

Выделение и определение фенольных кислот в плодах рябины (*Sorbus L.*) методом газовой хроматографии

И.В. Груздев, *Н.Э. Вебер, О.В. Скροцкая

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
Российская Федерация, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

*Адрес для переписки: Вебер Никита Эдуардович, e-mail: veber.n@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 21 февраля 2024 г., после доработки – 22 апреля 2024г.

Виды рода *Sorbus L.* (рябина) – древесные растения, произрастающие в Северном полушарии, представляют интерес как декоративные, пищевые и лекарственные растения. Плоды рябины содержат уникальный комплекс макро- и микроэлементов, а также биологически активных веществ, включая фенольные соединения. Сложность состава растительных образцов требует разработки высокоселективных и чувствительных способов для определения содержания органических компонентов разных классов. Для определения фенольных кислот в плодах рябины предложен способ, основанный на их двухстадийной химической модификации и предполагающий получение метиловых эфиров в условиях кислотного метанолиза, жидкостную экстракцию толуолом, промежуточную реэкстракцию в водно-щелочной раствор, последующее силилирование N, O-бис-(триметилсилил) трифторацетамидом (BSTFA) и газохроматографическое определение полученных производных с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектором. Изучены условия экстракционного извлечения фенольных кислот из плодов рябины по следующим параметрам: тип экстрагента, соотношение массы образца и экстрагента при проведении экстрагирования, а также продолжительность экстракции (механическое перемешивание). Оптимизирована стадия газохроматографического определения получаемых производных фенол кислот, установлены их хроматографические характеристики. Показано, что в процессе пробоподготовки удается добиться практически полного отделения алифатических кислот и других сопутствующих компонентов не кислотной природы от фенольных соединений, что значительно повышает как селективность, так и чувствительность определения аналитов. Интервал определяемых содержаний фенольных кислот (4-гидроксibenзойная кислота, 2-гидроксibenзойная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-бензойная кислота, 4-гидроксикоричная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-коричная кислота) в плодах рябины составляет 0.005-0.5 мг/г, предел обнаружения 0.001-0.002 мг/г, относительная погрешность 10-15%, масса навески растительного образца – 0.5 г, общая продолжительность анализа – 4 ч.

Ключевые слова: лекарственные растения, рябина (*Sorbus L.*), фенольные кислоты, экстракция, химическая модификация, газовая хроматография, хромато-масс-спектрометрия

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2024, vol. 28, no. 2, pp. 87-97

DOI: 10.15826/analitika.2024.28.2.002

Isolation and determination of phenolic acids in rowanberry fruits (*Sorbus L.*) by gas chromatography

I.V. Gruzdev, *N.E. Veber, O.V. Skrotskaya

Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IB FRC
Komi SC UB RAS),
28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation

*Corresponding author: Nikita E. Veber, e-mail: veber.n@ib.komisc.ru

Submitted 21 February 2024, received in revised form 22 April 2024

Species of the genus *Sorbus L.* (rowan) are woody plants growing in the Northern Hemisphere; they are of interest as decorative, food and medicinal plants. Rowan fruits contain a unique complex of macro- and microelements, as well as biologically active substances, including phenolic compounds. Complexity of

the composition of plant samples requires the development of highly selective and sensitive methods for determining the content of organic components of different classes. A method for determining phenolic acids in rowan fruits is proposed. The method is based on two-stage chemical modification of the acids, and involves preparing methyl esters under acidic methanolysis conditions, liquid extraction with toluene, intermediate re-extraction into an aqueous alkaline solution, subsequent silylation with N, O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) and gas chromatographic determination of the obtained derivatives using a flame ionization or mass spectrometric detector. Conditions for extraction of phenolic acids from rowan fruits were studied according to the following parameters: type of extractant, sample to the extractant mass ratio, and duration of extraction (mechanical stirring). The stage of gas chromatographic determination of obtained phenolic acid derivatives was optimized, and their chromatographic characteristics established. The possibility of achieving practically complete separation of aliphatic acids and other accompanying components of a non-acidic nature from phenolic compounds in the course of sample preparation was demonstrated; which significantly increased both the selectivity and sensitivity of the determination of analytes. The range of determined content of phenolic acids (4-hydroxybenzoic acid, 2-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamic acid) in rowan fruits was 0.005–0.5 mg/g, the limit of detection was 0.001–0.002 mg/g, the relative error was 10–15%, the sample weight was 0.5 g, the total duration of the analysis was 4 hours.

Keywords: medicinal plants, rowanberry (*Sorbus L.*), phenolic acids, extraction, chemical modification, gas chromatography, chromato-mass spectrometry

ВВЕДЕНИЕ

Виды рода *Sorbus L.* (рябина) – древесные растения, произрастающие в Северном полушарии. Благодаря уникальным биологическим особенностям (способность произрастать в условиях экстремального климата, неприхотливость к почвам) многие виды рябины удается культивировать и в условиях Севера. Представители этого рода интересны также как декоративные, пищевые и лекарственные растения [1].

Плоды рябины обыкновенной – фармакопейный вид лекарственного растительного сырья, известный в медицине как поливитаминное средство. Плоды рябины содержат сахар (до 5 %), яблочную, лимонную, винную и янтарную кислоты (до 2.5 %), дубильные и пектиновые вещества (до 1 %), аскорбиновую кислоту (до 0.2 %), каротиноиды (до 0.02 %), а также аминокислоты, эфирные масла, флавоноиды, тритерпеновые соединения, макро- и микроэлементы (калий, кальций, магний, натрий) [2–4].

Исследования показали, что 40 %-ный этанольный экстракт плодов рябины и выделенный из него полифенольный комплекс стимулирует фагоцитарную и бактерицидную активность иммунокомпетентных клеток, а также образование антител. Данное свойство связывают с наличием в плодах рябины комплекса фенольных соединений, прежде всего, проантоцианидинов, обладающих антиоксидантным, иммуностропным, противовоспалительным и капилляроукрепляющим действием [2, 3, 5, 6].

Классическим инструментальным методом определения веществ фенольного ряда в растениях является спектрофотометрия. Окрашенные соединения фенолов получают при взаимодействии с реактивами Фолина-Дениса или Фолина-Чокальтеу и измеряют оптическую плотность растворов при длинах волн 725 и 760 нм соответственно [5–9]. Оба реактива могут взаимодействовать не только с фенолами, но и с другими веществами, такими как аскорбиновая кислота, ароматические амины и сахара, что часто приводит к завышению результатов анализа [10].

Спектрофотометрические методы позволяют получать информацию только о суммарном содержании фенольных соединений, поэтому для определения индивидуальных соединений в растениях необходимо применять хроматографические методы.

Наиболее распространённым методом определения фенолов в растительных материалах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с диодно-матричным [5, 9, 11–15], флуориметрическим [16, 17] или масс-спектрометрическим [11, 12, 14, 15, 17, 18] детектированием. Для повышения селективности определения фенольных соединений в неочищенных растительных экстрактах, а также с целью их дополнительного концентрирования применяют твердофазную экстракцию (SPE) на различных сорбентах [19, 20].

Наряду с методом ВЭЖХ для определения фенольных соединений в растительных образцах применяют и газохроматографические методы (ГХ). В отличие от методов ВЭЖХ, ГХ методы требуют проведения предварительной дериватизации фенолов с целью снижения их полярности и повышения летучести аналитов [21]. Существует два основных направления химической модификации фенолов – получение их алкиловых [22–24] и триалкилсилильных [25–28] эфиров. Такие эфиры разделяют на неполярных или слабополярных полисилоксановых неподвижных жидких фазах, а для детектирования применяют пламенно-ионизационный [22, 26, 27] или масс-спектрометрический детектор [23–25, 27, 28].

Оба хроматографических метода имеют свои преимущества и недостатки. Так, к преимуществам газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) относят большую эффективность хроматографических колонок, более надежную идентификацию компонентов пробы из-за наличия обширных библиотек масс-спектров, и, в целом, этот метод обеспечивает большую точность результатов количественного

определения фенольных кислот [18]. К достоинствам метода ВЭЖХ относится более простая подготовка проб к хроматографическому анализу, большая селективность, связанная с вариабельностью параметров разделения аналитов (состав и pH подвижной фазы, тип хроматографической колонки и др.), а также отсутствие ограничения по молекулярной массе аналитов [29].

Большой проблемой, с которой часто сталкиваются исследователи при изучении сложных смесей, является необходимость селективного извлечения определяемых соединений из анализируемого образца. Так, содержание фенол кислот и алифатических карбоновых кислот в некоторых лекарственных травах (орегано, тимьян, шалфей) может различаться более, чем на порядок [18],

а сложность и многокомпонентность состава растительных образцов увеличивает вероятность наложения хроматографических пиков аналитов [15].

В данной работе предложен газохроматографический способ определения фенольных кислот в растениях (плоды рябины), позволяющий в процессе пробоподготовки отделить фенольные кислоты от других соединений кислотной природы (алифатические кислоты и др.), что позволяет значительно повысить как селективность, так и чувствительность определения аналитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

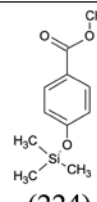
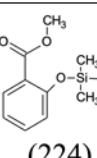
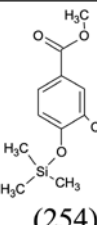
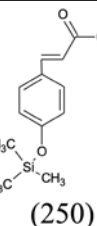
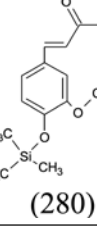
Стандартные вещества и реактивы. Для приготовления стандартных растворов фенол кислот

Таблица 1

Структура производных фенольных кислот и их хромато-масс-спектрометрические характеристики

Table 1

Structure of phenolic acid derivatives and their chromatography and chromato-mass spectrometry characteristics

№ пика	Аналит	Структура производного (молекулярная масса)	Характеристичные ионы, m/z (интенсивность)	Индекс удерживания
1	4-гидроксibenзойная кислота	 (224)	73 (24), 135 (67), 149 (28), 209 (100), 224 (50)	1506
2	2-гидроксibenзойная кислота <i>Салициловая кислота</i>	 (224)	59 (33), 89 (25), 179 (29), 209 (100), 224 (2)	1526
3	4-гидрокси-3-метоксибензойная кислота <i>Ванилиновая кислота</i>	 (254)	73 (26), 193 (37), 224 (100), 239 (59), 254 (37)	1663
4	4-гидроксикоричная кислота <i>Оксикоричная кислота</i>	 (250)	73 (37), 203 (30), 219 (30), 235 (64), 250 (100)	1801
5	4-гидрокси-3-метоксикоричная кислота <i>Феруловая кислота</i>	 (280)	73 (42), 219 (21), 250 (100), 265 (20), 280 (36)	2012

* – для полидиметилсилоксановой неподвижной фазы, содержащей 5 % фенильных групп

лот использовали стандартные образцы фирмы «Sigma-Aldrich» с содержанием основного вещества не менее 99 %: 4-гидроксибензойная кислота, 2-гидроксибензойная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-бензойная кислота, 4-гидроксикоричная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-коричная кислота. В качестве вспомогательных реактивов использованы: кислота серная концентрированная, «о.с.ч.»; кислота соляная концентрированная, «х.ч.»; гидроксид натрия, «ч.д.а.»; хлорид натрия, «х.ч.»; триэтиламин, «х.ч.»; N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) и 2,3,6-трихлорфенол фирмы «Sigma-Aldrich».

Растворители. Метилловый спирт, «х.ч.»; гексан, «о.с.ч.»; толуол, «х.ч.»; бензол, «х.ч.»; диэтиловый эфир, «х.ч.»; дихлорметан, «ч.д.а.»; ацетон, «х.ч.»; дистиллированная вода, очищенная при помощи системы очистки PURELAB UltraScientific фирмы ELGA (электропроводность 0.05-0.06 мкСм/см, органический углерод 3-10 ppb).

Оборудование. Хромато-масс-спектрометрический анализ (ГХ-МС) выполняли на газовом хроматографе «TRACE GC Ultra» («Thermo Fisher Scientific», США) с масс-селективным детектором DSQ и системой сбора и обработки хроматографической информации «Xcalibur Data System» (версия 1.4). Масс-спектры получали в режиме электронной ионизации (энергия электронов 70 эВ, сканирование

масс в интервале 50-650 а.е.м.). Для идентификации компонентов применяли программное обеспечение AMDIS 2.71 («NIST», США) и библиотеку масс-спектров NIST05 MS Library (210044 соединения).

Разделение компонентов проводили на капиллярной колонке TG-5MS («Thermo Fisher Scientific», США): длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина неподвижной фазы 0.25 мкм (полидиметил-силоксан, 5 % фенильных групп). Программирование температуры термостата колонок 100 °С – 5 °С/мин – 350 °С, газ-носитель – гелий (99.99 %), скорость газа-носителя 0.5 см³/мин, деление потока – 1:30, температура испарителя 280 °С, интерфейса 250 °С, камеры ионизации 200 °С. Результаты хромато-масс-спектрометрической идентификации фенольных кислот приведены в табл. 1.

Количественный химический анализ фенольных кислот в растительных материалах проводили на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД) и программным обеспечением «Хроматэк Аналитик 2.6» при следующих условиях: программирование температуры термостата колонок 110 °С – 4 °С/мин – 250 °С, газ-носитель – азот (99.99 %), давление газа-носителя на входе колонки – 40 кПа, деление потока – 1:30, температура испарителя – 280 °С, детектора – 250 °С.

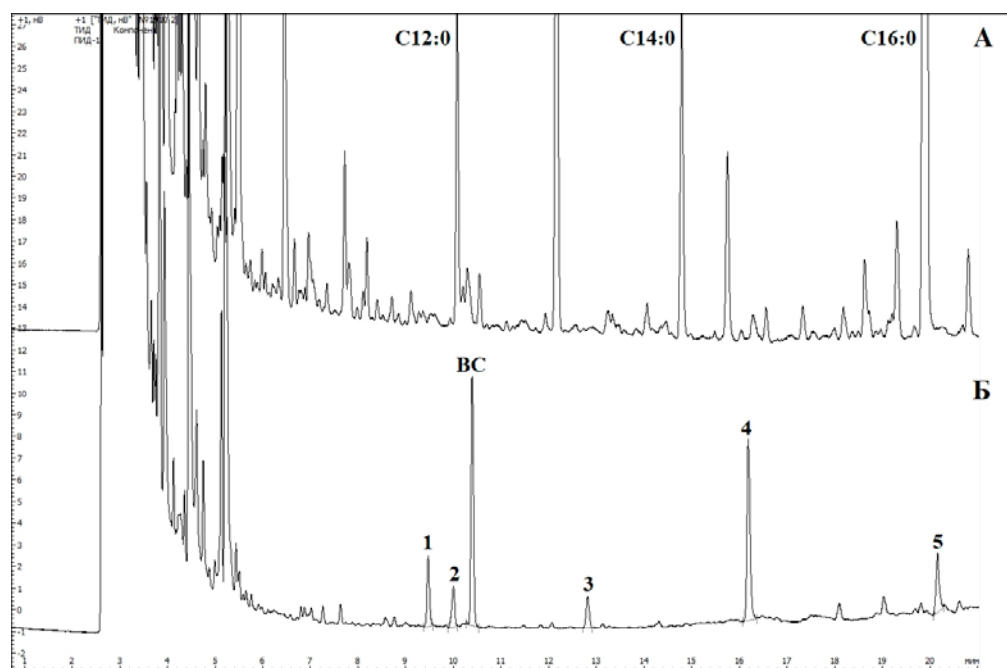


Рис. 1. Хроматограмма, иллюстрирующая определение фенольных кислот в плодах рябины вида *Sorbus aria* до отделения (А) и после отделения (Б) жирных кислот из экстракта (эфирные производные кислот): додекановая кислота (C12:0), тетрадекановая кислота (C14:0), гексадекановая кислота (C16:0), 4-гидроксибензойная кислота (1), 2-гидроксибензойная кислота (2), 4-гидрокси-3-метокси-бензойная кислота (3), 4-гидроксикоричная кислота (4), 4-гидрокси-3-метокси-коричная кислота (5), BC – внутренний стандарт. Условия хроматографического разделения указаны в тексте

Fig. 1. Chromatogram illustrating determination of phenolic acids in rowan fruits of the *Sorbus aria* species before separation (A) and after separation (B) of fatty acids from the extract (acid esters): dodecane acid (C12:0), tetradecane acid (C14:0), hexadecane acid (C16:0), 4-hydroxybenzoic acid (1), 2-hydroxybenzoic acid (2), 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (3), 4-hydroxycinnamic acid (4), 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamic acid (5), BC – internal standard. Chromatographic separation conditions are described in the text

Для разделения аналитов применяли кварцевую капиллярную колонку ZB-5 («Phenomenex», США): длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина неподвижной фазы 0.25 мкм (полидиметилсилоксан, 5 % фенильных групп). Хроматограмма экстракта, содержащего эфирные производные определяемых соединений, полученная при указанных условиях, приведена на рис. 1Б.

Подготовка проб. В качестве объекта исследования выбраны плоды разных видов рябины (*Sorbus L.*) из коллекции Ботанического сада Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Образцы рябины, высушенные при комнатной температуре, размалывали при помощи лабораторной мельницы IKA A11 (25000 об/мин) и просеивали через сито ($d = 0.25$ мм). Навеску образца массой 0.5 г переносили в коническую колбу вместимостью 100 см³, приливали 10 см³ метанола и экстрагировали в течение 30 мин на перемешивающем устройстве ELMi S-3L (140 об/мин). Последующее метилирование проводили в соответствии с рекомендациями работы [30], для чего 2.5 см³ экстракта переносили в стеклянную виалу вместимостью 15 см³ и вводили 0.35 см³ соляной кислоты (38 %). Виалу герметично закрывали винтовой крышкой, выдерживали в термостате при 90 °С в течение 90 мин и охлаждали до комнатной температуры. В охлажденную смесь приливали 2.5 см³ насыщенного раствора хлорида натрия, 1.5 см³ раствора гидроксида натрия (3 моль/дм³), 0.5 см³ толуола и экстрагировали в течение 5 мин. После расслаивания фаз отбирали 5 см³ нижнего (водно-спиртового) слоя, переносили в стеклянную пробирку, добавляли 0.7 см³ раствора серной кислоты (1.5 моль/дм³), 8.5 см³ толуола, 0.1 см³ внутреннего стандарта (2,3,6-трихлорфенол, 0.2 мг/см³) и проводили экстракцию в течение 5 мин. После расслаивания фаз отбирали 8 см³ толуольного экстракта, переносили в другую стеклянную пробирку, добавляли 0.8 см³ раствора гидроксида натрия (0.1 моль/дм³) и проводили реэкстракцию фенолов в течение 3 мин. После расслаивания фаз

7.5 см³ верхнего (органического) слоя удаляли. В пробирку вносили 0.05 см³ раствора серной кислоты (1.5 моль/дм³) и проводили повторную экстракцию в течение 3 мин. После расслаивания фаз 0.05 см³ верхнего (органического) слоя переносили в стеклянную виалу для проведения силилирования. Силилирование аналитов проводили при условиях, указанных в работе [31], добавляя 0.005 см³ триэтиламина (катализатор) и 0.01 см³ BSTFA. Смесь выдерживали в термостате при температуре 85 °С в течение 60 мин и анализировали методом ГХ-ПВД.

Идентификацию эфирных производных фенолкислот на хроматограмме проводили по хроматографическим индексам удерживания [32], значения которых приведены в табл. 1.

Для определения количественного содержания фенольных кислот в плодах рябины применяли метод внутреннего стандарта (внутренний стандарт: 2,3,6-трихлорфенол). Массовую концентрацию фенолкислот в экстрактах из плодов ρ (мг/см³) рассчитывали на основе уравнений (табл. 2), полученных при градуировке хроматографа [33]:

$$\rho = a \frac{S}{S_{st}} + b,$$

где S/S_{st} – соотношение площадей хроматографических пиков аналита и внутреннего стандарта (2,3,6-трихлорфенол), a , b – коэффициенты.

Массовую долю ω (мг/г) фенольной кислоты в плодах рябины рассчитывали по формуле:

$$\omega = \rho \frac{V_3}{m_0}$$

где ρ – массовая концентрация фенола в экстракте, мг/см³; V_3 – объем экстракта, отобранного для анализа, см³; m_0 – масса растительного образца, г.

Предел обнаружения (MDL) и минимально определяемую концентрацию (ML) фенолкислот в экстрактах из плодов рябины устанавливали по

Таблица 2

Аналитические характеристики методики определения фенольных кислот ($P = 0.95$, $n = 6$)

Table 2

Analytical characteristics of phenolic acids determination method ($P = 0.95$, $n = 6$)

№ пика	Кислота	Уравнение регрессии	R^2	**MDL, мкг/г	ML, мкг/г
1	4-гидрокси-бензойная	$\rho = (10.31 \pm 0.14) \cdot 10^{-3} \cdot (S/S_{st})$	0,9998	1.7	5.1
2	2-гидроксибензойная	$\rho = (11.11 \pm 0.13) \cdot 10^{-3} \cdot (S/S_{st})$	0,9999	1.7	5.1
3	4-гидрокси-3-метокси-бензойная	$\rho = (9.62 \pm 0.13) \cdot 10^{-3} \cdot (S/S_{st})$	0,9998	1.3	3.9
4	4-гидрокси-коричная	$\rho = (22.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-3} \cdot (S/S_{st})$	0,9996	1.8	5.4
5	4-гидрокси-3-метокси-коричная	$\rho = (31.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-3} \cdot (S/S_{st})$	0,9997	1.9	5.7

* – для диапазона концентраций градуировочных растворов 0.001–0.02 мкг/мл

** – значения MDL и ML приведены для экстрактов, полученных из растительного образца массой 0,5 г

алгоритму, рекомендуемому US EPA [34]. Для этого анализировали семь растворов фенолкислот в метаноле с концентрацией компонентов 0.002 мг/см³ по методике, приведенной выше, и рассчитывали MDL и ML по формулам:

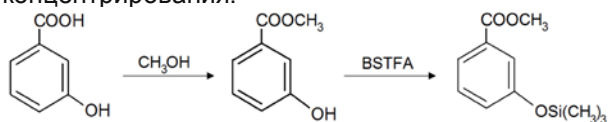
$$MDL = t_{(n-1, P=0.99)} s \quad ML = 3MDL$$

где s – стандартное отклонение результатов повторяющихся анализов (семь растворов фенолкислот); $t_{(n-1, P=0.99)}$ – коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности $P = 0.99$, n – число измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методика определения фенольных кислот. Для определения содержания фенольных кислот в растительных материалах методом газовой хроматографии, нами разработана методика, основные стадии которой представлены на рис. 2.

Методика предполагает двухстадийную химическую модификацию фенольных кислот – метилирование по карбоксильной группе в среде метанола и последующее силилирование в среде толуола после проведения экстракционного концентрирования:



Преимущество проведения дериватизации именно в такой последовательности состоит в следующем. При метилировании в среде метанола (кислотный метанолиз) этерификации подвергаются соединения с карбоксильными группами, прежде всего алифатические карбоновые кислоты [30]. Фенолкислоты при этих условиях также метилируются по карбоксильной группе, но при последующей экстракции из водно-спиртового щелочного раствора

в экстракт не переходят, поскольку находятся в форме фенолят-ионов. Алифатические кислоты, в свою очередь, в форме соответствующих метиловых эфиров практически количественно удаляются из водно-спиртового раствора и не мешают последующему хроматографическому определению фенолкислот (рис. 1 и 2). Кроме того, на стадии реэкстракции фенолкислот происходит не только их концентрирование, но и удаление сопутствующих компонентов, которые не обладают кислотными свойствами (рис. 2). Выделенные таким образом фенольные кислоты после силилирования определяют методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектором.

В плодах рябины (*Sorbus L.*) методом хромато-масс-спектрометрии были идентифицированы пять фенольных кислот, структурные формулы получаемых производных и их хромато-масс-спектрометрические характеристики приведены в табл. 1.

Оптимизация условий экстрагирования фенолкислот. Одним из наиболее важных этапов количественного химического анализа растительных материалов является экстракция, цель которой – максимально полное извлечение из образца аналитов. На процесс экстрагирования влияют многие факторы, такие как полярность растворителя, продолжительность экстракции, соотношение масс пробы и экстрагента, а также свойства самих экстрагируемых соединений [35, 36].

Низкомолекулярные алифатические спирты относятся к числу наиболее эффективных экстрагентов полярных органических соединений из различных растительных материалов [5–7, 9, 15, 18], сочетая в себе активный центр (ОН-группа) и углеводородный радикал. Действительно, по сравнению с другими растворителями, традиционно применяемыми для экстрагирования органических соединений из твердых матриц, степень извлечения фенольных



Рис. 2. Аналитический цикл определения фенольных кислот в растительных материалах

Fig. 2. Analytical cycle for determination of phenolic acids in plant materials

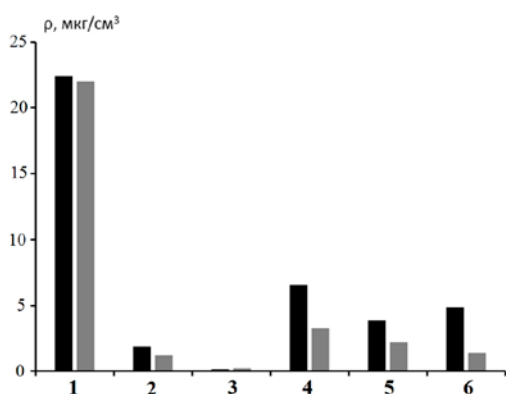


Рис. 3. Зависимость суммарной концентрации фенольных кислот в экстракте из плодов рябины от природы экстрагента: метанол (1), бензол (2), гексан (3), ацетон (4), дихлорметан (5), диэтиловый эфир (6); вид *S. mougeotii* (черный), вид *S. americana* (серый), масса образца 2 г, настаивание 24 ч

Fig. 3. Dependence of the total concentration of phenolic acids in the extract from rowan fruits on the nature of the extractant: methanol (1), benzene (2), hexane (3), acetone (4), dichloromethane (5), diethyl ether (6); species *S. mougeotii* (black), species *S. americana* (gray), sample weight 2 g, infusion 24 h

кислот из плодов рябины метанолом значительно выше (рис. 3).

Для установления оптимального соотношения масс экстрагента (m_3) и навески растительного образца (m_0) изучена зависимость извлечения фенолкислот от соотношения m_3/m_0 (рис. 4). Масса извлеченных кислот из разных образцов рябины возрастает до соотношения $m_3/m_0 \sim 10$, после чего она практически не изменяется, и применение больших соотношений будет сопровождаться перерасходом экстрагента.

Еще один параметр, влияющий на степень экстрагирования аналитов из растительных материалов – время контакта экстрагента с образцом. Наиболее продолжительно здесь смачивание образца, которое увеличивает как активную площадь десорбции аналитов, так и скорость их диффузии в раствор. Для интенсификации процесса извлечения фенолкислот использовали механическое перемешивание смеси метанола с измельченным растительным образцом. Зависимость извлечения исследуемых фенолкислот от продолжительности механического перемешивания для разных образцов рябины имеет сходный характер (рис. 4). Максимальное извлечение целевых кислот в метанол происходит при экстракции в течение 30–40 мин, после чего их концентрация в экстракте не изменяется, что указывает на достижение предела извлечения кислот при данных условиях.

Итак, наиболее эффективное экстрагирование фенолкислот из растительного образца достигается при соблюдении следующих условий:

- экстрагент: метанол;
- массовое соотношение экстрагент/образец при экстрагировании: не менее 10;

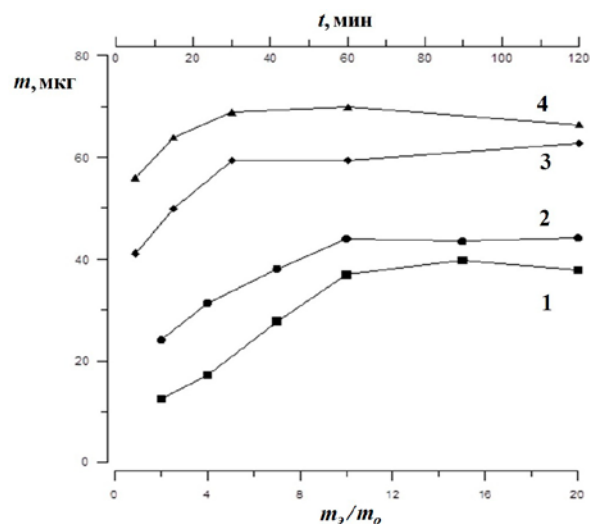


Рис. 4. Зависимость массы фенольных кислот в экстракте из плодов рябины при экстрагировании метанолом от массового соотношения экстрагент/образец (кривые 1 и 2) и времени механического перемешивания (кривые 3 и 4); вид *S. mougeotii* (1), вид *S. americana* (2), *S. koehneana* (3), вид *S. amurensis* (4), масса образца 0.5 г

Fig. 4. Dependence of the mass of phenolic acids in the extract from rowan fruits during extraction with methanol on the extractant/sample mass ratio (curves 1 and 2) and the time of mechanical stirring (curves 3 and 4); species *S. mougeotii* (1), species *S. americana* (2), *S. koehneana* (3), species *S. amurensis* (4), sample weight 0.5 g

- продолжительность экстрагирования: не менее 30 мин (механическое перемешивание суспензии метанола и измельченного растительного материала, 140 об/мин).

Определение фенольных кислот в растительных образцах. На основе проведенных исследований был разработан способ определения фенольных кислот в растительных образцах с применением внутреннего стандарта (рис. 2). В табл. 3 приведены результаты определения содержания фенольных кислот в плодах рябины двух разных видов, полученные методом «введено-найденно».

Применение двухстадийной химической модификации в процессе пробоподготовки позволяет значительно уменьшить мешающее влияние сопутствующих компонентов и детектировать фенольные кислоты (4-гидроксibenзойная кислота, 2-гидроксibenзойная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-бензойная кислота, 4-гидроксикоричная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-коричная кислота) в растительных материалах на уровне 1-2 мкг/г (табл. 2). Интервал определяемых содержаний фенольных кислот в плодах рябины составляет 0.005-0.5 мг/г, относительная погрешность 10-15 %, масса навески растительного образца – 0.5 г, общая продолжительность анализа – 4 ч.

Таблица 3

Результаты определения фенольных кислот в плодах рябины методом «введено-найдено» ($n = 5, P = 0.95$)

Table 3

Results of determination of phenolic acids in rowan fruits by the “added-found” method ($n = 5, P = 0.95$)

Фенольные кислоты, w, мкг/г	Добавка, мкг/г		s _r
	введено	найдено	
Плоды рябины (<i>Sorbus amurensis</i>)			
<i>p</i> -гидроксibenзойная, 5.2 ± 0.7	10.0	9.4 ± 1.3	0.06
<i>o</i> -гидроксibenзойная, н/о		10.4 ± 1.6	0.06
4-гидрокси-3-метоксибензойная, н/о		9.8 ± 0.9	0.04
4-гидроксикоричная кислота, 14.4 ± 1.8		10.2 ± 1.4	0.05
4-гидрокси-3-метоксикоричная, 6.8 ± 0.8		11.2 ± 1.5	0.05
Плоды рябины (<i>Sorbus discolor</i>)			
<i>p</i> -гидроксibenзойная, 9.8 ± 1.4	20.0	20.6 ± 2.2	0.04
<i>o</i> -гидроксibenзойная, н/о		19.8 ± 1.9	0.04
4-гидрокси-3-метоксибензойная, н/о		20.6 ± 2.8	0.05
4-гидроксикоричная кислота, 19.2 ± 2.4		22.1 ± 2.2	0.04
4-гидрокси-3-метоксикоричная, 4.6 ± 0.7		19.1 ± 2.3	0.05

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения фенольных кислот (4-гидроксibenзойная кислота, 2-гидроксibenзойная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-бензойная кислота, 4-гидроксикоричная кислота, 4-гидрокси-3-метокси-коричная кислота) в плодах рябины предложен способ, основанный на их двухстадийной химической модификации и предполагающий получение метиловых эфиров в условиях кислотного метанолиза, жидкостную экстракцию толуолом, промежуточную рекстракцию в водно-щелочной раствор, последующее силилирование N, O-бис-(триметилсилил) трифторацетамидом (BSTFA) и газохроматографическое определение с применением пламенно-ионизационного детектора (ГХ/ПИД).

Изучены условия экстракционного извлечения фенольных кислот из плодов рябины и оптимизирована стадия газохроматографического определения получаемых производных фенолкислот, установлены их хроматографические характеристики. Химическая модификация фенолкислот проводится с целью повышения селективности их определения – в процессе пробоподготовки удается полностью исключить мешающее влияние алифатических кислот и других сопутствующих компонентов не кислотной природы.

Применение двухстадийной химической модификации позволяет достигать пределов обнаружения фенольных кислот в растительных материалах (при массе образца 0.5 г) на уровне 1-2 мкг/г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено на базе ЦКП «Хроматография» Института биологии Коми НЦ УрО РАН и УНУ «Научная коллекция живых растений Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН» (№ 507428) в рамках государственного задания по теме «Репродуктивный потенциал ресурсных растений при интродукции на европейском Северо-Востоке» (№ 122040600020-7).

ACKNOWLEDGMENTS

The study was carried out using the equipment of the center of collective usage “Chromatography” of the Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS and the Scientific Collection of Living Plants of the Botanical Garden of the Institute of Biology of the Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS (USI No. 507428) within the framework of the state assignment on the topic of “Reproductive potential of resource plants when introduced in the European North-East” (No. 122040600020-7).

ЛИТЕРАТУРА

- Скроцкая, О.В., Пунегов В.В. Содержание каротиноидов в плодах растений видов и сортов рода *Sorbus* L. при интродукции в условиях Севера (Республика Коми) // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10, № 3. С. 112-116.
- Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г. Химический состав и биологическое действие экстракта из плодов рябины // Химия растительного сырья. 2015. Т. 2. С. 161-168.
- Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Sweet Rowanberries / A.T. Hukkanen [et al.] // J. Agric. FoodChem. 2006. V. 54, № 1. P. 112-119.
- Соколов П.Д. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hydrangeaceae - Haloragaceae. Л.: Наука, 1987. 326 с.
- Olszewska M.A., Presler A., Michel P. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from the Selected *Sorbus* Species // Molecules. 2012. V. 17, № 3. P. 3093-3113.
- Assessment of the Content of Phenolics and Antioxidant Action of Inflorescences and Leaves of Selected Species from the Genus *Sorbus* Sensu Stricto / M.A. Olszewska [et al.] // Molecules. 2010. V. 15, № 12. P. 8769-8783.
- A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts / N. Cicco [et al.] // Microchem. J. 2009. V. 91, № 1. P. 107-110.
- Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу: модифи-

- кация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 291-299.
9. Lapornik B., Prošek M., Golc Wondra A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time // J. Food Eng. 2005. V. 71, № 2. P. 214-222.
10. Box J.D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters // Water Res. 1983. V. 17, № 5. P. 511-525.
11. Analysis of Eleven Phenolic Compounds Including Novel *p*-Coumaroyl Derivatives in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by Ultra high-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection / A. Ribas Agustí [et al.] // Phytochem. Anal. 2011. V. 22, № 6. P. 555-563.
12. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species / L. Barros [et al.] // Food Chem. Toxicol. 2009. V. 47, № 6. P. 1076-1079.
13. Quantities of phenolic compounds and their impacts on the perceived flavour attributes of rye grain / R.-L. Heiniö [et al.] // J. Cereal Sci. 2008. V. 47, № 3. P. 566-575.
14. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) / M.J. Simirgiotis [et al.] // Food Chem. 2012. V. 131, № 1. P. 318-327.
15. Extraction and Determination of Phenolic Compounds in the Berries of *Sorbus americana* Marsh and *Lonicera oblongifolia* (Goldie) Hook / M. Becerra-Herrera [et al.] // Food Anal. Methods. 2015. V. 8, № 10. P. 2554-2559.
16. Characterization of Primary Standards for Use in the HPLC Analysis of the Procyanidin Content of Cocoa and Chocolate Containing Products / W. Hurst [et al.] // Molecules. 2009. V. 14, № 10. P. 4136-4146.
17. Kalili K.M., De Villiers A. Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216, № 35. P. 6274-6284.
18. Kivilompolo M., Obúrka V., Hyötyläinen T. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 388, № 4. P. 881-887.
19. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1187, № 1-2. P. 18-24.
20. Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. Solid-phase extraction of soy isoflavones // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1076, № 1-2. P. 110-117.
21. Груздев И.В., Зенкевич И.Г., Кондратенко Б.М. Дериватизация при газохроматографическом определении следов фенолов и анилинов в водных средах (обзор) // Успехи химии. 2015. Т. 84, № 6. С. 653-664.
22. Citová I., Sladkovský R., Solich P. Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 573-574. P. 231-241.
23. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection / Y.C. Fiamegos [et al.] // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1041, № 1-2. P. 11-18.
24. Smolarz H.D. Application of GC-MS method for analysis of phenolic acids and their esters in chloroformic extracts from some taxons of Polygonum L. genus // Chem. Anal. 2001. V. 46, № 3. P. 439-444.
25. Chu T. Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography-mass spectrometry // Talanta. 2001. V. 54, № 6. P. 1163-1171.
26. Ifeanacho M.O., Ikewuchi C.C., Ikewuchi J.C. Investigation of the profile of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiaka heudelotii* using gas chromatography coupled with flame ionization detector // Food Sci. Nutr. 2017. V. 5, № 3. P. 646-652.
27. Quantitative characterization of important metabolites of avocado fruit by gas chromatography coupled to different detectors (APCI-TOF MS and FID) / E. Hurtado-Fernández [et al.] // Food Res. Int. 2014. V. 62. P. 801-811.
28. Determination of phenolic acids in Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry / S.-Y. Park [et al.] // Food Sci. Biotechnol. 2012. V. 21, № 4. P. 1141-1148.
29. Proestos C., Sereli D., Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS // Food Chem. 2006. V. 95, № 1. P. 44-52.
30. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography // J. Lipid Res. 2010. V. 51, № 3. P. 635-640.
31. Груздев И.В., Кондратенко Б.М., Лю-Лян-Мин Е.И. Определение монозамещенных нитрофенолов в воде методом газовой хроматографии // Аналитика и контроль. 2020. Т. 24, № 2. С. 142-151.
32. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Практическая газовая и жидкостная хроматография. СПб.: Изд-во СПб гос. ун-та, 2002. 616 с.
33. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 179 с.
34. U.S. Environmental Protection Agency: Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants (Part 136, Appendix A & B). U.S. Code of Federal Regulations, 2024. P. 110-631.
35. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1000, № 1-2. P. 657-691.
36. Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids // J. Sep. Sci. 2007. V. 30, № 18. P. 3268-3295.

REFERENCES

- Skrotskaia O.V., Punegov V.V. [The content of carotenoids in plant fruits of *Sorbus* L. species and varieties when introduced in the North (Komi Republic)]. *Samarskii nauchnyi vestnik [Samara Journal of Science]*. 2021, vol. 10, no. 3, pp. 112-116. (in Russian). doi.org/10.17816/snv2021103116.
- Fomenko S. E., Kushnerova N. F., Sprygin V. G. [Chemical composition and biological effect of extract from rowan fruits]. *Himiia rastitel'noy syr'ya [Chemistry of plant raw material]*. 2015, vol. 2, pp. 161-168. (in Russian). doi:10.14258/jcprm.201502571.
- Hukkanen A.T., Pölönen S.S., Kärenlampi S.O., Kokko H.I. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Sweet Rowanberries. *J. Agric. Food Chem.* 2006, vol. 54, no. 1, pp. 112-119. doi:10.1021/jf051697g.
- Sokolov P. D. *Rastitel'nye resursy SSSR. Tsvetkovye rasteniia, ih himicheskie sostavy, ispol'zovanie. Semeistva Hydrangeaceae-Haloragaceae [Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition, use. Families Hydrangeaceae-Haloragaceae]*. Leningrad, Nauka, 1987. 326 p. (in Russian).
- Olszewska M. A., Presler A., Michel P. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from

- the Selected. *Sorbus* Species. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 3, pp. 3093-3113. doi:10.3390/molecules17033093.
6. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P., Kicel A. Assessment of the Content of Phenolics and Antioxidant Action of Inflorescences and Leaves of Selected Species from the Genus *Sorbus* Sensu Stricto. *Molecules*, 2010, vol. 15, no. 12, pp. 8769-8783. doi:10.3390/molecules15128769.
7. Cicco N., Lanorte M. T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.*, 2009, vol. 91, no. 1, pp. 107-110. doi:10.1016/j.microc.2008.08.011.
8. Nikolaeva T., Lapshin P., Zagorskina N. [Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin-Denis reagent and Folin-Chocalteu reagent: modification and comparison]. *Himiia rastitel'novo syr'ia [Chemistry of plant raw material]*, 2021, pp. 291-299. (in Russian). doi:10.14258/jcprm.2021028250.
9. Lapornik B., Prošek M., Golc Wondra A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.*, 2005, vol. 71, no. 2, pp. 214-222. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036.
10. Box J.D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.*, 1983, vol. 17, no. 5, pp. 511-525. doi:10.1016/0043-1354(83)90111-2.
11. Ribas-Agustí A., Gratacós-Cubarsí M., Sárraga C., García-Regueiro J.-A., Castellari M. Analysis of Eleven Phenolic Compounds Including Novel *p*-Coumaroyl Derivatives in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by Ultra high performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Phytochem. Anal.*, 2011, vol. 22, no. 6, pp. 555-563. doi:10.1002/pca.1318.
12. Celikler S., Tas S., Vatan O., Ziyank-Ayvalik S., Yildiz G., Bilaloglu R. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, vol. 47, no. 6, pp. 1076-1079. doi:10.1016/j.fct.2009.01.039.
13. Heiniö R.-L., Liukkonen K.-H., Myllymäki O., Pihlava J.-M., Adlercreutz H., Heinonen S.-M., Poutanen K. Quantities of phenolic compounds and their impacts on the perceived flavour attributes of rye grain. *J. Cereal Sci.*, 2008, vol. 47, no. 3, pp. 566-575. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.018.
14. Simirgiotis M.J., Silva M., Becerra J., Schmeda-Hirschmann G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chem.*, 2012, vol. 131, no. 1, pp. 318-327. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.118.
15. Becerra-Herrera M., Lazzoi M. R., Sayago A., Beltrán R., Del Sole R., Vasapollo G. Extraction and Determination of Phenolic Compounds in the Berries of *Sorbus americana* Marsh and *Lonicera oblongifolia* (Goldie) Hook. *Food Anal. Methods*, 2015, vol. 8, no. 10, pp. 2554-2559. doi:10.1007/s12161-015-0151-5.
16. Hurst W.J., Stanley B., Glinski J. A., Davey M., Payne M. J., Stuart D. A. Characterization of Primary Standards for Use in the HPLC Analysis of the Procyanidin Content of Cocoa and Chocolate Containing Products. *Molecules*, 2009, vol. 14, no. 10, pp. 4136-4146. doi:10.3390/molecules14104136.
17. Kalili K.M., De Villiers A. Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins. *J. Chromatogr. A*, 2009, vol. 1216, no. 35, pp. 6274-6284. doi:10.1016/j.chroma.2009.06.071.
18. Kivilompolo M., Obürka V., Hyötyläinen T. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, vol. 388, no. 4, pp. 881-887. doi:10.1007/s00216-007-1298-8.
19. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J. Chromatogr. A*, 2008, vol. 1187, no. 1-2, pp. 18-24. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.001.
20. Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A*, 2005, vol. 1076, no. 1-2, pp. 110-117. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.045.
21. Gruzdev I.V., Kondratenok B.M., Zenkevich I.G. [Derivatization in gas chromatographic determination of phenol and aniline traces in aqueous media]. *Uspehi himii [Russian Chemical Reviews]*, 2015, vol. 84, no. 6, pp. 653-664. (in Russian). doi:10.1070/rcr4553.
22. Citová I., Sladkovský R., Solich P. Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 2006, vol. 573-574, pp. 231-241. doi:10.1016/j.aca.2006.04.077.
23. Fiamegos Y. C., Nanos C. G., Vervoort J., Stalikas C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1041, no. 1-2, pp. 11-18. doi: 10.1016/j.chroma.2004.04.041.
24. Smolarz H.D. Application of GC-MS method for analysis of phenolic acids and their esters in chloroformic extracts from some taxons of Polygonum L. genus. *Chem. Anal.*, 2001, vol. 46, no. 3, pp. 439-444.
25. Chu T. Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 2001, vol. 54, no. 6, pp. 1163-1171. doi:10.1016/s0039-9140(01)00392-7.
26. Ifeanacho M.O., Ikewuchi C.C., Ikewuchi J.C. Investigation of the profile of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiala heudelotii* using gas chromatography coupled with flame ionization detector. *Food Sci. Nutr.*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 646-652. doi:10.1002/fsn3.443.
27. Hurtado-Fernández E., Pacchiarotta T., Mayboroda O. A. Fernández-Gutiérrez A., Carrasco-Pancorbo A. Quantitative characterization of important metabolites of avocado fruit by gas chromatography coupled to different detectors (APCI-TOF MS and FID). *Food Res. Int.*, 2014, vol. 62, pp. 801-811. doi:10.1016/j.foodres.2014.04.038.
28. Park S.-Y., Ha S.-H., Lim S.-H., Jung J. Y., Lee S. M., Yeo Y., Kim J. K. Determination of phenolic acids in Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Food Sci. Biotechnol.*, 2012, vol. 21, no. 4, pp. 1141-1148. doi:10.1007/s10068-012-0149-3.
29. Proestos C., Sereli D., Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.*, 2006, vol. 95, no. 1, pp. 44-52. doi:10.1016/j.foodchem.2004.12.016.
30. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, 2010, vol. 51, no. 3, pp. 635-640. doi:10.1194/jlr.D001065.
31. Gruzdev, I.V., Kondratenok B.M., Liu-Lian-Min E.I. [Determination of mononitrophenols in water by gas-chromatography]. *Analitika i kontrol' [Analytical and Control]*, 2020, vol. 24, no. 2, pp. 142-151. (in Russian). doi:10.15826/analitika.2020.24.2.006
32. Stoliarov B.V., Savinov I.M., Vitenberg A.G. *Prakticheskaja gazovaja i zhidkostnaia khromatografija [Practical gas and liquid chromatography]*. Saint Petersburg, St. Petersburg State University Publishing House, 2002. 616 p. (in Russian).

33. Novak I. *Kolichestvennyi analiz metodom gazovoi khromatografii [Quantitative analysis by gas chromatography]*. Moscow, Mir publ., 1978. 179 p. (in Russian).
34. U.S. Environmental Protection Agency: Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants (Part 136, Appendix A & B). U.S. Code of Federal Regulations, 2024, pp. 110–631.
35. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 2003, vol. 1000, no. 1-2, pp. 657-691. doi:10.1016/s0021-9673(03)00058-x.
36. Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, 2007, vol. 30, no. 18, pp. 3268-3295. doi:10.1002/jssc.200700261.