

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)

Факультет химии и высоких технологий

Кафедра аналитической химии

Допустить к защите
Заведующий кафедрой
д-р хим. наук, проф.

 З. А. Темердашев
2019г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

КАТЕХИНОВЫЙ СОСТАВ ЧЕРНОГО КРАСНОДАРСКОГО ЧАЯ И
ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ ПО ВИДУ
ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ

Работу выполнила  К.В. Садовник

Направление подготовки 27.03.01 Стандартизация и метрология

Направленность (профиль) Стандартизация и сертификация

Научный руководитель
проф., д-р хим. наук, проф.  Т. Г. Цопко

Нормоконтролер
канд. хим. наук, доц.  О. Б. Воронова

Краснодар
2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Аналитический обзор.....	7
1.1 Чай как объект исследования.....	7
1.1.1 Химический состав чая.....	8
1.1.2 Виды чая.....	13
1.2 Методы исследования индивидуальных компонентов чая	15
1.3 Идентификация чая.....	21
1.4 Планирование эксперимента.....	24
2 Экспериментальная часть.....	27
2.1 Материалы, реактивы и используемое оборудование.....	27
2.2 Приготовление рабочих растворов	29
2.2.1 Приготовление фосфатного буферного раствора	29
2.2.2 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)–эпикатехина концентрацией 100 мг/дм ³	29
2.2.3 Приготовление головного (стандартного) раствора (+)–катехина концентрацией 50 мг/дм ³	30
2.2.4 Приготовление головного (стандартного) раствора кофеина концентрацией 1000 мг/дм ³	30
2.2.5 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)– эпигаллокатехин галлата концентрацией 1000 мг/дм ³	30
2.2.6 Приготовление головного (стандартного) раствора галловой кислоты концентрацией 200 мг/дм ³	31
2.2.7 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)– галлокатехина концентрацией 1000 мг/дм ³	31
2.2.8 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)–эпикатехин галлата концентрацией 1000 мг/дм ³	31

2.2.9 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)– эпигаллокатехина концентрацией 1000 мг/дм ³	32
2.2.10 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)– галлокатехин галлата концентрацией 1000 мг/дм ³	32
2.3 Приготовление экстракта чая.....	32
2.4 Проведение анализа методом МЭКХ.....	33
2.4.1 Методика определения катехинов, кофеина и галловой кислоты методом МЭКХ.....	33
2.4.2 Построение градуировочной зависимости	35
3 Результаты и их обсуждение.....	41
Заключение	53
Список использованных источников	55
Приложение А Отчет о патентно-информационных исследованиях	63

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КТ – катехин

ЭКТ – эпикатехин

ЭГКГ – эпигаллокатехин галлат

КФ – кофеин

ГК – галловая кислота

ГКт – галлокатехин

ЭГК – эпигаллокатехин

ГКГ – галлокатехин галлат

ЭКГ – эпикатехин галлат

ДДСН – додецилсульфат натрия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография

ОП МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография с обращенной полярностью

ВВЕДЕНИЕ

Чай является интернациональным напитком и одним из важнейших пищевкусовых продуктов.

В России чай выращивают в Краснодарском крае в районе Большого Сочи от Адлера до Туапсе, а также в поселке Цветочном Майкопского района, где выращивается самый северный чай в мире.

С целью восстановления и развития чаеводства на территории Краснодарского края и поставки на потребительский рынок конкурентоспособного, отвечающего международным стандартам чая был принят закон Краснодарского края от 08 августа 2016 года N 3453–КЗ «О развитии чаеводства на территории Краснодарского края» [1].

Развитие чаеводства влечет за собой необходимость защиты Краснодарского чая, а также его идентификации среди других чаев. Для этого необходимо более подробное изучение его физико–химических показателей, к которым относятся:

- содержание водорастворимых экстрактивных веществ;
- массовая доля влаги;
- общее содержание золы;
- содержание водорастворимой золы;
- содержание грубых волокон
- массовая доля металломагнитной примеси;
- массовая доля сырой клетчатки;
- массовая доля мелочи.

Особый интерес представляют экстрактивные вещества, которые составляют 41–58% сухого вещества. Основными экстрактивными веществами, содержащимися в чайном листе, являются дубильные вещества, эфирные масла, алкалоиды, аминокислоты, пигменты и витамины.

Наряду с суммарными показателями актуально определение индивидуальных компонентов. Так большое значение имеют катехины чая, так как они преобладают в его составе. Кофеин – основной по содержанию алкалоид, и галловая кислота, которая является составной частью галлированных катехинов.

Содержание данных компонентов в Краснодарских чаях малоизученно, поэтому целью работы является изучение катехинового состава Краснодарского чая для целей классификации по виду чайного растения.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета, уникальный идентификатор RFMEF159317X008.

1 Аналитический обзор

1.1 Чай как объект исследования

Чай является продуктом переработки (скручивания, сушки, для отдельных видов завяливания и ферментации) молодых верхушечных побегов вечнозеленого растения семейства Theaceae, вида *Camellia sinensis*.

Вид подразделяется на три подвида:

- Китайский (*Thea sinensis*): (японский (сэнтя), дарджилинг, формозский, вьетнамский, индонезийский, грузинский и др.),
- Ассамский или индийский (*Thea assamica*): (цейлонский, кенийский, угандийский и др.),
- Камбоджийский – естественный гибрид китайского и индийского: выращивается в некоторых районах Индокитая [2].

Кроме того, существует классификация чайных растений в зависимости от климатических разновидностей, в которых они произрастают, отличающихся анатомо-морфологическими признаками и химическим составом чайного листа, определяющим формирование специфических органолептических свойств [3, 4]:

- китайская
- японская (мелколистная китайская)
- африканская
- турецкая
- российская (краснодарский)
- индийская или ассамская
- индокитайская разновидность
- другие.

При производстве чая должны использоваться только молодые флешы, которые представляют собой побеги, имеющие 2–3 листочка с нераспустившейся почкой или же без нее. Самая ценная часть флеша – типсы, которые состоят из нераспустившейся почки и верхнего листочка. Типсы отличаются высоким содержанием водорастворимых экстрактивных веществ и низким содержанием нерастворимых фракций. Чем выше на чайном растении находится лист, тем больше в его составе водорастворимых веществ и меньше нерастворимых, и, конечно же, тем богаче вкус и ярче аромат готового чая [5].

1.1.1 Химический состав чая

Чайный лист состоит из воды и сухого вещества. В зеленых листьях чая (сырье) 73–81% составляет вода и только 19–27% сухие вещества. Наиболее значимыми составными частями сухого вещества чайного листа являются фенольные соединения, алкалоиды, эфирные масла, белки, углеводы, пектиновые вещества, пигменты, витамины, ферменты и минеральные вещества. Сухие вещества в свою очередь делятся на две группы:

- 1) растворимые (экстрактивные вещества или экстракт);
- 2) нерастворимые в воде (балластные вещества) [6].

Химический состав свежего чайного листа представлен в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Химический состав свежего чайного листа [6]

Экстрактивные вещества (41–58%)		Балластные вещества (42–59%)	
Фенольные соединения (катехины, теогаллин и др.)	14–26%	Белки	20–22%
Углеводы (моносахариды,	4–5%	Нерастворимые углеводы	5–18%

Продолжение таблицы 1.1

дисахариды, пентозы)		(целлюлоза, крахмал)	
Производные пурина (кофеин, теofilлин, теобромин и др)	2–4%	Пектиновые вещества (протопектин)	8–9%
Минеральные вещества: К, Са, Mg, F, Si, Na, Al, Mn, Sr и др.	3–4%	Лигнин	6–7%
Аминокислоты	1–2%	Смолы	2–3%
Органические кислоты (щавелевая, яблочная и др)	1%	Прочие нерастворимые вещества: соединенные с белками дубильные вещества; жирорастворимые витамины; нерастворимые минеральные вещества; нерастворимые ферменты;	1–2%
Прочие растворимые вещества: водорастворимые витамины; азотистые вещества; ферменты; ароматические вещества; спирты; пигменты.	10–12%		

Содержание растворимых веществ в зеленом чае больше (40–50%), чем в черном (30–45%). К тому же, чем моложе и выше качеством листья чая, тем больше экстрактивных веществ содержит полученный из них готовый чай [3].

Одним из основных алкалоидов в чае является кофеин. Его содержание обычно составляет от 1,5 до 5% на сухую массу. Алкалоиды чая также представлены теобромином, теofilлином, аденином, ксантином и др., однако по сравнению с кофеином их содержание незначительно. Так, например, содержание теобромина обычно составляет 0,1–0,4%, теofilлина 0,13–0,18%. [7] Это биологически активные вещества, оказывающие сильное возбуждающее и стимулирующее действие на организм человека [3, 8, 9].

Кофеин в чае находится главным образом в связанном состоянии в комплексе с танином. При переработке чайного листа кофеин вступает в реакцию с танином, и образуется таннат кофеина – вещество, обладающее приятным, без горечи, вкусом [3].

Помутнение охлажденного экстракта чая (образование «сливок»), обусловленное таннатом кофеина – показатель высокого качества чая [7].

Фенольные соединения в чайном листе представлены в основном танино–катехиновой смесью. Танино–катехиновую смесь делят на три фракции: катехиновую (растворимую в серном эфире); танинную (нерастворимую в серном эфире, с большей молекулярной массой); фракцию связанного танина (с минеральными веществами – танниды, с белками – таннаты) [4].

Основными фенольными составляющими свежих чайных листьев являются катехины. В молодых листьях их содержание составляет до 80%, до 20% составляет танинная фракция. Катехины являются наиболее восстановленными из флавоноидов и, следовательно, обладающими наибольшим антиоксидантным потенциалом, склонные к ферментативному окислению [4, 10].

Экспериментально показано, что катехины обладают широким спектром фармакологических свойств. Среди чайных катехинов максимальной антиоксидантной активностью обладает (–)-эпигаллокатехин галлат [11, 12].

Преобладающими в чае являются четыре типа катехинов: эпигаллокатехин, эпигаллокатехин галлат, эпикатехин и эпикатехин галлат. В меньших количествах содержатся галлокатехин, катехин и галлокатехин галлат. Структурные формулы основных катехинов чая изображены на рисунке 1 [13].

В процессе старения чайного листа увеличивается танинная фракция, а количество катехинов уменьшается. Дубильные вещества формируют вкус и

цвет чая, катехиновая фракция придает ему горький, вяжущий вкус, а терпкость, яркий цвет и другие свойства связаны с танинной фракцией [4].

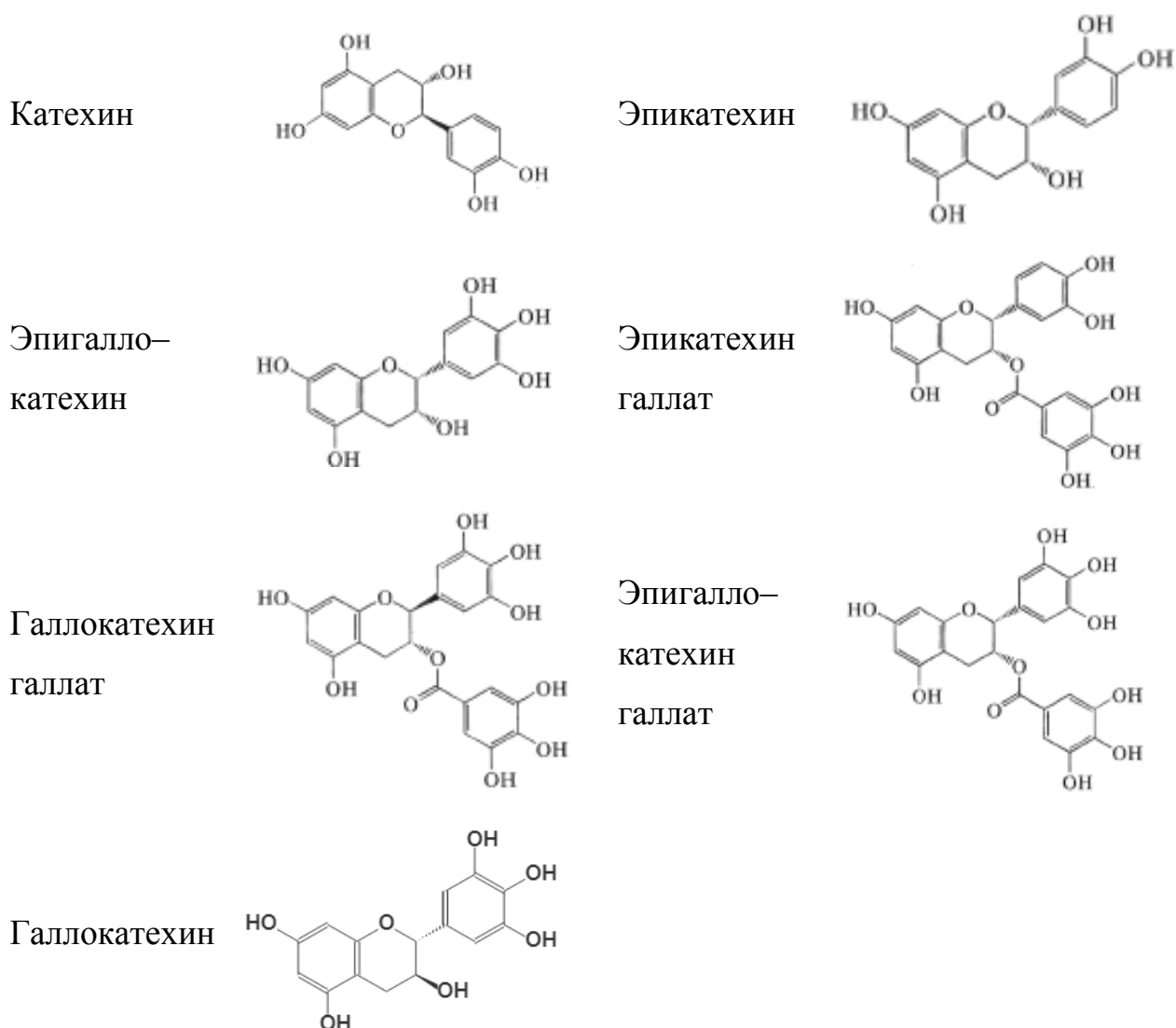


Рисунок 1.1 – Структурные формулы чайных катехинов

Окраска готового чая обусловлена пигментами, которые в основном представлены двумя группами красителей: теарубигинами (до 10% в сухом чае) и теафлавидами (не более 2%). Теафлавины нестойки, они легко окисляются и переходят в теарубигины [5, 16]. По соотношению этих красителей определяют качество чая. Чем больше процент содержания теафлавинов, тем лучше напиток [3, 14].

Основными веществами, обуславливающими аромат чая, являются эфирные масла, несмотря на их крайне незначительное количество в зеленых

чайных листьях (0,007–0,009% сухого вещества). Почка и первый лист содержат наибольшее количество эфирных масел. В процессе производства чая содержание эфирных масел меняется, так как компоненты, обуславливающие аромат зеленого листа улетучиваются, образуя новые эфирные масла, содержание которых в готовом чае достигает 0,02% [6].

Минеральные вещества в зеленом чайном листе и готовом чае содержатся в пределах 4–7% от общего количества сухих веществ [6]. Чай богат марганцем, фтором и алюминием по сравнению с другими источниками пищи. Также известно, что чайное растение имеет высокое содержание фтора. Кроме этих минеральных веществ чай содержит кальций, магний, железо, кремний и др. [7].

Чай содержит различные витамины, определяющие его физиологическую ценность: Р, К, Е, С, В1, В2, В3, РР и др. Основным витамином является витамин Р. Почти всем продуктам из чая, содержащим катехины, свойственна так называемая Р–витаминная активность [3, 8].

Сырье и готовая продукция высокого качества содержат больше экстрактивных веществ, чем низкокачественная.

Существует ряд факторов, влияющих на органический и минеральный состав чайного листа, к ним относятся: сорт растения, условия выращивания, возраст растения, условия и время сбора, агротехнические мероприятия, технология обработки и другие факторы.

Почка и первый лист чайного растения содержат большее количество экстрактивных веществ, чем второй и последующие, таким образом, увеличение возраста чайного листа приводит к уменьшению экстрактивных веществ. Их содержание меняется также по периодам сезона, то есть в начале и конце сезона – минимальное, в середине – максимальное [8].

1.1.2 Виды чая

Основной принята классификация чая по степени ферментации (окисления), так как в она содержит единый признак, по которому можно охарактеризовать разнообразие чаев. В соответствии с этой классификацией чаи подразделяют на следующие категории, представленные в таблице 1.2 [8]:

Таблица 1.2 – Классификация чая

Категория чая	Степень ферментации	Виды чая
Неферментированные	Окисление до 12% от суммы дубильных веществ исходного сырья	Белый чай, зеленый чай (не прошедший ферментацию или прошедший ее слабую степень)
Слабоферментированные	Окисление от 12% до 30% от суммы дубильных веществ исходного сырья	Желтые, оолонги (красные) и приготовленные тепловым методом недоферментированные черные чаи
Ферментированные	Окисление в пределах 35–45% от общего содержания дубильных веществ	Черные чаи, прошедшие полную ферментацию

Черный чай получают после высушивания и ферментации чайного листа.

Технология производства черного чая представлена в таблице 1.3 [4,10].

Таблица 1.3– Технология производства черного чая

Этап	Основные процессы
Завяливание чайного листа	Снижение влажности, листья приобретают эластичность и мягкость, необходимые для скручивая.
Скручивание (на машинах–роллерах или вручную)	Разрушение клеток чайного листа, высвобождение клеточного сока и его подготовка к ферментации под действием кислорода и ферментов клеток.
Ферментация	Образование сначала катехин-хинонов, а затем олигомеров – теафлавинов (2–6%) и теарубигинов (свыше 20%), обладающих высокой антиоксидантной активностью. Также происходит увеличение содержания галловой кислоты, высвобождающейся из галлированных катехинов. Глубина ферментации регулируется вариациями температуры и длительности сушки. За счет превращения дубильных веществ чайный лист приобретает характерный цвет, вкус и аромат.
Сушка	Прекращение ферментативных процессов и фиксация полученных в ходе ферментации свойств. Снижается количество экстрактивных, ароматических веществ, кофеина и витамина С. Проводится до содержания влаги 3–5%.
Сортировка	Отделение ломанных и грубых листьев.

В зеленом чае ферментация и окисление полностью исключаются, поэтому содержание катехинов, в особенности ЭГКГ, значительно выше, чем в черном чае [15].

Целью производства зеленого чая является фиксация веществ для сохранения свойств свежего листа, однако в процессе термической обработки происходит уменьшение танина, экстрактивных веществ и количества

свободных аминокислот, общее количество зеленых пигментов уменьшается, а желтых – увеличивается, незначительно повышается количество пектиновых веществ. Также при воздействии высоких температур постепенно уменьшается содержание кофеина. Технология производства зеленого чая представлена в таблице 1.4 [4, 10].

Таблица 1.4 – Технология производства зеленого чая

Этапы	Основные процессы
Фиксация	Обработка горячим увлажненным воздухом или паром для остановки биохимических процессов (инактивация ферментов).
Подсушка	Уменьшение содержания влаги до 60% для эластичности и мягкости листа, необходимые в процессе скручивания.
Выдержка	Выдержка для равномерного распределения влаги и полного разрушения хлорофилла.
Скручивание	Разрушение клеток чайного листа, высвобождение клеточного сока. Промежуточная сортировка и разбивка комьев.
Сушка и сортировка	Уменьшение содержания влаги до 3–4%, сортировка.

1.2 Методы исследования индивидуальных компонентов чая

Для определения качества чая можно использовать различные органолептические и физико–химические методы. Органолептический метод достаточно субъективен, поэтому наибольшее распространение получили физико–химические методы анализа.

Особый интерес представляет определение полифенолов, так как они обладают большой биологической активностью, и их концентрация в чае служит критерием его качества [16].

Наличие легко окисляющихся гидроксильных групп позволяет определять полифенолы электрофоретическими и хроматографическими методами. Присутствие хромофорных групп обеспечивает возможность определения спектрофотометрическими методами. Однако спектрофотометрические методы позволяют определять только общее содержание полифенольных соединений в пробе, поэтому основными методами анализа объектов, содержащих полифенольные соединения, являются хроматографические и электрофоретические [17].

Среди хроматографических методов наиболее распространенным является обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) с использованием различных детекторов: ультрафиолетовым (УФ) [18–21] или электрохимическим (ЭД) [22,23]. Также используется диодно-матричный детектор [24] и масс-спектрометрия [25].

Хроматографическому анализу предшествует стадия экстрагирования в водную или в водно-органическую среду. В роли органического растворителя, как правило, используют ацетонитрил или муравьиную кислоту.

В работе [26] был разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для одновременного определения катехина, эпикатехина, эпигаллокатехина, эпикатехин-3-галлата, эпигаллокатехин-3-галлат и кофеина в 29 образцах зеленого чая. Для анализа использовали колонку с обращенной фазой, ацетонитрил-трифторуксусную кислоту в качестве подвижной фазы и УФ-детектор (205 нм). Пределы обнаружения и количественного определения анализируемых катехинов составили: 0,004–0,05 мкг/мл и 0,01–0,17 мкг/мл соответственно.

Авторы исследования [27] определяли содержание восьми чайных катехинов (катехин, катехин галлат, эпикатехин, эпикатехин галлат, эпигаллокатехин, галлокатехин, галлататехин галлат и эпигаллокатехин галлат) и четыре теафлавина (теафлавин, теафлавин-3-галлат, теафлавин-3-галлат и теафлавин-3,3-дигаллат) одновременно в трех типах чая (зеленый,

черный и улун). Разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с трехквადрупольной tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС-МС). В методике использовали подвижную фазу, состоящую из 0,1% водной муравьиной кислоты и метанола при градиентном элюировании со скоростью потока 0,3 мл/мин и температуре колонки 30°C. Удовлетворительная линейность была достигнута в линейном диапазоне (0,02–5 г/мл для катехинов и 0,02–20 г/мл для теафлавинов) и коэффициентом точного определения ($R^2 > 0,9935$).

В ходе анализа [28] использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием для быстрого количественного определения катехинов (ГКт, ЭГК, КТ, ЭКТ, ЭГКГ, ЭКГ) зеленого чая и кофеина. В качестве подвижной фазы использовали триэтаноламин-фосфатный буфер с pH 2,5 (0,1 М) и ацетонитрила в режиме градиентного элюирования. В этих условиях шесть основных катехинов и кофеин были разделены в течение 3 минут. Метод был успешно применен для количественной характеристики трех марок зеленых чаев с различным географическим происхождением, подчеркивая их разницу в катехиновом составе. Результаты анализа были подтверждены путем получения хорошей корреляции между методами ВЭЖХ и МЭКХ.

Для качественного и количественного определения индивидуальных катехинов реже используют газовую хроматографию (ГХ) и тонкослойную хроматографию (ТСХ). Для определения катехинов методом ГХ используют насадочные капиллярные колонки с предварительной дериватизацией в более летучие соединения.

Широкое распространение для определения полифенольных соединений в реальных объектах получили методы капиллярного электрофореза [29–38].

Известно, что катехины относятся к полифенольным соединениям, которые в щелочной среде ($\text{pH} > 8$) за счет фенольных гидроксильных групп в молекулах аналитов могут быть отрицательно заряжены и разделяться в

режиме капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) в форме анионов, однако для количественного определения индивидуальных компонентов селективности разделения КЗЭ недостаточно из-за плохого разрешения пиков [39].

В качестве буферного электролита наиболее часто используют боратный с рН 8.0–9.5, поскольку в данных условиях образуются боратные комплексы с полифенолами. Однако известно, что в щелочной среде полифенолы неустойчивы. Поэтому использовать рабочие электролиты с высоким рН нежелательно [40].

Так, в работе [41] КЗЭ был адаптирован для одновременного определения основных компонентов в настоях зеленого чая. Разделение осуществляли с использованием боратного буфера с рН 8,0 и УФ-детектированием при 200 нм. Анализируемыми компонентами были ЭКТ, ЭГК, ЭКГ, ЭГКГ, КТ, кофеин, теанин и аскорбиновая кислота. Было показано, что при рН<8.0 селективность разделения недостаточна.

Авторами исследования [42] для анализа КЗЭ выбрали боратный буферный раствор (рН 9.0) с добавкой в буферный электролит β -циклодекстрина (4 ммоль·л⁻¹) и NaOH (10 ммоль·л⁻¹). Однако даже присутствие в буферном электролите комплексообразующей добавки, влияющей на коэффициенты разрешения, не позволило полностью разделить шестикомпонентную смесь: Кт, ЭКт, ЭКГ, ЭГКГ, ЭГК, ГКГ.

По результатам исследования [43] зонный вариант капиллярного электрофореза с добавкой в состав рабочего боратного буфера (рН 9.0) комплексообразующего вещества (β -циклодекстрина 8мМ) позволил разделить смесь полифенолов только на галлатированные и негаллатированные компоненты, что может быть полезным в групповом анализе.

Поэтому для проведения качественного и количественного определения компонентов различных сортов чая наиболее востребованным

является метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) с УФ детектированием [42].

В состав буферного электролита вводят поверхностно–активное вещество (ПАВ) – мицеллообразователи в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования и компоненты пробы распределяются между рабочим буфером и мицеллярной фазой согласно их гидрофобности [44].

Для разделения катехинов в основном используются рабочие электролиты со значением рН 6,0–8,0: фосфатные, фосфатно–боратные и боратные буферные растворы. В качестве мицеллообразователя чаще используется додецилсульфат натрия (ДДСН), а различными добавками в составе буфера, которые влияют на селективность разделения, могут быть метанол, ацетонитрил, мочевины и β –циклодекстрин. Для регистрации обычно используется УФ или диодно–матричный детектор. Пробоподготовка чаще всего заключается в экстракции компонентов чайного листа горячей водой с последующим разбавлением [45, 39].

Одним из достоинств данного метода является возможность одновременного определения как ионных, так и нейтральных аналитов и отсутствие необходимости в использовании органических растворителей. Метод объединяет капиллярный электрофорез и хроматографию.

Так, использование МЭКХ обеспечивает возможность одновременного определения катехинов, кофеина и галловой кислоты.

Авторы работы [43] провели сравнение методов МЭКХ с нормальной и обращенной полярностью и МЭЭКХ для определения катехинов и катехоламинов. Общее время анализа в режиме МЭКХ с нормальной полярностью составило 13 минут, предел обнаружения 1 мг/л, в режиме МЭКХ с обращенной полярностью 11 минут и 1 мг/л, в режиме МЭЭКХ 40 минут и 0,5 мг/л. Таким образом, результаты показали, что по эффективности МЭЭКХ превосходит мицеллярную электрокинетическую хроматографию,

но для экспрессного одновременного определения полифенолов и кофеина целесообразней использовать вариант ОП МЭКХ.

В работе [39] показана возможность использования мицеллярной электрокинетической хроматографии с обращенной полярностью для селективного разделения многокомпонентной смеси полифенолов (ЭКГ, ГКГ, ЭКт, ЭГКГ, ЭГК) и кофеина. Оптимальным для разделения смеси оказался ацетатно–цитратный буфер (рН~2.0). При сравнении двух вариантов капиллярного электрофореза (МЭКХ и ОП МЭКХ) эффективность последнего в 1,5–2 раза выше.

Авторами [46] для одновременного анализа катехинов (катехина, эпикатехина эпикатехин галлата, эпигаллокаехина, эпигаллокатехин галлата, галлокатехин галлата, галлокатехина) и теанина выбрана МЭКХ. Последний из-за плохого обнаружения был дериватизирован. Образцы зеленого чая анализировали с использованием 65 мМ ДДСН и 28 мМ циклодекстрина в кислой среде (рН 2,5). Разделение компонентов было получено за 5 минут. Полученные данные были проверены методом ВЭЖХ, результаты оказались сопоставимы.

В исследовании [16] с помощью МЭКХ одновременно были проанализированы важные компоненты зеленого чая (теанин, кофеин, аскорбиновая кислота, эпикатехин, эпигаллокатехин, галлат эпикатехина и галлат эпигаллокатехина). В качестве рабочего буфера использовали боратный буфер (80 мМ, рН 8,4), содержащий 50 мМ додецилсульфата натрия. С использованием этого метода были проанализированы экстракты зеленого, черного чая и чая улун. Время анализа составило 10 минут. Полученные результаты показали, что метод сэкономит время анализа и полезен для оценки качества чая.

Разработан метод мицеллярной электрокинетической хроматографии с пониженным расходом для определения катехинов в зеленом чае. Оптимальный электролит состоял из 0,2% триэтиламина, 50 ммоль/л ДДСН и 0,8% сульфатированного β -циклодекстрина (рН 2,9), что позволило

разделить пять катехинов в течение 4 минут. Образцы вводили в течение 5 с при постоянном напряжении 30 кВ. Приготовление образца заключалось в водной экстракции. Пределы обнаружения и количественного определения составили 0,02–0,1 и 0,1–0,5 мкг/мл соответственно. Полученные концентрации составили: для галлат эпигаллокатехина (23,4–112,4 мкг/мл), эпигаллокатехин (18,4–78,9 мкг/мл), галлат эпикатехина (5,6–29,6 мкг/мл), эпикатехин (4,6–14,5 мкг/мл) и катехин (3,2–8,2 мкг/мл) [47].

В работе [45] одновременно определяли пять катехинов чая: эпикатехин, катехин, эпигаллокатехин, галлат эпикатехина и галлат эпигаллокатехина, теанин, кофеин, галловую и аскорбиновую кислоты с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии. Буферный раствор представлял собой 25 мМ фосфатный буфер с 100 мМ ДДСН, 6% метанола, pH 7,0. Все компоненты разделяли в течение 13 минут. Детектирование проводилось при 200 нм. Предел обнаружения для всех анализов составлял от 1 до 20 мкг/мл.

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии был использован для быстрого определения семи чайных катехинов, кофеина, галловой кислоты, витамина С, теанина и теафлавина в чае. Все соединения были успешно разделены (при напряжении 20 кВ) в течение 8 мин. Рабочий буферный раствор (pH 7,0), содержал 10 мМ фосфата, 4 мМ тетрабората натрия, 45 мМ ДДСН и 0,5% этанола. Линейные диапазоны для полифенолы были получены от 2,5 до 100 мкг/мл. Как показали электрофореграммы, содержание чайных катехинов уменьшается в процессе увядания в помещении для приготовления пакетированного чая [48].

1.3 Идентификация чая

Большое количество чаев приводит к необходимости проведения всесторонней экспертизы их подлинности. При проведении экспертизы

идентифицируют вид чая, сорт и место его произрастания [49].

К общим идентифицирующим признакам чая относят: характерные форму, размер, анатомическое строение листа, специфичные вкус и аромат настоя, содержание водорастворимых экстрактивных веществ [5]. Для идентификации вида и места произрастания часто проводят исследование и катехинового состава чая (таблица 1.5) с применением хемометрических методов обработки данных.

Таблица 1.5 – Примеры классификации чая по виду и географической принадлежности на основе органических показателей

Метод определения	Исходная матрица данных	Хемометрическая процедура	Принцип классификации	Ссылка
Хиральная МЭКХ	Концентрации КФ, ЭГК, ЭКГ, ЭКТ, КТ, Тб	Метод главных компонент, кластерный анализ, дискриминантный анализ	По географической принадлежности: Япония и Китай	[50]
УЭЖХ–МС/МС	Концентрации 75 компонентов	Метод главных компонент, кластерный анализ	По региональной принадлежности: провинции Yunnan and Hunan (Китай)	[51]
ВЭЖХ	Времена удерживания КФ, КТ, ЭГК, ЭКТ, ЭГКГ, ГКГ, ЭКГ	Метод главных компонент, дискриминантный анализ	По району произрастания: 4 области провинции Zhejiang (Китай)	[52]
ВЭЖХ–МС	Концентрации 50 компонентов	Метод главных компонент, кластерный анализ, дискриминантный анализ	Классификация черного чая в зависимости от происхождения, ботанического разнообразия и метода обработки	[53]

Наибольшее распространение для анализа принадлежности образца к той или иной группе получили метод главных компонент, кластерный и дискриминантный анализы.

Метод главных компонент используется в анализе любых сложных химических данных, для которых характерно присутствие внутренних связей между переменными. Позволяет снизить размерность массива данных и уменьшить шум без существенной потери информации. Применяется для выявления взаимосвязей результатов измерений и выделения групп образцов, схожих или различных между собой [54].

Дискриминантный анализ включает методы классификации многомерных наблюдений по принципу максимального сходства при наличии обучающих признаков. Основными задачами является исследование межклассового различия в априорно заданных классах по нескольким переменным одновременно, а также классификация объектов, не входивших в выборку. Для выполнения дискриминантного анализа необходимо наличие нормальности закона распределения переменных для каждого класса, минимум двух классов и минимум двух объектов в каждом классе, он определяется так, чтобы каждое наблюдение принадлежало только одному классу. В результате анализа получают одну или нескольких функций, которые называются дискриминантными, которые зависят от значений показателей так, что каждый объект возможно отнести к одной из групп [54].

Кластерный анализ используется при создании классификации. В данном методе объекты группируются по степени сходства или близости. В результате образуются кластеры или группы очень схожих объектов [55].

Так, в работе [52] высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с методами анализа главных компонент и линейного дискриминантного анализа были применены для географической идентификации чая Xihu Longjing (XHLJ) из двух других типов чая Longjing и чая Non-Longjing. Кофеин, КТ, ЭГК, ЭКТ, ЭГКГ, ГКГ, ЭКГ были идентифицированы путем сравнения времени их удерживания со временем стандартных растворов. Хроматограммы образцов чая из четырех разных регионов были очень похожи. Было трудно классифицировать 4 вида чая напрямую по МГК. Тем не менее, высокие показатели общей точности 94,8%

и 87,6% для тренировочного и тестового набора были достигнуты для того, чтобы отличить XHLJ от других трех типов чая с помощью дискриминантного анализа. Таким образом, результаты показывают, что возможно отличить XHLJ от других чаев с помощью ВЭЖХ в сочетании с дискриминантным анализом.

В работе [51] выявлены качественные и количественные различия в химических компонентах образцов чая происхождения Юньнань (YGT) и Хунань (HGT). С помощью ВЭЖХ было идентифицировано 75 компонентов, включая алкалоиды, аминокислоты, катехины, флавоноиды, флавоновые гликозиды, фенольные кислоты и теафлавины. С помощью МГК и кластерного анализа была создана надежная и эффективная модель и установлены три характерных компонента, представляющие химические различия между YGT и HGT компонента (эпикатехин-(4 β →8)-эпигаллокатехин-3-О-галлат, ГКГ, витексин), которые четко указали на отличия зеленого чая от Юньнани и Хунани.

1.4 Планирование эксперимента

Математический метод многофакторного планирования экспериментов эффективен при оценке взаимного влияния всех параметров на значение и распределение аналитического сигнала [56].

Факторные планы – это экспериментальные планы, включающие одновременное изменение всех параметров в соответствии с заранее определенной матрицей экспериментов. Они хорошо приспособлены к определению относительной важности каждой переменной по сравнению с оценочными ответами. Основная идея так называемого многомерного исследования состоит в том, чтобы разработать небольшой набор экспериментов, в которых изменяются различные факторы, чтобы одновременно изучать отдельные переменные и их совокупное влияние[57].

Все возможные комбинации одновременного варьирования параметров процесса на всех выбранных уровнях реализуются в полном факторном эксперименте. Существенный недостаток полного факторного эксперимента – необходимость проведения излишне большого числа опытов. Поэтому широко используют метод дробного факторного эксперимента (дробных реплик). Метод применим в случае, если интервал варьирования факторов не слишком большой и эффекты взаимодействия отсутствуют. Перед постановкой экспериментов по методу дробного факторного эксперимента предварительно необходимо выбрать эффект взаимодействия, которым можно пренебречь, и оценить связанный с этим риск [58].

Статистические модели применяются для нахождения условий, обеспечивающих максимальное значение коэффициента разделения [59].

Для оптимизации метода жидкостной хроматографии с подвижной масс-спектрометрией для нецелевой метаболомики был использован дробный факторный эксперимент. В результате были исследованы девять параметров: напряжение конуса образца, напряжение конуса экстракции, температура источника, температура десольватации, расход десольватационного газа, скорость конического газа, хроматографическая скорость потока, скорость волны и скорость дрейфа газа [60].

По результатам статистической обработки данных были выбраны оптимальные параметры: напряжение конуса образца 35 В, напряжение конуса экстракции 5 В, температура источника 120°C, температура десольватации 330°C, расход десольватационного газа 400 л/ч, скорость конического газа 50 л/ч, хроматографическая скорость потока 80 мкл/мин, скорость волны 954 м/с и скорость дрейфа газа 80 мл/мин.

Авторы исследования [61] для оптимизации и моделирования метода зеленого детектирования RP-HPLC с двойным детектированием с помощью УФ- и флуоресцентных детекторов для одновременного определения софосбувира и ледипасвира была использована двухуровневая полнофакторная конструкция. Были выбраны три независимых фактора,

влияющие на хроматографическую производительность: рН водной подвижной фазы (рН), процентное содержание ацетонитрила в органической подвижной фазе (АКС%) и органический процент подвижной фазы (орг%). Измеряемыми параметрами выбраны: время удерживания, коэффициент мощности, число теоретических тарелок, ширина пика (Т), ширина пика на 50% и разрешение. Используя статистическую обработку данных, были получены оптимальными параметрами: рН = 3, АКС% = 50%, Орг% = 70%.

В работе [62] для оптимизации разделения энантиомеров молочной кислоты в жидкостях организма методом капиллярного электрофореза использовали факторную конструкцию. Количественными факторами выбраны: концентрация циклодекстрина, фоновые рН и концентрация буфера. Метод был применен для определения обоих изомеров в жидкостях организма. В результате проведения статистического анализа выбраны оптимальные условия с разрешением выше 1,5: фосфатный буфер 200 мМ при рН 5,6 с добавлением 413 мМ 2-гидроксипропил-циклодекстрина (HP- β -CD), 208°C, приложенный потенциал 220 кВ и капилляр с полиакриламидным покрытием.

Авторами работы [56] осуществлена оптимизация условия атомно-эмиссионного анализа с использованием многофакторного математического планирования. Параметрами являлись: положение аналитической зоны, скорость подачи газов, угол между электродами плазменной горелки и мощность ДДП. Каждому из факторов были присвоены индексы и определены интервалы варьирования. После обработки данных, на основе полученных уравнений регрессии провели расчет крутого восхождения и выбрали оптимальные условия: высота от основания факела 12 мм, угол между электродами 70°, расход транспортирующего газа 0,9 л/мин, плазмообразующего 3,5 л/мин, сила тока 95 А.

2 Экспериментальная часть

2.1 Материалы, реактивы и используемое оборудование

Для выполнения экспериментальных исследований использовались следующие средства измерений, устройства, реактивы, материалы:

- система капиллярного электрофореза «Капель–105М» (Россия) с положительной полярностью высокого напряжения, внутренний диаметр капилляра 75 мкм, эффективная длина капилляра 50 см, общая длина капилляра 60см, по ТУ 4215–023–20506233–98;
- система сбора и обработки данных «МультиХром для Windows» на основе персонального компьютера, Госреестр СИ РФ № 13473–98;
- центрифуга MiniSpinEppendorf (Германия);
- баня паровая;
- пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³, по ТУ 25–11–1592–81;
- шприц одноразовый типа «Луер» вместимостью 10,20 см³;
- фильтры целлюлозно – ацетатные, размер пор 0,2 мкм, диаметр 25 мм;
- насадка для фильтра;
- иономер «Эксперт–001»;
- стеклянный электрод для измерения pH;
- магнитная мешалка;
- весы лабораторные ВЛР–200 2 класса точности, ТУ 25–06–1131–75;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919–83;
- аппарат для дистилляции воды МРТУ 42–2028–62
- колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100, 250, 500 см³ исполнения 2,2 класса точности, ГОСТ 1770–74;

- колбы плоскодонные емкостью 250–300см³, ГОСТ 10394–72;
- воронки стеклянные по ГОСТ 25336 – 82;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 см³ исполнения 2,2 класса точности, ГОСТ 20292–74;

- лабораторные стаканы объёмом 100, 250 см³, ГОСТ25336–82.

В работе использовались реактивы марок х.ч., ч.д.а. и фармакологически чистые:

- галловая кислота, имп.;
- кофеин, имп.;
- (+)–катехин гидрат, имп.;
- (–)–эпикатехин, имп.;
- (–)–эпигаллокатехин галлат, имп.;
- (–)–галлокатехин, имп.;
- (–)–эпикатехин галлат, имп.;
- (–)–эпигаллокатехин, имп.;
- (–)–галлокатехин галлат, имп.;
- соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118–77;
- спирт этиловый ректифицированный, ГОСТ 5962–67;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709–72.
- вода бидистиллированная, ГОСТ 6709–72;
- калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а., по ТУ 6–09–5324–87;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12–водный, х.ч., по ГОСТ 4172–76;
- натрий додецилсульфат, имп.;
- натрия гидроокись, х.ч., ГОСТ 4328–77.

2.2 Приготовление рабочих растворов

2.2.1 Приготовление фосфатного буферного раствора

Для приготовления раствора точную навеску натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного ($m = 0,447675 \pm 0,002$ г) растворяли в 50 см^3 дистиллированной водой с добавлением 5 см^3 96%-ного этилового спирта в мерной колбе.

Для приготовления раствора точную навеску калия фосфорнокислого однозамещенного ($m = 0,340215 \pm 0,002$ г) растворяли в 100 см^3 дистиллированной водой с добавлением 5 см^3 96%-ного этилового спирта в мерной колбе.

Для приготовления фосфатного буферного раствора смешивали раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного и калия фосфорнокислого однозамещенного, pH раствора доводили до значения 7,4.

Для приготовления фосфатного буферного раствора с натрий додецилсульфатом точную навеску натрий додецилсульфата ($m = 0,25235 \pm 0,002$ г) растворяли в 25 см^3 фосфатного буферного раствора.

2.2.2 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)-эпикатехина концентрацией 100 мг/дм^3

На аналитических весах взвешивали $0,01000$ г (–)-эпикатехина с погрешностью $0,00025$ г, затем растворяли в 100 см^3 дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%-ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.3 Приготовление головного (стандартного) раствора (+)–катехина концентрацией 50 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,00500 г гидрата катехина с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.4 Приготовление головного (стандартного) раствора кофеина концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г кофеина с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.5 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)–эпигаллокатихин галлата концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г (–)–эпигаллокатихин галлата с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.6 Приготовление головного (стандартного) раствора галловой кислоты концентрацией 200 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,02000 г галловой кислоты с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.7 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)-галлокатихина концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г (–)-галлокатихин галлата с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.8 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)-эпикатихин галлата концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г (–)-эпикатихин галлата с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%–ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.9 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)-эпигаллокатихина концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г (–)-эпигаллокатихина с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%-ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.2.10 Приготовление головного (стандартного) раствора (–)-галлокатихин галлата концентрацией 1000 мг/дм³

На аналитических весах взвешивали 0,10000 г (–)-галлокатихин галлата с погрешностью 0,00025 г, затем растворяли в 100 см³ дистиллированной воды с добавлением 5% от объема колбы 96%-ного раствора этилового спирта. Раствор тщательно перемешивали.

2.3 Приготовление экстракта чая

Приготовление экстракта чая в соответствии с ГОСТ 19885–74 [63] 2,5000 г предварительно измельченной навески чая, взятой из средней пробы, взвешенной на аналитических весах с погрешностью не более 0,0002 г, помещали в колбу вместимостью 250 см³, приливали 200 см³ кипящей дистиллированной воды и ставили на водяную баню. Экстракцию вели в течение 45 минут. Экстракт фильтровали под вакуумом через воронку Бюхнера в колбу вместимостью 500 см³, фильтрат переносили в мерную колбу вместимостью 250 см³, охлаждали и доводили до метки дистиллированной водой.

2.4 Проведение анализа методом МЭКХ

2.4.1 Методика определения катехинов, кофеина и галловой кислоты методом МЭКХ

Электрофоретическое разделение компонентов проводят с помощью системы капиллярного электрофореза «Капель 105» (НПФ АП «Люмекс») с положительной полярностью, УФ–детектором и пневматическим вводом пробы. Используют немодифицированный кварцевый капилляр с внешней полиамидной пленкой длиной 60 (50) см и внутренним диаметром 75 мкм, прозрачный в УФ–области спектра. Капилляр перед началом работы кондиционируют: последовательно промывают 0,5 моль/дм³ раствором HCl (5 мин), бидистиллированной водой и 0,5 моль/дм³ раствором NaOH (по 3 мин), а затем рабочим буферным раствором (5 мин). Применяют фосфатный буферный раствор с концентрацией 25 ммоль/дм³ (pH 7,4), содержащий 35 ммоль/дм³ додецилсульфата натрия, с добавлением 5% этилового спирта (96%–ного). Между анализами капилляр промывают 0,5 моль/дм³ раствором HCl (2 мин), бидистиллированной водой и 0,5 моль/дм³ раствором NaOH (по 2 мин), а затем рабочим буферным раствором (3 мин).

Пробу в капилляр вводят пневматическим способом, создавая давление 30 мбар. Анализируемые соединения детектируют спектрофотометрическим методом при длине волны 210 нм.

Для построения градуировочного графика в мерные колбы вместимостью 10 мл последовательно вносят стандартные растворы галловой кислоты с концентрацией 200 мг/дм³, катехина с концентрацией 50 мг/дм³, эпикатехина с концентрацией 100 мг/дм³, эпигаллокатехин галлата с концентрацией 1000 мг/дм³, кофеина с концентрацией 1000 мг/дм³, галлокатехина с концентрацией 1000 мг/дм³, эпигаллокатехина с концентрацией 1000 мг/дм³, галлокатехин галлата с концентрацией 1000

мг/дм³, эпикатехин галлата с концентрацией 1000 мг/дм³, в объемах указанных в таблице 2.1 и доводят до метки дистиллированной водой. Тщательно перемешивают.

Таблица 2.1 – Объемы веществ в точках калибровки

Вещество	Объемы веществ в точках калибровки, см ³				
	1	2	3	4	5
Кф	0,25	0,5	0,75	1	1,5
Кт	0,1	0,2	1	1,5	2
ЭГКГ	0,1	0,25	0,5	1	2
ЭКт	0,05	0,1	0,25	0,75	2
ГК	0,025	0,05	0,25	0,5	1,5
ЭГК	0,010	0,05	0,1	0,5	1,5
ЭКГ	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
ГКГ	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
ГКт	0,01	0,025	0,05	0,075	0,2

Концентрации веществ в точках калибровки представлены в таблице 2.2.

Градуировочные растворы в количестве 0,8 см³ помещают в тefлоновые пробирки Эппендорф, центрифугируют 3 мин со скоростью вращения 7000 мин⁻¹, переносят в систему и проводят дозирование раствора. Предварительно строят базовую линию на основе буферного раствора, а затем снимают не менее 3-х электрофореграмм для каждой концентрации. При помощи системы сбора и обработки данных «МультиХром для Windows» (ЗАО «Амперсенд») на основе персонального компьютера получают электрофореграммы для заданных концентраций и строят график зависимости площади пика от концентрации вещества. Полученные результаты обрабатываются методом наименьших

квадратов. Ежедневно проверяют градуировку, проводя измерение градуировочной точки. Далее переходят к анализу проб чая.

Таблица 2.2 – Концентрации веществ в точках калибровки

Вещество	Концентрации веществ в точках калибровки, мкг/ см ³				
	1	2	3	4	6
Кф	25	50	75	100	150
Кт	0,5	1	5	7,5	10
ЭГКГ	10	25	50	100	200
ЭКт	0,5	1	2,5	7,5	20
ГК	0,5	1	5	10	30
ЭГК	1	5	10	50	150
ЭКГ	5	10	20	30	50
ГКГ	2	10	20	30	50
ГКт	1	2,5	5	7,5	20

Пробы чая фильтруют через целлюлозно–ацетатные фильтры и разбавляют в 4 раза, затем в количестве 0,8 см³ помещают в тefлоновые пробирки типа Эппендорф и центрифугируют в течение 3 мин со скоростью вращения 7000 мин⁻¹. Пробу переносят в систему и снимают не менее трех электрофореграмм. За результат анализа принимают среднее значение трех параллельных измерений.

2.4.2 Построение градуировочной зависимости

Для расчета концентраций Кф, Кт, ЭГКГ, ЭКт, ГК, ГКт, ЭГК, ГКГ, ЭКГ в образцах чая были получены градуировочные графики, представленные на рисунках 2.1–2.9.

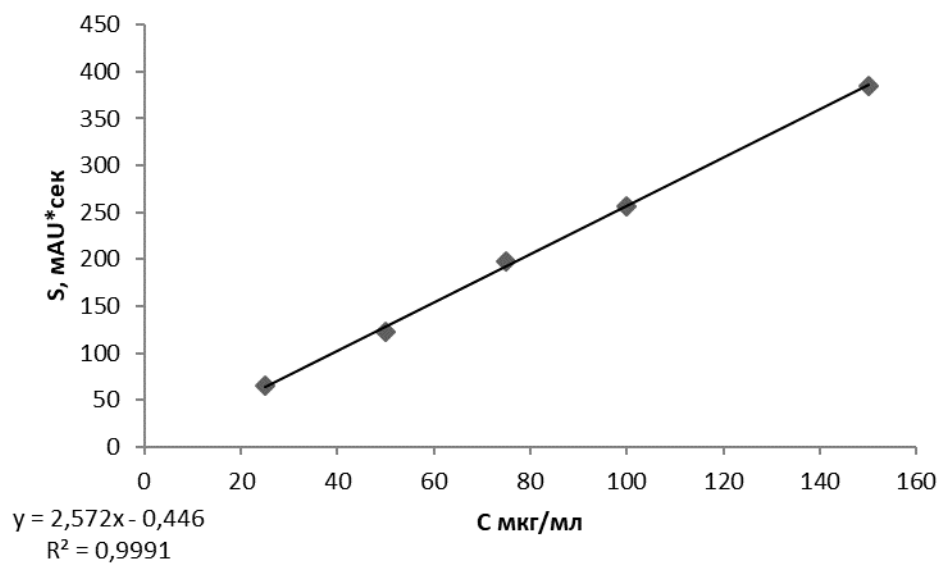


Рисунок 2.1 – Градуировочный график, построенный относительно кофеина

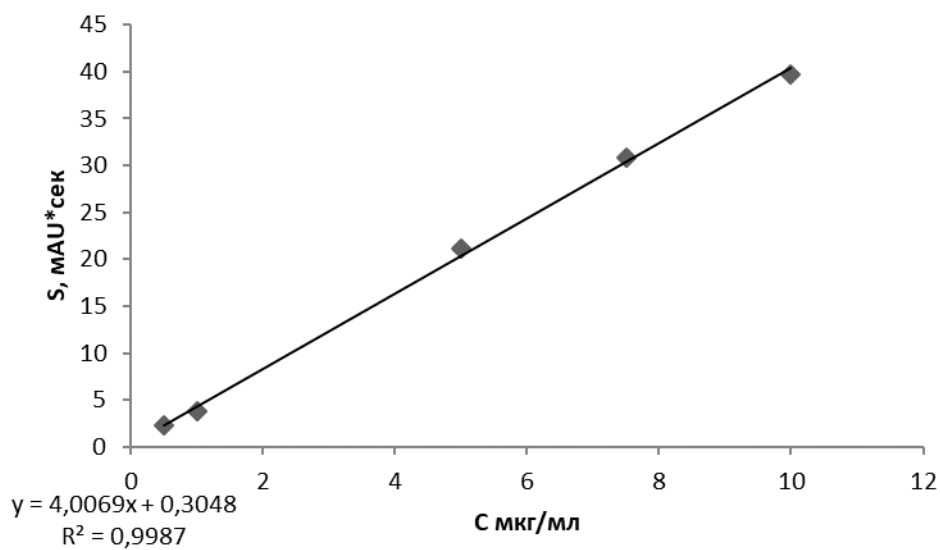


Рисунок 2.2 – Градуировочный график, построенный относительно катехина

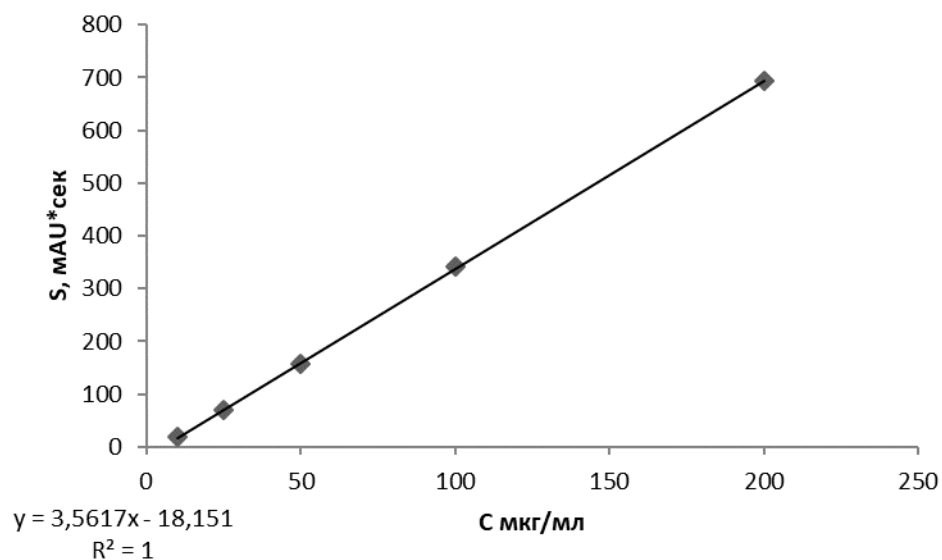


Рисунок 2.3 – Градуировочный график, построенный относительно эпигаллокатехин галлата

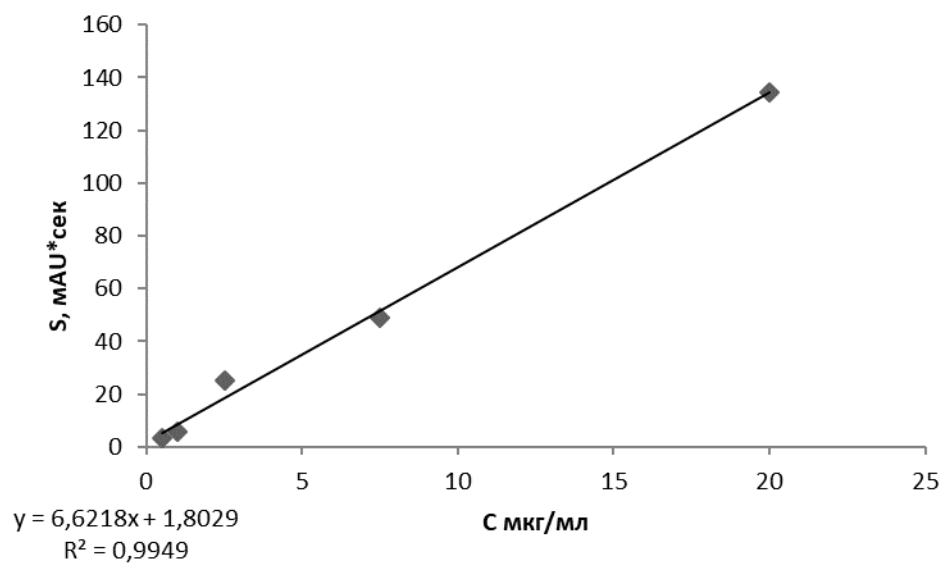


Рисунок 2.4 – Градуировочный график, построенный относительно эпикатехина

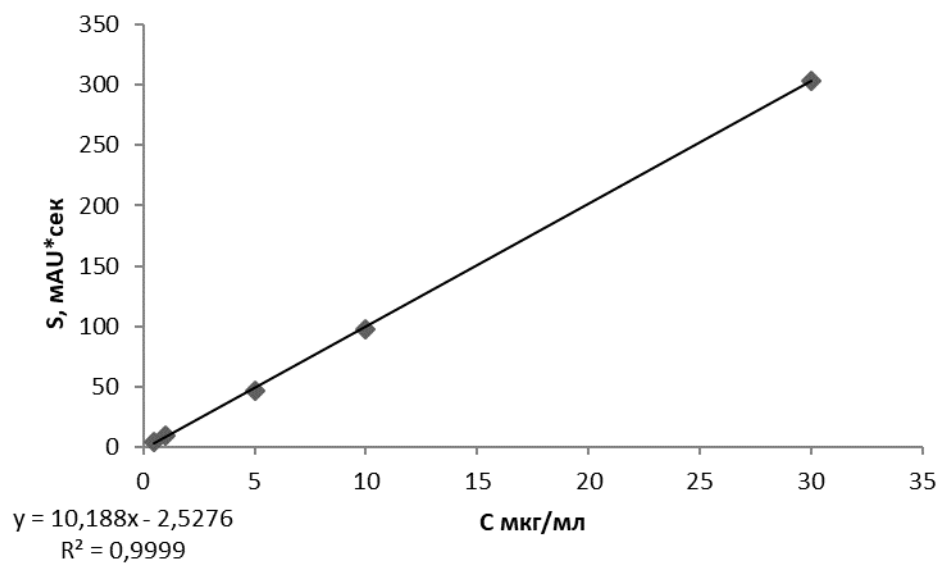


Рисунок 2.5 – Градуировочный график, построенный относительно галловой кислоты

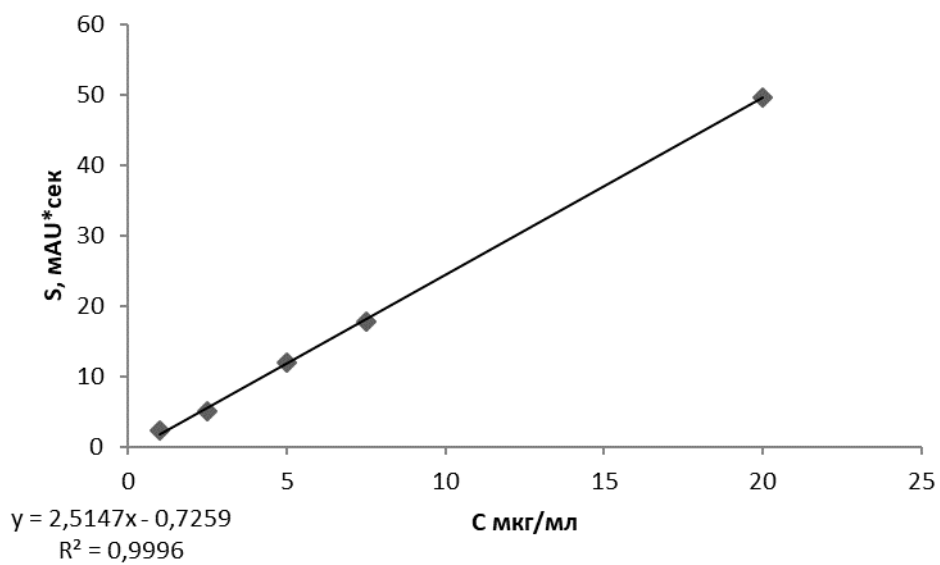


Рисунок 2.6 – Градуировочный график, построенный относительно галлокатехина

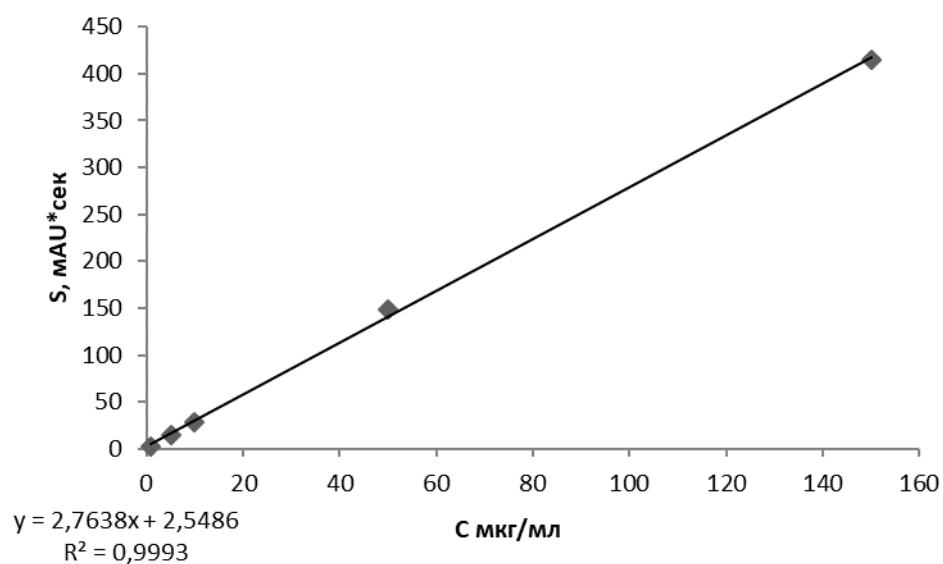


Рисунок 2.7 – Градуировочный график, построенный относительно эпигаллокатехина

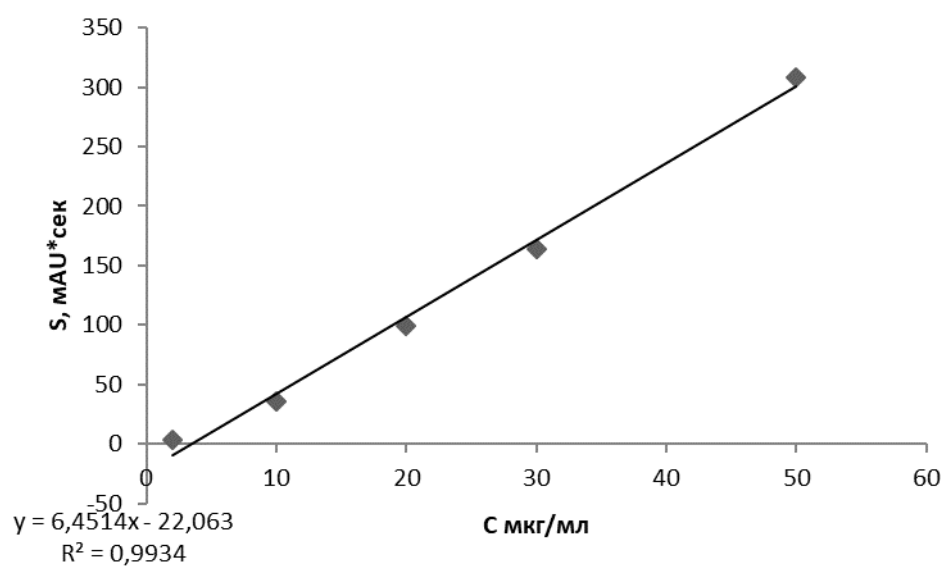


Рисунок 2.8 – Градуировочный график, построенный относительно галлокатехин галлата

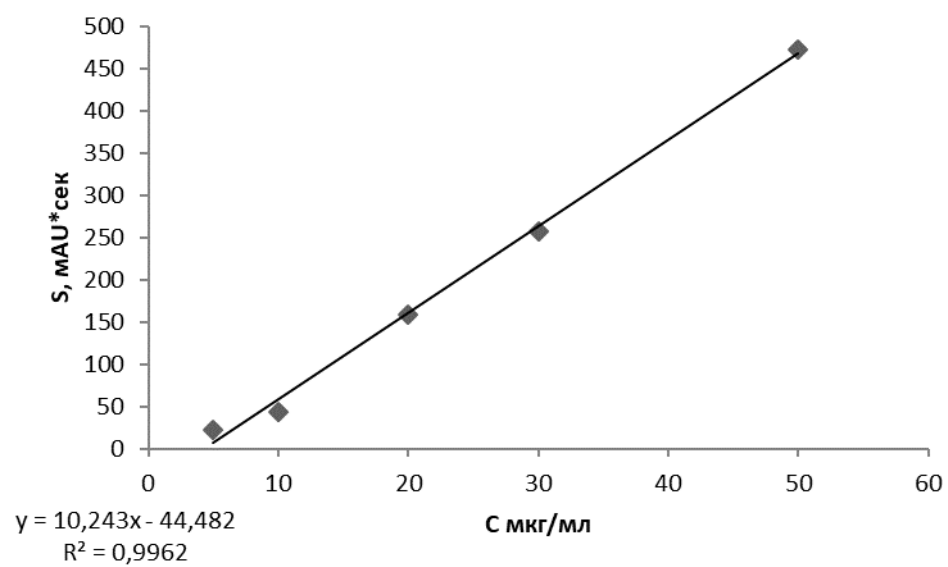


Рисунок 2.9 – Градуировочный график, построенный относительно эпикатехин галлата

3 Результаты и их обсуждение

Чай является одним из наиболее популярных тонизирующих напитков во всем мире и самым распространенным напитком в России [64].

Основными компонентами, содержащимися в чайном листе, являются фенольные соединения. Известно, что катехины обладают сильной антиоксидантной активностью, а кофеин оказывает стимулирующее действие. Таким образом, особый интерес представляют катехины чая, так как они преобладают в его составе, кофеин, являющийся основным по содержанию алкалоидом, а также галловая кислота, которая является составной частью галлированных катехинов.

Содержание данных компонентов в Краснодарских чаях малоизучено, поэтому целью работы является изучение катехинового состава Краснодарского чая для классификации по виду чайного растения.

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

1 Оптимизация условий определения основных катехинов, кофеина и галловой кислоты методом МЭКХ.

2 Формирование массива данных на основе анализа электрофоретического профиля экстрактов Краснодарского чая для дальнейшего использования в классификации чая.

3 Классификация черного чая по происхождению на основе электрофоретических профилей водных экстрактов чая с применением хемометрических подходов.

4 Построение лепестковых диаграмм характерных для Краснодарского чая и их сравнение с диаграммами, построенными для других видов чайного растения.

В магистерской работе Гуцаевой Кристины Сергеевны [65] было показано, что для исследования катехинового состава чая в равной мере можно использовать ВЭЖХ и капиллярный электрофорез. Нами для

исследования выбран метод КЭ – мицеллярная электрокинетическая хроматография.

Для оптимизации условий совместного определения кофеина, катехина, эпигаллокатехин галлата, эпикатехина, эпигаллокатехина, эпикатехин галлата, галлокатехин галлта, галлокатехина и галловой кислоты применен метод дробного факторного эксперимента типа 2^{4-1} . Математический метод многофакторного планирования эксперимента эффективен при оценке взаимного влияния всех параметров на значение и распределение аналитического сигнала.

В качестве параметров оптимизации были выбраны: сила тока в капилляре, время регистрации электрофореграммы и разрешение пиков модельного раствора катехинов, кофеина и галловой кислоты. Математическое планирование выполнено для факторов оказывающих наибольшее влияние на разделение исследуемых аналитов методом МЭХХ: рН и концентрация ведущего электролита (фосфатный буферный раствор), концентрации мицеллообразователя (ДДСН) и органического модификатора этанола.

На основании ранее проведенных экспериментов определили интервалы варьирования каждого из факторов представленные в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Уровни факторов и интервалы варьирования

Фактор	Шифр фактора	Уровень фактора			Интервал варьирования
		Нижний	Верхний	Основной	
рН	x_1	7	8	7,5	0,5
$C_{\text{ФБ}}$, мМ	x_2	20	35	27,5	7,5
$C_{\text{ДДСН}}$, мМ	x_3	15	50	32,5	17,5
$C_{\text{этанола}}$, %	x_4	4	7	5,5	1,5

Матрица планирования (таблица 3.2) включала в себя 8 опытов, каждый из которых повторяли дважды. По результатам проведенных опытов рассчитали уравнения регрессии.

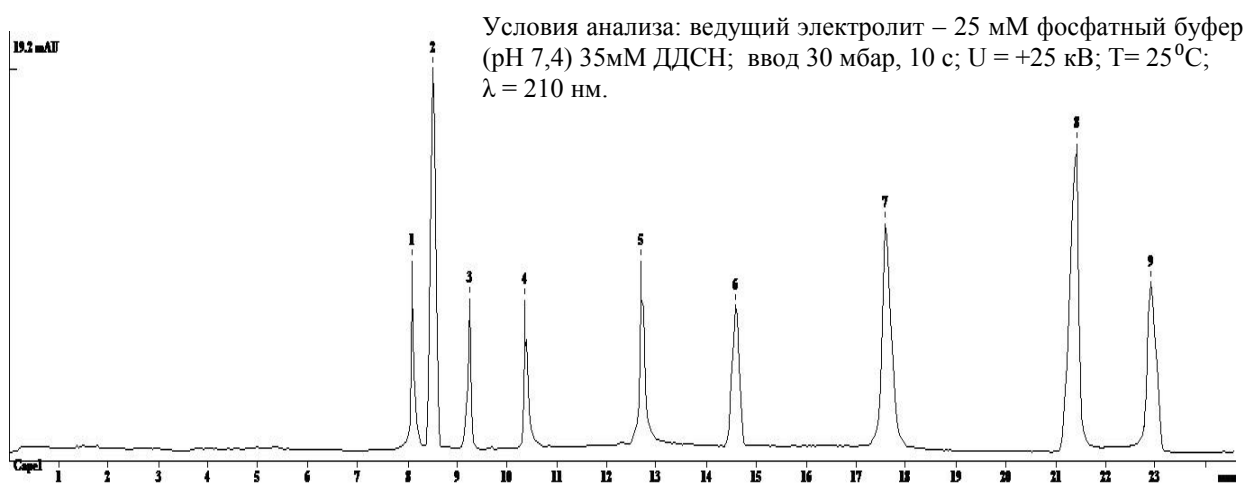
Таблица 3.2 – Матрица планирования эксперимента

№ опыта	Факторы							
	x0	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x4 (x1x2x3)
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Таблица 3.3 – Уравнения регрессии

Параметр	Уравнения
I , мкА	$y = 1,99x_2 + 1,31x_3 + 9,35$
$t_{эф-мы}$, мин	$y = 1,26x_3 - 48,36x_1 + 338,8$
1/2	$y = 0,11x_3 + 0,83$
2/3	$y = 0,25x_3 + 0,27$
5/6	$y = 0,34x_3$
8/9	$y = -7,14x_1 + 0,27x_3 + 57,8$

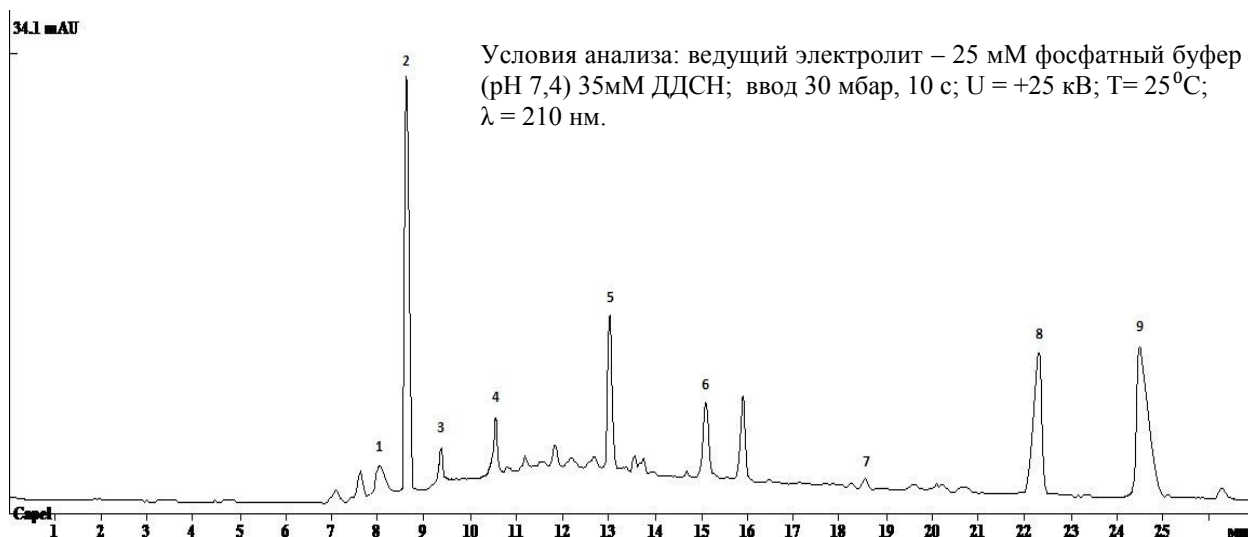
Используя полученные уравнения (таблица 3.3), выявили, что компромиссом между величиной силы тока, временем анализа и разрешением пиков являются следующие условия разделения: рН 7,4, концентрация ведущего электролита 25мМ, концентрация ДДСН 35мМ, 5% этанола (рисунок 3.1)



1–ГКТ, 2–КФ, 3–КТ, 4–ЭГК, 5–ЭГКГ, 6–ЭКТ, 7–ГКГ, 8–ГК, 9–ЭКГ

Рисунок 3.1 – Пример электрофореграммы модельной смеси

Повторяемость и воспроизводимость электрофоретического профиля (рисунок 3.2) оценивали с помощью серии из семи образцов чая, приготовленных независимо друг от друга. Каждый чайный экстракт вводили дважды. Стандартное отклонение величины площади характеристичных пиков не превышает 15% (таблица 3.4).



1–ГКТ, 2–КФ, 3–КТ, 4–ЭГК, 5–ЭГКГ, 6–ЭКТ, 7–ГКГ, 8–ГК, 9–ЭКГ

Рисунок 3.2 –Электрофореграмма экстракта черного чая

Таблица 3.4 – Стандартное отклонение величины площади характерных пиков

Аналит	ГКТ	Кф	КТ	ЭГК	ЭГКГ	ЭКТ	ГКГ	ГК	ЭКГ
$\sigma_{\text{повт}}, \%$	3,37	9,85	4,31	8,62	5,43	5,11	1,42	13,70	11,22
$\sigma_{\text{воспр}}, \%$	1,09	5,23	1,58	2,93	5,84	1,01	2,11	5,34	3,12

Концентрацию катехинов, кофеина и галловой кислоты находили по предварительно построенным градуировочным графикам. Диапазон линейности и характеристики уравнений регрессии приведены в таблице 3.5. Во всех случаях свободный член в уравнениях регрессии незначим.

Таблица 3.5 – Уравнения регрессии градуировочных зависимостей

Вещество	Уравнение регрессии	R ²	Диапазон линейности, мкг/мл
КФ	$y = (2,57 \pm 0,04)x$	0,999	25–150
КТ	$y = (4,01 \pm 0,08)x$	0,998	0,5–10
ЭГКГ	$y = (3,56 \pm 0,01)x$	1,000	10-200
ЭКТ	$y = (6,62 \pm 0,27)x$	1,000	0,5–20
ГК	$y = (10,19 \pm 0,07)x$	0,999	0,5–30
ГКт	$y = (2,51 \pm 0,03)x$	0,993	1-20
ЭГК	$y = (2,76 \pm 0,04)x$	0,999	1-150
ГКГ	$y = (6,45 \pm 0,30)x$	0,993	2-50
ЭКГ	$y = (10,24 \pm 0,37)x$	0,996	5-50

Объектами исследования служили образцы черного чая, изготовленные из сырья, выращенного в условиях Краснодарского края, и представленные лабораторией Всероссийского НИИ цветоводства и субтропических культур г. Сочи, а так же образцы индийского, цейлонского и китайского черного чая приобретенные в специализированных чайных магазинах.

Установлено, что для всех образцов черного чая преобладающими компонентами являются кофеин (26,42–45,49 мг/г) и эпикатехин галлат (10,93–23,86 мг/г), в меньших количествах содержатся галлокатехин галлат (2,94–9,56 мг/г), эпигаллокатехин галлат (0,79–70,51 мг/г), катехин (0,57–5,09 мг/г), галлокатехин (0,54–6,12 мг/г), эпигаллокатехин (0,46–22,86 мг/г), эпикатехин (0,39–15,87 мг/г) и галловая кислота (0,36–12,79 мг/г). Анализируя полученные результаты, можно выделить некоторые отличия: концентрация кофеина в образцах китайского чая примерно в 1,5 раза больше других, содержание ГКт, КТ и ГК в Китайском и Краснодарском чаях ниже, чем в цейлонском и индийском примерно в 3 раза (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Значения медианы и размаха для кофеина, катехинов и галловой кислоты в группах чая

Компонент	С, мг/г							
	Медиана				Размах			
	Цейлон	Краснодар	Индия	Китай	Цейлон	Краснодар	Индия	Китай
ГКТ	4,37	0,81	3,82	0,62	3,86-6,12	0,70-1,29	3,06-9,26	0,54-0,73
Кф	30,42	32,27	33,87	43,93	26,42-34,91	30,60-33,45	26,86-40,10	34,71-45,49
Кт	4,77	0,94	3,56	1,09	3,69-5,09	0,57-1,31	3,04-4,95	0,95-1,33
ЭГК	7,87	3,40	7,33	1,00	6,46-10,23	2,26-4,21	6,20-22,86	0,46-1,40
ЭГКГ	10,81	2,13	9,84	1,28	9,21-18,34	1,43-4,35	5,47-70,51	0,79-2,45
ЭКт	7,39	0,62	6,15	3,62	5,63-10,34	0,39-1,35	4,73-15,87	2,88-4,19
ГКГ	6,70	4,87	5,39	6,05	5,58-8,01	4,26-5,34	2,94-9,39	4,94-9,56
ГК	1,15	0,51	1,14	0,42	0,89-1,98	0,44-0,61	0,50-12,79	0,36-0,51
ЭКГ	16,11	20,41	6,85	19,99	14,65-18,52	18,40-22,32	10,93-19,81	16,55-23,86

При проведении классификации в качестве классификационных переменных для образцов чая выбрали отношения концентраций кофеина, катехинов и галловой кислоты. Применение к матрице данных, включающей в себя 36 отношений, дисперсионного анализа с последующей обработкой методом главных компонент, позволило установить, что наибольшее влияние на отнесение образца к определенной группе чая оказывают следующие 5 отношений: $C_{Кф}/C_{Кт}$, $C_{ЭГК}/C_{ЭКт}$, $C_{ЭГК}/C_{ГКт}$, $C_{Кт}/C_{ЭГК}$, $C_{Кф}/C_{ЭГК}$ (рисунок 3.3).

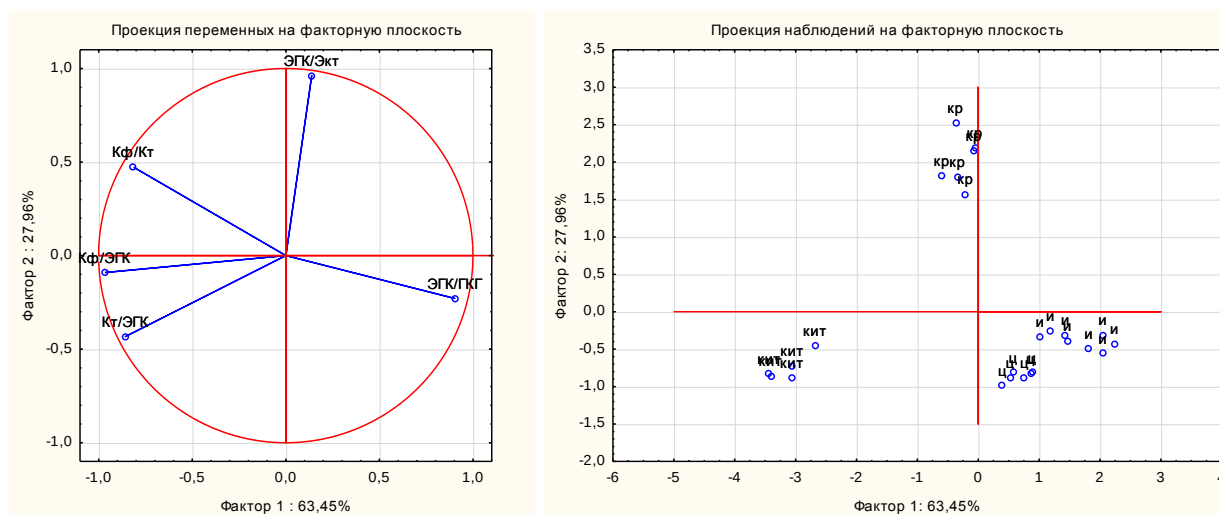


Рисунок 3.3 – Проекция отношений концентраций и образцов на факторную плоскость

Торговый продукт «Краснодарский чай» является купажом из местного сырья с добавлением чайного листа выращенного на территории Индии, Китая или Шри-Ланки. Было рассмотрено изменение установленного образа Краснодарского черного чая от доли введенного купажного индийского, цейлонского и китайского чая (таблица 3.7). Сравнение полученных диаграмм с диаграммами Краснодарских чаев разных торговых наименований показало, что вероятно купажируют чаев проводят индийским чаем. Диаграммы для Краснодарского чая разных торговых наименований представлены на рисунке 3.4.

Таблица 3.7 – Соотношение чая Краснодарский/купажный

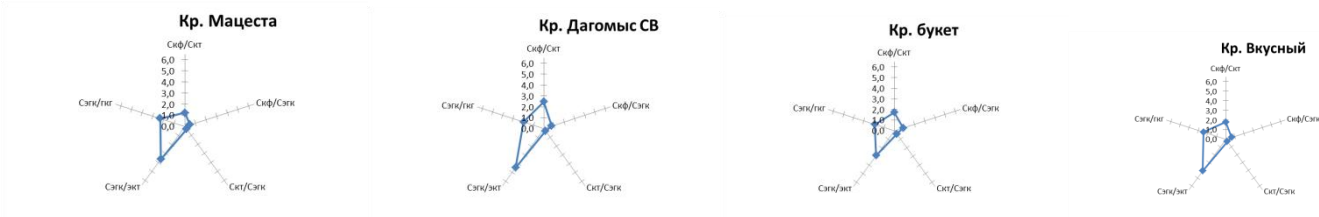
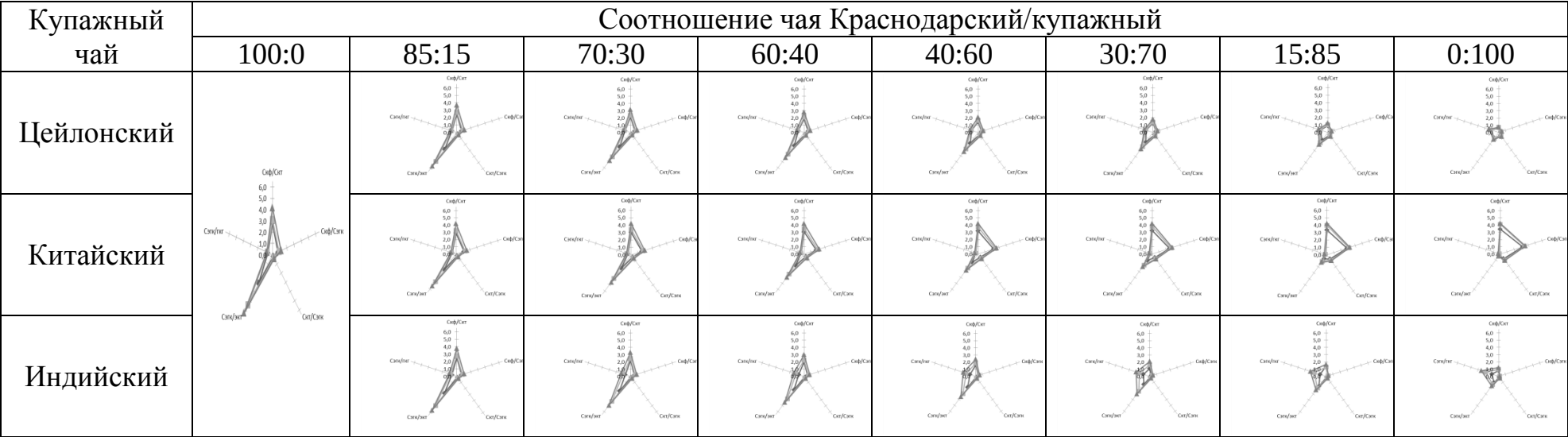


Рисунок 3.4 – Диаграммы для Краснодарского чая разных торговых наименований

Применение разработанной методики для определения катехинов, кофеина и галловой кислоты в водных экстрактах чая.

Известно, что при выращивании чая, культура не испытывает недостатка в фосфоре, а избыточное количество нитратов ухудшает качество чайного листа. Для чайного растения более важно внесение микроудобрений. Вносимые компоненты оказывают влияние на количество катехинов и могут менять биологическую ценность продукта, поэтому обычно проводят определение содержания танина и экстрактивных веществ общепринятыми методами. Особый интерес представляет изучение влияния внесенных в почву микроэлементов на содержание некоторых катехинов чая. Влияние некоторых удобрений на чайное растение представлено в таблице 3.8 [66].

Таблица 3.8 – Влияние удобрений на чайное растение

Вид удобрений	Влияние	
Азотистые	Отрицательное	ухудшение аромата уменьшение содержания танина уменьшение содержания экстрактивных веществ
Фосфорные	Отсутствие четких закономерностей влияния фосфорных и калийных удобрений на качественные показатели чая	
Калийные		
Микроудобрения:		
Mn	Положительное	увеличение содержания экстрактивных веществ увеличение содержания танина увеличение содержания кофеина улучшение органолептических свойств
Fe	Положительное	увеличение содержания экстрактивных веществ увеличение содержания танина
Zn	Положительное	увеличение содержания экстрактивных веществ увеличение содержания танина
Cu	Положительное	увеличение содержания экстрактивных веществ увеличение содержания танина
B	Положительное	улучшает углеводный и белковый обмен повышает синтез фенольных соединений
Co	Отрицательное	уменьшение массы флеша ухудшение механического состава чайного сырья
	Положительное	улучшает энергетический обмен растений улучшает биосинтез белка

Были проанализированы образцы зеленого и черного чая, изготовленные в лаборатории из сырья, полученного в условиях полевого микроделяночного опыта с внесением Zn, В, Са (таблица 3.9). Образцы были отобраны с разных делянок и после их анализа результаты усреднялись.

Содержание кофеина во всех образцах зеленого чая, а также КТ, ЭГКГ и ЭКт сопоставимы с контрольным образцом. При изготовлении черного чая полифенолы в результате ферментативной оксидации полифенолоксидами и пероксидами частично превращаются в теафлавины и теарубигины, которые придают черному чаю цвет и аромат. Содержание полифенольных веществ уменьшается, а галловой кислоты несколько увеличивается. Интересно отметить, что содержание ЭГКГ в черном чае уменьшается в 34 и 40 раз для контрольного образца и образца чая, полученного с делянки, удобренной В. Для образцов, полученных на делянках с внесенными Zn и Са уменьшение этого компонента составляет 25 и 20 раз соответственно.

Таблица 3.9 – Содержание кофеина, катехинов и галловой кислоты в экстрактах зеленого и черного чая

Действующее вещество микроудобрения	Доза микроудобрения, кг/га	Вид продукции	Содержание, мг/г				
			Кф	Кт	ЭГКГ	ЭКт	ГК
Контроль	–	черный	31,1	0,55	2,03	0,76	5,48
		зеленый	26,1	1,53	69	5,41	1,51
Zn	4,3	черный	29,9	0,36	2,36	0,47	4,68
		зеленый	24,5	1,56	61	5,16	1,36
Са	100	черный	30,6	0,57	3,03	0,75	5,35
		зеленый	26,6	1,94	65	5,31	1,56
В	6,0	черный	28,1	0,55	1,44	0,63	4,96
		зеленый	21,6	1,37	56,3	4,89	1,28

Таким образом показано, что внесение микроудобрений не только несколько изменяет содержание индивидуальных катехинов, но и влияет на их устойчивость к окислению при технологическом процессе.

Содержание кофеина, катехинов и галловой кислоты в зрелом листе, который отбирают для установления физиологического состояния растения, на отобранных участках мало отличаются (таблица 3.10).

При проведении классификации чая по виду чайного растения необходимо выбрать условно стандартные образцы, для которых известны сорт, место произрастания сырья и технология получения чая.

Таблица 3.10 – Содержание кофеина, катехинов и галловой кислоты в зрелом листе

Действующее вещество микроудобрения	Доза микроудобрения, кг/га	Содержание, мг/г				
		Кф	Кт	ЭГКГ	ЭКт	ГК
Контроль	–	22,7	0,45	30,3	4,22	0,33
Zn	4,3	19,9	0,94	35,6	5,86	0,33
Ca	100	19,7	0,63	32,2	5,41	0,34
B	6	15,3	0,64	26,5	4,99	0,32

Содержание анализируемых компонентов в черных чаях, изготовленных из сырья, выращенного на территории Краснодарского края, мало отличается (рисунок 3.5). Для зеленого чая наблюдается аналогичная картина (рисунок 3.6).

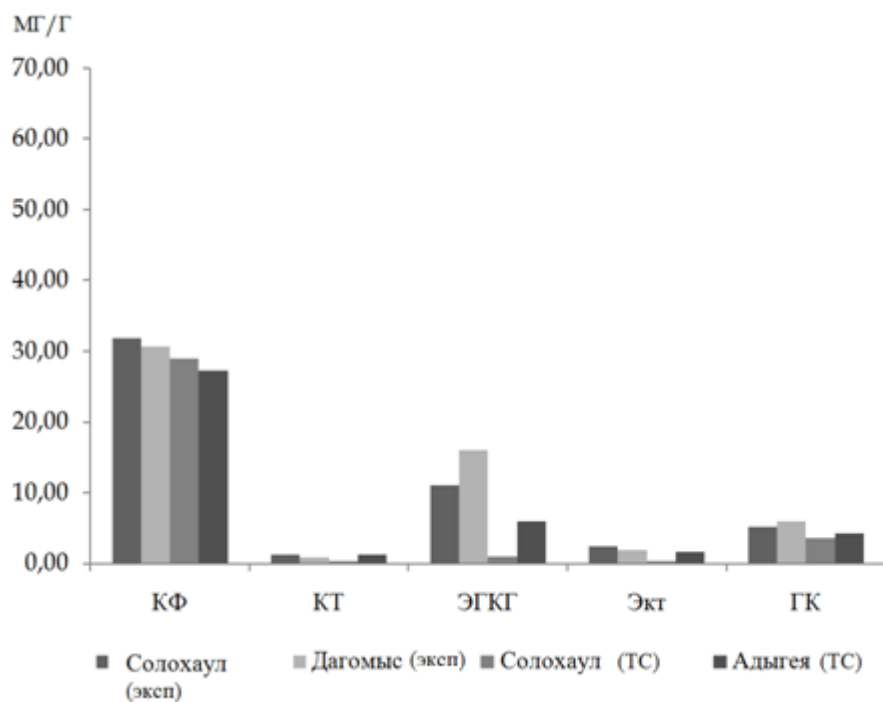


Рисунок 3.5 – Содержания кофеина, катехинов и галловой кислоты в экстрактах черного чая

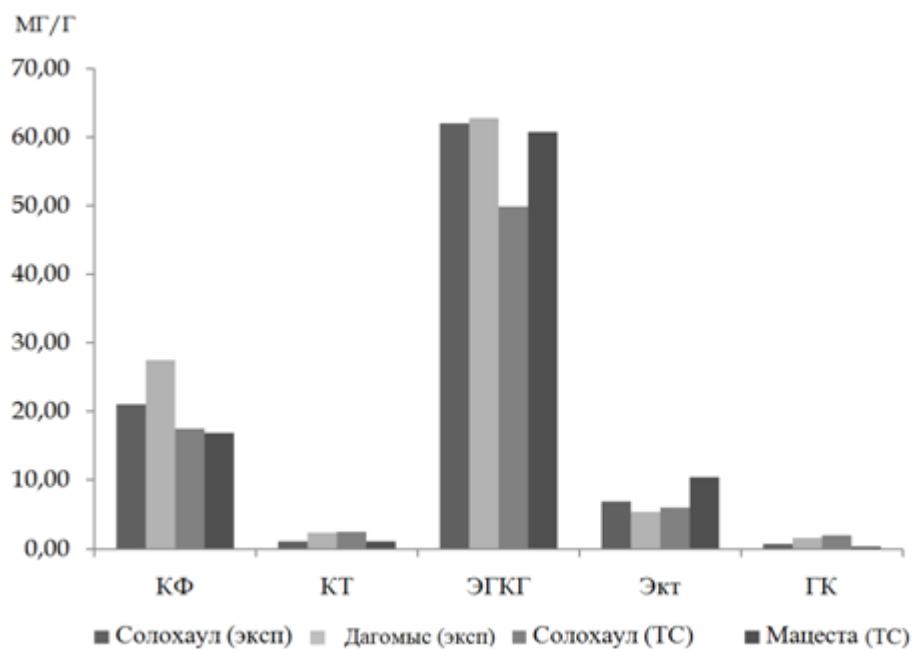


Рисунок 3.6 – Содержания кофеина, катехинов и галловой кислоты в экстрактах зеленого чая

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Анализ литературных данных показал актуальность классификации черного чая по происхождению на основе его органического состава и возможность использования для этого метода МЭКХ. Установлено, что для решения этой проблемы необходимо оптимизировать условия определения кофеина, катехинов (ГК_т, КФ, КТ, ЭГК, ЭГКГ, ЭКТ, ГКГ, ГК, ЭКГ) и галловой кислоты в чае методом МЭКХ.

2 Проведена оптимизация условий электрофоретического определения кофеина, катехинов (ГК_т, КФ, КТ, ЭГК, ЭГКГ, ЭКТ, ГКГ, ГК, ЭКГ) и галловой кислоты в чае методом МЭКХ с использованием ДФЭ типа 2⁴⁻¹. При планировании эксперимента в качестве параметров оптимизации выступали сила тока в капилляре, время регистрации электрофореграммы, разрешение пиков модельного раствора катехинов, кофеина, галловой кислоты, а факторами являлись рН (7.0–8.0), концентрация фосфатного буферного раствора (20–35 мМ) концентрации мицеллообразователя ДДСН (15–50 мМ) и органического модификатора этанола (4–7 %).

Установлены оптимальные условия определения кофеина, катехинов и галловой кислоты в чае: рН 7,4, концентрация ведущего электролита 25мМ, концентрация ДДСН 35мМ, 5% этанола.

Для всех аналитов в оптимальных условиях получены градуировочные зависимости в диапазонах, мкг/см³: (25–150) для кофеина, (0,5–10) для катехина, (10–200) для эпигаллокатехин галлата, (0,5–20) для эпикатехина, (0,5–30) для галловой кислоты, (1–20) галлокатехина, (1–150) для эпигаллокатехина, (2–50) для галлокатехин галлата, (5–50) для эпикатехин галлата.

3 Показано, что содержание катехинов (КТ, ЭГКГ, ЭКТ), кофеина и галловой кислоты в различных образцах черного и зеленого готового чая, выращенных на территории Краснодарского края, мало различаются.

Установлено, что внесение цинка, кальция и бора в качестве микроудобрений практически не влияет на состав катехинов в экстрактах зеленого и черного чая. Устойчивость к окислению катехинов увеличивается для образцов, выращенных на почвах с внесением цинка и кальция, в 25 и 20 раз соответственно.

4 Сформирован массив данных содержаний кофеина, катехинов и галловой кислоты в черных чаях разного типа происхождения: краснодарского, китайского, цейлонского, индийского.

Показано, что для всех образцов черного чая преобладающими компонентами являются кофеин (26,42–45,49 мг/г) и эпикатехин галлат (10,93–23,86 мг/г), в меньших количествах содержатся галлокатехин галлат (2,94–9,56 мг/г), эпигаллокатехин галлат (0,79–70,51 мг/г), катехин (0,57–5,09 мг/г), галлокатехин (0,54–6,12 мг/г), эпигаллокатехин (0,46–22,86 мг/г), эпикатехин (0,39–15,87 мг/г) и галловая кислота (0,36–12,79 мг/г). Концентрация кофеина в образцах китайского чая примерно в 1,5 раза больше чем в чаях другого типа, содержание ГКт, КТ и ГК в китайском и краснодарском чаях ниже, чем в цейлонском и индийском примерно в 3 раза.

5 Установлено, что при классификации черного чая по происхождению в качестве классификационных переменных целесообразно использовать отношения концентраций $C_{\text{Кф}}/C_{\text{Кт}}$, $C_{\text{ЭГК}}/C_{\text{ЭКт}}$, $C_{\text{ЭГК}}/C_{\text{ГКт}}$, $C_{\text{Кт}}/C_{\text{ЭГК}}$, $C_{\text{Кф}}/C_{\text{ЭГК}}$.

Показано, что лепестковые диаграммы, построенные на основе установленных характеристических соотношений для краснодарского, китайского, цейлонского и индийского черного чая, визуально различаются.

Показаны «дыхание» диаграмм в зависимости от доли купажного чая в продукте и возможность использования этого факта для выявления происхождения купажного чая.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Закон Краснодарского края от 08.08.2016 г. № 3453-КЗ «О развитии чаеводства на территории Краснодарского края» // (принят ЗС КК от 27.07.2016).
- 2 Даников, Н.И. Целебный чай / Н.И. Данников. – М.: Эксмо, 2012. – 224 с.
- 3 Похлебкин, В.В. Чай, его история, свойства и употребление / В.В. Похлебкин. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 120 с.
- 4 Герасимова, В.А. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров / Герасимова В.А. [и др.] – М.: Учебник для вузов, 2005. – 396 с.
- 5 Николаева, М.А. Идентификация и обнаружение фальсификации продовольственных товаров / М.А. Николаева, М.А. Положишникова. – М.: ИД «ФОРУМ»: ИНФРА–М, 2009. – 464 с.
- 6 Блинникова, О.М. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров / О.М. Блинникова. – Мичуринск: Изд. МичГАУ, 2007. – 234 с.
- 7 Engelhardt, U.H. Chemistry of tea / U.H. Engelhardt // Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. – 2013. – V. 3. – P. 999–1032.
- 8 У ВэйСинь, Энциклопедия целебного чая /У ВэйСинь. – М.: Изд. «Нева». – 2005. – 320 с.
- 9 Vaher, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis / M. Vaher, M. Koel // J. Chromatography A. – 2003. – V. 990. – P. 225–230.
- 10 Барабой, В. А. Катехины чайного растения: структура, активность, применение / В. А. Барабой // Биотехнология. – 2008. – Т. 1. – № 3. – С. 25 – 36.

- 11 Larger, P.J. Separation of tea polyphenols using micellar electrokinetic chromatography with diode array detection / P.J. Larger, A.D. Jones, C. Dacombe // J. Chromatography A. – 1998. – V. 799. – P. 309–320.
- 12 Nederkassel, A.M. Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modeling / A.M. Nederkassel [et al.] // J. Chromatography A. – 2005. – V. 1096. – P. 177.
- 13 Яшин, Я.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин [и др.] // Изд. «ТрансЛит», 2009. – 212 с.
- 14 Иванов, Ю.Г. Энциклопедия чая / Ю.Г. Иванов. – Смоленск: Русич, 2001. – 624с.
- 15 Opplinger, P. Das neue buch vom grünen tee / P. Opplinger. – Augsburg: Miden, 1999. – 125 p.
- 16 Horie, H. Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation / H. Horie, K. Kohata, // J. Chromatography A. – 1998. – V. 802. – №1. – P. 219–223.
- 17 Карцова, Л.А. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений / Л.А. Карцова, А.В. Алексеева // Журнал аналитической химии. – 2008. – Т.63. – № 11. – С. 1126–1136.
- 18 Tsuchiya, H. High-performance liquid chromatographic analysis of poly hydroxy flavones using solid-phase borate complex extraction / H. Tsuchiya // J. Chromatography B. – 1998. – V. 720. – P. 225–230.
- 19 Maiani, G. Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma / G. Maiani // J. Chromatography A. – 1998. – V. 692. – P. 311.
- 20 Alonso-Salces, R.M. A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues / R.M. Alonso-Salces [et al.] // J. Talanta. – 2005. – V. 65. – P. 654.

21 Tsuchiya, H Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography / H. Tsuchiya [et al.] // J Chromatography B. – 1997. – V. 703. – P. 253–258.

22 Sano, M. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / M.Sano [et al.] // The Analyst. – 2001. – V. 126. – P. 816.

23 Kumamoto, M. Enhanced separation and elution of catechins in HPLC using mixed-solvents of water, acetonitrile and ethyl acetate as mobile phase / M. Kumamoto [et al.] // Analytic. Sciences. – 2000. – V.16. – P. 139–144.

24 Zuo, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and puerh teas using HPLC with a photodiode array detector / Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng // Talanta. – 2002. – V. 57. – P. 307–316.

25 Del Rio, D. HPLC–MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea / D. Del Rio [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – V. 52. – P. 2807–2815.

26 El-Shahawi, M.S. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography / M.S. El-Shahawi [et al.] // Food Chemistry. – 2012. – V. 134. – № 4. – P. 2268–2275.

27 Tao, W. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC–MS–MS method / T. Wuqun [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2016. – V. 131. – P. 140–145.

28 Naldi, M. UHPLC determination of catechins for the quality control of green tea/ M. Naldia [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2016. – V. 88. – P. 307–314.

29 Weiss, D. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography / D. Weiss, C.R. Anderton // J. Chromatography A. – 2003. – V.1011. – P. 173–180.

30 Lee, B.-L. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis / B.-L. Lee [et al.] // J. Chromatography A. – 2000 – V. 881. – P. 439–447.

31 Мареева, Д. О. Определение галловой кислоты, катехина, эпикатехина и кофеина в экстрактах черного чая / Д.О Мареева [и др.] // Аналитика и контроль. – 2015. – Т. 19. – № 4–6. – С. 323–330.

32 El-Hady, D.A. Alkyl imidazolium ionic liquid based sweeping-micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of seven tea catechins in human plasma / D.A. El-Hady, H.M. Albishri // J. Chromatography B. – 2014. – V.969. – P. 224–229.

33 Lopez, M. del M. C. Development, validation and application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography method for routine analysis of catechins, quercetin and thymol in natural samples/ M. del M. C. Lopez [et al.] // Microchemical Journal. – 2011. – V.99. – №2. – P. 461–469.

34 Casale, M. Combining excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, parallel factor analysis, cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography and partial least squares class-modelling for green tea characterization / M. Casale [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – V.159. – P. 311–317.

35 Hsiao, H-Y. Determination of tea fermentation degree by a rapid micellar electrokinetic chromatography / H-Y. Hsiao [et al.] // Food Chemistry. – 2010. – V.120. № 2. – P. 632–636.

36 Sun, Y. Determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in wines by micellar electrokinetic chromatography / Y. Sun [et al.] // Food Chemistry. – 2008. – V.106. – № 1. – P. 415–420.

37 Stach, D. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography / D. Stach, O. J. Schmitz // J. Chromatography A. – 2001. – V.924. – № 1–2. – P. 519–522.

38 Pomponio, R. Analysis of catechins in extracts of *Cistus* species by microemulsion electrokinetic chromatography / R. Pomponio [et al.] // *J. Chromatography A*. – 2003. – V.990. – № 1–2. – P. 215–223.

39 Карцова, Л.А. Мицеллярная электрокинетическая хроматография с обращенной полярностью при разделении полифенольных соединений и кофеина / Л.А. Карцова, О.В. Ганжа // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7. – №6. – С. 902–908.

40 Карцова, Л.А. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений / Л.А. Карцова, А.В. Алексеева // Журнал аналитической химии. – 2008. – Т.63. – № 11. – С. 1126–1136.

41 Horie, H. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis / H. Horie, T. Mukai, K. Kohata // *J. Chromatography A*. – 1997. – V. 758. – P. 332–334.

42 Карцова, Л.А. Электрофоретическое разделение чайных флаваноидов в режиме капиллярного зонного электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии / Л. А. Карцова, О. В. Ганжа // Журнал прикладной химии. – 2006. – Т. 79. – № 7. – С. 1120 – 1124.

43 Карцова, Л.А. Новые возможности мицеллярной и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении катехинов и катехоламинов в природных объектах / Л. А. Карцова, О. В. Ганжа // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т.65. – №3. – С. 285–291.

44 Карцова, Л.А. Проблемы аналитической химии Т.18: Капиллярный электрофорез / Карцова Л. А.; под ред. Карцовой Л. А. – М.: Наука, 2014. – 444 с.

45 Aucamp, J. P. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography / J. P. Aucamp, Y. Hara, Z. Apostolides // *J. Chromatography A*. – 2000. – V. 876. – P. 235–242.

46 Fiori, J. Chiral analysis of theanine and catechin in characterization of green tea by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography and

high performance liquid chromatography/ J. Fioria [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – V. 1562. – P. 115–122.

47 Peres, R. G. Determination of catechins in green tea infusions by reduced flow micellar electrokinetic chromatography/ R. G. Renato [et al.] // Food Chemistry. – 2011. – V. 127. – №2. – P. 651–655.

48 Hsiao, H–Y. Determination of tea fermentation degree by a rapid micellar electrokinetic chromatography / H–Y. Hsiao, R. L. C. Chen, T–J. Cheng // Food Chemistry. – 2010. – V. 120. – P. 632–636.

49 Чепурной, И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров / И. П. Чепурной. – М.: Учебник для вузов, 2008. – 406 с.

50 Pasquini, B. Chiral cyclodextrin–modified micellar electrokinetic chromatography and chemometric techniques for green tea samples origin discrimination / B. Pasquini [et al.] // Talanta. – 2016. – № 150. – P. 7–13.

51 Xin, Z. UPLC–Orbitrap–MS/MS combined with chemometrics establishes variations in chemical components in green tea from Yunnan and Hunan origins / Z. Xin [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – № 266. – P. 534–544.

52 Wang, L. Geographical tracing of Xihu Longjing tea using high performance liquid chromatography / L. Wang [et al.] // Food Chemistry. – 2014. – № 146. – P. 98–103.

53 Shevchuk, A. Differentiation of black tea infusions according to origin, processing and botanical varieties using multivariate statistical analysis of LC-MS data / A. Shevchuk, L. Jayasinghe, N. Kuhnert // Food Research International. – 2018. – V. 109. – P. 387–402.

54 Краснянчин, Я.Н. Хемометрические методы в контроле подлинности продуктов питания и пищевого сырья / Я.Н. Краснянчин, А.В. Пантелеймонов, Ю.В. Холин // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т.5. – № 3. – С. 118–147.

55 Дребущак, Т.Н. Введение в хемометрику. Практика анализа экспериментальных данных / Т.Н. Дребущак. – Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011. – 88 с.

56 Купцов, С.Б. Применение математического метода многофакторного планирования эксперимента для оптимизации условий атомно-эмиссионного определения благородных металлов с использованием дугового двухструйного плазматрона / А. В. Купцов, С. Б. Заякина, А. И. Сапрыкин // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2015. – Т. 81. – № 11. – С. 15 – 19.

57 Saavedra, L. Optimization of the separation lactic acid enantiomers in body fluids by capillary electrophoresis / L. Saavedra, C. Barbas // Journal of Chromatography B. – 2002. – V. 766. – № 2. – P. 235–242.

58 Севастьянова, Н.Т. Особенности планирования химического эксперимента путем составления планов первого порядка/ Н. Т. Севастьянова, С. А. Баташев // ФГБОУ ВО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого», ООО «ГЕМСТАНДАРТ». – 2018. – № 8.3 (23). – С. 397 – 398.

59 Вершинин, В.И. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента / В.И. Вершинин, Н.В. Перцев. – Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. – 217 с.

60 Tebani, A Optimization of a liquid chromatography ion mobility-mass spectrometry method for untargeted metabolomics using experimental design and multivariate data analysis / A. Tebani [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2016. – V. 913. – P. 55 – 62.

61 EL-Shorbagy, H. Optimization and modeling of a green dual detected RP-HPLC method by UV and fluorescence detectors using two level full factorial design for simultaneous determination of sofosbuvir and ledipasvir: Application to average content and uniformity of dosage unit testing / H. EL-Shorbagy [et al.] // Microchemical Journal. – 2019. – V. 147. – P. 974 – 392.

62 Saavedra, L. Optimization of the separation lactic acid enantiomers in body fluids by capillary electrophoresis / L. Saavedra, C. Barbas // Journal of Chromatography B. – 2002. – V. 766. – P. 235 – 242.

63 ГОСТ 19885–74. Чай. Методы определения содержания танина и кофеина [Текст]. – Введ. 1975–07–01. – М.: Госстандарт России, 2009. – 4 с.

64 Шендеров, Б.А. Чай и кофе основа для создания функциональных напитков и продуктов питания / Б.А. Шендеров, А.Ф. Доронин // Пиво и напитки. – 2004. – № 2. – С. 94.

65 Гушаева, К.С. Установление качества чая по содержанию некоторых катехинов: выпускная квалификационная работа (магистерская диссертация). Кубанский государственный университет, Краснодар, 2017.

66 Малюкова, Л.С. Оптимизация плодородия почв и применения минеральных удобрений при выращивании чая в России / Л.С. Малюкова; под ред. В.Г. Минеева. – Сочи: ГНУ ВНИИЦиСК РАСХН, 2014. – 414 с.