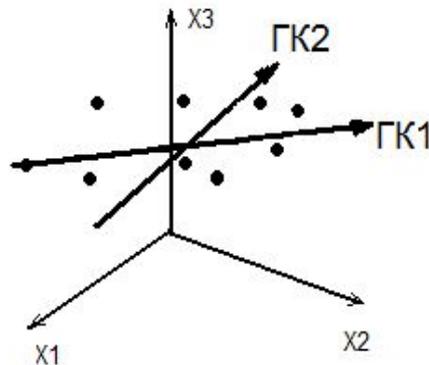
$N$  – число образцов  
(21)

$P$  – число переменных (1600)

	$t_1$	$t_2$	$t_p$
1	$I_{11}$	$I_{12}$	$I_{1p}$
...			
$N$			

### II шаг: уменьшение размерности матрицы

Направление главных компонент  
(ГК) –  
наибольший разброс в данных



Проецируем точки на  
новую плоскость

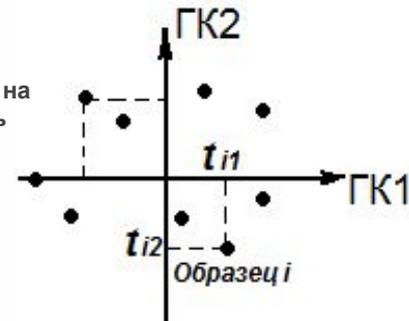
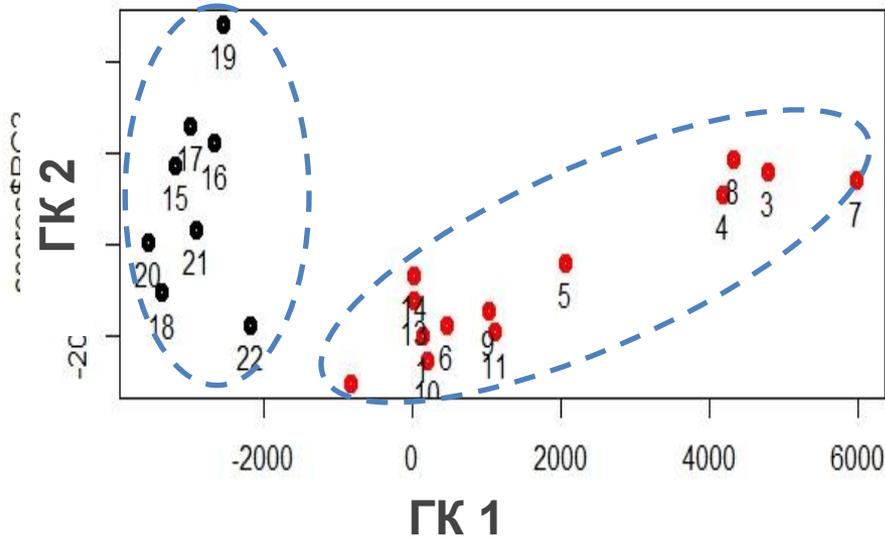


График счетов



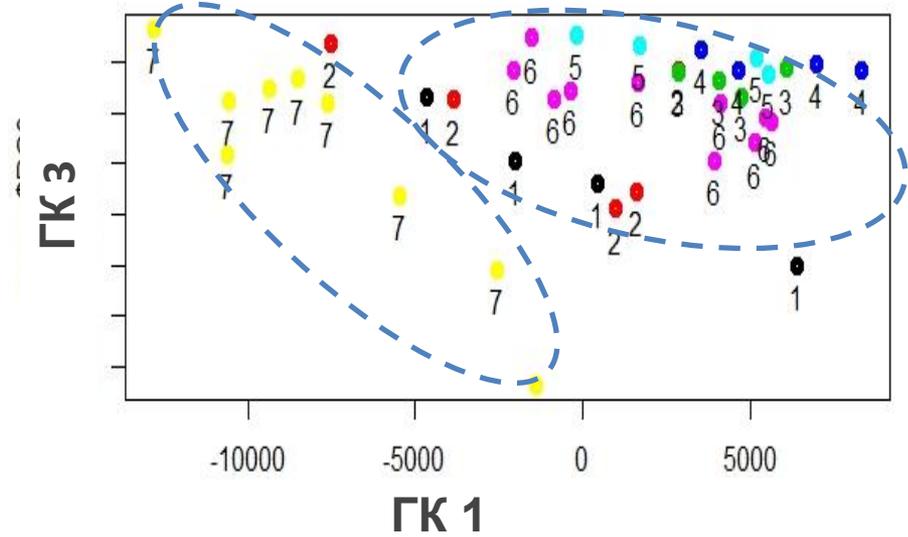
Аминокислоты

График счетов



Полифенолы

График счетов

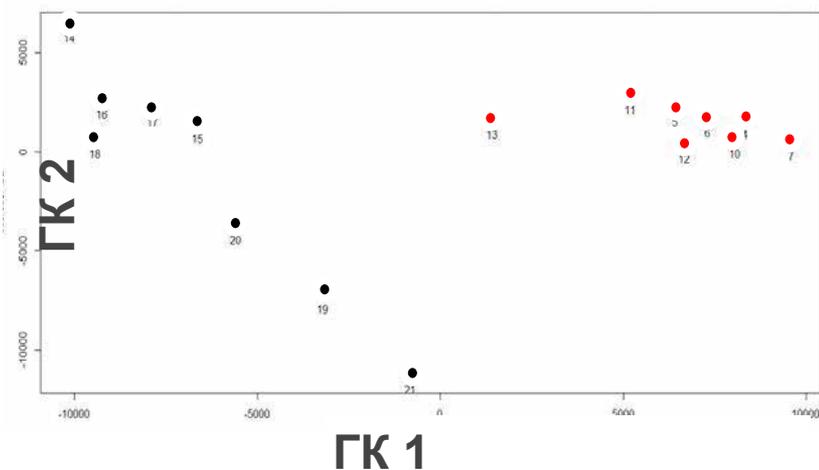


Обработка выполнена в R Software

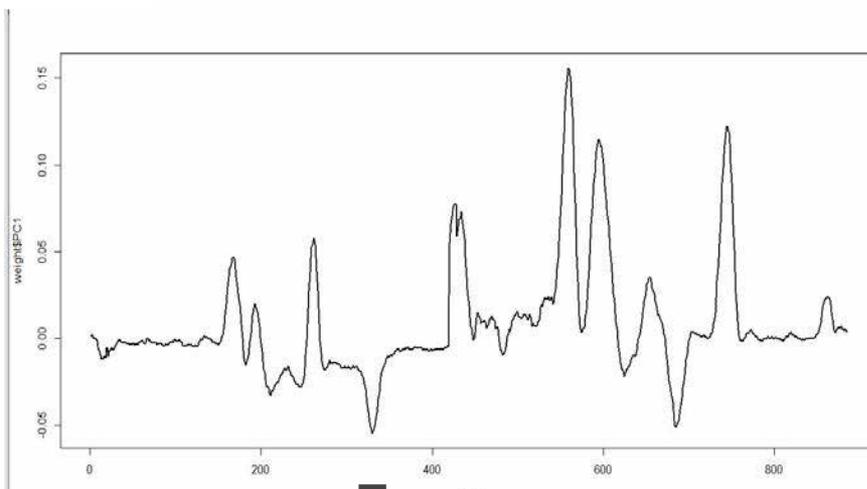


## Полифенолы+аминокислоты

### График счетов



### График нагрузок



**Аминокислоты: Ser, Glu, Asp**  
**Полифенолы: EGCG, ECG, GC, EGC**



Обработка выполнена в R Software



- 1. Предложен экспрессный вариант определения катехинов, кофеина и аминокислот в растительных объектах с использованием метода ВЭТСХ с видеоденсиметрическим детектированием**
- 2. Получены характеристические профили аминокислот и полифенолов в выбранных условиях в различных сортах чая и мандаринов**
- 3. Построена МГК-модель по профилям полифенолов и аминокислот селекционных чаев и чаев с различной степенью ферментации и выявлены доминирующие аналиты (Ser, Glu, Asp, EGCG, ECG, GC, EGC), определяющие различие**



**155**

Хроматографических  
пластинок сделано

**840**

Проб нанесено на  
пластинки

**69**

Раз попросили  
поделиться чаем



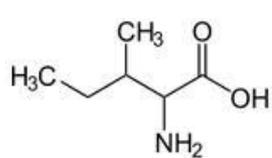
1. « High-Performance Thin-layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants » Eike Reich, Anne Schibli//Thieme.-.2007
2. «Содержание микроэлементов и низкомолекулярных антиоксидантов в чае» О.Н. Немерешина, Н.Ф. Гусев, А.В. Филиппова – 2014
3. «Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений» Л.А. Карцова, А.В. Алексеева – 2008
4. «Биохимия компонентов чай и особенности его биологического действия на организм» С. Н. Афонина, Е. Н. Лебева, Н. П. Сетко
5. Khan, I., Sangwan, P. L., Abdullah, S. T., Gupta, B. D., Dhar, J. K., Manickavasagar, R., & Koul, S. (2011). «*Ten marker compounds-based comparative study of green tea and guava leaf by HPTLC densitometry methods: Antioxidant activity profiling* ».
6. «Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity and simultaneous quantitative analysis of 15 polyphenols and caffeine in the flower buds of *Camellia sinensis* from different regions by LCMS» Toshio Morikawa
7. Д.О. Мареева, Т.Г. Цюпко, В.В. Милевская, А.З. Темердашев «Определение галловой кислоты, эпикатехина и кофеина в экстрактах черного чая», 2014
8. Я.И. Яшин, А.Я. Яшин «Чай. Химический состав чая и его влияние на



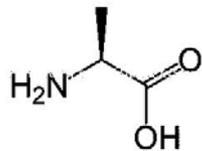
**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



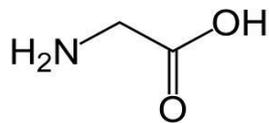
# Структуры важнейших α-аминокислот



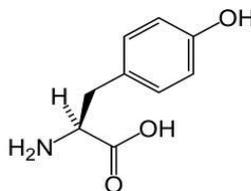
Изолейцин (*Иле*)



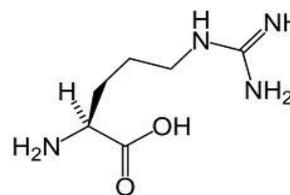
Аланин (*Ала*)



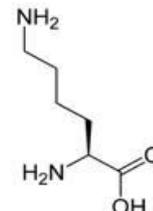
Глицин (*Гли*)



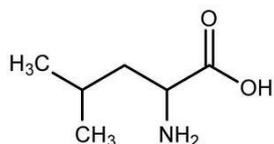
Тирозин (*Тир*)



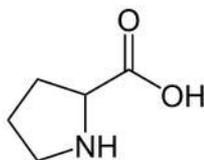
Аргинин (*Арг*)



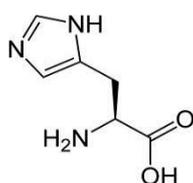
Лизин (*Лиз*)



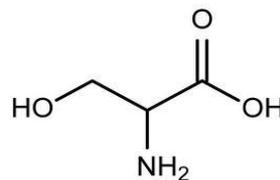
Лейцин (*Лей*)



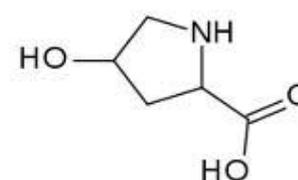
Пролин (*Про*)



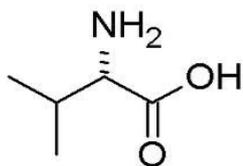
Гистидин (*Гис*)



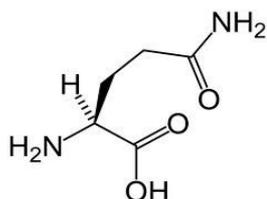
Серин (*Сер*)



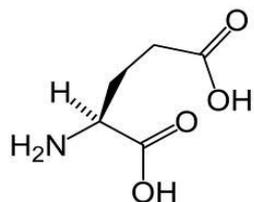
Гидроксипролин (*o-Про*)



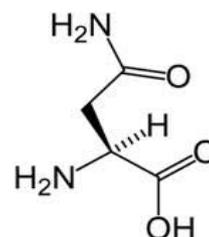
Валин (*Вал*)



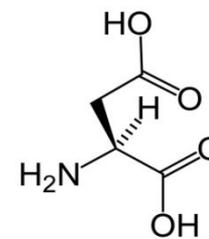
Глутамин (*Глн*)



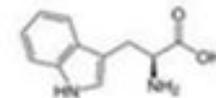
Глутаминовая кислота (*Глу*)



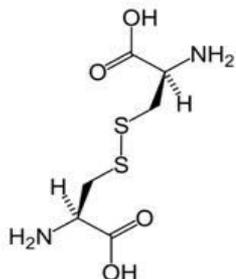
Аспарагин (*Асн*)



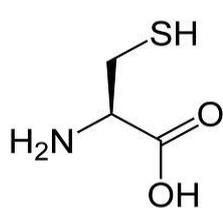
Аспарагиновая кислота (*Асп*)



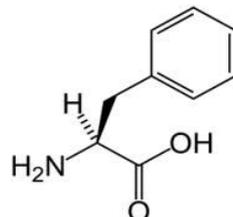
Триптофан (*Трп*)



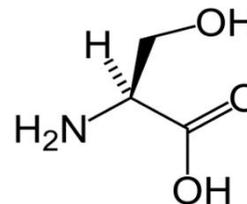
Цистин (*Цис-цис*)



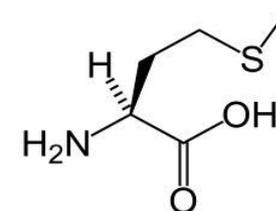
Цистеин (*Цис*)



Фенилаланин (*Фен*)



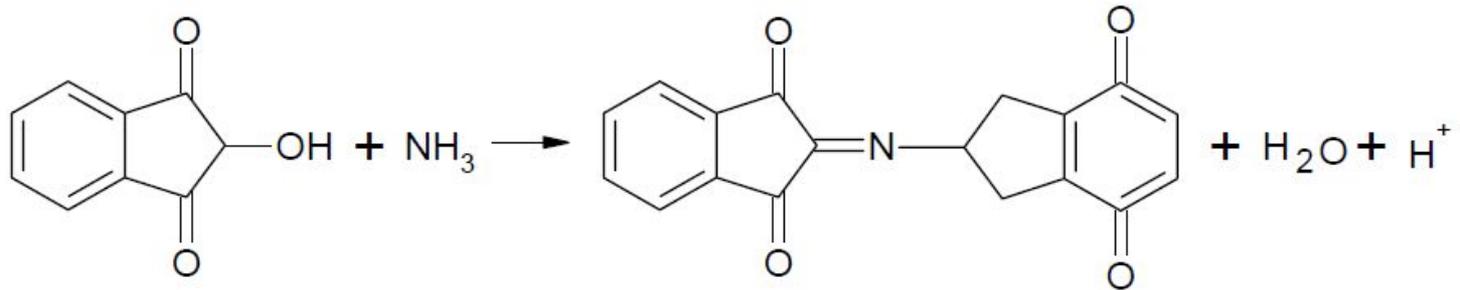
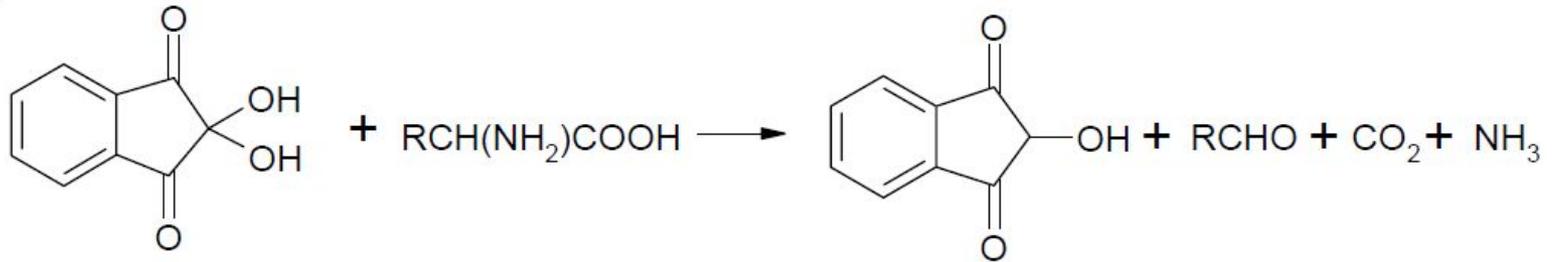
Треонин (*Тре*)



Метионин (*Мет*)



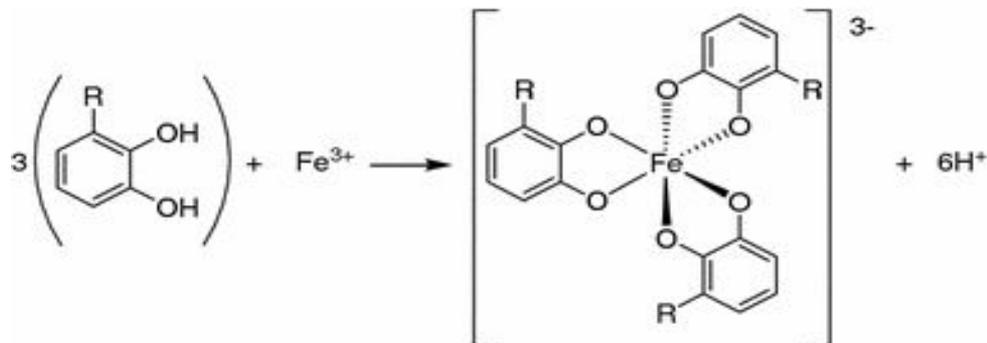
## Реакция аминокислоты с нингидрином





# КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ КАК ИСКЛЮЧЕНИЕ МЕШАЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ И САХАРОВ

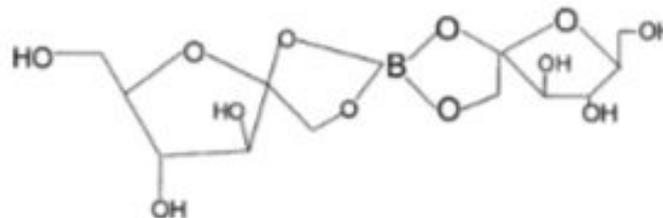
## 1. Комплекс диолов с железом



## 2. Комплекс полифенолов с $\beta$ -циклодекстрином



## 3. Комплекс сахаров с бором (для цитрусовых сортов)





# ОКИСЛЕНИЕ КАТЕХИНОВ

