

Санкт-Петербургский государственный университет

КАРПИЦКИЙ Дмитрий Алексеевич

Выпускная квалификационная работа

Изучение особенностей метаболомного профиля растений с противовирусной и противобактериальной активностью, полученных в культуре in vitro, методами хроматографии и капиллярного электрофореза

Уровень образования: магистратура

Направление 04.04.01 «Химия»

Основная образовательная программа ВМ.5512.2020 «Химия»

Научный руководитель:
доцент кафедры органической
химии, к.х.н.,
Бессонова Елена Андреевна

Рецензент:
старший научный сотрудник
научно-исследовательской
лаборатории хроматографии
ФГБОУ ВО СЗГМУ им И.И.
Мечникова Минздрава РФ
Малеваная Екатерина
Валерьевна

Санкт-Петербург
2022

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Перспективы растений рода <i>Iris</i> L.	9
1.2 Биотехнологии в производстве лекарственного растительного сырья.....	11
1.3 Основные метаболиты рода <i>Iris</i> L.....	12
1.3.1 Фенольные соединения <i>Iris</i> L.	13
1.3.1.1 Пробоподготовка растительных объектов к хроматографическому и электрофоретическому анализу для изучения профилей фенольных соединений	15
1.3.1.2 Определение фенольных соединений хроматографическими методами	18
1.3.2 Аминокислоты. Свободные аминокислоты и их роль в растении	21
1.3.2.1 Пробоподготовка растительных объектов к анализу хроматографическими и электрофоретическими методами для определения свободных аминокислот	22
1.3.2.2 Хроматографические и электрофоретические подходы к определению аминокислот	23
1.3.3 Органические кислоты. Короткоцепочечные органические кислоты и их роль в растении.....	24
1.3.3.1 Пробоподготовка растительных объектов к анализу хроматографическими и электрофоретическими методами для определения органических кислот	25
1.3.3.2 Определение короткоцепочечных органических кислот методами хроматографии и капиллярного электрофореза	26
1.4 Дизайн эксперимента в оптимизации условий пробоподготовки.....	29
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34

2.1	Материалы и реактивы	34
2.2	Оборудование	34
2.3	Объект исследования.....	35
2.4	Приготовление растворов	36
2.4.1	Приготовление буферных растворов.....	36
2.4.2	Приготовление растворов стандартов полифенолов и аминокислот	37
2.4.3	Приготовление раствора для проявления полифенолов и аминокислот в ВЭТСХ.....	37
2.5	Методы исследования	38
2.5.1	Условия выращивания <i>Iris sibirica</i> и <i>Iris ensata</i> методами биотехнологии.	38
2.5.2	Условия определения полифенолов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрическим детектированием	39
2.5.3	Условия определения аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрическим детектированием	40
2.5.4	Условия электрофоретического разделения анионов органических кислот	41
2.5.5	Подготовка растительных объектов к хроматографическому и электрофоретическому анализу	41
2.5.6	Получение дансильных производных аминокислот	43
3	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	44
3.1	Получение характеристических профилей фенольных соединений экстрактов листьев <i>Iris sibirica</i> L. методом обращенно-фазовой ВЭЖХ	46
3.1.1	Выбор условий хроматографического разделения фенольных соединений метанольных экстрактов <i>Iris sibirica</i> L. и <i>Iris ensata</i> L.	46
3.1.2	Поиск оптимальных условий извлечения фенольных соединений из <i>Iris sibirica</i> L.	47
3.1.3	Получение хроматографических профилей флавоноидов <i>Iris sibirica</i> L. Идентификация флавоноидов методом хромато-масс-спектрометрии	51

3.2	Получение характеристических профилей полифенолов в экстрактах листьев биотехнологического сырья <i>Iris ensata</i> L. методом ВЭТСХ.....	60
3.2.1	Выбор условий разделения полифенолов в метанольных экстрактах листьев <i>Iris ensata</i> L. методом ВЭТСХ.....	60
3.2.2	Получение характеристических профилей биотехнологического сырья методом ВЭТСХ.....	62
3.3	Получение характеристических профилей аминокислот в экстрактах листьев <i>I. sibirica</i> L. методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.....	66
3.3.1	Разделение дансильных производных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ	66
3.3.2	Поиск условий извлечения аминокислот из листьев биотехнологического сырья <i>I. sibirica</i> L.	68
3.3.3	Получение характеристических профилей аминокислот листьев биотехнологического сырья <i>I. sibirica</i> L.....	69
3.4	Получение характеристических профилей органических кислот в экстрактах листьев <i>I. sibirica</i> L. методом КЭ.....	72
3.4.1	Выбор условий электрофоретического определения органических кислот. Извлечение органических кислот из растительного сырья.....	72
3.4.2	Получение характеристических профилей органических кислот растительного сырья <i>I. sibirica</i> L.	76
	ВЫВОДЫ.....	80
	БЛАГОДАРНОСТИ И СВЕДЕНИЯ О РАБОТЕ.....	81
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	82

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

1-НУК, α -НУК – 1-нафтиуксусная кислота

6-БАП – 6-бензиламинопурин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС-ТОF – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным времяпролётным масс-спектрометрическим детектированием

ГЭР – глубокий эвтектический растворитель

УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография

УВЭЖХ-МС/МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС - газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

КЭ – капиллярный электрофорез

КЭ-УФ - капиллярный электрофорез с ультрафиолетовым детектированием

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

ОФ ВЭЖХ – обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПФ – подвижная фаза

ПЭГ - полиэтиленгликоль

ТСХ – тонкослойная хроматография

УЗ – ультразвук

УФ – ультрафиолетовый

ЭОП – электроосмотический поток

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

C18 – силикагель, модифицированный октадецильными радикалами

DAD – *diode-array detector*, диодно-матричное детектирование

ESI-MS/MS – *tandem mass-spectrometry with electrospray ionization*, тандемная масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией

SEF – *sensitivity enhancement factor*, степень концентрирования

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время отмечается значительный интерес к растительным объектам – ведётся поиск лекарственных растений, обладающих высокой биологической активностью, а также новых природных молекул, способных помочь человеку в борьбе с различными заболеваниями. Растения рода *Iris* L. давно и успешно зарекомендовали себя в данном аспекте, они широко используются в традиционной медицине для борьбы с бактериальными и вирусными инфекциями. Экстракты на их основе обладают пестицидными, антибактериальными, противовирусными, антиоксидантными, противовоспалительными, противоопухолевыми благодаря накоплению в этих растениях рода *Iris* L. широкого спектра биологически активных веществ (флавоноиды, аминокислоты, органические кислоты и др.).

Однако, некоторые неизученные виды *Iris* L., например, *Iris sibirica* L. и *Iris ensata* L., относятся к исчезающим и занесены в Красные книги регионов РФ. Использование краснокнижных растений для получения лекарственных препаратов не представляется возможным. Решением проблемы являются биотехнологические подходы, такие как микроразмножение и аэропонные технологии, позволяющие получать лекарственное растительное сырьё высокого качества в необходимых количествах в короткие сроки и в любое время года. Важной особенностью биотехнологических подходов является возможность направленного биосинтеза биологически активных веществ и получения культур с высоким содержанием вторичных метаболитов. К одним из значимых регуляторов их накопления в клеточных культурах растений относятся такие компоненты питательных сред, как гормоны и гормоноподобные соединения.

Для оптимизации условий выращивания требуются методики эффективного контроля биотехнологического сырья. Однако, в литературе отсутствует единая схема пробоподготовки и анализа растительных объектов, а методы контроля получаемого сырья, закреплённые в нормативных документах, устарели и не позволяют полно оценить содержание природных биологически активных веществ для разработки биотехнологии получения растительного сырья. Актуальной задачей является разработка эффективных аналитических подходов для определения и

идентификации индивидуальных веществ в растительных объектах. Эта задача может быть успешно решена с применением хроматографических (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС) и электрофоретических методов, которые уже зарекомендовали себя при определении биологически активных веществ в сложных природных матрицах, позволяющие проводить как целевое, так и нецелевое профилирование аналитов.

Объектом данного исследования выступало биотехнологическое сырьё *Iris sibirica* L. и *Iris ensata* L., выращенное в аэропонике и на питательных средах с различным содержанием фитогормонов цитокинина 6-бензиламинопурина (6-БАП) и ауксина α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК).

Целью работы являлась разработка подходов к селективному извлечению фенольных соединений, аминокислот и органических кислот из биотехнологического сырья видов *Iris* L. с дальнейшим получением хроматографических и электрофоретических профилей биологически активных аналитов и выявлением закономерностей их изменений в зависимости от содержания фитогормонов в питательных средах.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выбор условий селективного разделения биологически активных компонентов: флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС и ВЭТСХ, аминокислот методом ВЭЖХ-МС/МС, органических кислот методом КЭ-УФ.
2. Разработка регламента подготовки проб растительных объектов *Iris* L. для извлечения аналитов, включающая в себя выбор экстрагентов и выявление факторов, влияющих на эффективность экстракции аналитов.
3. Целевое и нецелевое профилирование биологически активных веществ *Iris* L. в выбранных условиях.
4. Идентификация фенольных соединений методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией.
5. Выявление закономерностей накопления определяемых биологически активных веществ в биотехнологическом сырье *Iris* L. в зависимости от гормонального состава питательной среды.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Перспективы растений рода *Iris* L.

В последнее время интерес к растительным объектам увеличивается – ведётся поиск растений, обладающих высокой биологической активностью, а также поиск новых природных молекул, способных помочь человеку в борьбе с различными заболеваниями. Несмотря на то, что растения рода *Iris* L. используются как декоративные, давно известна и их биологическая активность. Экстракты ирисов обладают пестицидными, антибактериальными, противовирусными, антиоксидантными, противовоспалительными, противоопухолевыми и другими свойствами благодаря накоплению в этих растениях широкого спектра биологически активных веществ [1,2]. Народами Европы и Дальнего Востока многие его виды использовались в медицинских целях, такие как *Iris germanica* L., *Iris suaveolens* Boiss. & Reut., *Iris dichotoma* Pall, *Iris pallasii* Fisch. ex Trevir. и некоторые другие [3]. Один из видов ириса, *I. tectorum* L., и в настоящее время находится в государственной фармакопее Китая [4].

Спектр веществ, обнаруженных в ирисах, достаточно широкий: фенолы, ксантоны, стероиды, терпеноиды, флавоноиды, изофлавоноиды, иридоиды, сапонины, танины, алкалоиды и т.д., и именно они обуславливают биологическую активность экстрактов ириса [3]. Это открывает перспективы использования извлечений из растительного сырья *Iris* L. для лечения комплексных заболеваний, которые сложно побороть таргетированными препаратами, например, ожирение, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рак и другие [5]. Механизм действия таких лекарств ещё предстоит установить.

Современный подход к поиску действующих молекул – это метаболическое профилирование, включающее в себя качественный и количественный анализ метаболитов образца. Оно подразделяется на целевое (количественный анализ одного или нескольких конкретных веществ) и нецелевое (сравнительный анализ как можно большего числа веществ) профилирование. Также существует разделение на *metabolite fingerprinting* – «отпечаток пальца» образца, описание внутриклеточных метаболитов – и *metabolite footprinting*, профилирование внеклеточных метаболитов [6]. Во всех вышеизложенных подходах получили большое распространение

высокоэффективные гибридные методы анализа, такие как ГХ-МС, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС, КЭ-МС.

подавляющее большинство исследований фитохимического состава проведено для корней и корневищ *Iris L.*, поскольку они в течение долгого времени выступают источником эфирного масла, однако экстракты листьев также представляют большой интерес [1,3,7]. Известно, что у разных видов *Iris L.* метаболизм протекает с существенными отличиями, и потому поиск растительных объектов с неизученными биологически активными вторичными метаболитами является актуальной задачей.

Одним из малоизученных видов является *Iris sibirica L.* Ареал его распространения простирается от запада Франции через Украину до озера Байкал и Саянских гор. Несмотря на большую область произрастания, во многих регионах России он включён в Красную Книгу и находится под охраной.

Показано, что водный и этанольные (70 и 96%) экстракты листьев ириса сибирского демонстрируют противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса, обладая при этом невысокой токсичностью по отношению к клеткам почки зелёной мартышки VERO [8]. В извлечениях было подтверждено присутствие флавоноидов, сердечных гликозидов, терпенов, фенолокислот, дубильных веществ, кумаринов, ксантонов и сапонинов, однако детально структура веществ не была описана [8]. Полученные результаты демонстрируют перспективы использования данных экстрактов как противовирусных и противобактериальных препаратов широкого спектра действия.

Ещё одним перспективным видом ириса является *Iris ensata L.* Во многих регионах России он также включён в Красную Книгу. Он произрастает на Юго-Востоке России: в Приморье, на Сахалине, Курилах, на северо-востоке Китая и Японии. В его экстрактах был обнаружен мангиферин [9], гликозиды лютеолина [10], 5-гидроксифлавоны [11], а также выявлена высокая антиоксидантная активность [12].

Охранный статус данных растений препятствует как их анализу, так и промышленному использованию. Современные биотехнологические подходы помогают решить данный вопрос.

1.2 Биотехнологии в производстве лекарственного растительного сырья

Разработка подходов выращивания растений *in vitro* даёт возможность использовать в промышленных масштабах широкий круг вторичных метаболитов, которые выступают в качестве красителей, ароматизаторов, вкусовых добавок, консервантов и, что особенно важно, лекарств. Преимущества использования таких подходов очевидны: получаемое сырьё гарантированно не содержит тяжёлые металлы, гербициды и пестициды, обладает стабильным качеством и может производиться в требуемых количествах в любое время года.

Существуют традиционные и современные биотехнологические подходы. К традиционным подходам относят использование культур клеток тканей и органов растений (к которым в том числе относится микроразмножение), соматического эмбриогенеза, улучшенной селекции, а также оптимизацию среды и условий выращивания, например, гидропонные и аэропонные технологии [13]. К современным – применение элиситации, биотрансформации, переноса генов, иммобилизации культуры клеток, «бородатых корней», а также добавок прекурсоров метаболитов. Необходимо отметить, что разделение методов основано на сложности манипуляций с объектом (поэтому первую группу ещё называют простыми методами, а вторую – сложными, продвинутыми). Они не являются взаимоисключающими, скорее напротив, их совместное использование позволяет добиться наилучших результатов.

На текущий момент подавляющее большинство исследований по применению биотехнологических подходов посвящено агрокультурам. Успешные эксперименты были проведены, например, с гречихой посевной (*Fagopirum esculentum* L.) и каперсом колючим (*Capparis spinose* L.). Показано, что воздействие салициловой кислотой успешно простимулировало накопление рутина в этих культурах в условиях *in vitro* [14,15]. Применение же биотехнологических подходов для лекарственного сырья малоизучено. На базе Института химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета для *Iris sibirica* L. была разработана методика выращивания методом микроразмножения с применением элиситоров – фитогормонов 6-бензиламинопурина и 1-нафтилуксусной кислоты с последующим аэропонным выращиванием [16].

Актуальной задачей является детальное изучение влияния концентрации гормонов и выбранного биотехнологического метода на фитохимический состав получаемого лекарственного сырья.

1.3 Основные метаболиты рода *Iris* L.

Виды рода *Iris* L. являются источниками большого перечня вторичных метаболитов. Основные вещества, обнаруженные в экстрактах *Iris* L. – это фенольные соединения, такие как изофлавоны, простые фенолы и ксантоны; неполярные соединения со стероидной и изопреновой (изопреноидной) структурой; алкалоиды [3,17]. Другие классы вторичных метаболитов содержатся в достаточно малых количествах и считаются минорными [18]. Для детального понимания метаболизма растения, и, как следствие, эффективного его регулирования требуется контроль первичных метаболитов. Важными первичными метаболитами являются аминокислоты и карбоновые кислоты, которые участвуют в метаболических путях растения и являются прекурсорами в синтезе действующих веществ растений [19,20]. Однако, работ по данной теме в отношении лекарственного биотехнологического растительного сырья крайне мало.

Из растений рода *Iris* L. наиболее изучены виды *Iris lactea* L., *Iris dichotoma* L., *Iris germanica* L., *Iris pseudacorus* L., *Iris japonica* L. [3,21–24]. Хроматографическими и другими физико-химическими методами анализа показано, что ирисы имеют в своём составе как общераспространённые соединения, такие как кверцетин, апигенин, мангиферин, рутин, коричная, кумаровая, феруловая кислоты, так и более редкие или уникальные структуры, например, α -, β - и γ -ираны, иридоиды, текторигенины, иристекторигенины, ирифлогенины [25–28].

В составе эфирного масла ирисов α - и γ -ираны обуславливают характерный запах и цвет, что делает его одним из самых дорогих масел, представленных на рынке [17,29]. Более того, эфирное масло демонстрирует высокую противобактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [17]. В экстрактах *Iris* L. текторигенин обуславливает высокую противомикробную [30] и антиоксидантную [31] активность, а также в комплексе с иридином и иригенином имеет потенциал в борьбе с раком [32,33]. Однако, поскольку виды ириса демонстрируют значительные отличия в

фитохимическом составе сырья, изучение метаболитов растений рода *Iris* L., а также установление физиологической активности соединений всё ещё является актуальной задачей.

1.3.1 Фенольные соединения *Iris* L.

Вторичные метаболиты фенольной природы являются ароматическими соединениями, содержащими как минимум одну гидроксильную группу. Их многообразие обусловлено модифицированием молекул. Чаще всего фенольные соединения существуют в форме гликозидов, что повышает их растворимость в воде и, как следствие, биодоступность. Также распространённые процессы образования производных полифенолов – это метилирование и метоксилирование [18].

Большой интерес представляют флавоноиды благодаря их широкому фармакологическому спектру действия. Известно антиагрегирующее, антиоксидантное, антиатеросклеротическое, а также противовирусное и противобактериальное действие веществ этого класса. В эту группу фенольных соединений входит более 4500 соединений. Их структура включает в себя два ароматических кольца и трёхуглеродный фрагмент, а разнообразие флавоноидов обусловлено числом и положением гидроксильных и кето-групп, положением ароматического кольца (рис. 1).

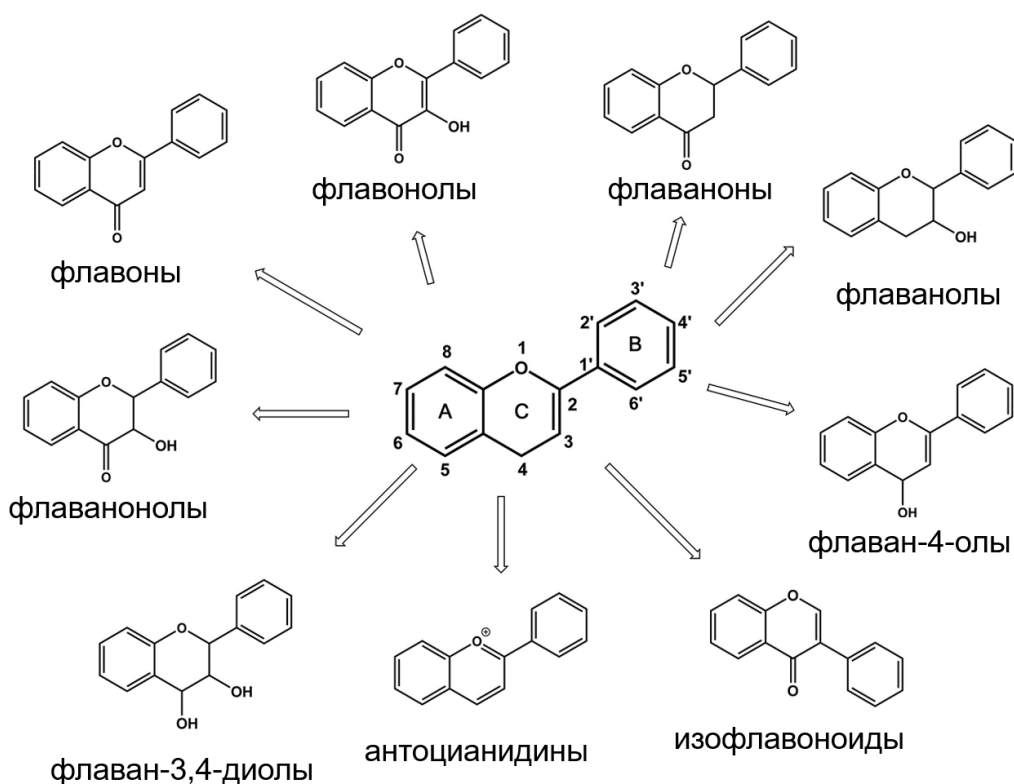


Рис. 1. Классификация флавоноидов по строению углеродного скелета, присутствию и положению функциональных групп

Они обладают высокой антиоксидантной активностью, что связывают с наличием одновременно двух механизмов инактивации свободных радикалов [34]. Один из них – образование стабильных комплексов с ионами металлов, являющихся прооксидантными катализаторами, а второй – непосредственное взаимодействие со свободными радикалами [34] (рис. 2).



Рис. 2. Окисление кверцетина свободным радикалом с образованием хинона

Метаболиты ирисов являются производными большого перечня как мооядерных фенолов, так и изофлавонов, флавонов, ксантонов и других групп веществ. Из важнейших фенольных кислот в видах *Iris L.* обнаружены *транс-*

коричная, кофейная, феруловая, галловая, *n*-кумаровая, ванилиновая, а также *n*-гидроксibenзойная и протокатеховая кислоты [35]. Из флавоноидов в природном сырье найдены 7-О-гликозиды текторигенина, метоксилированные флавоноиды иристекторигенин А и В, их гликозиды иристекторин А и В, О-гликозиды тригидроксифлавонов и С-гликозиды, такие как витексин и изовитексин, метокси- и гликозидные производные апигенина, свертисин [4,36–40]. В работах проводят анализ биологической активности как индивидуальных соединений *Iris L.*, таких как изонигрицин, изоирисолидон, мирицетин, так и всего экстракта [41–45].

1.3.1.1 Пробоподготовка растительных объектов к хроматографическому и электрофоретическому анализу для изучения профилей фенольных соединений

Важным этапом при исследовании растительных объектов является стадия пробоподготовки, основная ее цель – максимальное извлечение биологически активных веществ из сырья. Подготовка растительных объектов к анализу отличается крайне широким перечнем применяемых подходов. Само сырьё может быть как закуплено у конкретного поставщика, так и собрано самостоятельно в определённых регионах. После сбора обычно сырьё высушивают, в некоторых работах проводят немедленную консервацию биологически активных веществ жидким азотом для подавления эндогенного метаболизма [44]. Далее сырьё измельчают, для этого применяют как пестик со ступкой, так и специальные мельницы, а затем его могут фракционировать при помощи специальных сит.

Следующим этапом пробоподготовки является стадия экстракции, которая необходима для извлечения определяемых веществ из природных объектов. Многообразие подходов к экстракции фенольных соединений показано в таблице 1.

Таблица 1. Подготовка проб растительных объектов к анализу хроматографическими и электрофоретическими методами

Объект анализа	Аналиты	Условия извлечения	Источник
<i>Iris hungarica L.</i> <i>Iris sibirica L.</i>	Мангиферин	2 г сырья (фракция 2-10 мм) заливали 50 мл 60% этанола, экстрагировали в колбе с обратным холодильником при 80-90°C в течение 1 часа; затем повторили с той же порцией сырья 2 раза по 30 минут.	[46]

		Экстракты объединяли, выпаривали при 80-90°C и растворяли в 15 мл 70% этанола	
<i>Senna siamea</i> <i>Distemonanthus benthamianus</i> <i>Harrisonia abyssinica</i> <i>Pycnanthus angolensis</i>	Фенольные кислоты, флавоноиды, катехины	5 г сырья на 100 мл этилацетата (метанола), оставили на ночь при комнатной температуре. Экстракт сконцентрировали в ротационном испарителе при 40°C.	[47]
<i>Hysopppus cuspidatus</i>	Фенольные кислоты и их производные	2 г заливали 20 мл 70% этанола, затем нагревали при 85°C с обратным холодильником в течение 1 часа. Экстракцию проводили дважды, полученные извлечения объединяли.	[48]
<i>Phellodendron amurense</i> <i>Rheum palmatum</i> <i>Cudrania tricuspidata</i> <i>Citrus recutilata</i>	Антрахиноны, алкалоиды, флавоноиды	1) Пробирку с 0,1 г образца, 6 мл метанола и 200 мкл 37% HCl нагревали до 70°C на водяной бане в течение 1 часа; экстракт фильтровали и высушивали в токе азота 2) Вials объёмом 10 мл наполняли наполовину суспензией измельчённого образца в 8 мл смеси метанол-вода 8:2 (v/v), затем нагревали до 70°C на водяной бане в течение 15 минут, экстракт фильтровали и высушивали в токе азота	[49]
<i>Ixora coccinea</i>	Флавоноиды, фенольные кислоты	1,5 кг корней извлекали 80% метанолом в течение 3 часов при 40°C. Супернатант анализировали.	[50]
<i>Citrus aurantium</i>	Флавоноиды	0,5 г сырья (65 меш) извлекали 50 мл метанола в конической колбе на 150 мл при помощи ультразвука (700 Вт, 40 кГц). Экстракт фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм.	[51]
<i>Kaempheria parviflora</i>	Метоксифлавоны	Высушенные корни дважды обрабатывали 95% этанолом в соотношении 1:5 в течение 72 часов при комнатной температуре. Экстракты объединяли, фильтровали и упаривали в ротационном испарителе	[52]
<i>Prunus avium</i>	Флавоноиды, антоцианы, антиоксиданты	1) 2,5 г сырья смешивали с 100 мл 0,1% раствора соляной кислоты в 80% метаноле и перемешивали в гомогенизаторе в течение 10 с (735 об в мин). Образец помещали в систему микроволновой экстракции и воздействовали излучением мощностью 200 Вт в течение 4 мин. Экстракт фильтровали и хранили при -20°C. 2) 2,5 г сырья смешивали с 100 мл 0,1% раствора соляной кислоты в 80% метаноле и перемешивали в гомогенизаторе в течение 10 с (735 об в мин). Образец помещали в систему ультразвуковой экстракции на 5 минут. Экстракты фильтровали и хранили при -20°C	[53]

Как видно из таблицы 1, что условия подготовки проб растительных объектов к анализу в литературе варьируются крайне широко: наиболее распространенные подходы – это мацерация и перколяция. Традиционными экстрагентами фенольных соединений являются спирты; в работах используют метанол, этанол и водно-этанольные смеси, реже этиацетат или ацетон. Однако в выборе прочих параметров не наблюдается какая-либо закономерность: фракция (размер частиц) сырья зачастую не описывается; соотношение массы сырья к объёму экстрагента колеблется от 1:1 до 1:60; соотношение объёмных частей растворителей в экстрагенте начинается от 50% и заканчивается чистыми растворителями; кратность экстракции зачастую ограничивается на трёх, однако в целом количество повторов непостоянно; для извлечения дополнительно воздействуют микроволнами, ультразвуком, переводят экстрагент в сверхкритическую фазу, используют проточные системы или аппарат Сокслета; в зависимости от всего вышеописанного длительность процесса варьируется от 15 минут до суток и недель.

После проведения извлечения некоторые исследователи выпаривают экстрагент и перерастворяют экстракт в растворителе, более совместимым с выбранным типом хроматографии. Например, при использовании ВЭЖХ экстрагент заменяют на метанол или ацетонитрил.

Показана высокая эффективность и экспрессность извлечения полифенолов с использованием ультразвуковой экстракции [53,54]. Ультразвук ускоряет высвобождение веществ, содержащихся в растительном сырье, за счет разрушения клеточной стенки, ускорения массопереноса и облегчения доступа растворителя к содержимому клетки [55]. Кроме того, извлечение полифенолов с использованием ультразвука характеризуется меньшей деградацией аналитов по сравнению с используемыми ранее подходами.

В последние годы также большой интерес вызывает применение метода сверхкритической флюидной экстракции для извлечения биологически активных соединений из природных объектов [56,57]. Благодаря использованию сверхкритического флюида в качестве растворителя, обладающего низкой вязкостью и высокой диффузионной способностью, процесс извлечения происходит быстро и эффективно. Кроме того, углекислый газ, часто используемый для экстракции, обладает значительными преимуществами, такими как нетоксичность,

доступность и легкость удаления из экстракта, что может устранить проблему аллергии, вызванную органическими растворителями [58].

Можно выделить основные факторы, влияющие на степень извлечения полифенолов из растительных объектов – это природа и концентрация растворителя, температура и время экстракции, соотношение сырья-экстрагент. В подавляющем большинстве публикаций не указывается какое-либо обоснование выбранных условий; изредка указывается литература, откуда они были заимствованы. Однако, правильный выбор условий пробоподготовки исследуемых объектов является ключевым моментом в аналитической химии при анализе сложных многокомпонентных смесей в целом и в фитохимическом анализе в частности.

Решением проблемы выбора условий может выступить использование дизайна эксперимента – подхода к исследованию с применением математического аппарата статистики, позволяющего сделать однозначные выводы о полученном результате.

1.3.1.2 Определение фенольных соединений хроматографическими методами

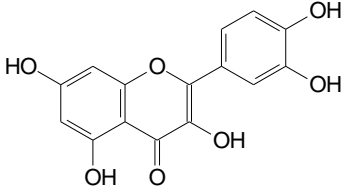
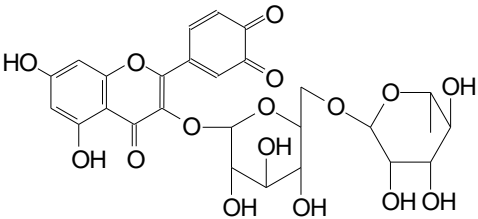
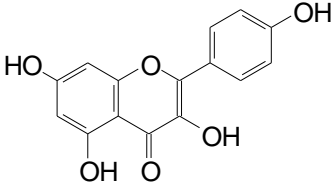
В настоящее время в Государственной Фармакопее РФ среди метаболитов лекарственного растительного сырья регламентируется определение лишь дубильных соединений и эфирномасличной фракции [59,60]. При этом приведённые методики не предполагают детального анализа и направлены лишь на получение суммарных показателей. Определение индивидуальных флавоноидов и фенольных кислот в общей фармакопейной статье не описано в принципе, имеются лишь методики для конкретных растений. В работах по изучению растительного сырья широко распространена методика спектрофотометрического определения, основанная на методе Фолина-Чокальтеу или на получении комплекса с ионами алюминия Al^{3+} [61–65]. Однако, они так же не дают детальной информации о фитохимическом составе получаемого сырья и имеют сравнительно высокие пределы обнаружения.

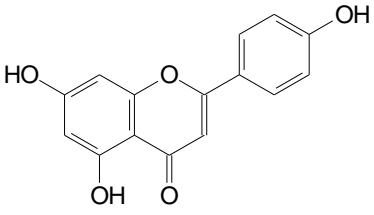
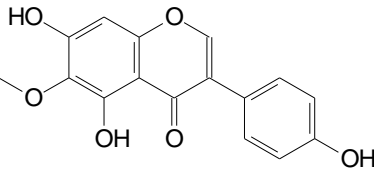
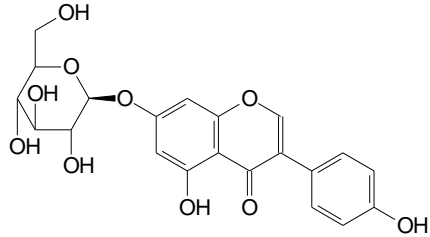
Хроматографические методы обеспечивают проведение экспрессного и более полного фитохимического анализа, идентификацию и количественное определение каждого отдельного соединения. При определении флавоноидов в лекарственных

растениях применяют в основном тонкослойную и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим и флюоресцентным детектированием [66–69]. Наибольшее распространение получила обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ). Анализ обычно проводится на колонках с модифицированным силикагелем с C_{18} алкильными группами, однако используют также и фазы с C_4 - C_{30} группами.

Флавоноиды и фенольные кислоты поглощают в ультрафиолетовой области, поэтому их обнаружение проводят с использованием спектрофотометрических детекторов [70,71]. Большинство производных бензойной кислоты имеют максимум поглощения в диапазоне длин волн 246-262 нм, кроме галловой и сиреневой кислот (271 и 275 нм, соответственно), а гидроксикоричные кислоты имеют максимумы в областях 225-235 нм и 290-330 нм (по данным, представленным в Reaxys). Флавоноиды имеют несколько характеристичных полос поглощения около 250 и 350 нм (табл. 2).

Таблица 2. Структурные формулы и характеристичные полосы УФ-поглощения наиболее распространённых флавоноидов в метаноле

Название	Формула	Максимумы полос поглощения λ_{\max} , нм	Источник
Кверцетин		253, 368	[72]
Рутин		257, 355	[73]
Кемпферол		267, 372	[74]

Апигенин		266, 335	[75]
Текторигенин		229, 264	[76]
Генистин		260, 323	[77]

Если целью анализа является идентификация полифенолов и определение их структуры, то применяют метод хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР [2,36,78].

За последние годы проведен целый ряд исследований фитохимического состава лекарственных растений, например, *Neorautaneria mitis* [79], *Zanthoxylum armatum* [80], *Iris germanica* [28], *Rosa canina* [81], *Perilla frutescens* [82], *Conocarpus erectus* [83] и другие. В данных работах разделение флавоноидов, отличающихся по полярности, проводят в градиентном режиме элюирования, где в качестве подвижной фазы (ПФ) используют водно-ацетонитрильные или водно-метанольные растворы с добавкой муравьиной кислоты (0,1 -1%).

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) для разделения биологически активных соединений в растительных объектах представляет большой интерес как экспрессная и более гибкая альтернатива методу ОФ ВЭЖХ. Разделение фенольных соединений обычно проводят нормально-фазовой ТСХ на алюминиевых или полимерных пластинах с закрепленным слоем силикагеля. В основе подвижных фаз, как правило, используют смеси растворителей, таких как гексан, толуол, этилацетат, ацетон или бутанол-1, а селективность и эффективность регулируют добавками воды, муравьиной и уксусной кислот [84–86].

Детектирование полифенолов проводят как на пластинках с флуоресцентным индикатором в виде зон без свечения, так и по собственной окраске некоторых соединений, либо с помощью дериватизации [86–89]. В качестве дериватирующего агента для флавоноидов наиболее распространен 2-аминоэтиловый эфир дифенилборной кислоты – продукты его реакции с флавоноидами и фенольными кислотами имеют интенсивную флуоресценцию разного цвета, позволяющую установить класс флавоноида [90–93].

1.3.2 Аминокислоты. Свободные аминокислоты и их роль в растении

Аминокислоты являются основными структурными единицами полипептидов и белков. Те, в свою очередь, выполняют широкий перечень функций: транспортную, сигнальную, иммунную, строительную, двигательную, ферментативную и многие другие. Кроме того, аминокислоты служат предшественниками для биосинтеза нейротрансмиттеров, порфиринов, полиаминов и других важных биологически активных веществ, являются главной формой запасаания и транспорта азота, помогающие растению как в росте, так и в защите [20]. Они участвуют в биосинтезе защитных соединений, а также перемещаются растениями либо от поражённых участков, либо к поражённым участкам [94,95]: например, обычный ваточник (*Asclepias syriaca* L.) выводит аминокислоты из поражённых листьев, а красный ваточник (*Asclepias incarnata* L.), наоборот, транспортирует в лист [96]. Есть сообщения о сигнальных и коммуникативных функциях аминокислот, которые связаны с обменом информацией с микробиотой корней [97].

На клеточном уровне аминокислоты имеют особые функции. Так, пролин действует как осмолит и сигнальная молекула для регуляции транспорта ионов, детоксикации ионов переходных металлов [98,99], регулируют внутриклеточный pH [100]; глутамин транспортирует азот и углерод между тканями, выступает одним из источников энергии для быстро делящихся клеток, является прекурсором в биосинтезе нуклеиновых кислот. Также аминокислоты, по-видимому, усиливают защитные свойства растительных веществ. В *Stereum complicatum* были сначала обнаружены, а затем и выделены гибридные соединения сесквитерпенов и α -аминокислот триптофана, валина, треонина и других [101].

Исходя из вышеизложенного в работах предлагается использовать профиль свободных аминокислот как маркер стресса растения и делать выводы о содержании вторичных метаболитов [102–105]. Таким образом, качественный анализ аминокислот в растительном сырье и сопоставление их содержания является важной информацией при выборе условий выращивания лекарственного сырья методами биотехнологии и его дальнейшего контроля.

1.3.2.1 Пробоподготовка растительных объектов к анализу хроматографическими и электрофоретическими методами для определения свободных аминокислот

Как и в случае с полифенолами, общей схемы подготовки пробы для извлечения аминокислот из растительных объектов не существует. Наиболее распространенным методом извлечения аминокислот из биологических материалов является жидкостная экстракция. В этом случае используют полярные экстрагирующие системы, чаще всего состоящие из воды с добавкой органических растворителей (ацетон, ацетонитрил, хлороформ или спирты) и кислот (5-сульфосалициловая кислота, хлорная кислота, трихлоруксусная кислота или 0,01 М HCl при pH 2,2) [106–112]. В описанных подходах сильно варьируются условия пробоподготовки, такие как температура экстракции, время процесса, способы модификации и другие параметры [106–110]. Введение добавки минеральной или органической кислоты в состав экстрагента позволяет повысить выход свободных аминокислот из растительных объектов, а кипячение в 6М HCl полностью гидролизует белки и высвобождает все аминокислоты [113,114]. Эффективным методом предварительной обработки проб и концентрирования аминокислот является твердофазная экстракция на различных сорбентах [115–118].

Аминокислоты являются полярными аналитами и большинство из них не имеют хромофорных групп, поэтому для их определения методом ОФ ВЭЖХ во многих работах получают флуоресцирующие производные аминокислот и проводят обнаружение с помощью флуориметрического и ультрафиолетового детекторов или детектора с диодной матрицей. Для этого осуществляют их дериватизацию в офф-лайн, он-лайн или ин-лайн режиме с использованием различных реагентов, таких как дансил (5-диметиламинонафталин-1-сульфонил хлорид), дабсил хлорид (4-

(диметиламино)азобензол-4-сульфонил хлорид), *орто*-фталевый альдегид отдельно и в сочетании 3-меркаптопропионовой кислотой, фенилизотиоцианат и 9-флуоренилметоксикарбонил хлорид [119–124]. Реакции с ними хорошо изучены и показывают стабильные и воспроизводимые результаты.

1.3.2.2 Определение аминокислот хроматографическими методами

Хроматографические методы анализа широко используются для анализа как протеиногенных аминокислот, так и непротеиногенных. Определение аминокислот без дериватизации проводят в условиях гидрофильной, ион-парной и ионообменной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического или какого-либо электрохимического детектирования [125–129]. Однако, наиболее распространенными подходами являются определения аминокислот в виде производных методом ОФ ВЭЖХ с ультрафиолетовым, флуориметрическим или масс-спектрометрическим детектированием с использованием в качестве подвижных фаз систем вода-метанол или вода-ацетонитрил с добавлением буферных растворов [119–123]. Значительная часть работ по изучению аминокислотного состава растительных объектов выполнены методом ОФ ВЭЖХ с офф-лайн дериватизацией и флуориметрическим детектированием (рис. 3) благодаря его высокой чувствительности, относительной доступности и возможности сочетания с другими детекторами.

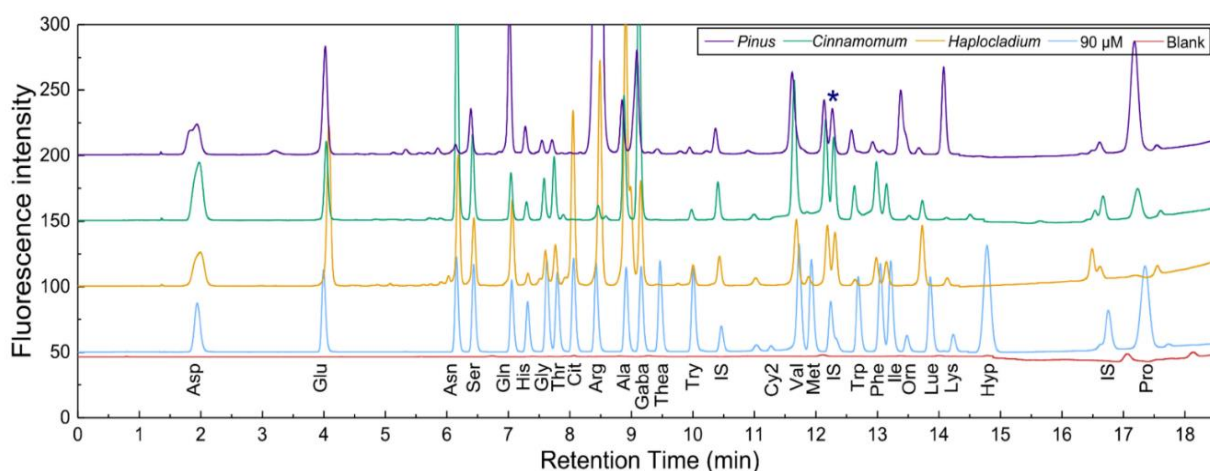


Рис. 3. Хроматографические профили производных 28 аминокислот раствора стандартов (90 мкМ) и растительных экстрактов *Haplocladium microphyllum*, *Cinnamomum camphora* и *Pinus massoniana Lamb*, полученные методом ОФ ВЭЖХ с

флуориметрическим детектированием, *off-line* дериватизация с о-фталевым альдегидом и 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом. Порядок элюирования аминокислот: глутаминовая кислота (Glu), аспарагиновая кислота (Asp), аспарагин (Asn), серин (Ser), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), треонин (Thr), цитруллин (Cit), аргинин (Arg), аланин (Ala), γ -аминомасляная кислота (Gaba), теанин (Thea), тирозин (Tyr), α -аминомасляная кислота (Aaba, внутренний стандарт, на рисунке IS), цистин (Cy2), валин (Val), метионин (Met), норвалин (Nva, внутренний стандарт, на рисунке IS), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), орнитин (Orn), лейцин (Leu), лизин (Lys), гидроксипролин (Hyp), саркозин (Sar, внутренний стандарт, на рисунке IS) и пролин (Pro); символом «*» отмечен ион аммония (NH_4^+) [130].

В некоторых работах [131–133] проводят пост-колоночную дериватизацию, поскольку нет другой возможности детектировать аналиты, однако офф-лайн или предколоночное проведение той же реакции положительно сказалось бы на аналитических показателях методики.

1.3.3 Органические кислоты. Короткоцепочечные органические кислоты и их роль в растении

Перечень органических кислот, выделяемых и поглощаемых растениями, достаточно широк – это щавелевая, винная, уксусная, лимонная, масляная, пропионовая, малоновая, молочная, янтарная, яблочная, фумаровая, адипиновая, хинная и другие кислоты [134–136]. В клетках растений они регулируют обмен ионами, поддерживают необходимый pH и осмотический потенциал, участвуют в биосинтезе защитных соединений и обеспечении стрессоустойчивости растений [137–139].

Крайне важную роль в осуществлении дыхания клеток и функционирования цикла Кребса выполняют анионы таких органических кислот, как ацетат, малат, сукцинат и цитрат. Недостаточная концентрация любой из этих кислот замедляет (или даже останавливает) данные процессы и, как следствие, весь связанный с ними вторичный метаболизм [140–142]. В работе [143] предлагают использовать профиль органических кислот как один из наиболее объективных показателей эффективного

протекания вторичного метаболизма в растениях рода *Malus*. Для некоторых органических кислот установлено и собственное защитное действие: так, сукцинат, выделенный из микроорганизмов, обладает противобактериальным, противогрибковым и нематоцидным действием, а α -кетоглутаровая кислота подавляет рост фитопатогенного грибка *Fusarium napiforme* и нематод *Ditylenchus destructor* [144]. Однако, механизм этого действия изучен недостаточно.

Таким образом, органические кислоты являются важными для фитохимического контроля метаболитами, поскольку их профиль может косвенно отражать состояние растения в целом и изменения во вторичном метаболизме в частности, а также позволяет напрямую контролировать содержание органических кислот с противомикробной активностью.

1.3.3.1 Пробоподготовка растительных объектов к анализу хроматографическими и электрофоретическими методами для определения органических кислот

Пробоподготовка растительного сырья при извлечении органических кислот, представленная в литературе, достаточно противоречива и не подкреплена теоретическим обоснованием, как и в случае полифенолов. Условия подготовки растительных объектов к определению органических кислот приведены в таблице 3.

Таблица 3. Условия извлечения органических кислот из растительных объектов

Объект анализа	Условия извлечения	Источник
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Сырьё-экстрагент 1:20 (г/мл), 90% метанол, 20 мин, 75°C, 1400 об/мин	[145]
<i>Cratogeomys formosum</i> <i>Antidesma</i> <i>ghaesebilla</i>	Сырьё-экстрагент 1:50 (г/мл), 2М HCl, 15 мин, 80°C.	[146]
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Сырьё заморожено; сырьё-экстрагент 9:1 (г/мл), 70% хлорная кислота, до оттаивания, -10°C; далее процедуры нейтрализации и перерастворения	[147]
<i>Aechmea fasciata</i>	Сырьё заморожено, сырьё-экстрагент 1:10 (г/мл), вода, время и температура не указаны	[148]

<i>Acacia xiphophylla</i>	Сырьё лиофилизировано, сырьё-экстрагент 1:50 (г/мл), 5% хлорная кислота, 4°C, время не указано, далее подготовка к анализу ГХ	[149]
<i>Adansonia digitata</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i> <i>Huphaene thebaica</i> <i>Tamarindus indica</i>	Сырьё-экстрагент 1:10 (г/мл), 70% этанол (объ.), гомогенизировано 5 мин 70 об/мин, далее обработка УЗ в течение 1 часа, 25°C	[141]
<i>Silene paradoxa</i>	Сырьё заморожено, сырьё-экстрагент 1:10 (г/мл), вода, извлечение в ступке при измельчении пестиком с охлаждением жидким азотом, время не указано	[150]

В качестве экстрагентов органических кислот и их солей используют метанол или этанол, их смеси с водой, а также растворы хлорной и соляной кислот (табл. 3). Проведение экстракции при пониженной температуре, по-видимому, позволяет сохранить действительные концентрации кислот при извлечении и исключить их превращения в метаболических циклах.

Известно, что в щелочных условиях лигнин и лигноцеллюлозы разрушаются, существенно облегчая экстракцию внутриклеточных компонентов [151–154]. Однако, работ по извлечению органических кислот из растительных клеток в щелочных условиях практически нет.

1.3.3.2 Определение короткоцепочечных органических кислот методами хроматографии и капиллярного электрофореза

Для определения органических кислот используют, как и жидкостную, так и газовую хроматографию. В первом случае разделение органических кислот обычно проводят методом ионообменной хроматографии с кондуктометрическим детектированием и ОФ ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования с рефрактометрическим, спектрофотометрическим и МС детектированием [155–159]. Подвижная фаза в данном случае представляет собой 0,1%-1% раствор неорганической кислоты, например, серной H_2SO_4 или фосфорной H_3PO_4 , либо буферную систему с низким значением рН. Анализ обычно занимает около 20 мин, но эффективность для органических кислот невысокая (рис. 4). Хотя метод ОФ ВЭЖХ широко используется для определения органических кислот, из-за высокой

полярности анализов наблюдается недостаточная селективность разделения, что затрудняет их определение в сложных природных объектах.

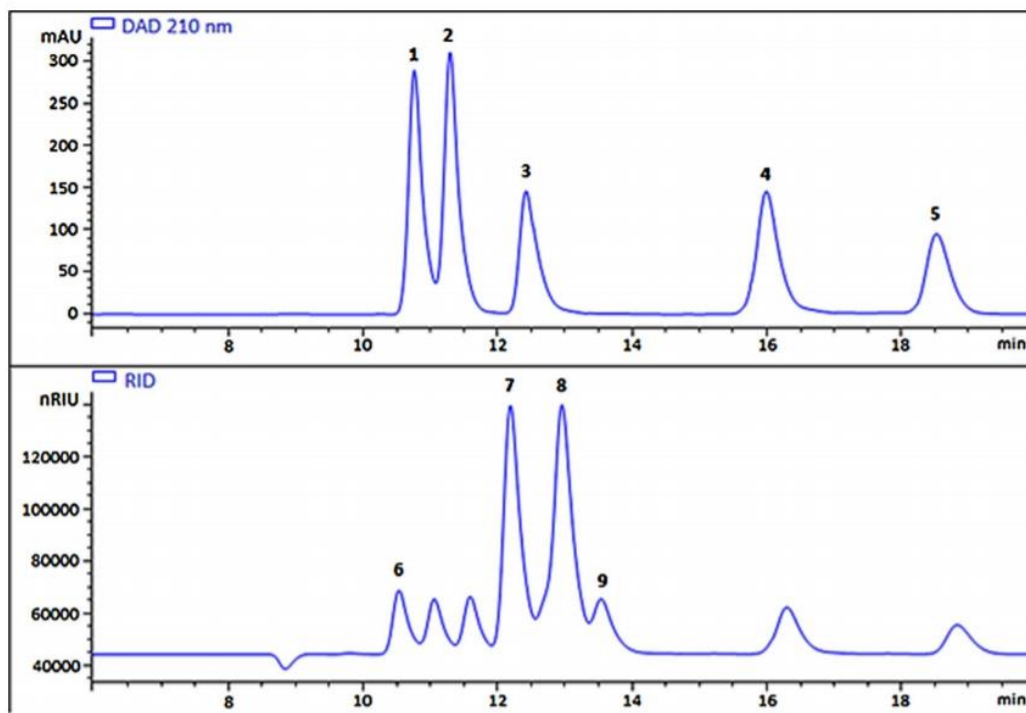


Рис. 4. Разделение короткоцепочечных органических кислот и углеводов (растворы стандартов) методом ионообменной ВЭЖХ с детектором на диодной матрице (детектирование при длине волны 210 нм) и рефрактометрическим детектором. Пики: 1- лимонная кислота, 2 – винная кислота, 3 – яблочная кислота, 4 – молочная кислота, 5 – уксусная кислота, 6 – мальтоза, 7 – глюкоза, 8 – фруктоза, 9 – рамноза. Условия ВЭЖХ: колонка Agilent Hi-Plex H (300 × 7,7 мм, 8 мкм), ПФ – 4 мМ H₂SO₄, изократический режим элюирования [155].

Для определения органических кислот методом ГХ используют капиллярные колонки с жидкой фазой на основе полиметилсилоксанов с 0-15% фенильными группами с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектированием [160–163]. Время анализа также составляет около 20 минут, однако для анализа короткоцепочечных кислот необходима предварительная стадия дериватизации (например, получение силильных производных или этерификация), что существенно увеличивает время анализа. Как правило, пределы обнаружения у газохроматографических методик ниже, чем в ВЭЖХ [164–166].

Альтернативным вариантом определения заряженных аналитов является метод капиллярного электрофореза. В условиях капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) при положительной полярности, т.е. при направлении электроосмотического потока (ЭОП) от анода к катоду, электрофоретическая подвижность аналитов будет направлена против направления ЭОП. В этом случае и время анализа будет чрезмерно большое, а часть анионов с высокой электрофоретической подвижностью может не достигать окошка детектора. Это существенным образом ограничивает выбор фонового электролита, который должен обеспечивать высокую скорость ЭОП, чтобы результирующая подвижность анионов была направлена в сторону детектора [167].

Стандартным подходом для определения органических кислот методом КЗЭ является использование условий с обращенным ЭОП с прямым или косвенным детектированием [168–171]. Для этого на поверхности кварцевого капилляра формируют положительное покрытие (динамическое или статическое); в результате в условиях КЭ направление ЭОП обращается и разделение анионов проводят при отрицательной полярности. Широкое распространение получило создание динамического покрытия путем введения в состав фонового электролита положительно заряженных ПАВ, в частности, солей цетилтриметиламмония. Перспективными направлениями являются применение для этих целей ионных жидкостей на основе имидазола и разработка стабильных статических покрытий [172–176]. В качестве фонового электролита используют слабо щелочные буферные растворы, такие как фосфатный и боратный, а также органические основания (диэтаноламин). В случае косвенного детектирования органических кислот в состав фонового электролита добавляют поглощающие добавки (бензойная кислота, 2,6-дикарбоксилат пиридиния, фталаты и др). Основное требование к выбору поглощающей добавки – анионы аналитов и поглощающей добавки должны иметь близкую подвижность. Иногда в состав ФЭ добавляют ионы кальция и магния (около 10 ppm) для повышения селективности разделения анионов органических кислот за счет обратимого образования хелатных комплексов [156,171,177–179]. Большим преимуществом метода КЭ является возможность увеличения чувствительности детектирования аналитов с помощью применения различных вариантов *on-line* концентрирования, таких как стэкинг с усилением поля, стэкинг с

водной пробкой, электростэкинг, изотахофоретическое концентрирование, свипинг. Их применение позволяет снизить пределы обнаружения органических кислот, что важно при анализе сложных природных объектов.

Стэкинг с усилением поля, один из наиболее широко используемых методов *on-line* концентрирования, основан на концентрировании ионов пробы за счет различия электрофоретических подвижностей аналитов в зоне пробы и зоне фонового электролита. Стэкинг реализуется в условиях, когда проводимость зоны пробы в капилляре ниже, чем у фонового электролита. При приложении напряжения к капилляру в зоне пробы возникает более сильное электрическое поле, чем в фоновом электролите. В результате ионы аналитов будут двигаться быстрее в зоне пробы и концентрироваться на границе раздела между пробой и фоновым электролитом. Ограничивает применение стэкинга эффект обратного давления и последующий *дестэкинг* – размывание зон пробы за счёт появления ламинарного потока [167].

Модификацией данного подхода является стэкинг с усилением поля с водной пробкой. В этом случае перед вводом пробы, растворенной в разбавленном буферном растворе, в капилляр вводится вода («водная пробка»). За счёт дополнительной разницы в электропроводности зон удаётся достигнуть увеличения степеней концентрирования аналитов, а также уменьшить влияние матрицы пробы [167].

1.4 Дизайн эксперимента в оптимизации условий пробоподготовки

Дизайн эксперимента успешно применяется как в скрининговых [180–182], так и в детальных [183,184] исследованиях. Его преимущества перед стандартным подходом в оптимизации условий путем последовательного перебора параметров в определенном диапазоне существенны, поэтому дизайн эксперимента всё чаще используется в работах последних лет [185–188].

Данные методы позволяют проводить оптимизацию по заданному количеству факторов *одновременно*, а также учитывают влияние всех факторов *одновременно*. В таком случае установленный максимум или минимум контролируемого параметра является достоверным, в то время как найденный экстремум при переборе факторов зависит от порядка их оптимизации. Данные математические подходы не только

позволяют получить более четкое представление о влиянии различных факторов на экстракцию, но и помогают определить область, в которой необходимо оптимизировать экстракцию.

Кроме того, при масштабных исследованиях дизайн эксперимента позволяет сократить количество экспериментов в 2, 4 и более раз. Существующие подходы к дизайну позволяют решать как задачи детальной оптимизации, так и поиска наиболее значимых факторов (или взаимодействий этих факторов) из выбранных ранее.

Дизайн эксперимента позволяет строить индивидуальные зависимости от каждого фактора и определять вид функции этой зависимости. При визуализации результатов широко используется построение *поверхностей отклика* – изображения зависимости оптимизируемого параметра от двух факторов (рис. 5).

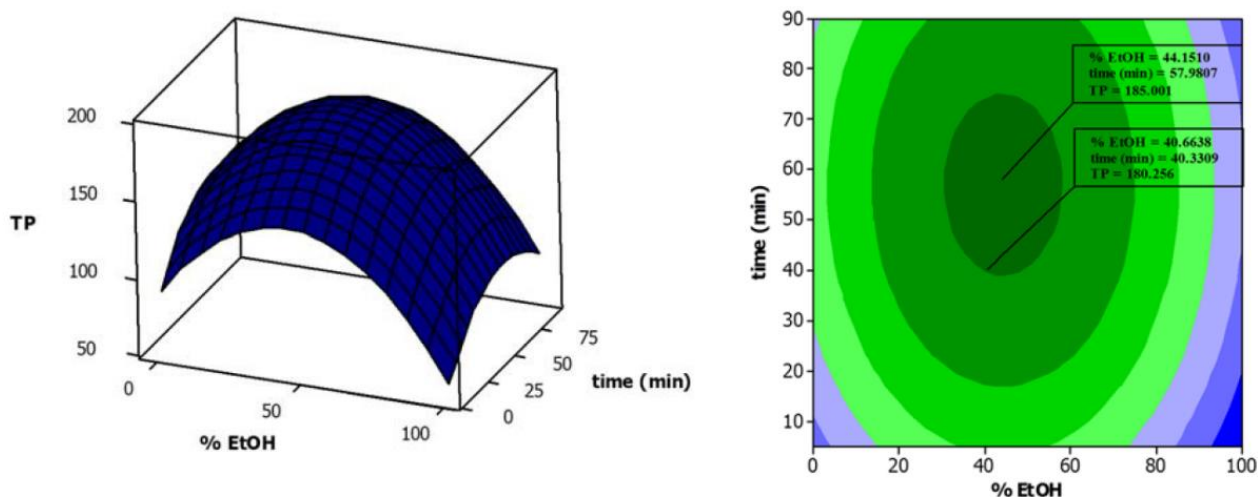


Рис. 5. График поверхности отклика (слева) и контурный график (справа), показывающие влияние концентрации этанола в экстрактах белого чая и взаимосвязь с антиоксидантной активностью, которая оценивалась по суммарному содержанию полифенолов [180].

Так, использование полнофакторного дизайна эксперимента позволило установить условия наилучшего извлечения фенольных соединений из семян тмина индийского (*Trachyspermum ammi*), кунжута индийского (*Sesamum indicum*), базилика душистого (*Ocimum basilicum*) и клоповника посевного (*Lepidium sativum* L.) [189]. В качестве факторов были выбраны содержание NaOH и метанола в добавляемых растворах, сами добавляемые объёмы, продолжительность и

температура процесса. Были установлены факторы (температура процесса и объём добавляемой щёлочи), которые наиболее сильно влияли на выход фенольных соединений (рис. 6), самые высокие показатели получены для семян базилика душистого.

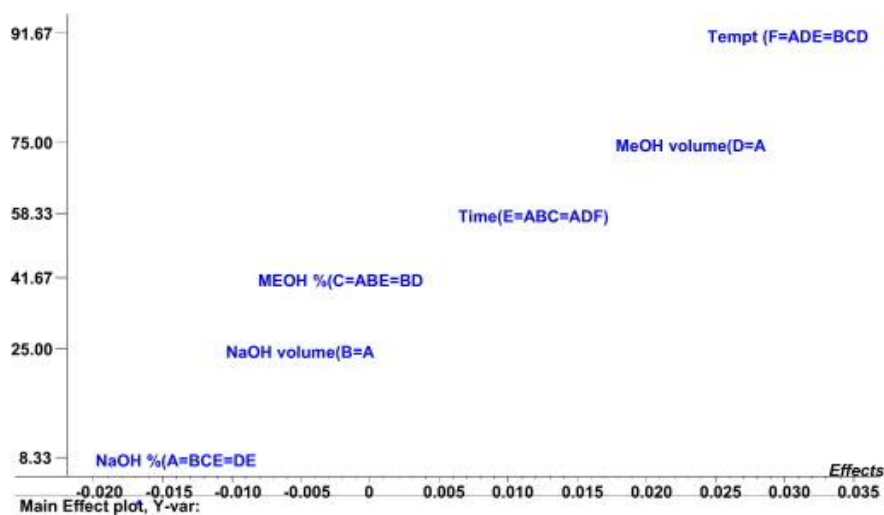


Рис. 6. График основных влияний на экстракцию полифенолов из семян базилика душистого [189].

В работе [190] использовали дизайн Бокса-Бенкена для оптимизации извлечения глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР) терпенов и гинкголевых кислот из гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.). Исследователи оптимизировали температуру и время ультразвуковой экстракции, а также содержание воды в экстрагенте. В качестве параметра отклика было выбрано содержание конкретных метаболитов гинкго двулопастного. Это позволило и установить влияние каждого фактора на извлечение каждого вещества (рис. 7) и определить наиболее значимый фактор – содержание воды в ГЭР.

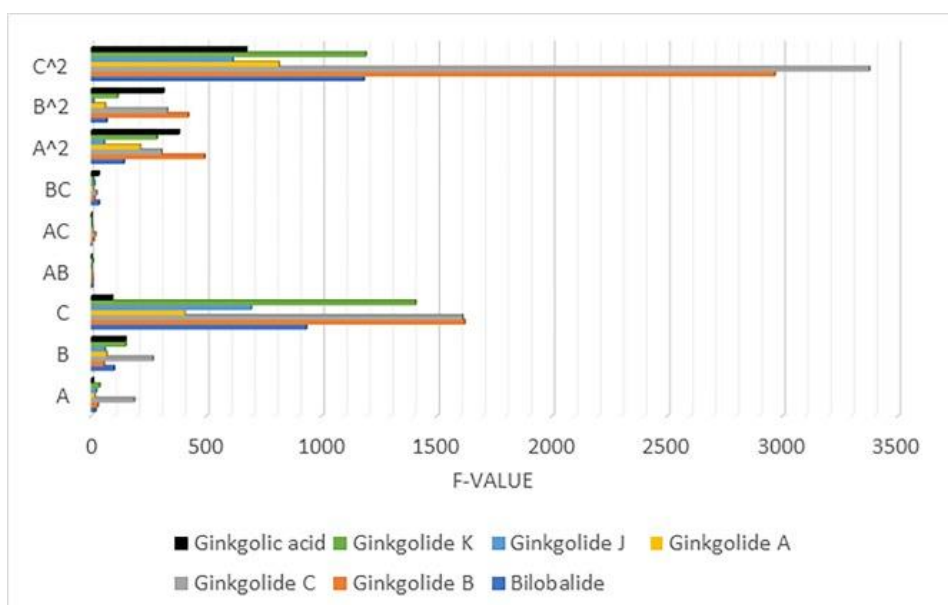


Рис. 7. Влияние времени экстракции (A), температуры экстракции (B) и содержания воды в ГЭР (C) на выход 6 гинкголидов, выраженное через F-value [190]

Таким образом, изучение лекарственного сырья *Iris sibirica L.* и *Iris ensata L.*, полученного методами биотехнологии, является актуальной задачей. Применение хроматографических и электрофоретических методов анализа обеспечит проведение более полного фитохимического анализа и идентификацию основных метаболитов растительного сырья. Следует отметить, что в литературе отсутствуют единые подходы к подготовке растительного сырья к анализу, что требует разработки оптимальных условий извлечения биологически активных веществ. Всё вышеизложенное позволит провести как целевое, так и нецелевое профилирование биологически активных веществ (полифенолы, аминокислоты, органические кислоты) в биотехнологическом сырье и выявить влияние фитогормонов.

Целью работы являлась разработка подходов к селективному извлечению фенольных соединений, аминокислот и органических кислот из биотехнологического сырья видов *Iris L.* с дальнейшим получением хроматографических и электрофоретических профилей биологически активных анализов и выявлением закономерностей их изменений в зависимости от содержания фитогормонов в питательных средах.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выбор условий селективного разделения биологически активных компонентов: флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС и ВЭТСХ, аминокислот методом ВЭЖХ-МС/МС, органических кислот методом КЭ-УФ.
2. Разработка регламента подготовки проб растительных объектов *Iris L.* для извлечения аналитов, включающая в себя выбор экстрагентов и выявление факторов, влияющих на эффективность экстракции аналитов.
3. Целевое и нецелевое профилирование биологически активных веществ *Iris L.* в выбранных условиях.
4. Идентификация фенольных соединений методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией.
5. Выявление закономерностей накопления определяемых биологически активных веществ в биотехнологическом сырье *Iris L.* в зависимости от гормонального состава питательной среды.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и реактивы

Компоненты подвижных фаз ВЭЖХ: деионизованная вода (получена на деионизаторе «АКВИЛОН Д 301», (Россия)); ацетонитрил (HPLC grade, Acros organics), муравьиная кислота (х.ч., «Неохим»);

Компоненты подвижных фаз ТСХ: метанол, этанол, этилацетат, вода, аммиак водный (30%), уксусная кислота, муравьиная кислота, бутанол, тетрагидрофуран, ацетон, толуол, гексан. Применяемые растворители имели класс ч.д.а.

Компоненты фоновых электролитов КЭ: борная кислота (Sigma-Aldrich), гидроксид натрия («ч.д.а.»), бензойная кислота (БК) («х.ч.»), цетилтриметиламмоний бромид («AppliChem»), диэтаноламин (ДЭА) («Biochem», «х.ч.»).

Реактивы для экстракции: метанол (Baker), этанол («ч.д.а.»), деионизованная вода (получена на деионизаторе «АКВИЛОН Д 301» (Россия)), соляная кислота («ч.д.а.»), петролейный эфир и гексан («Вектон», «ч.д.а.»).

Стандарты определяемых соединений. Полифенолы: кверцетин, рутин, нарингенин, кверцетин-3- β -D-гликозид и мангиферин («Sigma-Aldrich», 99-98%); *аминокислоты:* гистидин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутамин, серин, глутаминовая кислота, треонин, глицин, аланин, пролин, изолейцин, лейцин, норлейцин, аланин, пролин, валин, метионин, триптофан («Sigma-Aldrich»); *органические кислоты:* муравьиная кислота, уксусная кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, молочная кислота, щавелевая кислота (ч.д.а.);

Реактивы для дериватизации: дансилхлорид («Sigma-Aldrich»), 2-аминоэтиловый эфир дифенилборной кислоты (98%, «Acros Organics»), нингидрин (1-водный, хч), ПЭГ 400 (хч).

2.2 Оборудование

Хроматографический анализ полифенолов и аминокислот проводили на следующих жидкостных хроматографах: система ВЭЖХ Shimadzu LC-20

Prominence с диодно-матричным детектором; система УВЭЖХ Shimadzu LC-30 с тройным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометрическим детектором с электроспреей ионизацией (Maxis Bruker); система УВЭЖХ-МС/МС timsTOF Pro (Bruker Daltonics). Были использованы хроматографические колонки Luna C18 150 мм×2.0 мм, 5 мкм («Phenomenex»), Kinetex C18 (150×2,1 мм, 2,6 мкм) и Intensity Solo2 C18 column (100 x 2.1 мм, 1,8 мкм).

Хроматографический анализ полифенолов методом ТСХ проводили в стеклянных хроматографических камерах на пластинах с закрепленным слоем силикагеля на алюминиевой подложке ВЭТСХ-АФ-В-УФ («Sorbfil», 10 x 10 см) с последующим проявлением. Проявление полифенольных соединений проводили погружением в 1% раствор 2-аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты и последующим опрыскиванием 5% раствором ПЭГ 200 для фиксации окраски.

Электрофоретическое определение органических кислот проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ-105М» (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург) со спектрофотометрическим детектированием (дейтериевая лампа, рабочий диапазон длин волн 190-400 нм) и водным термостатированием (от +10 °С до +50 °С). В работе использовали кварцевые капилляры с внешним полиимидным покрытием внутренним диаметром 50 мкм, с эффективной длиной 75 см и общей длиной 85 см.

Для оптимизации экстракции фенольных соединений и аминокислот были составлены полнофакторные дизайны эксперимента с использованием программного обеспечения Minitab 19. Обработку экстрактов ультразвуком проводили в ультразвуковой термостатируемой ванне («Branson»).

Нагревание проводили на плитках с контролем температуры IKA RCT basic и в термостате LOIP LF 25/350-VS2. Центрифугирование проводили в настольной центрифуге ELMi CM-50.

2.3 Объект исследования

Объект исследования – интактное и биотехнологическое растительное сырьё *Iris sibirica* L. сорт Стерх и *Iris ensata* L. Растения-регенеранты микрклонально размножали и выращивали в условиях аэропоники в отделе биотехнологии растений Алтайского государственного университета.

2.4 Приготовление растворов

Для приготовления 50 мл исходного раствора 4 М NaOH растворяли навеску 8 г гидроксида натрия NaOH в 25 мл дистиллированной воды, затем раствор переносили в мерную колбу объёмом 50 мл и доводили до метки. Полученный раствор хранили в полипропиленовой пробирке 50 мл (Falcon).

Для приготовления 50 мл исходного раствора 1 М HCl к 30 мл дистиллированной воды добавляли 5,56 мкл концентрированной соляной кислоты, затем переносили в мерную колбу объёмом 50 мл и доводили до метки. Полученный раствор хранили в полипропиленовой пробирке 50 мл (Falcon).

Растворами NaOH и HCl доводили pH растворов и буферов до требуемых значений. При необходимости из исходных растворов готовили растворы меньших концентраций разбавлением.

2.4.1 Приготовление буферных растворов

Приготовление 0,3 М боратного буферного раствора pH 9,18

Для приготовления 50 мл исходного 0,3 М боратного буферного раствора с pH 9,18 растворяли навеску ($0,9300 \pm 0,0001$) г борной кислоты H_3BO_3 в 25 мл дистиллированной воды и доводили pH с помощью раствора 4М гидроксида натрия NaOH. Раствор фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм. Рабочие буферные растворы (10, 20 мМ) готовили разбавлением концентрированного раствора деионизованной водой.

Приготовление 20 мМ раствора бензойной кислоты

Раствор 20 мМ бензойной кислоты готовили растворением навески ($0,1221 \pm 0,0001$) г в 50,00 мл деионизованной воды при воздействии ультразвука. Воду для приготовления отбирали пипеткой Мора. Полученный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Whatman 0,45 мкм.

Приготовление 5 мМ раствора цетилтриметиламмония бромида

Раствор 5 мМ цетилтриметиламмония бромида готовили растворением навески ($0,0911 \pm 0,0001$) г в 30 мл деионизованной воды, затем доводили объём до 50 мл в мерной колбе.

Приготовление 0,2М раствора диэтанолamina

0,2 М раствор диэтанолamina готовили растворением навески ($0,7314 \pm 0,0001$) г в 30 мл деионизованной воды, а затем доводили объём до 50 мл в мерной колбе.

Все растворы после приготовления переносили в полипропиленовые пробирки объёмом 50 мл для хранения.

2.4.2 Приготовление растворов стандартов полифенолов и аминокислот

Растворы стандартов катехинов, кофеина, аминокислот получали растворением навесок соединений ($1,0 \pm 0,1$) мг в объеме (1 мл) 0,05 М соляной кислоты. Полученные растворы хранили при -18°C .

Растворы стандартов флавоноидов получали растворением навесок около $0,0020 \pm 0,0001$ г (точная навеска) в метаноле.

2.4.3 Приготовление раствора для проявления полифенолов и аминокислот в ВЭТСХ

Приготовление 1% раствора 2-аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты

Раствор 1% 2-аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты получали растворением навески 250 мг 2-аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в метаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл, объём доводили до метки растворителем и перемешивали раствор.

Приготовление раствора макрогола 400

Раствор макрогола 400 получали растворением навески массой 1,25 г в метаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл, объём раствора доводили метанолом до метки и перемешивали раствор.

2.5 Методы исследования

2.5.1 Условия выращивания *Iris sibirica* и *Iris ensata* методами биотехнологии

Питательные среды готовили по прописи Мурасиге-Скуга [191], содержащие 30 г/л сахарозы, мезоинозит, витамины: никотиновую кислоту, пиридоксин, тиамина гидрохлорид. В ходе этапа введения в культуру добавляли 3 мкМ α -НУК (α -нафтилуксусной кислоты) и 8 мкМ 6-БАП (6-бензиламинопурина), на этапе микроразмножения добавляли от 1 мкМ до 10 мкМ 6-БАП с добавкой L-глутамина и аденинсульфата в количестве 100 мг/л; каждый вариант питательной среды дополнительно был приготовлен с добавкой 1 мкМ α -НУК. Среда разливали в пластиковые контейнеры (по 30 мл) или культуральные флаконы (по 10 мл) [16]. Автоклавировали приготовленные среды в течение 20 мин при температуре 120 °С. Экспланты культивировали в условиях 16/8 ч (свет / темнота) при 24-26 °С [16].

Для получения аэропонного сырья растения-регенеранты культивировали в течение трёх месяцев в аэропонной установке, разработанной в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» Ю.Ц. Мартиросяном и коллегами. Модуль установки состоит из трех ярусов, на каждом ярусе одновременно можно высадить и вырастить от 92 до 366 растений, технологическая площадь 0,98 м², освещенность 35 кЛк, потребляемая мощность 3 кВт*ч. Выращивание растений на аэропонной установке проводили в культивационном помещении, оборудованном контрольным климатическим блоком. Водообеспечение и минеральное питание растений осуществлялось путем периодического впрыскивания питательного раствора (под давлением 5 атм), орошающего корневую систему растений. В паузах между подачей раствора происходила аэрация корней. Система обеспечена автоматическим управлением технологического процесса подачи питательного раствора, режимов аэрации корневой системы, длительности и цикличности светового периода, поддержания необходимой температуры и влажности в культивационном помещении. Необходимым условием работы аэропонной установки являлся постоянный воздухообмен - минимальное значение составляет 5000 м³/час. Оптимальная

температура роста ириса 26–28 °С. Относительная влажность должна составлять 65–80%. Очищенное и отсортированное сырьё высушивалось по методике Музычкиной Р.А. и коллег сразу после сбора рассыпая тонким слоем [16].

2.5.2 Условия определения полифенолов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрическим детектированием

Условия определения фенольных соединений методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ-МС: подвижная фаза: 0,1 % HCOOH в ацетонитриле и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, градиентный режим элюирования (таблица 5), скорость потока: 0,3 мл/мин, объем пробы: 10 мкл. Диодно-матричное детектирование (диапазон длин волн 190 – 800 нм); обработка результатов – при длине волны 280 нм. Параметры квадрупольного времяпролетного МС/МС детектирования: электрораспылительная ионизация аналитов при положительной и отрицательной полярности, напряжение на капилляре +4,5 кВ (при положительной полярности) и -3.5 кВ (при отрицательной полярности), скорость распыляющего газа (азота): 3 л/мин, скорость потока и температура осушающего газа (азота) - 6 л/мин, 220°C, диапазон масс: m/z от 100 до 1000.

Условия разделения флавоноидов методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием: раствор пробы (смесь стандартов или экстракт растительного сырья) объемом 10 мкл наносили на стартовую линию ВЭТСХ пластинки на нагревательном столике при температуре 40°C. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, предварительно уравновешенную в течение 10 мин подвижной фазой этилацетат/вода/муравьиная кислота/уксусная кислота (лед) (9/2,5/1/1, по объему). Когда фронт подвижной фазы достигал 8 см, пластинку вынимали и высушивали в течение 5 мин на нагревательном столике при 90°C, затем теплую пластинку сразу обрабатывали раствором дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира методом опускания в раствор реагента, а затем раствором макрогола 400. Пластинку сушили на воздухе в течение 30 мин и обнаружение производных полифенолов проводили в УФ свете денситометра при длине волны 365 нм.

2.5.3 Условия определения аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрическим детектированием

Условия хроматографического определения дансильных производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ-МС: ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным (диапазон длин волн 190 – 800 нм) и МС детектированием. Подвижная фаза: 0,1 % HCOOH в ацетонитриле и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты. Градиентный режим элюирования (табл. 4). Скорость потока: 0,4 мл/мин. Объем пробы: 2,5 мкл. Параметры квадрупольного времяпролетного МС/МС детектирования: электрораспылительная ионизация аналитов при положительной полярности, напряжение на капилляре +4,5 кВ, скорость распыляющего газа (азота): 3 л/мин, скорость потока и температура осушающего газа (азота) - 6 л/мин, 220°C, диапазон масс: m/z от 100 до 1000. Детектирование аминокислот проводили по молекулярному иону [M+H]⁺ (табл. 5)

Таблица 4. Условия градиентного режима элюирования производных аминокислот методом ВЭЖХ-МС

Градиентный режим при разделении фенольных соединений		Градиентный режим при разделении аминокислот	
Время, мин	Фаза В, %	Время, мин	Фаза В, %
0	3	0	5
1	3	1	5
17	25	15	95
32	55	18	5
32,50	90	22	5

Таблица 5. Значения масс молекулярных ионов дансильных производных аминокислот ([M+H]⁺)

Аминокислота	Время удерживания, мин	[M+H] ⁺ , m/z
His	4,36	389,1271
Arg	4,94	408,1691
Asn	5,04	366,1108
Gln	5,37	380,1253
Ser	5,69	339,0995
Glu	5,96	381,1103
Asp	5,96	367,0945

Thr	6,31	353,1152
Gly	6,52	309,0892
Ala	7,07	323,105
Pro	8,53	349,1204
Val	8,85	351,1363
Met	8,91	383,1088
Trp	9,33	438,1466
Phe	9,96	399,1358
Ile	10,15	365,1515
Leu	10,35	365,1519
Nle	10,68	365,1518
Tyr	16,06	648,1811
Sarcosine	7,99	323,1046

2.5.4 Условия электрофоретического разделения анионов органических кислот

КЗЭ с косвенным УФ детектированием (230 нм), длина капилляра 75/65 см (общая / эффективная длина капилляра), фоновый электролит: 9 мМ диэтаноламин, 10 мМ бензойная кислота, 0,5 мМ бромид цетилтриметриламмония; гидродинамический ввод пробы: 45с×30мбар (1350 мбар×с), напряжение: -20 кВ; температура: 20⁰С; время анализа: 12 минут.

Условия on-line концентрирования органических кислот (стэкинг с водной пробкой и усилением поля): ввод водной пробки 6 с × 30 мбар (180 мбар × с), ввод пробы 45 с × 30 мбар (1350 мбар×с). Экстракт перед анализом разбавляли в 20 раз.

2.5.5 Подготовка растительных объектов к хроматографическому и электрофоретическому анализу

Получение растительных экстрактов для определения фенольных соединений

Растительное сырьё измельчали в фарфоровой ступке до состояния гомогенного порошка. Точную навеску полученного порошка (0,1000±0,0005) г помещали в круглодонную колбу объёмом 25 мл, добавляли 5 мл экстрагента и нагревали с обратным холодильником. Состав экстрагента, температура и время нагрева устанавливались согласно плану эксперимента (табл. 6). Полученный

экстракт переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили объем растворителем до 10 мл и фильтровали через шприцевой фильтр (Whatman, пористость 0,45 мкм). Полученный раствор анализировали методами ОФ ВЭЖХ.

Таблица 6. План эксперимента по поиску оптимальных условий извлечения фенольных соединений из растительных объектов

№	Температура T, °C	Время t, мин	Содержание метанола C, %
1	80	15	100
2	50	60	50
3	65	37,5	75
4	80	60	100
5	50	15	100
6	80	60	50
7	50	60	100
8	65	37,5	75
9	65	37,5	75
10	80	15	50
11	50	15	50

Получение растительных экстрактов для определения аминокислот

Растительное сырьё измельчали до состояния гомогенного порошка. Очную навеску полученного порошка ($0,1000 \pm 0,0005$) г помещали в круглодонную колбу, добавляли в колбу 5 мл экстрагента, затем добавляли аликвоту соляной кислоты и нагревали на водяной бане с обратным холодильником. Состав экстрагента, температура и время нагрева устанавливались согласно плану эксперимента (табл. 7). Полученный экстракт переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили объем растворителем до 10 мл и фильтровали через шприцевой фильтр (Whatman, пористость 0,45 мкм). С полученным раствором проводили операцию дериватизации и анализировали хроматографическими методами.

Таблица 7. План эксперимента по поиску оптимальных условий извлечения аминокислот из растительных объектов

№	Температура T, °C	Время, мин	Содержание метанола C, %	HCl, мкл
1	70	20	50	100
2	100	60	0	10
3	85	40	25	55
4	85	40	25	55
5	100	60	50	100
6	70	60	50	10
7	70	60	0	100
8	85	40	25	55
9	100	20	50	10
10	100	20	0	100
11	70	20	0	10

Получение растительных экстрактов для определения органических кислот

Извлечения органических кислот для дальнейшего анализа и сопоставления профилей были получены следующим образом: навеску сырья $0,0500 \pm 0,0001$ г переносили в стеклянную вialу объёмом 4 мл, добавляли 1 мл 0,1 М NaOH и оставляли в ультразвуковой бане на 1 час. Извлечение фильтровали через шприцевой фильтр 0,45 мкм (Whatman). Перед анализом экстракт разбавляли в 20 раз, центрифугировали (13000 об/мин, 5 мин), а затем переносили в автосемплер прибора.

2.5.6 Получение дансильных производных аминокислот

45 мкл экстракта или раствора стандартов аминокислот смешивали с 280 мкл боратного буферного раствора (pH 9.5) и 100 мкл дансилхлорида (7 мкг/мл в ацетонитриле), выдерживали 15 минут в термостате при 75°C, затем добавляли 20 мкл CH₃COOH (лед.) и центрифугировали 10 мин. Отбирали верхние 250 мкл слоя и помещали в вialы для анализа методом ВЭЖХ.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экстракты различных видов *Iris* L. благодаря значительному содержанию соединений фенольной природы, а также аминокислот – обладают противовирусным, противобактериальным, антиатеросклеротическим и другими эффектами. Это стимулирует создание на их основе новых растительных лекарственных препаратов.

Биологически активные вещества в течение многих десятилетий получали преимущественно из дикорастущих лекарственных растений. Однако такой подход со временем приводит к исчерпанию их природных популяций и ставит отдельные виды лекарственных растений на грань исчезновения. Новым и перспективным подходом для получения вторичных метаболитов растительного происхождения является использование биотехнологических методов, таких как гидропонные технологии и микроклональное размножение, имеющие потенциал для крупномасштабного выращивания растений и производства вторичных метаболитов. Следует подчеркнуть, что оптимизация технологии, то есть выявление возможности направленного биосинтеза растений на производство биологически активных веществ, требует разработки подходов эффективного контроля биотехнологического сырья.

Таким образом, *целью* работы являлась разработка подходов к селективному извлечению фенольных соединений, аминокислот и органических кислот из биотехнологического сырья видов *Iris* L. с дальнейшим получением хроматографических и электрофоретических профилей биологически активных аналитов и выявлением закономерностей их изменений в зависимости от содержания фитогормонов в питательных средах.

В качестве аналитов были выбраны биологически активные вещества трёх классов: флавоноиды, аминокислоты и органические кислоты. Именно наличие флавоноидов и их качественный состав обуславливают биологическую активность экстрактов лекарственных растений. Аминокислоты и органические кислоты участвуют в биосинтезе флавоноидов и имеют ряд важнейших функций в метаболизме растений. Они интересны как маркеры стресса растений, а также как прекурсоры синтеза вторичных метаболитов.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выбор условий селективного разделения биологически активных компонентов: флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС и ВЭТСХ, аминокислот методом ВЭЖХ-МС/МС, органических кислот методом КЭ-УФ.
2. Разработка регламента подготовки проб растительных объектов *Iris L.* для извлечения аналитов, включающая в себя выбор экстрагентов и выявление факторов, влияющих на эффективность экстракции аналитов.
3. Целевое и нецелевое профилирование биологически активных веществ *Iris L.* в выбранных условиях.
4. Идентификация фенольных соединений методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией.
5. Выявление закономерностей накопления определяемых биологически активных веществ в биотехнологическом сырье *Iris L.* в зависимости от гормонального состава питательной среды.

Разделение полифенолов из-за их гидрофобности обычно проводят методом ОФ ВЭЖХ. Для определения полярных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ, многие из которых не содержат хромофорных групп, требуется предварительное получение производных подходящим реагентом. В работе для определения аминокислот использовали дериватизацию с дансилхлоридом. Поскольку природные экстракты растительного сырья имеют сложный химический состав, условия для селективного разделения аналитов методом ОФ ВЭЖХ в сочетании с диодно-матричным детектированием (DAD) и методом тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS/MS) были оптимизированы с использованием реальных образцов (метанольных экстрактов растительного сырья *Iris L.*). При определении органических кислот преимуществами обладает метод КЭ, позволяющий проводить анализ быстрее, чем методами ВЭЖХ, без дополнительной стадии дериватизации.

3.1 Получение характеристических профилей фенольных соединений экстрактов листьев *Iris sibirica* L. методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

3.1.1 Выбор условий хроматографического разделения фенольных соединений метанольных экстрактов *Iris sibirica* L. и *Iris ensata* L.

Важнейшими биологически активными веществами растений *Iris* L. являются фенольные соединения, а именно агликоны флавоноидов и изофлавоноидов и соответствующие им гликозиды. На метанольных экстрактах листьев растительного сырья *Iris sibirica* L., основными компонентами которого являются полифенольные соединения, были найдены условия их селективного хроматографического разделения методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием (рис. 8). В качестве подвижной фазы выбраны 0,1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил с 0,1% добавкой муравьиной кислоты, элюирование проводили в градиентном режиме. На хроматограмме в области 14-28 мин обнаруженные компоненты соответствуют фенольным производным, т.к. имеют характерные полосы поглощения на 220 нм, 270-280 нм и 330-350 нм (рис. 8)

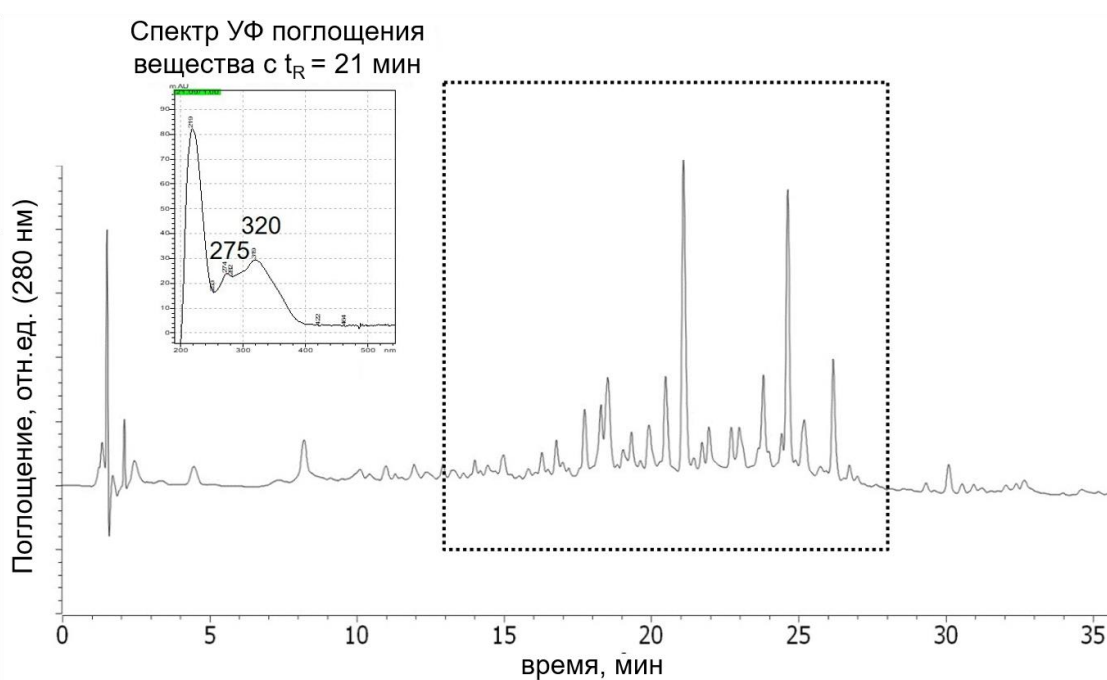


Рис. 8. Хроматографический профиль образца ириса сибирского *Iris sibirica* L. и спектр УФ поглощения одного из веществ в выделенной области. Условия: ОФ ВЭЖХ-DAD, колонка Luna C18 150 мм×2.0 мм, 5 мкм, ПФ: А - 0,1% HCOOH, вода, В – 0,1% HCOOH, ацетонитрил

Показано, что выбранные условия хроматографического разделения полифенолов подходят для определения наиболее распространённых флавоноидов в растительных объектах, таких как кверцетин, рутин, кверцетин-3-β-D-глюкозида и нарингенина (рис. 9).

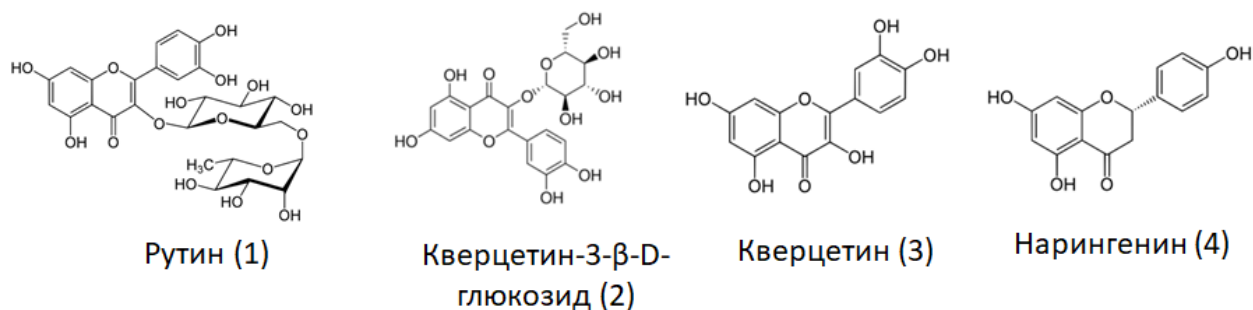


Рис. 9. Структурные формулы рутин, кверцетин-3-β-D-глюкозида, рутина, кверцетин и нарингенина

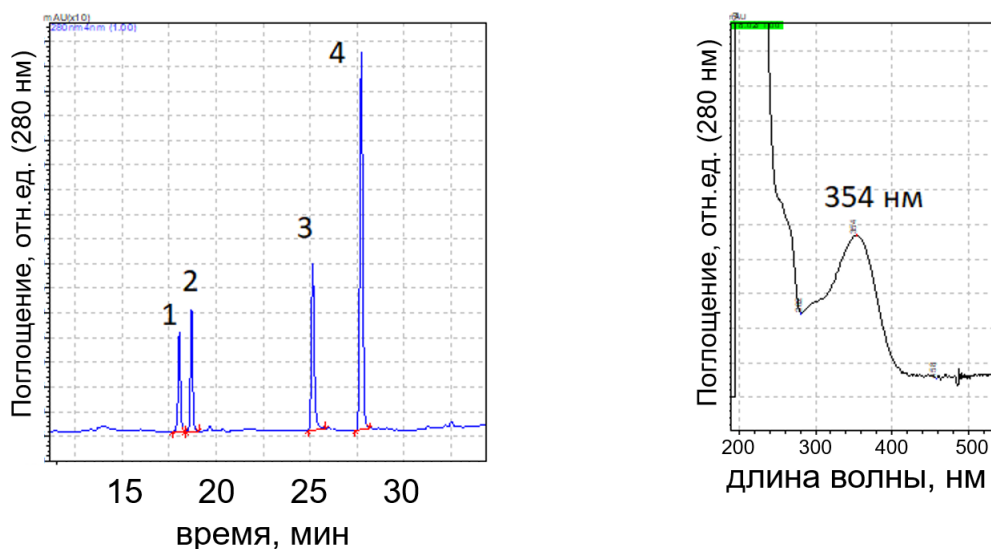


Рис. 10. Хроматограмма смеси стандартов рутина (1), кверцетина (2), кверцетин-3-β-D-глюкозида и нарингенина (2 мкг/мл) методом ОФВЭЖХ и УФ-спектр поглощения рутина. Условия: как на рис. 8

3.1.2 Поиск оптимальных условий извлечения фенольных соединений из *Iris sibirica* L.

На основании литературных данных выбраны наиболее значимые факторы, влияющие на извлечение фенольных соединений, и их диапазон варьирования: температура нагревания экстракта (50-80°C), время экстракции (15-60 мин) и

содержание метанола (50-100 %, по объему). Построен полнофакторный дизайн эксперимента, в котором три рассматриваемых фактора варьировались на двух уровнях (табл. 6). В план была включена центральная точка в трёх повторностях, в которых для каждого фактора было взято усреднённое значение для учета нелинейного влияния факторов. Всего проведено 11 экспериментов с отличающимися условиями извлечения фенольных соединений (табл. 6).

Степень извлечения контролировали по сумме площадей пиков с 14 по 28 мин (см. выделенную область на рис. 8). Построение математической модели и её последующий анализ показал, что наилучший результат достигается при учитывании взаимодействий выбранных факторов (уравнение 1), значение коэффициента детерминации $R^2=64,49\%$. Согласно построенному графику Парето (рис. 11), позволяющему оценить вклад факторов и их взаимодействие на извлечение фенольных соединений, наибольшее влияние оказывает взаимодействие температуры нагрева экстракта и времени нагрева. На рис. 12 приведены зависимости суммарной площади пиков флавоноидов от каждого из выбранных факторов. Для температуры нагрева максимум наблюдается вблизи 68°C , что соответствует температуре кипения метанола. Увеличение суммарной площади пиков наблюдается при увеличении содержания метанола в экстрагенте и уменьшении времени нагрева.

$$\begin{aligned} \text{Сумм. площадь} = & -1082560 + 14669 \text{ темп-ра} + 580087 \text{ время} + 2335 \text{ сод-е} \\ & \text{MeOH} - 733 \text{ темп-ра} * \text{время} + \\ & + 144 \text{ темп-ра} * \text{сод-е MeOH} - 126 \text{ время} * \text{сод-е MeOH} \quad (R^2=64,49\%) \quad (1) \end{aligned}$$

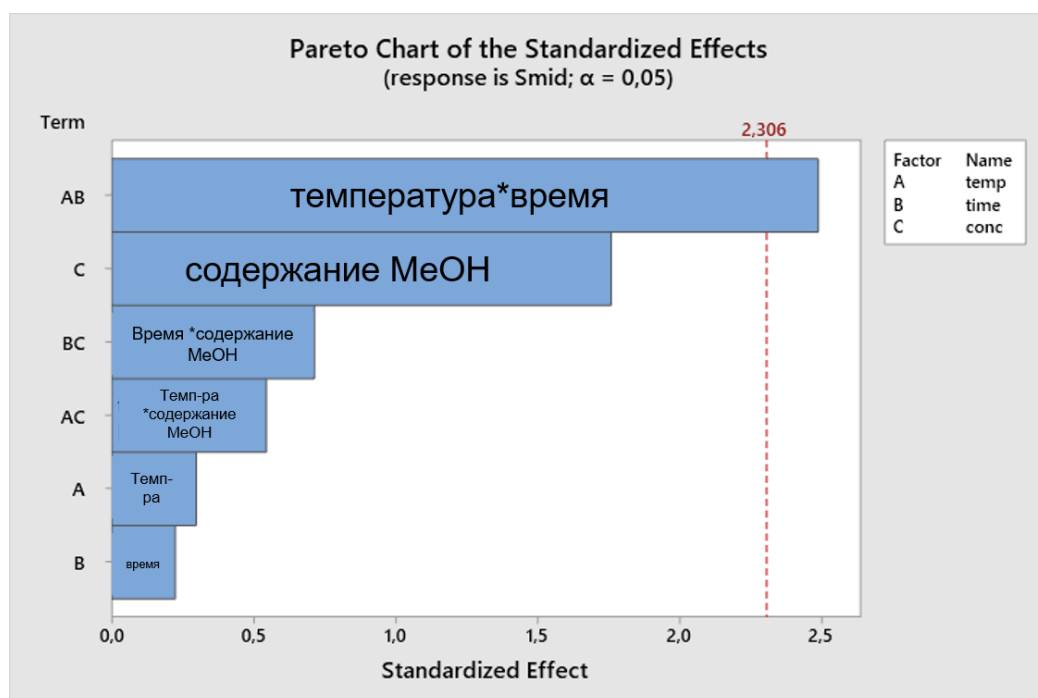


Рис 11. График Парето для факторов, влияющих на суммарную площадь пиков фенольных соединений (А – температура экстракции, В – время экстракции, С – концентрация метанола).

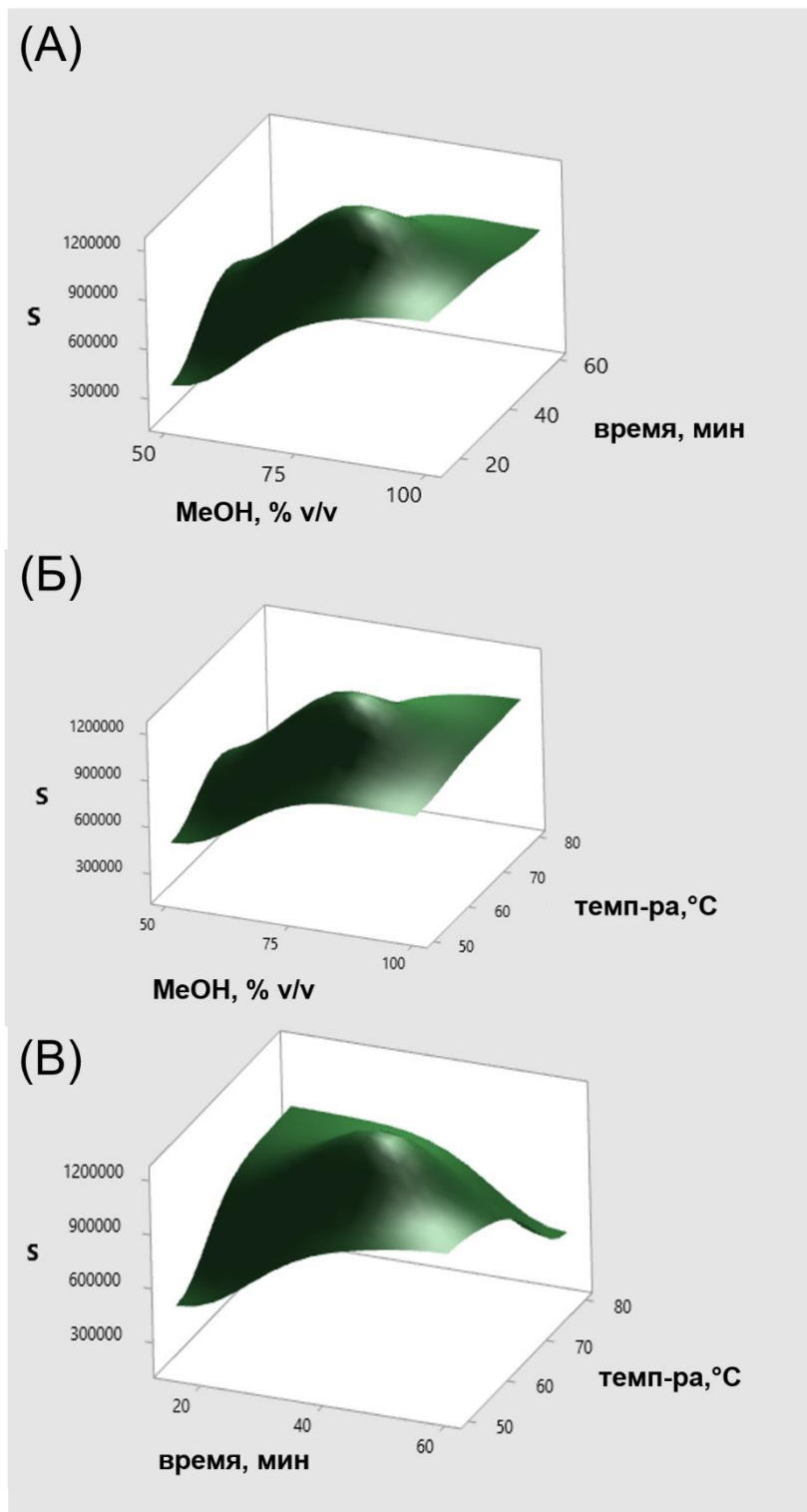


Рис 12. Зависимости суммарной площади фенольных соединений от содержания метанола и времени экстракции (А); содержания метанола и температуры экстракции (Б); времени и температуры экстракции (В)

Таким образом, максимальные степени извлечения достигаются при извлечении 100% метанолом при 65°C в течение 15 минут.

В некоторых работах показано, что существенное влияние на выход фенольных соединений оказывает воздействие ультразвука [192–195]. Поэтому независимо было изучено влияние обработки ультразвуком (15, 30, 45 и 60 мин) на экстракцию фенольных соединений в выбранных условиях. Обработка ультразвуком не оказывала существенного влияния на эффективность экстракции полифенолов (рис. 13), в дальнейших экспериментах ее не включали в подготовку образцов. Отмечено, что обработка ультразвуком значительно увеличивала выход флавоноидов в экстрактах, полученных не в оптимальных условиях, но площади пиков не превышали значений, полученных для оптимальных условий.

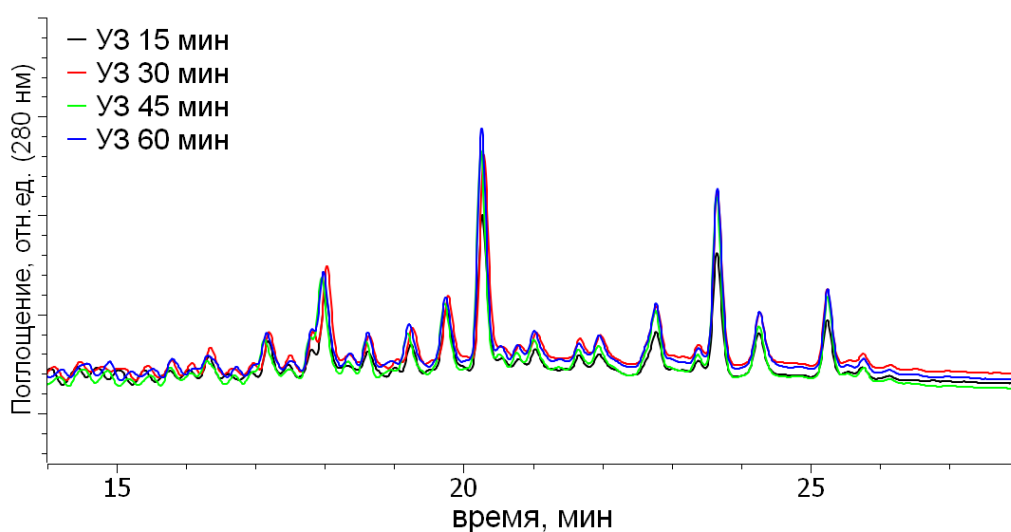


Рис. 13. Влияние ультразвука на экстракцию флавоноидов из *Iris sibirica* L. Условия ВЭЖХ: ВЭЖХ-DAD, 280 нм; градиентный режим; А - 0,1% HCOOH в воде, Б - 0,1% HCOOH в ацетонитриле

3.1.3 Получение хроматографических профилей флавоноидов *Iris sibirica* L. Идентификация флавоноидов методом хромато-масс-спектрометрии

В оптимизированных условиях были получены характеристические профили биотехнологического сырья *Iris sibirica* L., выращенного в аэропонике и на питательных средах с различным содержанием цитокинина 6-бензиламинопурина (6-БАП) и ауксина α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК). Содержание 6-БАП варьировалось от 1 до 10 мкМ, ауксина – 0 и 1 мкМ (рис. 14). Профили были получены методом ВЭЖХ-МС/МС-QTOF с электрораспылительной ионизацией при

положительной и отрицательной полярности. Растения, выращенные на средах с добавкой 1 мкМ 6-БАП, выступали в качестве контроля.

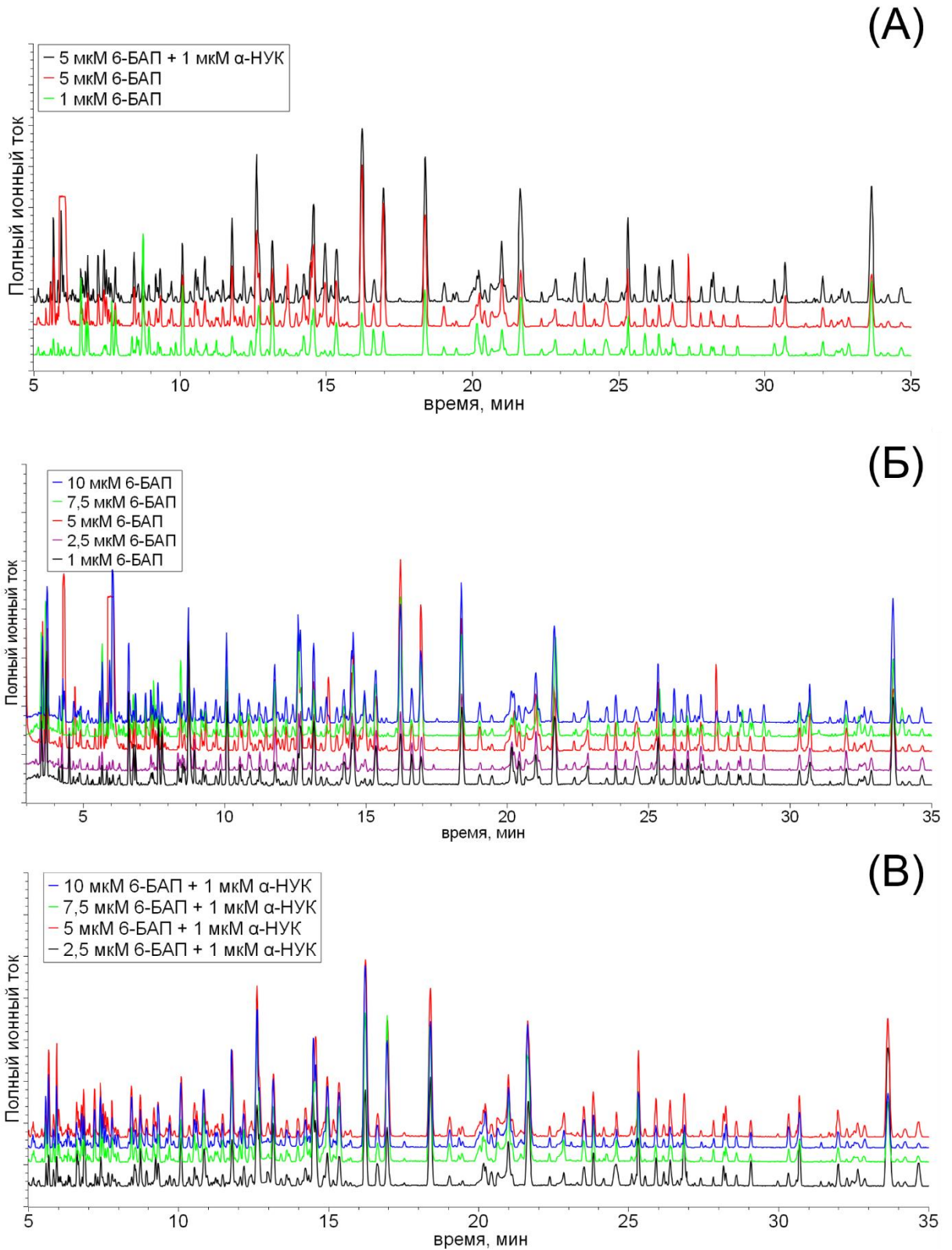


Рис. 14. Хроматографические профили фенольных соединений биотехнологического сырья, выращенного на питательных средах с различным фитогормональным составом. (А) – варьирование содержания ауксина α-НУК (0-1

мкМ) при концентрации цитокинина 6-БАП 5 мкМ, (Б) – варьирование содержания цитокинина 6-БАП (1-10 мкМ) без добавки ауксина α -НУК, (В) – варьирование содержания цитокинина 6-БАП в присутствии ауксина α -НУК

Обнаружено, что увеличение концентрации фитогормонов существенно влияет на содержание некоторых анализов. Например, добавление ауксина α -НУК в состав питательной среды увеличивает содержание неполярных фенольных соединений, элюируемых на 13-30 минутах, но в то же время пики полярных соединений уменьшаются. Изменение содержания цитокинина 6-БАП влияло практически на все анализы индивидуально.

Идентификацию основных фенольных соединений проводили с помощью базы данных растительных метаболитов Bruker. Однако большинство полифенолов были идентифицированы сопоставлением точных масс молекулярных ионов $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$, спектров MS^2 , значений времён удерживания и имеющихся литературных данных. Результаты представлены в таблице.

MS^2 спектры О-гликозидов флавоноидов содержат характеристичные сигналы фрагментарных ионов с разницей масс 162 Да, что соответствует потере одного или нескольких остатков гексоз. Потеря фрагмента массой 146 Да указывает на остатки рамнозы или кумаровых кислот (рис. 15). Для С-гликозидов флавоноидов в MS^2 спектре присутствуют характерные сигналы масс 90 Да и 120 Да.

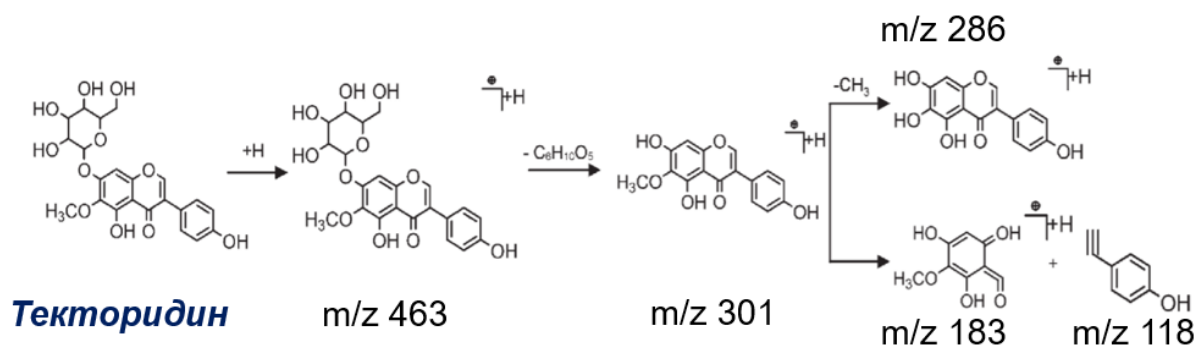


Рис. 15. Пути фрагментации текторидина при электрораспылительной ионизации в положительной полярности

Всего было обнаружено 37 метаболитов в экстрактах листьев *I. sibirica* L. (табл. 8). Они относятся к следующим группам: О-гликозиды флавоноидов, С-

гликозиды флавоноидов, изофлавоноиды и их производные, ксантоны, флавоны и флавоон-3-олы. Изофлавоноиды являются основной группой полифенолов, представленной в высоких концентрациях в экстрактах листьев *I. sibirica* L. Принимая остатки гексоз как остатки глюкозы, для нескольких соединений в скобках приведены их тривиальные названия.

Некоторые из обнаруженных аналитов были найдены и в других видах рода Ирис. Так, в работах [26,196] указано, что генистеин был обнаружен в *I. tectorum*, *I. aphylla*, *I. domestica*, *I. pseudacorus*; витексин в *I. albicans*, *I. chrysophilla*, *I. ensata*, *I. germanica*, *I. bollandica*, *I. laevigata*, *I. revoluta*, *I. rossi*; гиспидулин в *I. bungei*, *I. domestica*, *I. pseudacorus*; иристекторигенин А и его изомеры в корневищах *I. tectorum*, *I. dichotoma*. 7-метоксиапигенин, связанный с 7-О-гликозидом апигенина был обнаружен в *I. sisyrinchium* and *I. minutoaurea*, а дегидрированная форма дигидрокемпферола – кемпферол – была обнаружена в *I. tectorum*, *I. bracteata*, *I. douglasiana*, *I. germanica*, *I. innominata*, *I. prismatica*, *I. pseudacorus*, *I. tenax*. Катехины, галлокатехины были обнаружены в некоторых экстрактах, но, в целом, их присутствие в растениях рода *Iris* L. не было описано.

Таблица 8. Идентифицированные фенольные метаболиты в экстрактах листьев биотехнологического сырья *Iris sibirica* L.

	Название соединения	Время удерживания, мин	Брутто-формула	ММ, Да	m/z [M+H] ⁺	Δm/z (+)	MS/MS (+)	m/z [M-H] ⁻	Δm/z (-)	MS/MS (-)	Источник
Ксантоны											
1	1,3,6,7-тетрагидроксиксантон С – гексозид (мангиферин)	4.58	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	422.0844	423.0889	3.3	-	421.077 6	1.8	331, 301, 285, 271, 259	[196,197]
С-гликозиды флавоноидов											
2	Апигенин-С-гексозид (Витексин)	5.82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1051	433.1158	2.9	313, 283	431.094 4	2.4	311, 283, 117	Braker*
3	4'-О-метил-апигенин 8-С-гексозид	6.01	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.1207	447.1291	0.1	327, 297	445.113 6	2.5	325, 297, 282	[196]
4	Апигенин 8-С-(2''-гексозил)-гексозид	5.46	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.1579	595.1619	3.8	415, 313, 283	593.148 9	3.9	413, 311, 293	[196]
О-гликозиды флавоноидов											
5	О-дигексозид флавоноида	5.68	-	608	609.1988	-	447, 429, 327, 297	607.163 5	-	487, 445,427, 307, 292	-
6	Хризозеиол-7-О-гексозид	9.02	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462.1157	-	-	-	461.106 4	3.1	446, 299, 283, 255	Braker*
Изофлавоны											
7	Текторигенин-7- О-гексозил -4'-О-гексозид	5.14	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.1685	625.1768	3.0	463, 343, 313, 301, 286	623.158 1	4.0	461, 443, 323, 299, 284	[3,198,199]
8	Текторигенин-7- О-дигексозид	5.84	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.1685	625.1735	3.2	301, 286	623.162 1	4.1	299, 284	[3,198,199]

9	Дихотомитин	18.78	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	358.0683	359.0778	4.1	344, 329, 301,	357.063 6	2.0	342,327,31 2	[198–200]
10	Генистеин-О-гексозид (Генистин)	5.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1051	433.1518	3.1	181	431.096 3	2.5	270, 269, 239	Bruker*, [200]
11	Изомер генистеин О- гексозида	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1051	433.1546	0.6	271	-	2.6	-	
12	Генистеин	7.22	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.0523	271.0985	0.8	-	269.044 2	1.6	132; 133; 134; 135	Bruker*, [3]
13	Текторигенин	10.85	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.0628	301.0693	1.4	286, 239, 168	299.054 5	1.8	284, 255	[199,200]
14	Рамноцитрин	12.15			301.0707	0.1	286, 168	299.056 1	1.8	284, 255	[200]
15	Изотекторигенин	12.63			301.0691	1.6	286, 168	299.055 3	1.7	284, 255	[200]
16	Текторигенин-О-гексозид (Текторидин)	7.40	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462.1157	463.1252	2.3	301,286, 167	461.106 3	2.7	446, 341, 299, 284	[197,199– 201]
17	Иристекторигенин В-О- гексозид (Иристекторин В)	6.90	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	492.1262	493.1366	3.3	331, 316, 301, 168	491.116 7	3.0	329, 314, 313, 299, 271	[197,199– 201]
18	Иристекторигенин А-О- гексозид (Иристекторин А)	7.63	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	492.1262	493.1388	4.8	331, 316, 298	491.116 7	3.0	329, 314, 313, 299, 271	[197,200,20 1]
19	Иристекторигенин А	11.79	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.0734	331.0792	2.4	316, 299, 301, 194, 168	329.066 7	1.8	314, 299, 271, 255, 157, 134	[3,197,200]
20	Иристекторигенин В	12.20	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.0734	331.0607	0.7	316, 299, 273, 298, 168	329.066 7	1.9	314, 299, 271, 255, 157, 134	[197,200,20 1]
21	Ирисолидон	16.24	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.0785	315.0834	2.5	300, 285, 282, 269, 255	313.057 8	1.9	298, 283, 255, 239	[197,200]

22	Изомер ирисолидона	18.39	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.0785	315.0781	2.0	299, 285, 282, 257	313.0578	2.0	298, 283, 255, 239	
23	Ирисолидон О-гексозид	9.33	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	476.1313	477.1331	2.4	315, 300, 282, 269	475.1218	3.0	313, 298	[197]
24	Изомер ирисолидон О-гексозида	10.36	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	476.1313	477.1403	2.2	315, 299, 285, 282	475.1289	3.0	313, 297, 298	
25	Ирилон	14.85	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298.0472	299.0535	0.4	269, 241, 225	297.0389	1.7	279, 269, 239, 117	[22,196,199]
26	Иристоригенин А-7-О-гексозил-4'-О-гексозид (Иристорин В-4'-О-глюкозид)	5.52	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	654.1791	655.1827	3.4	493, 408, 331, 316	653.1750	4.5	491, 371, 329, 314	[199,200]
27	Иригенин	12.64	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.0840	361.0933	1.6	303, 345, 328, 168	359.0772	2.1	344, 329, 314, 286, 258, 214	[3,197,200]
Флавоны											
28	Нарингенин-7-О-дигексозид (Нарингин)	7.15	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.1787	-	-	-	579.1678	3.9	271, 151, 125	[197,201]
29	Нарингин	12.6	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.0713	273.0760	2.5	153	271.0596	1.7	125, 119, 151	[197,201]
30	Эупатилин	15.26	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.0891	-	-	-	343.0803	2.1	313, 298, 285, 270, 242, 226	Bruker Database*
31	Гиспидулин	10.97	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.0628	301.0617	1.5	286, 229, 168	299.0545	1.8	284, 255, 227, 183, 136	Bruker Database*
32	Генкванин (7-метоксиапигенин)	16.61	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.0679	285.0623	1.8	270, 242, 181, 99	283.0608	1.7	269, 268, 267, 239	Bruker Database*
33	Дигидрокемперол	7.25	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.0628	289.1108	2.2	-	287.0553	1.6	215, 177, 125,	Bruker Database*

34	6,7,3',4'- тетрагидроксифлавон	8.68	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.0628	289.0651	3.5	153, 135	287.055 2	1.6	151, 135, 134	Bruker Database*
Флаванолы											
35	Эпигаллокатехин	3.03	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306.0734	307.0781	3.1	139	305.066 6	1.9	261, 219, 179, 165, 125, 109	Bruker Database*
36	Катехин	4.81	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.0785	291.0853	1.1	147, 139, 123,	289.072 5	1.7	245, 289, 179	Bruker Database*
Фенольные кислоты											
37	Кофейная кислота	5.6	C ₉ H ₈ O ₄	180.0423	-	-	-	179.034 3	1.1	161, 135	[201]

С помощью полученных характеристических профилей было изучено влияние изменения содержания цитокинина 6-БАП и ауксина 1-НУК в питательной среде на содержание изофлавонов в экстрактах листьев *I. sibirica* L. (рис. 16).

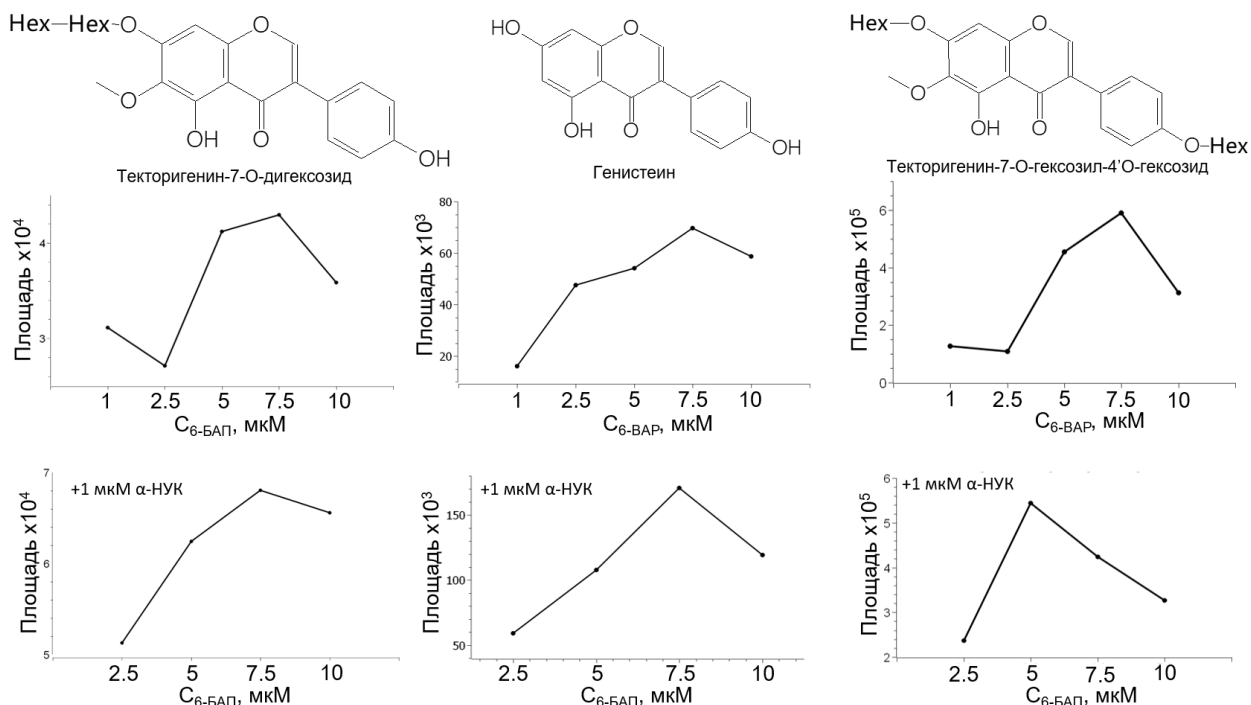


Рис. 16. Индивидуальные зависимости накопления некоторых изофлавоноидов растительного сырья *Iris sibirica* L. от гормонального состава питательной среды

На основании полученных данных можно сделать выбор оптимальных условий выращивания биотехнологического сырья *I. sibirica* L.: максимум для флавоноидов наблюдается на питательной среде с 7,5 мкМ 6-БАП и 1 мкМ 1-НУК. Полученные результаты показывают пригодность предложенной методики для эффективного контроля и оптимизации биотехнологических подходов.

Таким образом, были выбраны условия разделения фенольных соединений экстрактов *Iris sibirica* L. методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС, оптимизированы условия извлечения флавоноидов (65°C, 15 мин, 100% метанол), получены хроматографические профили и выявлено индивидуальное влияние фитогормонов на накопление флавоноидов. В экстрактах биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. идентифицировано 37 соединений фенольной природы и построены индивидуальные зависимости их накопления, а также определены оптимальные условия выращивания биотехнологического сырья.

3.2 Получение характеристических профилей полифенолов в экстрактах листьев биотехнологического сырья *Iris ensata* L. методом ВЭТСХ

Целью отдельного блока исследования явилась разработка экспрессного варианта определения флавоноидов для быстрого контроля биотехнологических подходов с применением метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

Преимуществами метода ВЭТСХ является экспрессность анализа, простота аппаратного оформления, возможность одновременного анализа нескольких образцов, гибкость, легкость изменения состава элюирующих систем и модификации сорбента, что важно при выборе условий разделения. Следует отметить, что одним из ограничений ВЭТСХ является открытость системы, что приводит к мешающему влиянию условий окружающей среды (температуры, влажности) на результат разделения. Однако, стандартизация условий метода ВЭТСХ и контроль всех основных этапов проведения анализа позволяют получать воспроизводимые результаты и селективное разделение сложных природных объектов. Тем не менее, в качестве объекта исследования был выбран биотехнологический *Iris ensata* L., предварительный качественный анализ которого показал меньшее разнообразие в накапливаемых флавоноидах [202].

3.2.1 Выбор условий разделения полифенолов в метанольных экстрактах листьев *I. ensata* L. методом ВЭТСХ

Выбор условий хроматографического разделения фенольных соединений проводили с использованием как растворов стандартов флавоноидов различной полярности (кверцетин, рутин, кверцетин-3- β -D-глюкозид, мангиферин, нарингенин) (рис. 17), так и экстракта (раствор метанола, 70%) одного из образцов биотехнологического сырья *I. ensata* L.

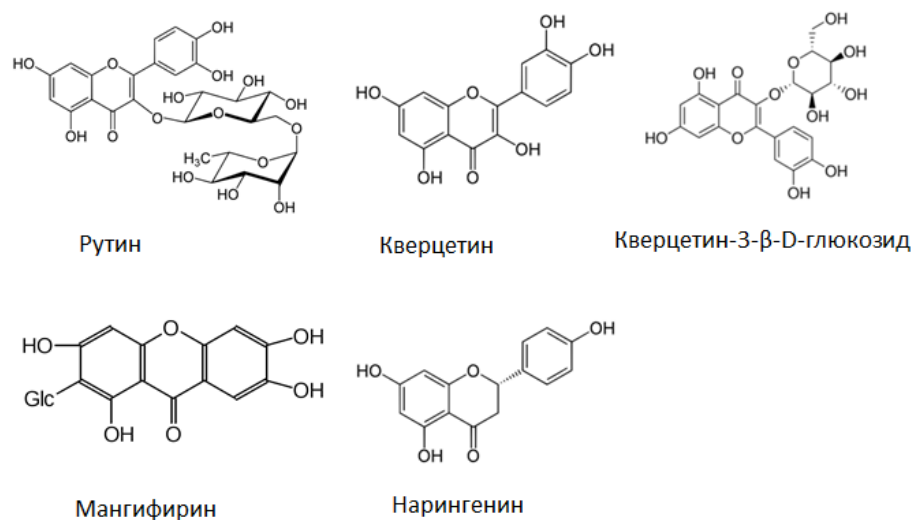


Рис. 17. Структурные формулы определяемых флавоноидов в лекарственных растениях *I. ensata* L.

Для детектирования флавоноидов использовали реакцию дериватизации 2-аминоэтиловым эфиром дифенилборной кислоты (рис. 18), в результате которой образуются производные, флуоресцирующие при длине волны 365 нм, причём для различных классов флавоноидов испускаемая длина волны индивидуальна

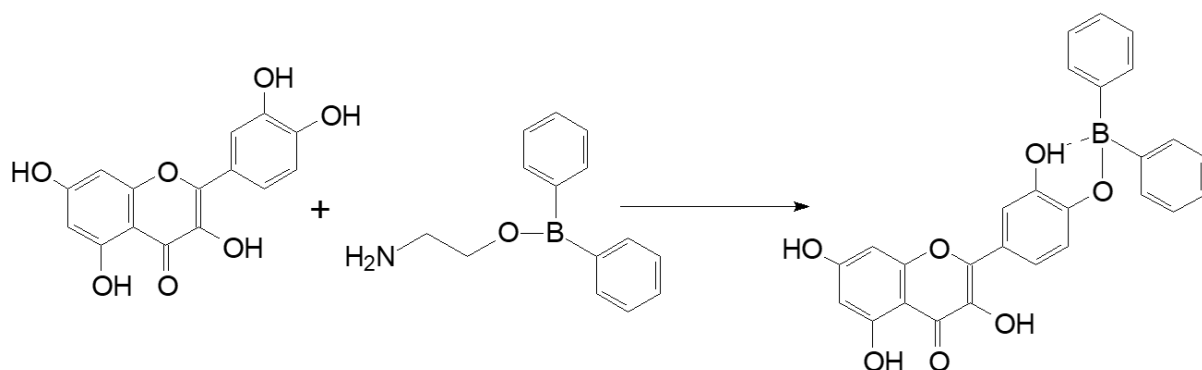


Рис. 18. Схема реакции взаимодействия кверцетина с 2-аминоэтиловым эфиром дифенилборной кислоты.

В составе элюирующей системы варьировали природу растворителей, составляющих основу (гексан, хлороформ, толуол, этилацетат, ацетон, метанол, вода), а также их соотношение. Увеличение эффективности и селективности при разделении флавоноидов *Iris ensata* L. обеспечило уменьшение pH за счет добавления кислот в состав подвижной фазы. В результате смещения равновесия диссоциации гидроксильных групп, а также модификацией кислотами поверхности силикагеля, флавоноиды становятся менее полярными и имеют меньшее сродство к полярной

неподвижной фазе. На селективность разделения аналитов, имеющих близкие параметры удерживания, большое влияние оказало добавление воды, которая модифицирует поверхность силикагеля.

Анализ экстрактов биотехнологического сырья показал, что в экстрактах листьев *I. ensata* L. содержатся в большом количестве полярные фенольные соединения или их гликозиды. Это обусловило выбор более полярной системы растворителей этилацетат/вода с добавлением муравьиной и уксусной кислот (9:2,5:1:1, по объему) (табл. 9).

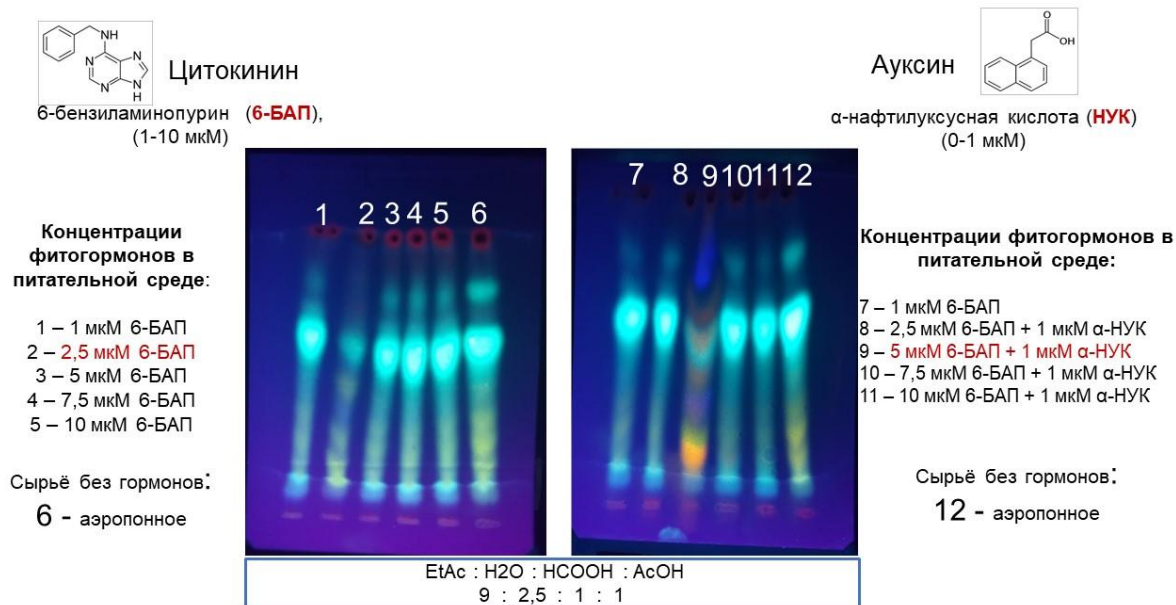
Таблица 9. Влияние состава подвижной фазы в ВЭТСХ на эффективность и селективность разделения флавоноидов

Подвижная фаза	α	N
Этилацетат / гексан / муравьиная кислота (7:3:1)	↑	↓
Этилацетат / вода / муравьиная кислота / укс. кислота (9:2,5:1:1)	↑	↑
Толуол / ацетон / муравьиная кислота (4:6:1)	↑	↓
Толуол / ацетон / муравьиная кислота (3:7:1)	↑	↓

где α - селективность разделения, N – эффективность

3.2.2 Получение характеристических профилей биотехнологического сырья методом ВЭТСХ

В выбранных условиях получены хроматографические профили полифенолов метанольных экстрактов листьев биотехнологического сырья *I. ensata* L. (рис. 19).



4

Рис. 19. Характеристические профили полифенолов метанольных экстрактов биотехнологического сырья листьев лекарственных растений *I. ensata* L., выращенных на питательных средах с различным содержанием фитогормонов. Условия ВЭТСХ: этилацетат/вода/муравьиная кислота/уксусная кислота 9/2,5/1/1

Следует отметить, что отличия между профилями образцов биотехнологического растительного сырья незначительны для *I. ensata* L. Существенное изменение профиля фенольных соединений наблюдается в образце №9 – 5 мкМ 6-БАП с добавкой 1 мкМ α-НУК. При данном сочетании гормонов зона производного с голубым свечением значительно уменьшилась, но при этом увеличилось разнообразие веществ фенольной природы (рис. 20).

Качественный анализ полученных характеристических профилей листьев *I. ensata* L. позволил провести предварительную идентификацию основных классов полифенольных соединений и отдельных флавоноидов на основании литературных данных (рис. 20). По цвету и параметрам удерживания веществ возможно предположить наличие даже тех анализов, которых не было в стандартах. Так, перечисляя от линии старта, были обнаружены антоцианы (темно-красные зоны), апигенин (зеленая зона), фенольные кислоты (синие зоны). В экстрактах присутствуют также флавонолы и их гликозиды (жёлтые и буро-жёлтые зоны соответственно). Наиболее интересно высокое содержание вещества, имеющее голубую

люминесценцию. По окраске и по параметру R_f это вещество совпадает со стандартом мангиферина, что также было подтверждено по значению точной массы молекулярного иона и массам характерных фрагментов, полученных в результате анализа экстракта методом ВЭЖХ-МС/МС с электроспреей ионизацией (рис. 21). Мангиферин интересен тем, что обладает широкой противовирусной активностью [203–206], и увеличивает потенциал использования экстракта *Iris ensata* L. в производстве лекарственных препаратов на его основе.

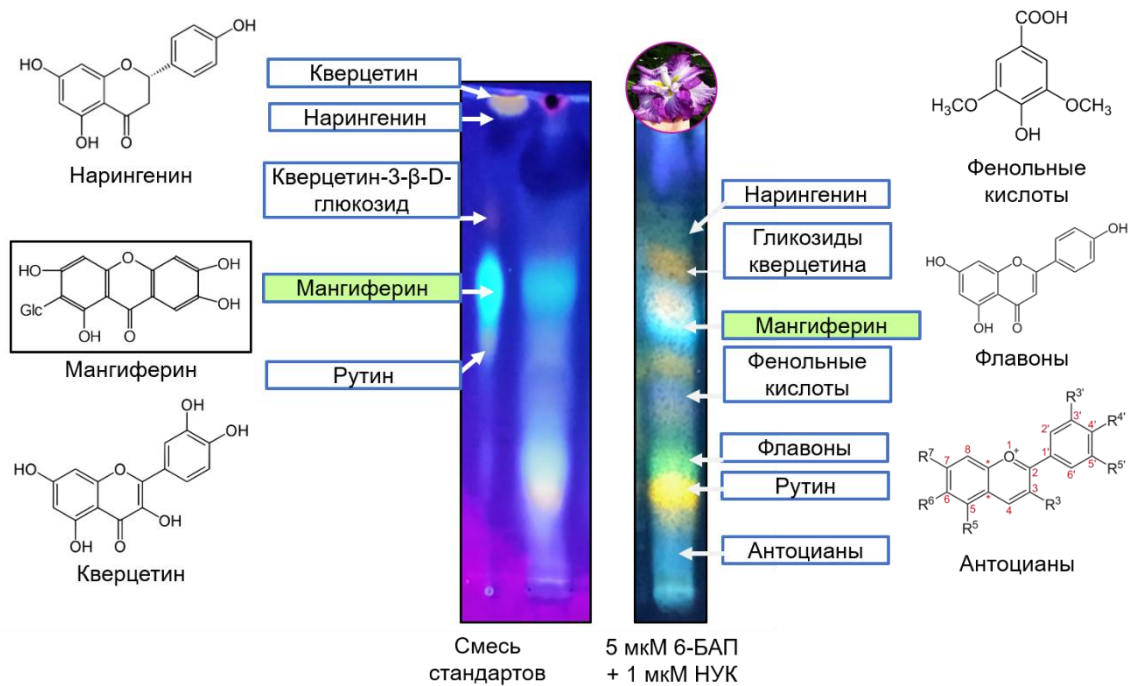


Рис. 20. Качественная идентификация полифенолов в метанольных экстрактах листьев лекарственных растений *I. ensata* L. на примере образца №9 (5 мкМ 6-БАП + 1 мкМ α-НУК) и образца №10 (7,5 мкМ 6-БАП + 1 мкМ α-НУК). Условия ВЭТСХ: см. рис. 19

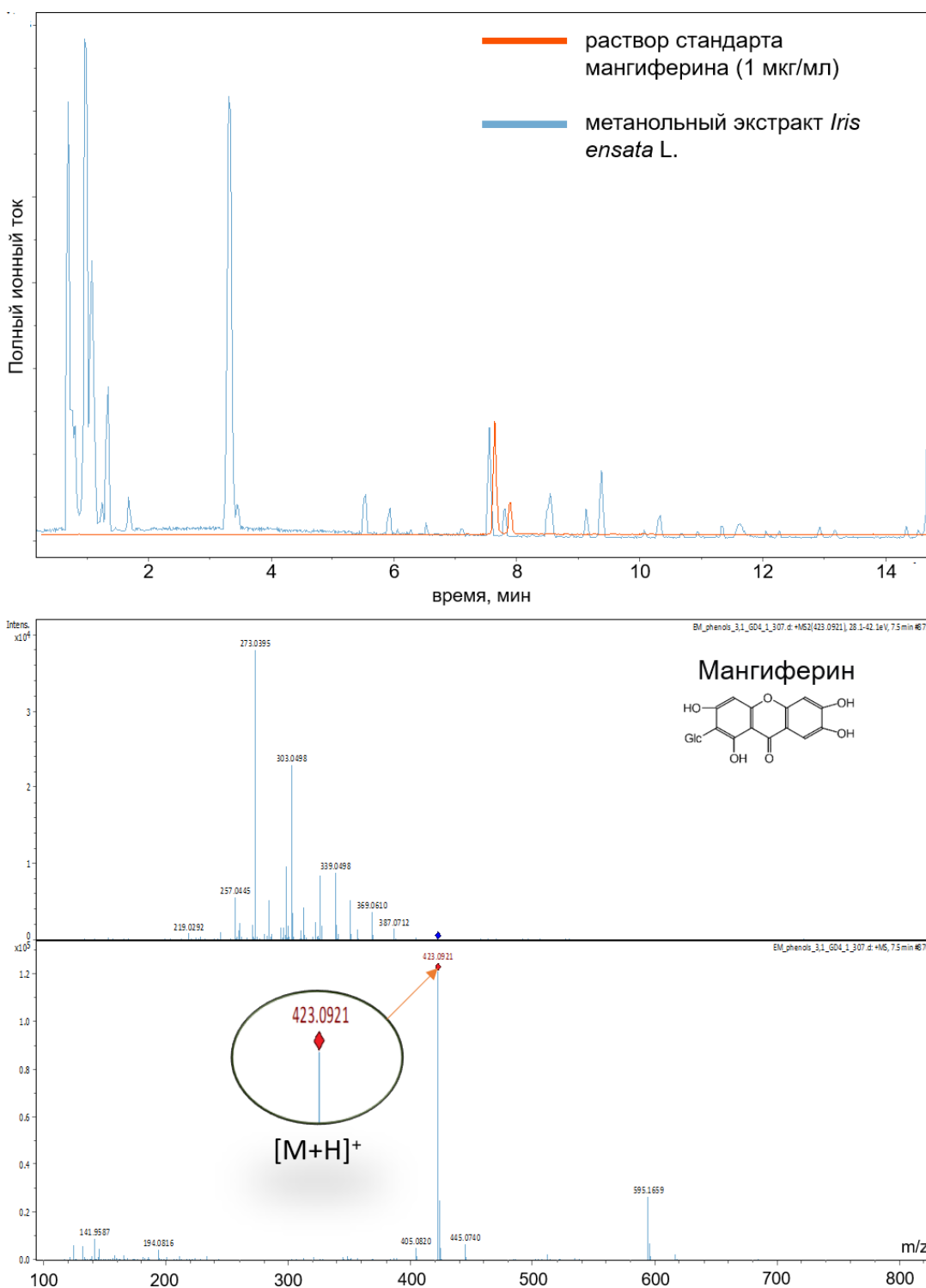


Рис. 21. Хроматограмма экстракта листьев *Iris ensata* L. образец № 10 (7,5 мкМ 6-БАП + 1 мкМ α -НУК) и масс-спектр (МС и МС/МС) пика мангиферина (время удерживания - 7,8 мин). Условия УВЭЖХ-МС/МС: timsTOF Pro (Bruker Daltonics); ПФ: А – 0,1% водный раствор НСООН, В – ацетонитрил, 0,1% НСООН; колонка Intensity Solo2 C18 column (100 x 2.1 мм, 1,8 мкм)

Таким образом, разработан экспрессный вариант определения флавоноидов в листьях растительного сырья методом ВЭТСХ с видеоденситометрическим детектированием и показана перспективность его применения для контроля биотехнологического сырья *I. ensata* L. Получены характеристические профили полифенолов и аминокислот в листьях биотехнологического сырья *Iris ensata* L. и отмечено влияние фитогормонов на биосинтез аналитов.

3.3 Получение характеристических профилей аминокислот в экстрактах листьев *I. sibirica* L. методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

3.3.1 Разделение дансильных производных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ

Ранее в лаборатории хроматографических и электрофоретических методов анализа СПбГУ были оптимизированы условия получения и определения дансильных производных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрическим детектированием (рис. 22). Для получения производных аминокислот использовали реакцию с дансилхлоридом (рис. 23). Данная реакция протекает быстро, воспроизводимо, практически не подвержена матричным эффектам, а образующиеся производные способны как поглощать в УФ-области, так и флуоресцировать.

Разделение аминокислот проводили в градиентном режиме элюирования (линейный 5-95%, 20 минут). Построение хроматограмм по выделенному ионному току для каждой аминокислоты (табл. 5) позволяет однозначно определить зону производного аминокислоты и нивелирует ошибки при определении площадей пиков.

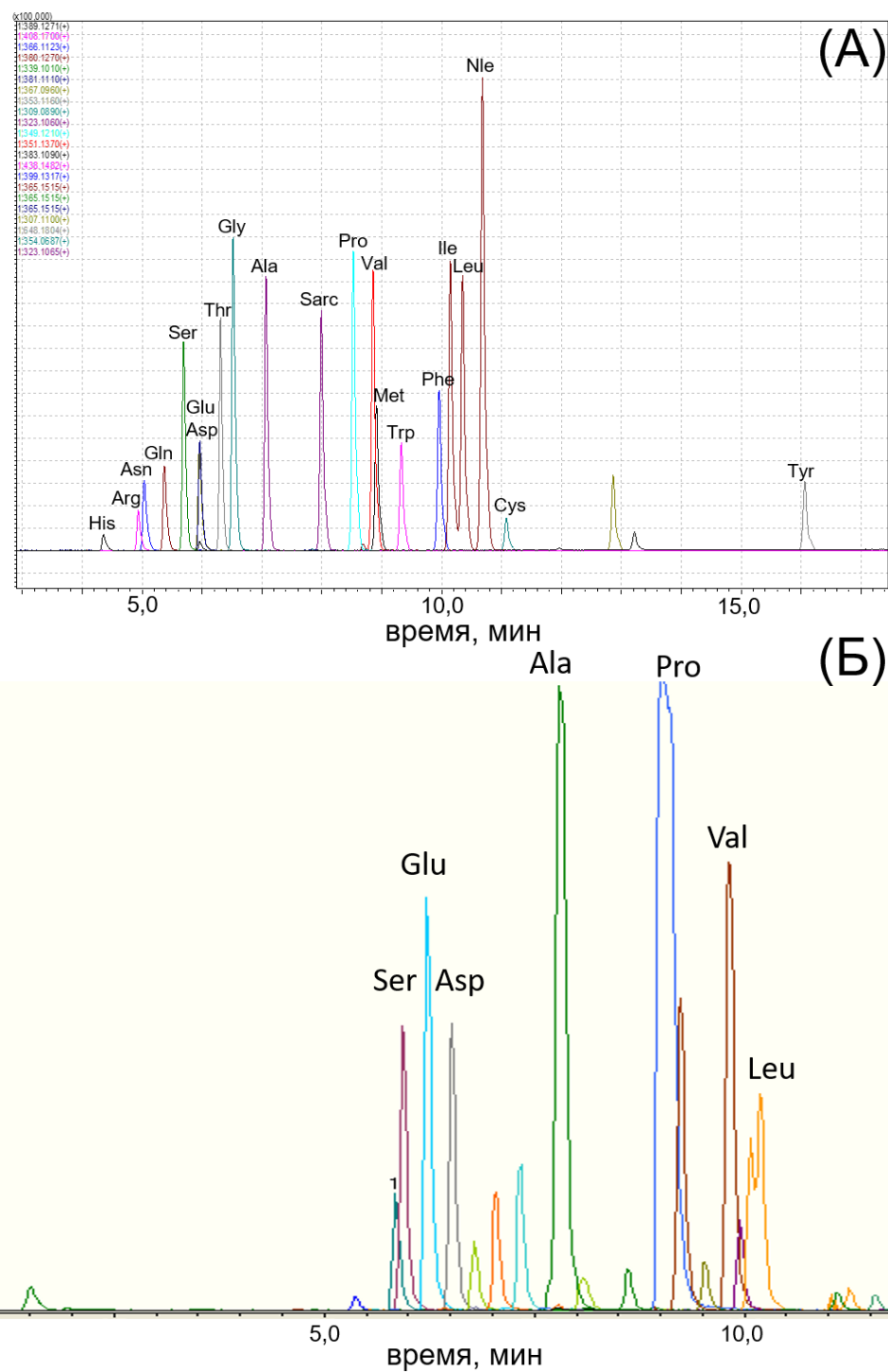


Рис. 22. Хроматограммы по выделенному ионному току стандартов аминокислот (А) и водного экстракта *Iris sibirica* L. (Б), полученные методом ОФ ВЭЖХ-МС. Условия ВЭЖХ-МС: Shimadzu LC-30; ПФ: А - 0,1% водный раствор НСООН, В - ацетонитрил, 0,1% НСООН; колонка Kinetex C18 (150x2,1 мм, 2,6 мкм).

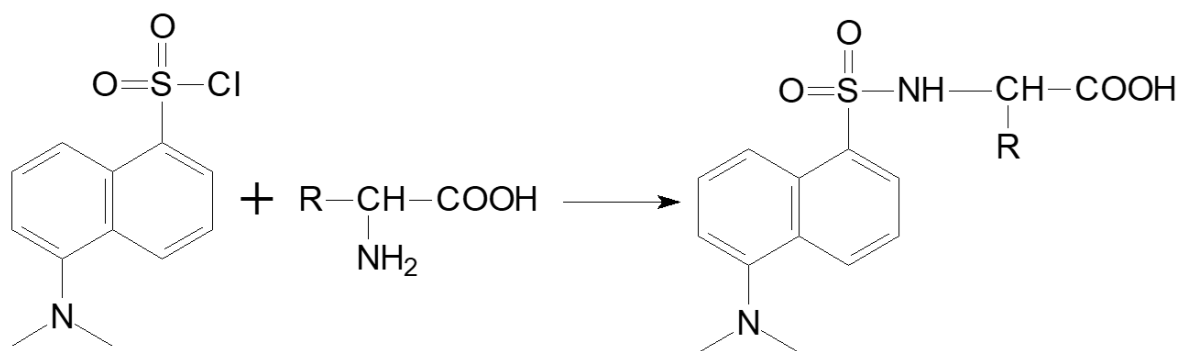


Рис. 23. Реакция аминокислоты с дансилхлоридом

Получен хроматографический профиль аминокислот экстракта листьев *I. sibirica* L. (рис. 22 (Б)) и установлены доминирующие аминокислоты: серин, пролин, аргинин, глутаминовая кислота, валин, лейцин.

3.3.2 Поиск условий извлечения аминокислот из листьев биотехнологического сырья *I. sibirica* L.

Перед проведением определения аминокислот в растительном сырье необходимо выбрать условия их экстракции. Для оптимизации условий экстракции аминокислот из листьев *I. sibirica* L. был применен подход аналогичный, как и в экспериментах с флаваноидами, а именно построение дизайна эксперимента. На основании анализа литературных данных выбраны наиболее значимые факторы, влияющие на извлечение аминокислот, и их диапазон варьирования: содержание метанола в экстрагенте (0-50 %, v/v), время экстракции (20-60 мин), температура процесса (70-100 °С) и объем добавки соляной кислоты (конц., 10-100 мкл).

Получены индивидуальные зависимости площади пика каждой аминокислоты от исследуемых факторов. На рисунке 7 приведены примеры для некоторых аминокислот. На основании построенных графиков Парето выявлены наиболее влияющие факторы: содержание метанола в экстрагенте, температура нагревания, а также концентрация кислоты. Обнаружена общая тенденция в характере этих зависимостей для всех аналитов, что позволило выбрать оптимальные условия для извлечения всех аминокислот: 50% метанол, 70°С, 20 мин, 100 мкл HCl.

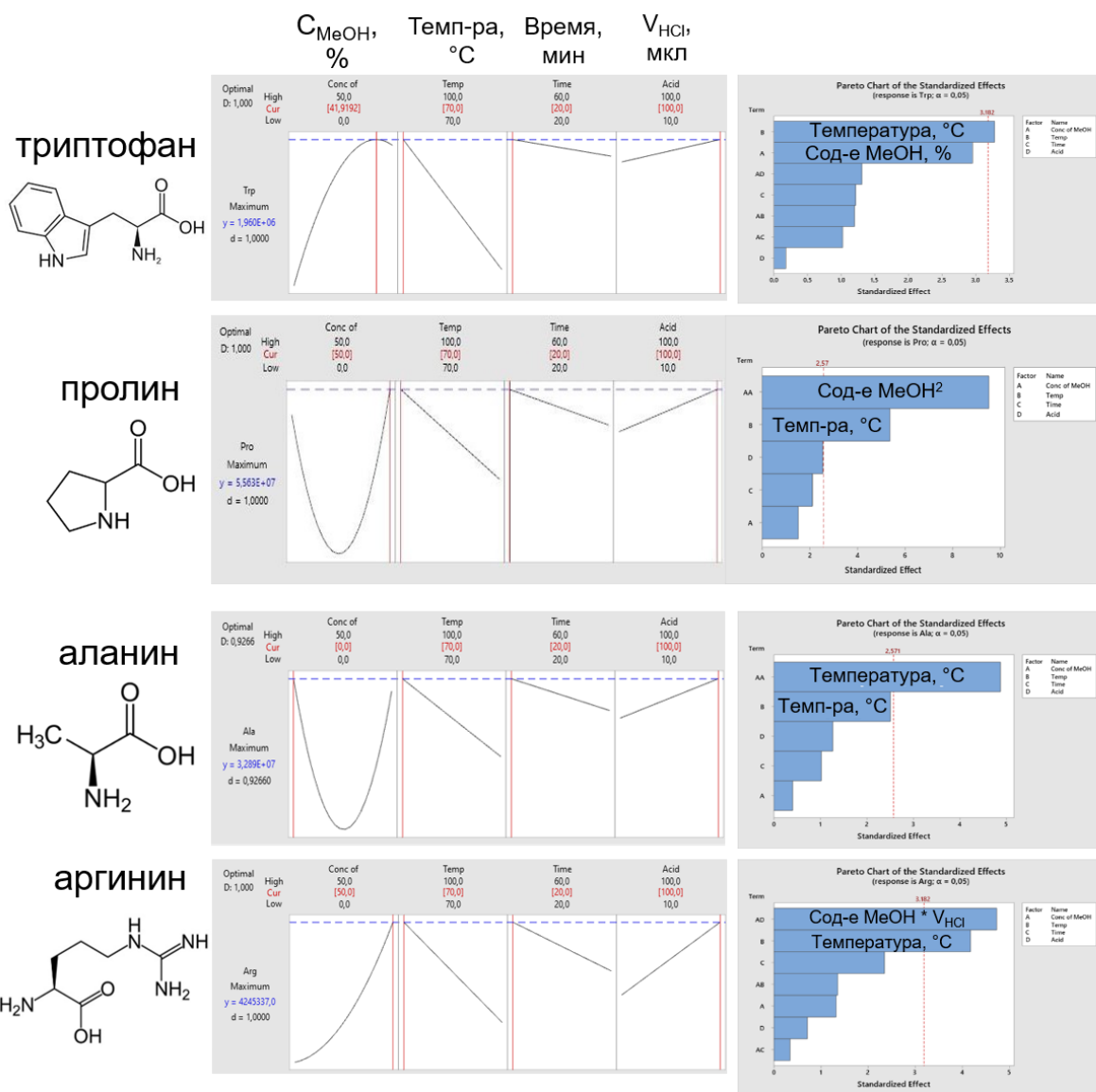


Рис. 24. Зависимости площадей пиков пролина, аланина, триптофана, аргинина от содержания метанола в экстрагенте, температуры нагрева, времени нагрева и добавки кислоты в экстракте (слева). Графики Парето для факторов, влияющих на площади пика (справа).

3.3.3 Получение характеристических профилей аминокислот листьев биотехнологического сырья *I. sibirica* L.

В выбранных условиях получены характеристические профили аминокислот в биотехнологическом растительном сырье *I. sibirica* L. Основными аминокислотами экстрактов *Iris sibirica* L. являются гистидин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, глутамин, треонин, глицин, аланин, пролин, валин, триптофан, фенилаланин, лейцин, изолейцин и лизин. Видно, что влияние б-

БАП на содержание каждой аминокислоты индивидуально, однако с добавкой 1-НУК (рис. 25) это влияние нивелируется для большинства аминокислот. Без добавки 1-НУК (рис. 26) зависимость содержания аминокислот от концентрации 6-БАП прослеживается намного лучше, однако установить какие-либо закономерности трудно; в основном они носят нелинейный характер. При анализе профилей с одинаковым содержанием 6-БАП можно отметить, что введение 1-НУК существенно увеличивает содержание каждой аминокислоты (рис. 27). Это коррелирует и с усилением биосинтеза агликонов флавоноидов.

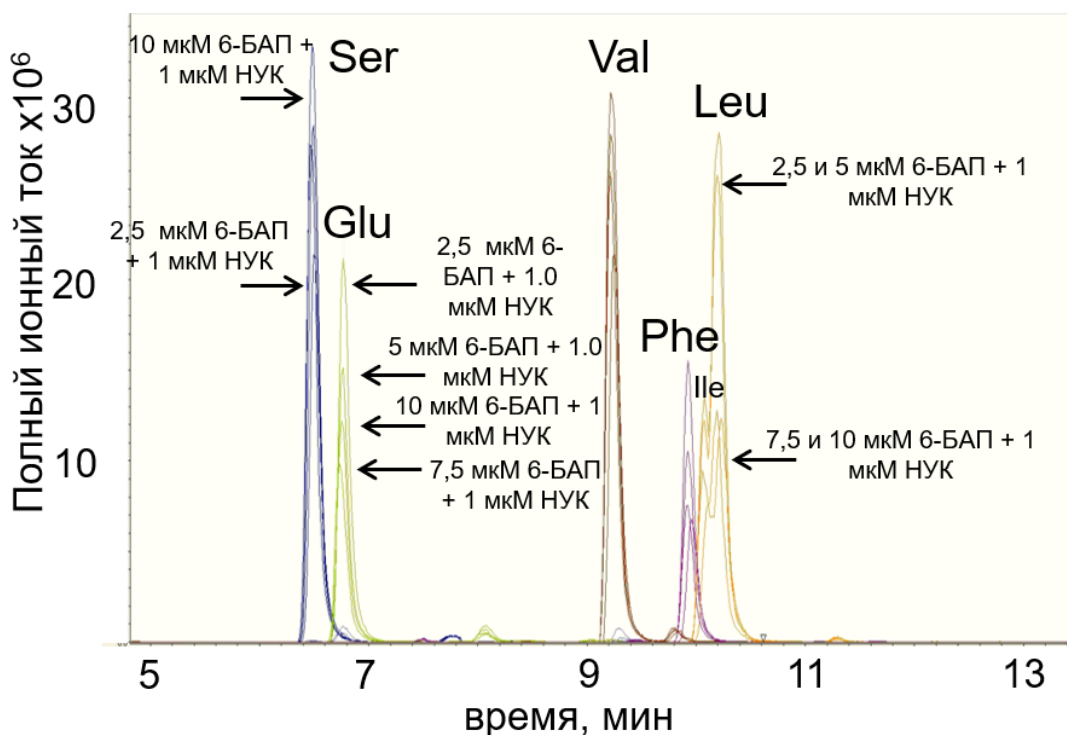


Рис. 25. Хроматографические профили по выделенной массе ионов дансильных производных аминокислот в экстрактах биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. при варьировании 6-БАП (1-10 мкМ) с добавкой 1-НУК (1 мкМ). Условия ВЭЖХ-МС: Shimadzu LC-30; ПФ: А - 0,1% водный раствор HCOOH , В - ацетонитрил, 0,1% HCOOH ; колонка Kinetex C18 (150x2,1 мм, 2,6 мкм).

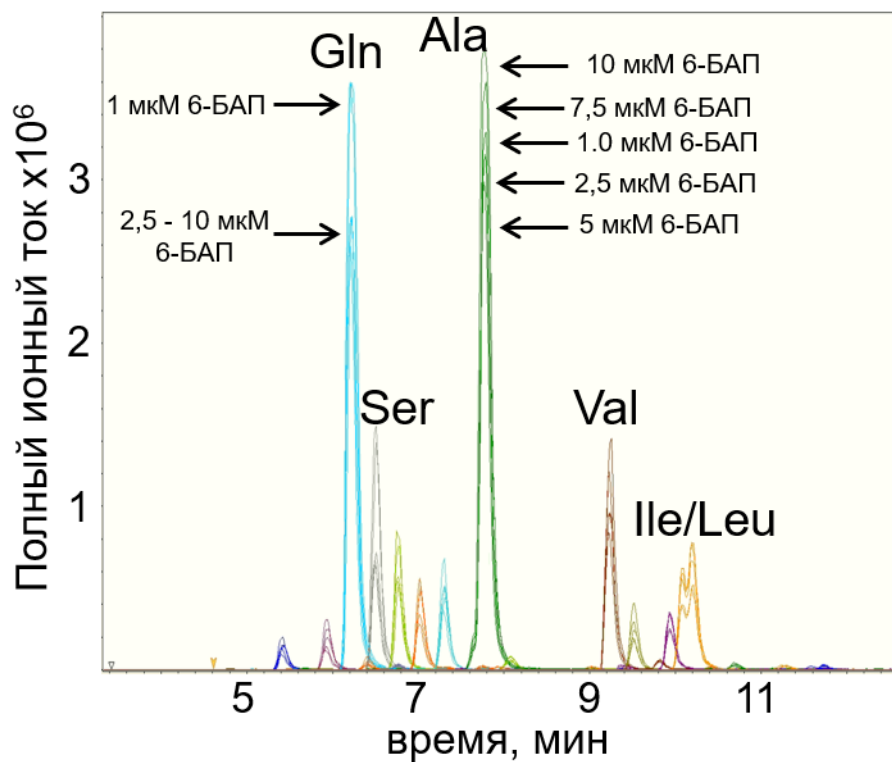


Рис. 26. Хроматографический профиль по выделенной массе ионов дансильных производных аминокислот в экстракте биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. при варьировании 6-БАП (1-10 мкМ) без добавки 1-НУК. Условия ВЭЖХ: как на рисунке 25.

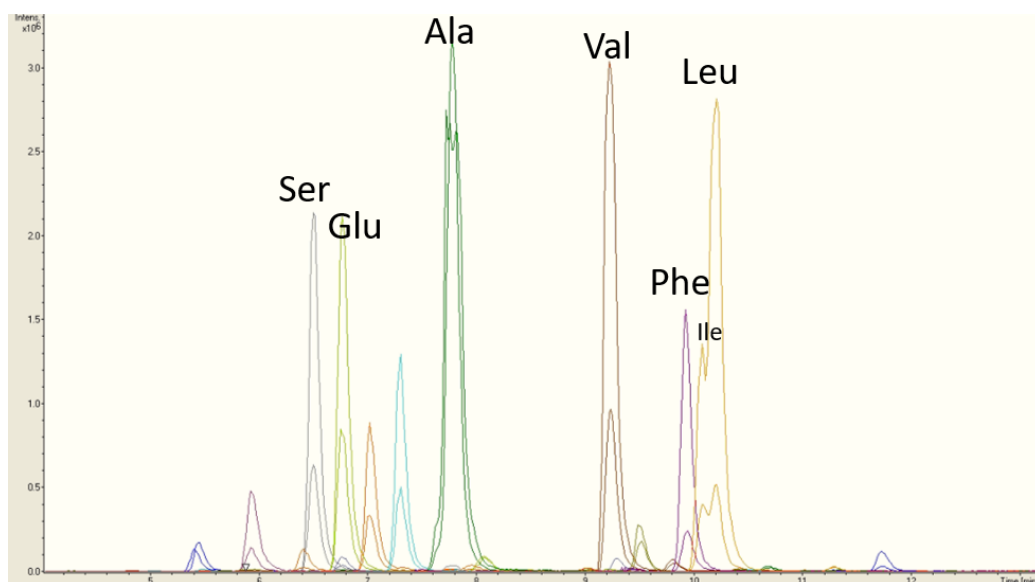


Рис. 27. Хроматографические профили по выделенной массе ионов дансильных производных аминокислот в экстрактах *Iris sibirica* L. при варьировании 1-НУК (0-1 мкМ) при концентрации 6-БАП 2,5 мкМ. Условия ВЭЖХ: как на рис.

Таким образом, выбраны условия разделения дансильных производных аминокислот в экстрактах *Iris sibirica* L. методом ВЭЖХ-МС, оптимизированы условия их извлечения (70°C, 20 мин, 50% метанол, 100 мкл HCl_{конц}). В выбранных условиях получены хроматографические профили аминокислот в листья биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. и выявлено индивидуальное влияние фитогормонов на содержание аминокислот в экстрактах.

3.4 Получение характеристических профилей органических кислот в экстрактах листьев *I. sibirica* L. методом КЭ

3.4.1 Выбор условий электрофоретического определения органических кислот. Извлечение органических кислот из растительного сырья

Органические кислоты играют важную роль в дыхании клеток и функционировании цикла Кребса. Профиль органических кислот может быть одним из наиболее объективных показателей эффективного протекания вторичного метаболизма. Для некоторых из них установлено и собственное защитное действие [144]. Таким образом, определение органических кислот являются важным показателем для контроля метаболитами, поскольку их профиль может косвенно

отражать состояние растения в целом и изменения во вторичном метаболизме в частности, кроме того, позволяет напрямую контролировать содержание органических кислот с противомикробной активностью.

В данной работе определяли следующие органические кислоты: щавелевая, муравьиная, винная, яблочная, лимонная, молочная, янтарная и уксусная. Разделение органических кислот экстрактов *Iris sibirica* L. проводили методом КЗЭ с косвенным спектрофотометрическим детектированием в условиях, предлагаемых «Люмэкс» [207]. Поскольку анионы органических кислот заряжены отрицательно и имеют высокую электрофоретическую подвижность, то их определение проводят в условиях КЗЭ с обращенным ЭОП. В этом случае стенки кварцевого капилляра динамически модифицировали положительно заряженным ПАВ – цетилтриметиламмония бромидом (ЦТАБ). Выбор условий разделения анализов проводили на растворах стандартов органических кислот (рис. 28).

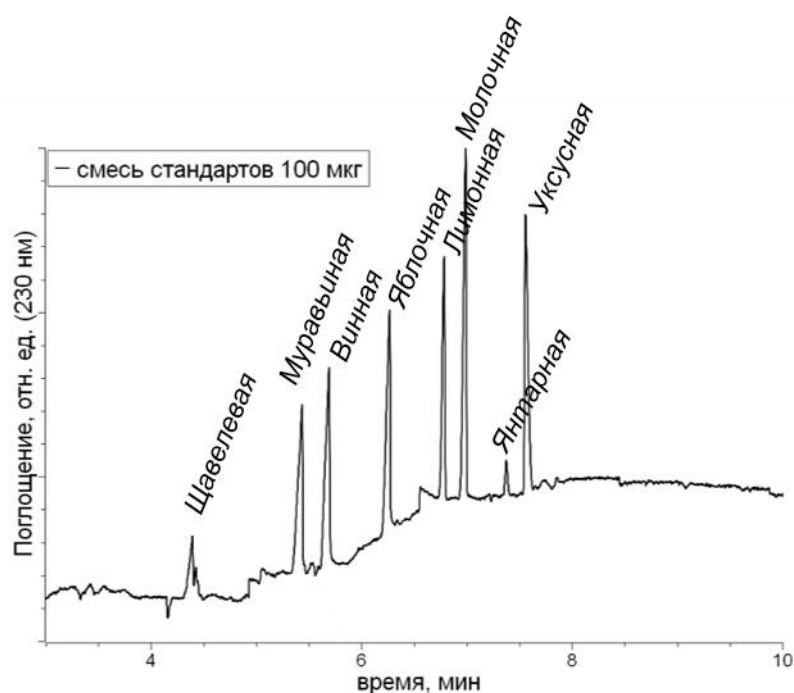


Рис. 28. Электрофореграмма разделения стандартов органических кислот КЗЭ с косвенным УФ детектированием в условиях on-line концентрирования (стэкинг с водной пробкой и с усилением поля). Условия КЭ: 9 мМ ДЭА, 10 мМ БК, 0,5 мМ ЦТАБ; -20 кВ; 230 нм; ввод пробы 45 с 30 мбар

Для увеличения чувствительности и эффективности при определении органических кислот были оптимизированы условия *on-line* концентрирования аналитов: стэкинга с водной пробкой и стэкинга с усилением поля. Варьировали время ввода водной пробки (2-10 с при 30 мбар), степень разбавления пробы (фактор разбавления 2-20), время ввода пробы (5-75 с при 30 мбар) (рис. 29). Выбраны лучшие условия концентрирования органических кислот по эффективности и степени концентрирования: разбавление пробы водой в 20 раз, затем гидродинамический ввод водной пробки - 6 с 30 мбар и пробы 45 с 30 мбар. Степень концентрирования (SEF) составила 48 раз.

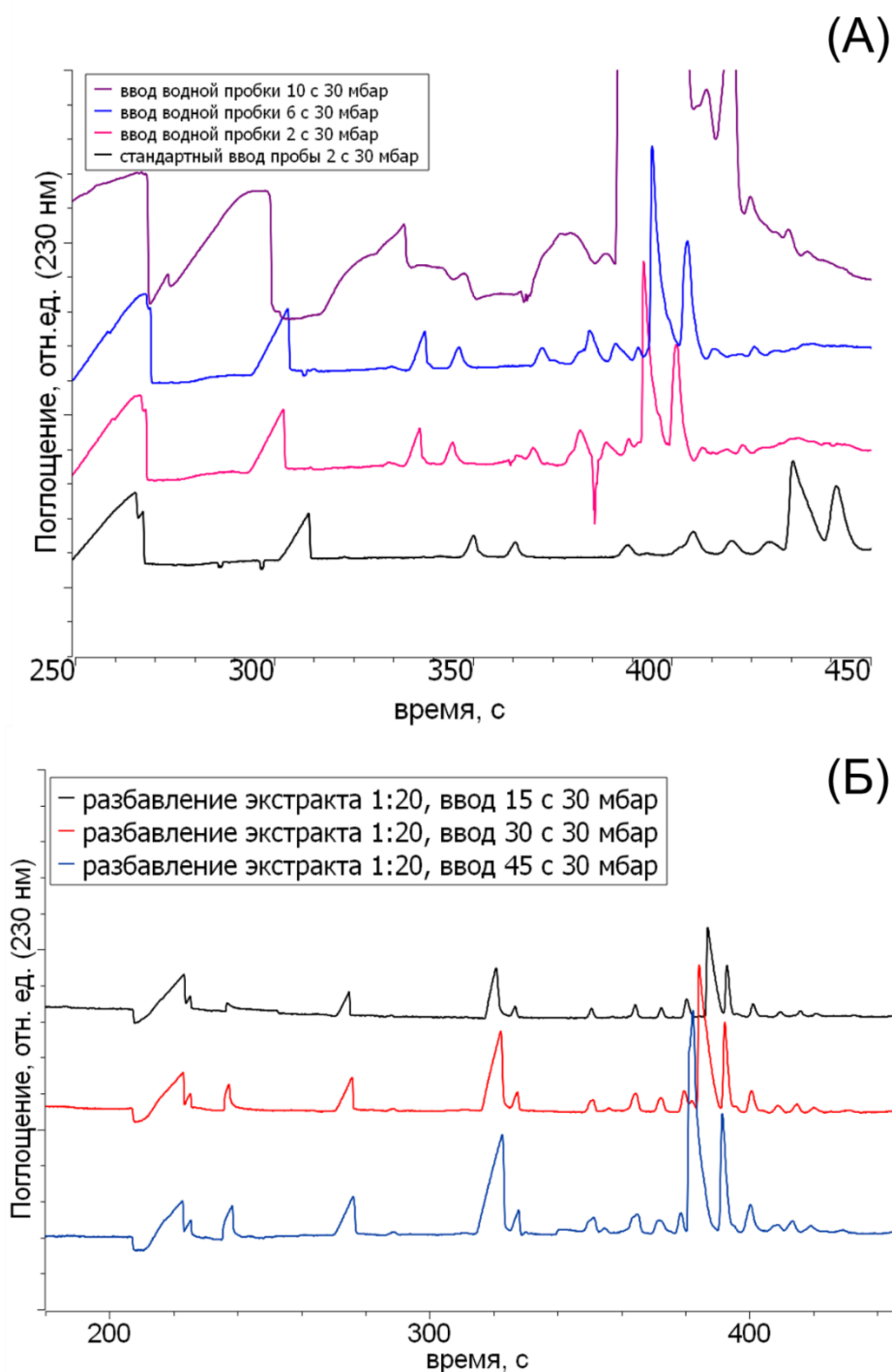


Рис. 29. Электрофореграммы выбора условий стэкинга с водной пробкой и усилением поля на растворах экстрактов *Iris sibirica* L. (А) Подбор ввода водной пробки; (Б) подбор ввода разбавленной пробы в условиях КЗЭ с косвенным УФ детектированием. Условия КЭ: 9 мМ ДЭА, 10 мМ БК, 0,5 мМ ЦТАБ; -20 кВ; 230 нм; ввод пробы 45 с 30 мбар

Извлечения органических кислот для анализа методом КЭ и сопоставления профилей проводили раствором гидроксида натрия (0,1М) с дополнительной

ультразвуковой обработкой. В выбранных условиях получен профиль органических кислот одного из образцов биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. и проведён его качественный анализ органических кислот методом стандартных добавок (рис. 30). При качественном анализе в КЭ имеет значение не только время миграции, но и форма пиков, а также их взаимное расположение. В экстрактах ириса сибирского были обнаружены все исследуемые органические кислоты.

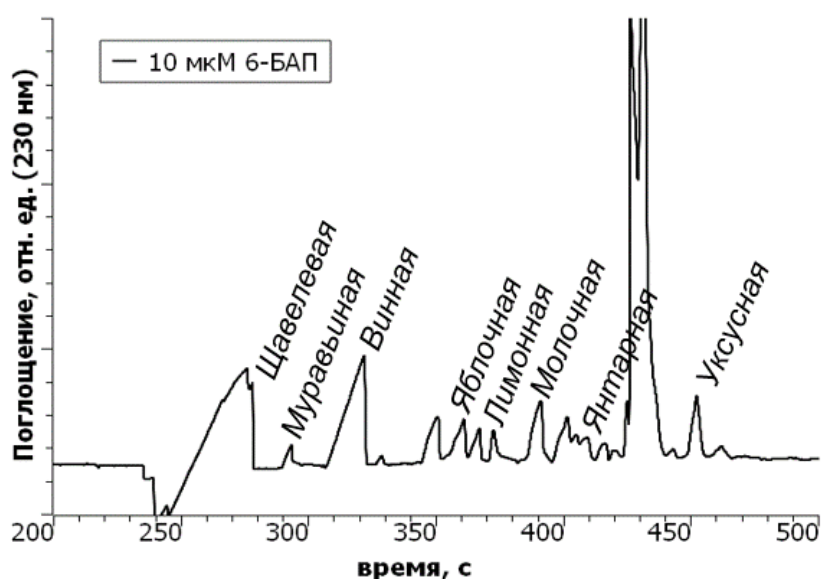


Рис. 30. Электрофоретический профиль органических кислот щелочного экстракта растительного сырья *Iris sibirica* L. Условия КЭ: см. рис. 29

3.4.2 Получение характеристических профилей органических кислот растительного сырья *I. sibirica* L.

В выбранных условиях КЗЭ получены характеристические профили органических кислот щелочных экстрактов листьев биотехнологического сырья *Iris sibirica* L. (рис. 31, 32).

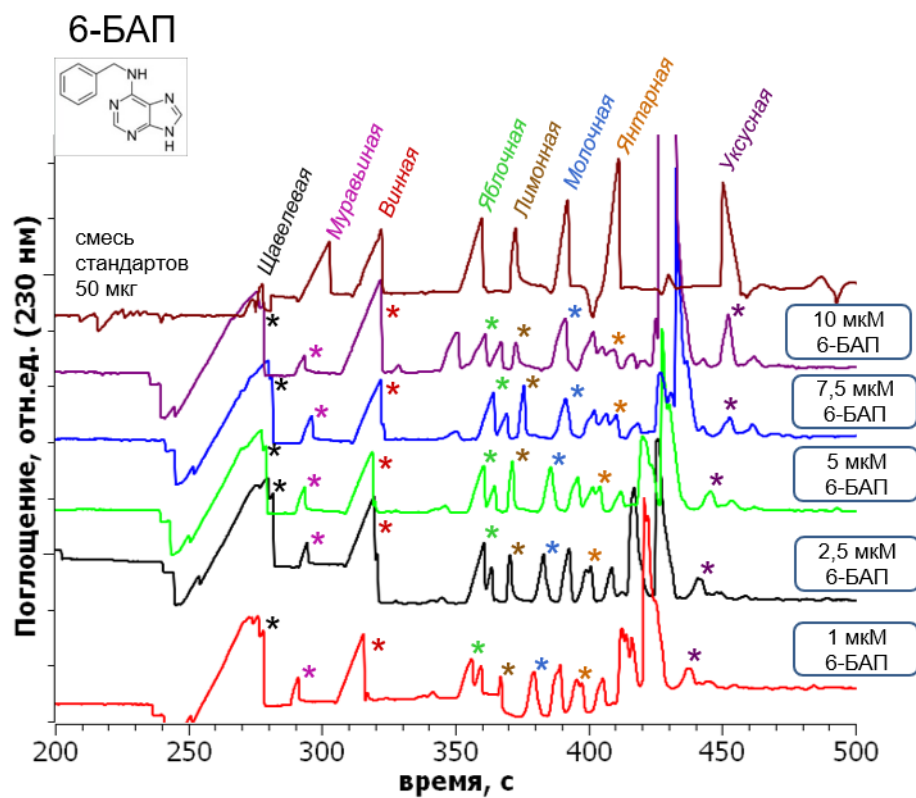


Рис. 31. Электрофореграммы щелочных экстрактов биотехнологического сыря *I. sibirica* L., выращенного на питательных средах с варьированием 6-БАП без добавки ауксина. Условия КЭ: см. рис. 29

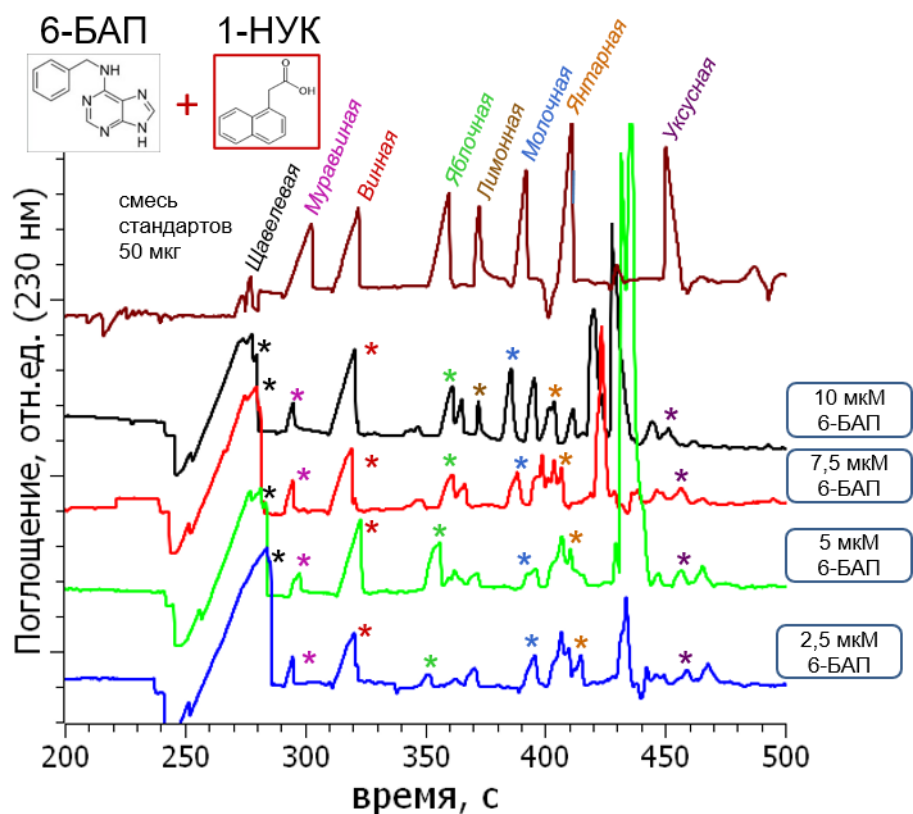


Рис. 32. Электрофореграммы щелочных экстрактов биотехнологического сыря *Iris sibirica* L., выращенного на питательных средах с варьированием 6-БАП с добавкой ауксина. Условия КЭ: см. рис. 29.

Проведён качественный анализ щелочных экстрактов биотехнологического сыря *I. sibirica* L. Обнаружены щавелевая, муравьиная, винная, яблочная, лимонная, молочная, янтарная и уксусная кислоты. При сопоставлении профилей можно отметить постепенное увеличение содержания органических кислот при увеличении концентрации 6-БАП как с добавкой ауксина 1-НУК, так и без неё. Однако само по себе введение добавки 1-НУК значительно снижает содержание органических кислот (рис. 32). Можно предположить, что с введением ауксина органические кислоты расходуются через метаболические пути (шикиматный, поликетидный, мевалонатный) на биосинтез агликонов флавоноидов намного интенсивнее. Это коррелирует с полученными ранее результатами по изменению содержания флавоноидов в экстрактах листьев *Iris sibirica* L.

Таким образом, были выбраны условия разделения органических кислот в экстрактах *I. sibirica* L. методом КЭ-УФ, оптимизированы условия on-line концентрирования (стэкинг с водной пробкой и усилением поля; ввод водной пробки б с 30 мбар, ввод пробы 45 с 30 мбар, разбавление пробы 1:20). Получены электрофоретические профили органических кислот в экстрактах листьев биотехнологического сырья *I. sibirica* L. и выявлено индивидуальное влияние фитогормонов на содержание органических кислот.

ВЫВОДЫ

1. Выбраны условия хроматографического и хроматомасс-спектрометрического определения флавоноидов и аминокислот в экстрактах *Iris L.* методом ОФ ВЭЖХ с градиентным режимом элюирования.
2. Разработаны схемы подготовки проб для эффективного извлечения флавоноидов и аминокислот из листьев *Iris L.* с применением дизайна эксперимента. Выявлены основные факторы, влияющие на эффективность экстракции аналитов (взаимодействие температуры и времени нагрева, а также содержание метанола – для флавоноидов; температура нагрева и содержание метанола – для аминокислот) и установлены оптимальные условия извлечения: для полифенолов – экстракция 100% метанолом при 65°C в течение 15 мин, для аминокислот – экстракция 50% метанолом с добавкой 100 мкл $\text{HCl}_{\text{конц}}$ при 70°C в течение 20 мин.
3. Получены характеристические профили флавоноидов и аминокислот методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и профили органических кислот методом КЗЭ в экстрактах биотехнологического сырья *Iris L.*
4. Проведена предварительная идентификация фенольных соединений (37 соединений) методом ОФ ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией. Они относятся к классам изофлавоноидов, ксантонов, флавонов и фенольных кислот.
5. Выявлены закономерности накопления аналитов в зависимости от гормонального состава питательной среды. Показано, что при концентрации фитогормона БАП в питательной среде 7.5 мкМ с добавкой 1 мкМ НУК наблюдается максимальная концентрация основных флавоноидов в экстрактах листьев *Iris L.*
6. Разработан экспрессный вариант контроля биотехнологического сырья по содержанию флавоноидов методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием.

БЛАГОДАРНОСТИ И СВЕДЕНИЯ О РАБОТЕ

Выражаю особую благодарность научному руководителю к.х.н., доценту Елене Андреевне Бессоновой за чуткое руководство и помощь в подготовке, проведении и оформлении экспериментов, за содействие и поддержку в подготовке и презентации полученных результатов на конкурсах, конференциях и в публикациях.

Выражаю особую благодарность руководителю научной группы хроматографических и электрофоретических методов анализа профессору, д.х.н. Анне Алексеевне Карцовой за бесценные советы и помощь, за содействие и поддержку в подготовке и презентации полученных результатов на конкурсах, конференциях и в публикациях.

Выражаю благодарность Научному парку СПбГУ, Ресурсным центрам «Методы анализа состава вещества» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за предоставленное оборудование и консультации.

Работа представлена на всероссийских и международных конференциях; награждена дипломом II степени на XXXI Менделеевском конкурсе студентов-химиков, дипломом I степени на стендовой сессии конференции «Ломоносов-2022»; отмечена организаторами 17-ой международной конференции «Modern Analytical Chemistry» в Праге; поддержана в качестве проекта ноябрьской химической образовательной программы 2021 года в образовательном центре «Сириус»; отмечена стипендией благотворительного фонда Владимира Потанина (Заявка № СК22-003952).

Работа выполнена при поддержке гранта Фонда содействия инновациям по программе «Умник», (Договор 15145ГУ/2020 от 27.05.2020) и гранта РФФИ 19-13-00370 «Новые подходы к получению характеристических профилей объектов со сложной матрицей с участием ионогенных модификаторов методами хроматографии и электрофореза».

Результаты работы были оформлены в научную статью «Development of approach for flavonoid profiling of biotechnological raw materials *Iris sibirica* L. by HPLC with high resolution tandem mass spectrometry» и приняты к публикации журналом *Phytochemical Analysis* издательства Wiley (DOI:10.1002/pca.3135).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang H., Cui Y., Zhao C. Flavonoids of the Genus *Iris* (Iridaceae) // *Mini-Reviews Med. Chem.* 2010. Vol. 10, № 7. P. 643–661.
2. Ni G., Li J.-Y., Yu D.-Q. Two new iridal-type triterpenoids from *Iris forrestii* // *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2019. Vol. 21, № 9. P. 881–886.
3. Kukula-Koch W. et al. Major secondary metabolites of *Iris* spp. // *Phytochem. Rev.* 2015. Vol. 14, № 1. P. 51–80.
4. SHU P. et al. Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MSn // *Chin. J. Nat. Med.* 2010. Vol. 8, № 3. P. 202–207.
5. Azmi L. et al. Multivariate analysis of herbal drugs with diverse pharmacological activities: metabolomics study // *Medicinal and Aromatic Plants*. Elsevier, 2021. P. 87–96.
6. Shafi A., Zahoor I. Metabolomics of medicinal and aromatic plants: Goldmines of secondary metabolites for herbal medicine research // *Medicinal and Aromatic Plants*. Elsevier, 2021. P. 261–287.
7. Mykhailenko O. et al. Phenolic compounds from *Iris hungarica* as potential anti-inflammatory agents // *Free Radic. Biol. Med.* 2021. Vol. 165. P. 44–45.
8. Скрининг химического состава и биологической активности *Iris sibirica* L. сорт Cambridge // *Chem. plant raw Mater.* 2016.
9. Денисова О.А., Глызин В.И., Патудин А.В. Определение содержания ксантонового гликозида мангиферина у некоторых растений рода *Iris*, *Gentiana*, *Hedysarum* // *Химико-фармацевтический журнал.* 1980. Vol. 14. P. 76–77.
10. Pryakhina N.I., Blinova K.F. Luteolin C-glycosides from *Iris ensata* // *Chem. Nat. Compd.* 1984. Vol. 20, № 1. P. 107–107.
11. Boltenkov E. V., Rybin V.G., Zarembo E. V. Flavones from Callus Tissue of *Iris ensata* // *Chem. Nat. Compd.* 2005. Vol. 41, № 5. P. 539–541.
12. Ganaie A.A., Mishra R.P., Allaie A.H. Antoxydant activity of some extracts of *Iris*

- ensata // J. Pharmacogn. Phytochem. 2018. Vol. 7, № 2. P. 230–235.
13. Bhatia S., Bera T. Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture // Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. Elsevier, 2015. P. 231–291.
 14. Sun Z. et al. Exogenous application of salicylic acid enhanced the rutin accumulation and influenced the expression patterns of rutin biosynthesis related genes in *Fagopyrum tartaricum* Gaertn leaves // Plant Growth Regul. 2012. Vol. 68, № 1. P. 9–15.
 15. Kianersi F. et al. Biosynthesis of rutin changes in *Capparis spinosa* due to altered expression of its pathway genes under elicitors' supplementation // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2020. Vol. 141, № 3. P. 619–631.
 16. Tikhomirova L.I. et al. Obtaining plant materials of siberian iris (*Iris sibirica* L.) by methods of biotechnology // Chem. plant raw Mater. 2018. № 4. P. 235–245.
 17. Hussain H. et al. Iris (*Iris germanica*) Oils // Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier, 2016. P. 481–486.
 18. Основы биохимии вторичного обмена растений.
 19. Mykhailenko O. et al. The Comparative Analysis of Carboxylic Acid Composition of Four Iris Species from Ukraine // Chem. Biodivers. 2021. Vol. 18, № 3.
 20. Li L. et al. Alteration of local and systemic amino acids metabolism for the inducible defense in tea plant (*Camellia sinensis*) in response to leaf herbivory by *Ectropis oblique* // Arch. Biochem. Biophys. 2020. Vol. 683. P. 108301.
 21. Michalak A. et al. *Iris pseudacorus* as an easily accessible source of antibacterial and cytotoxic compounds // J. Pharm. Biomed. Anal. 2021. Vol. 195. P. 113863.
 22. Singab A.N.B. et al. Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity // Ind. Crops Prod. 2016. Vol. 92. P. 308–335.
 23. Yousefsani B.S. et al. A review on phytochemical and therapeutic potential of *Iris germanica* // J. Pharm. Pharmacol. 2021. Vol. 73, № 5. P. 611–625.
 24. Wagay J.I., Jain K. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Iris

- kashmiriana and *Iris ensata* Extracts against Selected Microorganisms // *J. Drug Deliv. Ther.* 2018. Vol. 8, № 6. P. 28–34.
25. Miyake Y., Ito H., Yoshida T. Identification of iridals as piscicidal components of Iridaceous plants and their conformations associated with CD spectra // *Can. J. Chem.* 1997. Vol. 75, № 6. P. 734–741.
 26. Iwashina T., Mizuno T. Flavonoids and Xanthones From the Genus *Iris* : Phytochemistry, Relationships with Flower Colors and Taxonomy, and Activities and Function // *Nat. Prod. Commun.* 2020. Vol. 15, № 10. P. 1934578X2093715.
 27. Khatib S., Faraloni C., Bouissane L. Exploring the Use of *Iris* Species: Antioxidant Properties, Phytochemistry, Medicinal and Industrial Applications // *Antioxidants.* 2022. Vol. 11, № 3. P. 526.
 28. Schütz C. et al. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC–PDA–MS analysis // *Fitoterapia.* 2011. Vol. 82, № 7. P. 1021–1026.
 29. Do T.K.T. et al. Authenticity of essential oils // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015. Vol. 66. P. 146–157.
 30. Asiri Y.A. *The ABC Clinical Guide to Herbs* Edited by Mark Blumenthal, Tara Hall, Alicia Goldberg, Tanja Kunz, Kara Dinda, Josef Brinckmann, and Bernd Wollschlaeger. American Botanical Council, Austin, Texas, USA. First Edition 2003. ISBN: 3-13-132391-4 // *Ann. Saudi Med.* 2004. Vol. 24, № 2. P. 149–149.
 31. Ložienė K. et al. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes // *Food Chem.* 2007. Vol. 103, № 2. P. 546–559.
 32. Wani S.H. et al. Evaluation of prominent Isoflavonoids of *Iris* plant as futuristic cancer drug components // *Int. J. Bot. Stud.* 2017. Vol. 2, № 1. P. 129–134.
 33. Wani S.H. et al. RP- HPLC facilitated quantitative analysis of tectorigenin in the different species of *Iris* plant and evaluation of its in vitro anticancer potential // *Int. J. Curr. Res.* 2013. Vol. 5, № 2. P. 206–211.

34. Harkin J.M. Biochemistry of Phenolic Compounds. Herausg. v.J. B. Harborne. Academic Press, London-New York 1964. 1. Aufl., X, 618 S., 1 Tafel, mehrere Abb., 30 Tab., geb. £ 6.6.0 // *Angew. Chemie*. 1966. Vol. 78, № 7. P. 399–400.
35. Machalska A. et al. Screening for phenolic acids in five species of *Iris* collected in Mongolia // *Acta Chromatogr*. 2008. Vol. 20, № 2. P. 259–267.
36. Zhang C.-L. et al. Two new flavonoid glycosides from *Iris tectorum* // *Phytochem. Lett*. 2016. Vol. 15. P. 63–65.
37. Mizuno T., Okuyama Y., Iwashina T. Phenolic compounds from *Iris rossii*, and their chemotaxonomic and systematic significance // *Biochem. Syst. Ecol*. 2012. Vol. 44. P. 157–160.
38. Choudhary M.I. et al. A benzil and isoflavone from *Iris tenuifolia* // *Phytochemistry*. 2008. Vol. 69, № 9. P. 1880–1885.
39. Conforti F. et al. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents // *Fitoterapia*. 2009. Vol. 80, № 1. P. 62–67.
40. Ma Y. et al. C-glycosylflavones from the leaves of *Iris tectorum* Maxim. // *Acta Pharm. Sin. B*. 2012. Vol. 2, № 6. P. 598–601.
41. Nazir N. Immunomodulatory activity of isoflavones isolated from *Iris kashmiriana*: Effect on T-lymphocyte proliferation and cytokine production in Balb/c mice // *Biomed. Prev. Nutr*. 2013. Vol. 3, № 2. P. 151–157.
42. Vihakas M. et al. Rapid estimation of the oxidative activities of individual phenolics in crude plant extracts // *Phytochemistry*. 2014. Vol. 103. P. 76–84.
43. Mosihuzzman M. et al. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis* // *Life Sci*. 2013. Vol. 92, № 3. P. 187–192.
44. Basgedik B., Ugur A., Sarac N. Antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties of *Iris albicans* // *Ind. Crops Prod*. 2015. Vol. 69. P. 480–484.
45. Amin A. et al. Investigating the pharmacological potential of *Iris kashmiriana* in limiting growth of epithelial tumors // *Pharmacogn. J*. 2013. Vol. 5, № 4. P. 170–175.

46. Ковалёв В.Н. et al. Количественное определение мангиферина в корневищах *Iris hungarica* и *Iris sibirica* методом ВЭЖХ // AZƏRBAYCAN ƏSZAÇILIQ və Farmakoter. JURNALI. 2016. Vol. 1. P. 13–17.
47. Bene K. et al. A multidirectional investigation of stem bark extracts of four African plants: HPLC-MS/MS profiling and biological potentials // J. Pharm. Biomed. Anal. 2019. Vol. 168. P. 217–224.
48. Zhao L. et al. HPLC-DAD analysis of *Hyssopus Cuspidatus* Boriss extract and mensuration of its antioxygenation property // BMC Complement. Med. Ther. 2020. Vol. 20, № 1. P. 228.
49. De Luca E. et al. A SERS and HPLC study of traditional dyes from native Chinese plants // Vib. Spectrosc. 2018. Vol. 95. P. 62–67.
50. Muhammad H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Ixora coccinea* root and quantification of phenolic compounds using HPLC // South African J. Bot. 2020. Vol. 135. P. 71–79.
51. Wu M. et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 10 bioactive flavonoids in *Aurantii Fructus Immaturus* (Zhishi) by ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution tandem mass spectrometry combined with chemometric methods // Phytochem. Anal. 2022.
52. Joothamongkhon J. et al. Quantitative analysis of methoxyflavones discriminates between the two types of *Kaempferia parviflora* // Phytochem. Anal. 2022.
53. Ockun M.A. et al. Comparative evaluation of phenolic profile and antioxidant activity of new sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes in Turkey // Phytochem. Anal. 2022.
54. Yuan Y. et al. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method // J. Food Sci. 2019. Vol. 84, № 12. P. 3850–3865.
55. Dhanani T. et al. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera* // Arab. J. Chem. 2017. Vol. 10. P. S1193–S1199.

56. Reis J.H. de O. et al. Supercritical Extraction of Red Propolis: Operational Conditions and Chemical Characterization // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 20. P. 4816.
57. Martínez J., Vance S. Supercritical Extraction Plants // *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. CRC Press, 2007. P. 25–49.
58. Paviani L.C. et al. Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract // *Brazilian J. Chem. Eng.* 2012. Vol. 29, № 2. P. 243–251.
59. ОФС.1.5.3.0008.18 Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // Государственная Фармакопея РФ. Издание XIV. 2018. Vol. 2.
60. ОФС.1.5.3.0010.15 Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // Государственная Фармакопея РФ. Издание XIV. 2018. Vol. 2.
61. Глущенко А.В., Георгиянц В.А., Бевз Н.Ю. Количественное определение флавоноидов и суммы полифенолов в надземной части володушки золотистой // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2014. Vol. 11, № 1. P. 172–176.
62. Chierentin G.S., Teixeira B.S., Del Mastro N.L. Total phenolic compounds of irradiated chia seeds // *Brazilian J. Radiat. Sci.* 2021. Vol. 9, № 1A.
63. AlFaris N.A. et al. Total phenolic content in ripe date fruits (*Phoenix dactylifera* L.): A systematic review and meta-analysis // *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. Vol. 28, № 6. P. 3566–3577.
64. Rojas-Ocampo E. et al. Antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of pulp and bagasse of four Peruvian berries // *Heliyon*. 2021. Vol. 7, № 8. P. e07787.
65. Полухина Т.С. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье шалфея степного // *Медико-фармацевтический журнал “Пульс.”* 2020. Vol. 22, № 9. P. 52–57.
66. Khuluk R.H. et al. An HPLC-DAD Method to Quantify Flavonoids in *Sonchus*

- arvensis and Able to Classify the Plant Parts and Their Geographical Area through Principal Component Analysis // *Separations*. 2021. Vol. 8, № 2. P. 12.
67. Goleniowski M. et al. *Phenolic Acids // Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 1951–1973.
68. Palacio L. et al. Effect of inoculum age on kinetic of biomass formation and phenolic accumulations in *Larrea divaricata* Cav. cell suspension culture // *Mol. Med. Chem*. 2010. Vol. 21. P. 64–69.
69. Zhao L., Liu L., Li J. Qualitative and Quantitative Analysis of Five Bioactive Flavonoids in *Salix bordensis* Turcz. by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS // *Am. J. Anal. Chem*. 2014. Vol. 05, № 13. P. 851–860.
70. Kumar N., Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications // *Biotechnol. Reports*. 2019. Vol. 24. P. e00370.
71. Palacio L. et al. In Vitro Propagation of “Jarilla” (*Larrea divaricata* CAV.) and Secondary Metabolite Production // *Biol. Pharm. Bull*. 2008. Vol. 31, № 12. P. 2321–2325.
72. Parveen M. et al. Structure elucidation, DNA binding and molecular docking studies of natural compounds isolated from *Crateva religiosa* leaves // *J. Mol. Struct*. 2022. Vol. 1251. P. 131976.
73. Walkowiak A. et al. Discrimination of Adulterated Ginkgo Biloba Products Based on 2T2D Correlation Spectroscopy in UV-Vis Range // *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 2. P. 433.
74. Mady M.S. et al. Polyphenolic profile and ethno pharmacological activities of *Callistemon subulatus* (Cheel) Craven leaves cultivated in Egypt // *J. Ethnopharmacol*. 2022. Vol. 284. P. 114698.
75. Abo-Qotb S.M.S. et al. In vivo anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Orobanche crenata* (Forssk.) aerial parts in relation to its phytomolecules // *Nat. Prod. Res*. 2022. Vol. 36, № 4. P. 1067–1072.
76. Tarbeeva D. V. et al. Polyphenolic Metabolites from *Iris pseudacorus* // *Chem. Nat*.

- Compd. 2014. Vol. 50, № 2. P. 363–365.
77. Kavtaradze N.S. et al. Isoflavonoids from Roots of *Pueraria hirsuta* Distributed in Georgia and their Hepatoprotective Activity // Chem. Nat. Compd. 2022. Vol. 58, № 1. P. 27–31.
 78. Šibul F. et al. HPLC–MS/MS profiling of wild-growing scentless chamomile // Acta Chromatogr. 2020. Vol. 32, № 2. P. 86–94.
 79. Kagisha V. et al. HPLC-UV Method for Standardization of *Neorautanenia mitis*, an African Plant Used in an Anti-Scabies Ointment // Rev. Bras. Farmacogn. 2020. Vol. 30, № 4. P. 582–587.
 80. Zhuo Z. et al. Fingerprint analysis of *Zanthoxylum armatum* DC. by HPLC // J. Food Compos. Anal. 2021. Vol. 96. P. 103736.
 81. Fetni S. et al. Composition and biological activity of the Algerian plant *Rosa canina* L. by HPLC-UV-MS // Arab. J. Chem. King Saud University, 2020. Vol. 13, № 1. P. 1105–1119.
 82. Deguchi Y., Ito M. Rosmarinic acid in *Perilla frutescens* and perilla herb analyzed by HPLC // J. Nat. Med. Springer Singapore, 2019. № 0123456789.
 83. Khalil R. et al. Phenolic acid profiling by RP-HPLC: Evaluation of antibacterial and anticancer activities of *Conocarpus erectus* plant extracts // Biol. Clin. Sci. Res. J. 2020. Vol. 2020, № 1.
 84. Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M. Drogenanalyse. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983.
 85. Kaya B., Menemen Y., Saltan F. Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* l. species collected in the North-eastern Black sea region of Turkey // African J. Tradit. Complement. Altern. Med. 2012. Vol. 9, № 3.
 86. Maleš Ž. et al. Thin-layer chromatographic analysis of flavonoids, phenolic acids, and amino acids in some Croatian *Hypericum* taxa // J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC. 2004. Vol. 17, № 4. P. 280–285.
 87. Gurunathan A., Subramaniam P. Preliminary phytochemical studies in the leaf, stem

- and root extracts of the traditional medicinal plant species, *Thalictrum javanicum* Blume // *Ruhuna J. Sci.* 2016. Vol. 5. P. 7.
88. Ouédraogo J.C.W. et al. Enhanced extraction of flavonoids from *Odontonema strictum* leaves with antioxidant activity using supercritical carbon dioxide fluid combined with ethanol // *J. Supercrit. Fluids.* 2018. Vol. 131. P. 66–71.
 89. Wang K. et al. TLC separation of catechins and theaflavins on polyamide plates // *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC.* 2009. Vol. 22, № 2. P. 97–100.
 90. Fougère L. et al. TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix // *Phytochem. Anal.* 2019. Vol. 30, № 2. P. 218–225.
 91. Behar N., Tiwari K.L., Jadhav S.K. Comparative Phytochemical Screening of Bioactive Compounds in *Curcuma caesia* Roxb. and *Curcuma longa* // *Res. J. Med. Plant.* 2013. Vol. 7, № 2. P. 113–118.
 92. Buhian W.P.C., Rubio R.O., Martin-Puzon J.J. Chromatographic fingerprinting and free-radical scavenging activity of ethanol extracts of *Muntingia calabura* L. leaves and stems // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2017. Vol. 7, № 2. P. 139–143.
 93. Jesionek W., Majer-Dziedzic B., Choma I.M. Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH • // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015. Vol. 38, № 11. P. 1147–1153.
 94. Appel H.M. et al. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5.
 95. Halkier B.A., Gershenzon J. BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GLUCOSINOLATES // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. Vol. 57, № 1. P. 303–333.
 96. Tao L., Hunter M.D. Allocation of resources away from sites of herbivory under simultaneous attack by aboveground and belowground herbivores in the common milkweed, *Asclepias syriaca* // *Arthropod. Plant. Interact.* 2013. Vol. 7, № 2. P. 217–224.
 97. Smirnova I. et al. Metabolic interaction at the level of extracellular amino acids

- between plant growth-promoting rhizobacteria and plants of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Rhizosphere*. 2022. Vol. 21, № 3. P. 100477.
98. Zhou S. et al. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory // *Plant Physiol*. 2015. P. pp.01405.2015.
 99. Lwalaba J.L.W. et al. High accumulation of phenolics and amino acids confers tolerance to the combined stress of cobalt and copper in barley (*Hordeum vulgare*) // *Plant Physiol. Biochem*. 2020. Vol. 155. P. 927–937.
 100. Crawford L.A. et al. The Synthesis of [gamma]-Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH // *Plant Physiol*. 1994. Vol. 104, № 3. P. 865–871.
 101. Perera W.H., Meepagala K.M., Duke S.O. Sesquiterpene- α -amino acid quaternary ammonium hybrids from *Stereum complicatum* (Steraceae) // *Biochem. Syst. Ecol*. 2020. Vol. 93. P. 104176.
 102. Zhang M. et al. Genistein rescues hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension through estrogen receptor and β -adrenoceptor signaling // *J. Nutr. Biochem*. 2018. Vol. 58. P. 110–118.
 103. Martínez-Castillo J.I., Saldaña-Robles A., Ozuna C. Arsenic stress in plants: A metabolomic perspective // *Plant Stress*. 2022. Vol. 3. P. 100055.
 104. Alfosea-Simón M. et al. Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system // *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 2020. Vol. 272. P. 109509.
 105. Shakya M. et al. Changes to the amino acid profile and proteome of the tropical freshwater microalga *Chlorella* sp. in response to copper stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2022. Vol. 233. P. 113336.
 106. Gwatidzo L., Botha B.M., McCrindle R.I. Determination of amino acid contents of manketti seeds (*Schinziophyton rautanenii*) by pre-column derivatisation with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and RP-HPLC // *Food Chem*. 2013. Vol. 141, № 3. P. 2163–2169.
 107. Zhu G. et al. Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two

- Compositae plants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. Vol. 158. P. 300–308.
108. Wang L. et al. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction // *Food Chem.* 2010. Vol. 123, № 4. P. 1259–1266.
 109. Moerdijk-Poortvliet T.C.W. et al. Extraction and analysis of free amino acids and 5'-nucleotides, the key contributors to the umami taste of seaweed // *Food Chem.* 2022. Vol. 370. P. 131352.
 110. Axelrod K., Samburova V., Khlystov A.Y. Relative abundance of saccharides, free amino acids, and other compounds in specific pollen species for source profiling of atmospheric aerosol // *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 799. P. 149254.
 111. Yibo C. et al. Comparisons of Metabolic Profiles for Carbohydrates, Amino Acids, Lipids, Fragrance and Flavones During Grain Development in indica Rice Cultivars // *Rice Sci.* 2022. Vol. 29, № 2. P. 155–165.
 112. Kemelbek M., Samir A., Burasheva G.S. Amino acid and fatty acid contents of the plants KRASCHENINNIKOVIA CERATOIDES // *Ser. Chem. Technol.* 2021. Vol. 5–6, № 449. P. 40–44.
 113. Budniak L. et al. Determination of amino acids of some plants from Gentianaceae family // *Pharmacia.* 2021. Vol. 68, № 2. P. 441–448.
 114. Determination of Amino Acids of Cultivated Species of the Genus *Primula L.* // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2020. Vol. 11, № 2. P. 8969–8977.
 115. Valimaña-Traverso J. et al. Cationic amine-bridged periodic mesoporous organosilica materials for off-line solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples prior to their simultaneous enantiomeric determination by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2018. Vol. 1566. P. 146–157.
 116. Guo M. et al. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization // *J. Food Compos. Anal.* 2015. Vol. 42. P. 84–90.
 117. Li Z., Wu J., Jia L. Analysis of amino acids in blood by combining zeolitic

- imidazolate framework-8-based solid phase extraction and capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. Vol. 168. P. 30–37.
118. Breadmore M.C. Preconcentration and frontal electroelution of amino acids for in-line solid-phase extraction–capillary electrophoresis // *Anal. Chim. Acta.* 2006. Vol. 556, № 1. P. 121–126.
 119. Feshchenko H. et al. Study of *Epilobium angustifolium* L. amino acids content by HPLC method // *Sci. Pharm. Sci.* 2021. № 6 (34). P. 85–90.
 120. Prudhviraju C. et al. Pre and Post Column Derivatization of Amino Acid - A Systematic Review of HPLC // *Acta Sci. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 5, № 8. P. 104–115.
 121. Corleto K.A. et al. A sensitive HPLC-FLD method combined with multivariate analysis for the determination of amino acids in l-citrulline rich vegetables // *J. Food Drug Anal.* 2019. Vol. 27, № 3. P. 717–728.
 122. Guillaume Y.-C., André C. A novel chiral column for the HPLC separation of a series of dansyl amino and arylalkanoic acids // *Talanta.* 2008. Vol. 76, № 5. P. 1261–1264.
 123. Krause I. et al. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives // *J. Chromatogr. A.* 1995. Vol. 715, № 1. P. 67–79.
 124. Kazan R.M. et al. Determination of amino acids content in tea species using liquid chromatography via pre-column fluorescence derivatization // *Microchem. J.* 2019. Vol. 150. P. 104103.
 125. Furota S. et al. Quantitative analysis of underivatized amino acids in the sub- to several-nanomolar range by ion-pair HPLC using a corona-charged aerosol detector (HPLC–CAD) // *J. Chromatogr. B.* 2018. Vol. 1095. P. 191–197.
 126. Smon A. et al. Comparison of liquid chromatography with tandem mass spectrometry and ion-exchange chromatography by post-column ninhydrin derivatization for amino acid monitoring // *Clin. Chim. Acta.* 2019. Vol. 495. P. 446–450.
 127. da Silva J.L., Delfino J.R., Stradiotto N.R. Underivatized amino acids detection by anion-exchange chromatography coupled to a nanostructured detector // *J.*

- Chromatogr. B. 2021. Vol. 1174. P. 122733.
128. Xu Y. et al. Identification of d-amino acids in tea leaves // *Food Chem.* 2020. Vol. 317. P. 126428.
 129. Qiu J. et al. Integration of solid phase extraction with HILIC-MS/MS for analysis of free amino acids in source water // *J. Environ. Sci.* 2022.
 130. Zheng N. et al. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in plant tissue by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *Acta Geochim.* 2017. Vol. 36, № 4. P. 680–696.
 131. Saurina J., Hernández-Cassou S. Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate // *J. Chromatogr. A.* 1994. Vol. 676, № 2. P. 311–319.
 132. Fiorino A., Frigo G., Cucchetti E. Liquid chromatographic analysis of amino and imino acids in protein hydrolysates by post-column derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid // *J. Chromatogr. A.* 1989. Vol. 476. P. 83–92.
 133. Tsiasioti A., Tzanavaras P.D. Selective post-column derivatization coupled to cation exchange chromatography for the determination of histamine and its precursor histidine in fish and Oriental sauce samples // *Food Chem.* 2021. Vol. 351. P. 129351.
 134. Ma J.F., Ryan P.R., Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids // *Trends Plant Sci.* 2001. Vol. 6, № 6. P. 273–278.
 135. Li G.-X. et al. Characteristics of Organic Acid Secretion Associated with the Interaction between *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and Poplar Root System // *Biomed Res. Int.* 2018. Vol. 2018. P. 1–12.
 136. Kuiper I. et al. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2004. Vol. 17, № 1. P. 6–15.
 137. López-Bucio J. et al. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate // *Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18, № 4. P. 450–453.
 138. Xiang G. et al. Transcriptomic and phosphoproteomic profiling and metabolite

- analyses reveal the mechanism of NaHCO₃-induced organic acid secretion in grapevine roots // *BMC Plant Biol.* 2019. Vol. 19, № 1. P. 383.
139. Huang R. et al. Physicochemical characterizations of microalgal methyl esters extracted with hexane and refined by vacuum distillation at different temperatures // *Fuel.* 2021. Vol. 297. P. 120779.
 140. Davies D.D. Organic acid metabolism in plants // *Biol. Rev.* 1959. Vol. 34, № 4. P. 407–444.
 141. Ahmed M.A.A., Mohammed A.A.A., Ishag K.E.A. Identification and determination of organic acids in some selected medicinal plants grown in Sudan. // *J. Med. Plants Stud.* 2022. Vol. 10, № 1. P. 12–16.
 142. Rivasseau C. et al. Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection // *J. Chromatogr. A.* 2006. Vol. 1129, № 2. P. 283–290.
 143. Mignard P. et al. Effect of Genetics and Climate on Apple Sugars and Organic Acids Profiles // *Agronomy.* 2022. Vol. 12, № 4. P. 827.
 144. Morgunov I.G. et al. Application of organic acids for plant protection against phytopathogens // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101, № 3. P. 921–932.
 145. Lee C.P. et al. The versatility of plant organic acid metabolism in leaves is underpinned by mitochondrial malate–citrate exchange // *Plant Cell.* 2021. Vol. 33, № 12. P. 3700–3720.
 146. Sukontaprapun B. et al. Key Organic Acids in Indigenous Plants in Thailand // *Am. J. Plant Sci.* 2019. Vol. 10, № 10. P. 1855–1870.
 147. Gout E. et al. Metabolism of Methanol in Plant Cells. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 123, № 1. P. 287–296.
 148. Londers E. et al. Organic acid analysis and plant water status of two Aechmea cultivars grown under greenhouse conditions: implications on leaf quality // *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 2005. Vol. 105, № 2. P. 249–262.
 149. Adams M.A. et al. Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of

- Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives // *Anal. Biochem.* 1999. Vol. 266, № 1. P. 77–84.
150. Arnetoli M. et al. Determination of Organic Acids in Plants of *Silene paradoxa* L. by HPLC // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56, № 3. P. 789–795.
151. Li Y. et al. Effect of alkali lignins with different molecular weights from alkali pretreated rice straw hydrolyzate on enzymatic hydrolysis // *Bioresour. Technol.* 2016. Vol. 200. P. 272–278.
152. Singh S.K., Saulnier B.K., Hodge D.B. Lignin properties and cell wall response to deconstruction by alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis in brown midrib sorghums // *Ind. Crops Prod.* 2022. Vol. 178. P. 114566.
153. Yu X. et al. Empowering alkali lignin with high performance in pickering emulsion by selective phenolation for the protection and controlled-release of agrochemical // *J. Clean. Prod.* 2022. Vol. 339. P. 130769.
154. Qian J. et al. Characterization of the structural and dynamic changes of cell wall obtained by ultrasound-water and ultrasound-alkali treatments // *Ultrason. Sonochem.* 2021. Vol. 77. P. 105672.
155. Coelho E.M. et al. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil // *J. Food Compos. Anal.* 2018. Vol. 66. P. 160–167.
156. de Sena Aquino A.C.M. et al. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater // *Food Chem.* 2015. Vol. 172. P. 725–730.
157. Wang Y. et al. Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS // *Plant Sci.* 2017. Vol. 262. P. 91–102.
158. Zielinska D. et al. Podand and macrocyclic amine receptors with urea functionalities for potentiometric detection of organic acids in HPLC // *Anal. Chim. Acta.* 2004. Vol. 523, № 2. P. 177–184.

159. Lues J.F.R., Botha W.C., Smit E.J. Ion-exchange HPLC analysis of a broad spectrum of organic acids from matured Cheddar cheese and assessment of extraction methods // *Food Res. Int.* 1998. Vol. 31, № 6–7. P. 441–447.
160. Rozali N.L. et al. Identification of amines, amino and organic acids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) spear leaf using GC- and LC/Q-TOF MS metabolomics platforms // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2021. Vol. 37. P. 102165.
161. Pook C., Diep T.T., Yoo M.J.Y. Simultaneous Quantification of Organic Acids in Tamarillo (*Solanum betaceum*) and Untargeted Chemotyping Using Methyl Chloroformate Derivatisation and GC-MS // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 4. P. 1314.
162. Jham G.N. et al. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee // *Phytochem. Anal.* 2002. Vol. 13, № 2. P. 99–104.
163. Jayasinghe N.S. et al. Quantification of Sugars and Organic Acids in Biological Matrices Using GC-QqQ-MS. 2018. P. 207–223.
164. Fujii H. et al. Analysis of organic residues from the Châteaumeillant oppidum (Cher, France) using GC–MS // *J. Cult. Herit.* 2021. Vol. 51. P. 50–58.
165. Meena A.K. et al. Evolution of Pharmacological activity with Molecular Docking of active constituents present in roots and small branches of *Aegle Marmelos*: A comparative study using HPLC, GC–MS, LC-MS // *Phytomedicine Plus.* 2022. Vol. 2, № 1. P. 100210.
166. Cuevas F.J. et al. Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics // *Food Control.* 2017. Vol. 82. P. 203–211.
167. Капиллярный электрофорез // Проблемы аналитической химии / под ред. Карцовой Л.А. 2014. 444 с.
168. Saavedra L., García A., Barbas C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice // *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 881, № 1–2. P. 395–401.

169. Mato I. et al. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis // *Anal. Chim. Acta*. 2006. Vol. 565, № 2. P. 190–197.
170. Esteves V.I. et al. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine // *Anal. Chim. Acta*. 2004. Vol. 513, № 1. P. 163–167.
171. Castro R. et al. Comparative analysis of the organic acid content of vinegar by capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography with conductimetric detection // *Chromatographia*. 2002. Vol. 56, № 1–2. P. 57–61.
172. Brugnerotto P. et al. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey // *J. Food Compos. Anal.* 2019. Vol. 82. P. 103243.
173. Böke N., Sirén H., Petrik L.F. Fungal biofermentation of pine bark producing organic acids and their quantification with capillary electrophoresis // *Ind. Crops Prod.* 2015. Vol. 67. P. 41–48.
174. Li X. et al. On-line capillary electrophoresis enrichment by combining chitosan trapping with surfactant assisted sample stacking for the ultratrace determination of organic acids in Plateau alfalfa roots // *Anal. Chim. Acta*. 2013. Vol. 789. P. 100–106.
175. Azevedo M.S. et al. Screening and determination of aliphatic organic acids in commercial Brazilian sugarcane spirits employing a new method involving capillary electrophoresis and a semi-permanent adsorbed polymer coating // *Food Res. Int.* 2014. Vol. 60. P. 123–130.
176. Yu R.B., Quirino J.P. Ionic liquids in capillary electrophoresis // *Ionic Liquids in Analytical Chemistry*. Elsevier, 2022. P. 235–274.
177. Turkia H. et al. Capillary electrophoresis for the monitoring of carboxylic acid production by *Gluconobacter oxydans* // *J. Chromatogr. A*. 2010. Vol. 1217, № 9. P. 1537–1542.
178. Rösch T., Troffer J., Huhn C. Indirect CE-UV detection for the characterization of organic and inorganic ions of a broad mobility and pK a range in engine coolants // *Electrophoresis*. 2019. Vol. 40, № 21. P. 2806–2809.

179. Peres R.G. et al. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection // *Food Control*. 2009. Vol. 20, № 6. P. 548–552.
180. Peiró S. et al. Modelling Extraction of White Tea Polyphenols: The Influence of Temperature and Ethanol Concentration // *Antioxidants*. 2014. Vol. 3, № 4. P. 684–699.
181. Alonso-Salces R.M. et al. A validated solid–liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues // *Talanta*. 2005. Vol. 65, № 3. P. 654–662.
182. Grutzmann Arcari S. et al. Polyphenolic compounds with biological activity in guabiroba fruits (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) by comprehensive two-dimensional liquid chromatography // *Electrophoresis*. 2020. Vol. 41, № 20. P. 1784–1792.
183. Azahar N.F., Gani S.S.A., Mohd Mokhtar N.F. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions of *Curcuma Zedoaria* leaves using response surface methodology // *Chem. Cent. J.* 2017. Vol. 11, № 1. P. 96.
184. Hayder Z. et al. Modeling of polyphenols extraction from pomegranate by-product using rotatable central composite design of experiments // *Acta Ecol. Sin.* 2021. Vol. 41, № 2. P. 150–156.
185. Arvapally M. et al. Development of an analytical method for the quantitative determination of multi-class nutrients in different food matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using design of experiments // *Food Chem.* 2021. Vol. 341. P. 128173.
186. Eylem C.C. et al. High-Throughput Single-Step plasma sample extraction optimization strategies with experimental design for LC-MS and GC–MS integrated metabolomics and lipidomics analysis // *Microchem. J.* 2022. Vol. 179. P. 107525.
187. Alimoradi V. et al. Surfactant-assisted salting-out homogenous liquid–liquid extraction based on deep eutectic solvents using central composite design; application in the extraction of natamycin from fruit juices before its determination by HPLC-UV

- // *Microchem. J.* 2022. Vol. 179. P. 107504.
188. Moraes M.L.L., Silva S.A., Silva H.D.T. Experimental mixture design as a tool to evaluate coumarin (1,2-benzopyrone) extraction from *Dipteryx odorata* seeds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. Vol. 210. P. 114586.
 189. Mabood F. et al. New design of experiment combined with UV–Vis spectroscopy for extraction and estimation of polyphenols from Basil seeds, Red seeds, Sesame seeds and Ajwan seeds // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017. Vol. 178. P. 14–18.
 190. Abouheif S.A. et al. Optimization of terpene lactones and ginkgolic acids extraction from *Ginkgo biloba* L. leaves by natural deep eutectic solvents using experimental design and HPTLC-MS analysis // *Microchem. J.* 2022. Vol. 176. P. 107246.
 191. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
 192. Bakirtzi C., Triantafyllidou K., Makris D.P. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants // *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* 2016. Vol. 3, № 3. P. 120–127.
 193. Vuong Q. V. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology // *Ind. Crops Prod.* 2015. Vol. 63. P. 197–202.
 194. Liao J., Guo Z., Yu G. Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells // *Ultrason. Sonochem.* 2021. Vol. 76. P. 105661.
 195. Zimare S.B., Mankar G.D., Barmukh R.B. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenolics and flavonoids from the leaves of *Lobelia nicotianifolia* and their radical scavenging potential // *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* 2021. Vol. 4. P. 100109.
 196. Xie G.-Y. et al. Phenolic metabolite profiles and antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional Chinese medicine “She-gan” by on-line HPLC–DAD

- coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. Vol. 98. P. 40–51.
197. Mykhailenko O. et al. Qualitative and Quantitative Analysis of Ukrainian Iris Species: A Fresh Look on Their Antioxidant Content and Biological Activities // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 19. P. 4588.
198. Kumar B. et al. Chemical Profiling and Discrimination of Medicinal Himalayan Iris Species Using Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry Combined with Principal Component Analysis // *Brazilian J. Anal. Chem.* 2019. Vol. 6, № 25.
199. Wei Y., Shu P., Qin M. Qualitative and Quantitative Evaluation of Phenolic Compounds in *Iris dichotoma* Pall. 2012. № May 2011. P. 197–207.
200. Kostić A.Ž. et al. Phytochemical Analysis and Total Antioxidant Capacity of Rhizome, Above-Ground Vegetative Parts and Flower of Three Iris Species // *Chem. Biodivers.* 2019. Vol. 16, № 3. P. e1800565.
201. Živković U. et al. Genetic and Environmental Factors Jointly Impact Leaf Phenolic Profiles of *Iris variegata* L. // *Plants*. 2021. Vol. 10, № 8. P. 1599.
202. Tikhomirova L.I. et al. Pharmaco-biochemical study of practical use of some members of the genus *Iris* L. (review) // *Chem. plant raw Mater.* 2015. Vol. 3. P. 25–34.
203. Rechenchoski D.Z. et al. Mangiferin: A promising natural xanthone from *Mangifera indica* for the control of acyclovir – resistant herpes simplex virus 1 infection // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. Vol. 28, № 4. P. 115304.
204. Bangaru S., Manivannan P., Muthu S. Spectroscopic investigations, quantum chemical calculations and molecular docking studies of Mangiferin - an anti-viral agent of H1N1 Influenza virus // *Chem. Data Collect.* 2020. Vol. 30. P. 100580.
205. Singh S.K. et al. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012. Vol. 2, № 2. P. S884–S887.
206. Chen H. et al. New insights into the effects and mechanism of a classic traditional Chinese medicinal formula on influenza prevention // *Phytomedicine*. 2017. Vol. 27.

Р. 52–62.

207. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “КАПЕЛЬ.” СПб: ООО “Веда,” 2006. 212 р.