

УДК 581.1

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ С РЕАКТИВОМ ФОЛИНА-ДЕНИСА И РЕАКТИВОМ ФОЛИНА-ЧОКАЛЬТЕУ: МОДИФИКАЦИЯ И СРАВНЕНИЕ

© *Т.Н. Николаева**, *П.В. Лапшин*, *Н.В. Загоскина*

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276 (Россия), e-mail: niktat2011@mail.ru*

Проведена модификация метода определения суммарного содержания фенольных соединений в экстрактах растительных тканей с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу, позволяющая установить соответствие результатов, полученных при их использовании. Метод с применением реактива Фолина-Дениса адаптирован для проведения определений в микрообъемах. Для метода с применением реактива Фолина-Чокальтеу подобрана концентрация последнего (0.4 н, разведение стандартного реактива в 5 раз) и состав реакционной смеси, при использовании которых оптические плотности продуктов восстановления реактивов Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу содержащими полифенолы этанольными экстрактами из пшеницы, гречихи и калусной ткани чая были практически одинаковы. Спектры поглощения продуктов восстановления этих реактивов галловой кислотой, рутином, (-)-эпикатехином, а также этанольными экстрактами из пшеницы, гречихи и калусной ткани чая, располагались в одной и той же области (680–770 нм) и имели схожие характеристики. Калибровочные графики зависимости оптической плотности растворов от концентрации веществ-стандартов (галловая кислота, (-)-эпикатехин, рутин), построенные с использованием реактивов Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу, имели линейный характер в пределах концентраций 10–100 мкг/мл и практически совпадали. Результаты определения содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах растений, отличающихся способностью к их накоплению, показали очень близкие и статистически достоверные значения при использовании этих двух реактивов.

Ключевые слова: метод, фенольные соединения, реактив Фолина-Дениса, реактив Фолина-Чокальтеу, этанольные экстракты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках темы государственного задания Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (№ АААА-А-19-119041890054-8).

Введение

К актуальным и важным задачам исследователей и практиков относится определение содержания различных метаболитов в тканях и органах растений. К их числу относятся и фенольные соединения или полифенолы – одни из наиболее распространенных веществ вторичного метаболизма с чрезвычайно разнообразной структурой [1, 2]. Их функциональная роль связана с процессами роста и развития растений, регуляции процессов фотосинтеза, дыхания, гормональной системы, а также защиты от действия различных стрессовых факторов [3, 4]. Антиоксидантные и антирадикальные свойства этих вторичных метаболитов позволяют

Николаева Татьяна Николаевна – научный сотрудник,
e-mail: niktat2011@mail.ru

Лапшин Петр Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: p.lapshin@mail.ru

Загоскина Наталья Викторовна – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник,
e-mail: zagoskina@mail.ru

им «обезвреживать» активные формы кислорода [5]. Это обусловлено наличием в их структуре гидроксильных групп, которые легко взаимодействуют с различными активными формами кислорода, в том числе со свободными радикалами раз-

* Автор, с которым следует вести переписку.

ного происхождения, тем самым прерывая процессы радикально-цепного окисления, что особенно важно при действии стрессовых факторов на клетки растений [5, 6].

Известно, что фенольные соединения не синтезируются в организмах животных и человека, а поступают в них преимущественно с растительной пищей, где проявляют противовоспалительные, противовирусные, антиканцерогенные, кардиопротекторные и другие свойства [7]. Выраженное терапевтическое действие, высокая физиологическая активность и низкая токсичность растительных полифенолов обуславливают возможность их использования в медицинской и фармацевтической промышленности. Именно этот аспект вызывает большой интерес как у исследователей, так и практиков.

Для определения содержания фенольных соединений в тканях и клетках растений необходимы надежные, чувствительные и несложные в исполнении методы. В настоящее время для этой цели применяется спектрофотометрический (колориметрический) метод с использованием реактивов Фолина-Дениса или Фолина-Чокальтеу, содержащих в своем составе фосфовольфрамовые и фосфомолибденовые гетерополикислоты, которые восстанавливаются фенольными соединениями в щелочной среде. Это приводит к образованию комплекса синего цвета (вольфрамовая синь или гетерополисини), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений [8, 9].

Впервые метод количественного определения фенольных соединений в моче человека с использованием гетерополикислот был предложен Фолиным и Денисом в 1912 г. [10]. Впоследствии он был модифицирован Суэйном и Хиллисом для определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных объектах [11]. В течение длительного времени это был основной (классический) метод их определения с использованием реактива Фолина-Дениса [12]. Однако его недостатком было образование осадка белого цвета, который требовалось удалять (фильтрацией или центрифугированием) перед спектрофотометрированием гетерополисиней. В дальнейшем для устранения этого недостатка реактив Фолина-Дениса был модифицирован: в его состав был дополнительно внесен сульфат лития (для предотвращения образования осадка) и увеличена доля фосфомолибденовой кислоты в комплексе гетерополикислот (для повышения его чувствительности). Этот улучшенный вариант реактива Фолина-Дениса получил название «реактив Фолина-Чокальтеу» [13]. Первоначально он предназначался для определения содержания тирозина, триптофана и белка, но оказался подходящим и для количественного определения фенольных соединений [8, 13, 14].

Следует отметить, что в оригинальном методе определения содержания фенольных соединений в экстрактах растительных тканей использовались большие объемы реактивов, что требовало их значительного расхода [13]. В связи с этим в дальнейшем он претерпел разнообразные модификации, которые касались изменений объема реакционной смеси, концентрации реактива, соотношения образец-реактив [6, 15, 16]. Следует подчеркнуть, что уже в течение длительного периода времени для определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах этот метод применяется с использованием обоих этих реактивов. Однако в последние годы предпочтение отдается реактиву Фолина-Чокальтеу, особенно зарубежными авторами [16, 17]. В связи с этим возникает вопрос о возможности сопоставления данных по суммарному содержанию фенольных соединений в растительных экстрактах, полученных с использованием реактива Фолина-Дениса и реактива Фолина-Чокальтеу.

Цель работы – модификация и сравнение метода определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с применением реактива Фолина-Дениса и реактива Фолина-Чокальтеу для установления соответствия результатов, полученных при их использовании.

Экспериментальная часть

Для исследований использовали этанольные экстракты, полученные из гетеротрофной каллусной культуры чайного растения (*Camellia sinensis* L.), проростков мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Амир» и гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) сорта «Даша», а также растворы галловой кислоты, (-)-эпикатехина и рутина.

Каллусную культуру стебля чайного растения выращивали в темноте при +25 °С и относительной влажности 70% на основной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (5 мг /л), глюкозу (2.5%) и агар (7%) [18]. Для исследования использовали каллусы 20-дневного возраста. Проростки пшеницы и гречихи выращивали рулонным способом в течение 11 дней на воде при 16-часовом фотопериоде (освещение 5000 люкс) и температуре +25 °С. Материал фиксировали жидким азотом и хранили при -70 °С.

Фенольные соединения экстрагировали 96%-ным этанолом из замороженного жидким азотом и измельченного растительного материала в течение 45 мин при температуре 45 °С [19]. Гомогенат центрифугировали при 16000 об./мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отделяли и использовали для одновременного определения суммарного содержания фенольных соединений с реактивами Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу. Содержание фенольных соединений в растительном материале выражали в мг-экв. галловой кислоты / г сырой массы.

Растворы галловой кислоты, рутина и (-)-эпикатехина готовили путем разведения коммерческих препаратов («Serva», Германия) в 96%-ном этаноле в пределах концентраций 10–150 мкг/мл. Их использовали для построения калибровочных графиков с реактивом Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу. Реактив Фолина-Дениса был приготовлен согласно стандартной методике [12]. Реактив Фолина-Чокальтеу представлял собой коммерческий препарат («AppliChem.Pancreas», Германия).

Спектры поглощения гетерополисиней, образовавшихся при взаимодействии реактивов Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу с галловой кислотой, (-)-эпикатехином, рутином, этанольными экстрактами из каллусной культуры ткани чая, гречихи и пшеницы измеряли в пределах 600–900 нм.

При проведении исследований использовали микроцентрифуги MiniSpin (Эппендорф, Германия), термостаты «Гном» (ДНК-технологии, Россия), спектрофотометры СФ-46 (ЛОМО, Россия) и «Specord-40» (Германия).

Все определения проводили в пяти биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 12.2. В таблице представлены средние арифметические значения определений и их стандартные ошибки. Надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.050$.

Обсуждение результатов

Современный подход к выполнению научных исследований и получения данных требует применения надежных, воспроизводимых и несложных в исполнении методов, а также уменьшения на них затрат, в том числе за счет расхода реактивов. С этой целью в первую очередь был модифицирован классический (стандартный) метод определения суммарного содержания фенольных соединений с реактивом Фолина-Дениса, в котором реакционная смесь состоит из 0.5 мл образца (этанольный растительный экстракт или реактив-стандарт); 0.5 мл реактива Фолина-Дениса, 1 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и дистиллированной воды в общем объеме 10 мл [11, 12]. В нашем случае он был уменьшен до 1.5 мл при сохранении соотношения и концентрации всех компонентов, что позволило использовать пробирки фирмы «Эппендорф» (1.7 мл), термостаты ДНК-технологии и микроцентрифуги. Кроме того, вместо насыщенного раствора Na_2CO_3 концентрация которого может изменяться в зависимости от температуры окружающей среды, использовали 20%-ный раствор, как это отмечалось в других работах [6, 8]. Строго говоря, его концентрация не имеет принципиального значения и может варьировать в довольно широком диапазоне (от 7.5% до 20%). Необходимо лишь, чтобы она была одинаковой при проведении всех определений, поскольку функция этого компонента в реакционной смеси состоит в поддержании щелочной среды в области $\text{pH} = 9\text{--}10$, оптимальной для проведения реакции [8, 14].

Все вышеизложенное привело к тому, что состав реакционной смеси для определения суммарного содержания фенольных соединений стандартным методом содержал 0.075 мл этанольного экстракта из растительного материала или реактива-стандарта (при построении калибровочной кривой), 0.075 мл реактива Фолина-Дениса, 0.15 мл 20% раствора Na_2CO_3 и 1.20 мл дистиллированной воды.

Следующим этапом работы была отработка метода определения содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах растений с использованием реактива Фолина-Чокальтеу. Основным критерием в этом случае было получение одинаковых значений оптической плотности растворов гетерополисиней, образовавшихся в результате реакции фенольных соединений с этими двумя реактивами. Для этой цели определение проводили параллельно. Состав реакционной смеси в обоих случаях был одинаков, за исключением того, что при применении реактива Фолина-Чокальтеу при сохранении вносимого объема использовали его разные концентрации. Это достигалось за счет разведения коммерческого раствора в 2–10 раз (данные не приведены). Контролем в обоих случаях служила смесь, где вместо экстрактов вносили 0.075 мл 96% этанола. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч, при необходимости центрифугировали для удаления

образовавшегося осадка, после чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 725 нм [12]. Измерения проводили в кюветах с узким пучком длиной оптического пути 1 см.

Использование этого подхода показало, что при разбавлении коммерческого реактива Фолина-Чокальтеу в 5 раз (концентрация составила 0.4 н) оптическая плотность гетерополисиней, образованных при взаимодействии с этанольными экстрактами из различных растительных тканей, была практически равной таковой, которая была получена при использовании реактива Фолина-Дениса. Эти данные послужили основой для рассмотрения возможности расчета и представления данных по суммарному содержанию фенольных соединений в растениях по методу Фолина-Чокальтеу, базируясь на данных, полученных классическим методом с использованием реактива Фолина-Дениса, что имеет важное значение для представления экспериментального материала в научных статьях.

Для расчета суммарного содержания фенольных соединений в растительном материале необходимо было провести построение калибровочных графиков, отражающих зависимость оптической плотности раствора от концентрации вещества в нем. Для этой цели мы использовали галловую кислоту, которая принята в качестве стандарта для расчетов в большинстве научных работ (особенно зарубежных), а также (-)-эпикатехин и рутин, которые широко распространены в тканях растений и часто используются в качестве стандартов [20, 21]. Во всех случаях работу проводили параллельно, используя реактив Фолина-Дениса и реактив Фолина-Чокальтеу. Как следует из представленных на рисунке 1 данных, все калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации веществ-стандартов имеют линейный характер в пределах 10–100 мкг и практически полностью совпадают.

Следовательно, разработанный нами метод определения суммарного содержания фенольных веществ с реактивом Фолина-Чокальтеу сопоставим с таковым при использовании реактива Фолина-Дениса. Это подтверждается и результатами определения суммарного содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах пшеницы, гречихи и каллусной культуры ткани чайного растения (табл.). При использовании этих двух реактивов их количество в исследованных пробах было достаточно близким и статистически достоверным. Следовательно, значительные различия в содержании и составе фенольных комплексов у этих растительных объектов [18, 19, 22] не влияли на определение и расчет суммарного содержания фенольных соединений при использовании реактива Фолина-Дениса или реактива Фолина-Чокальтеу.

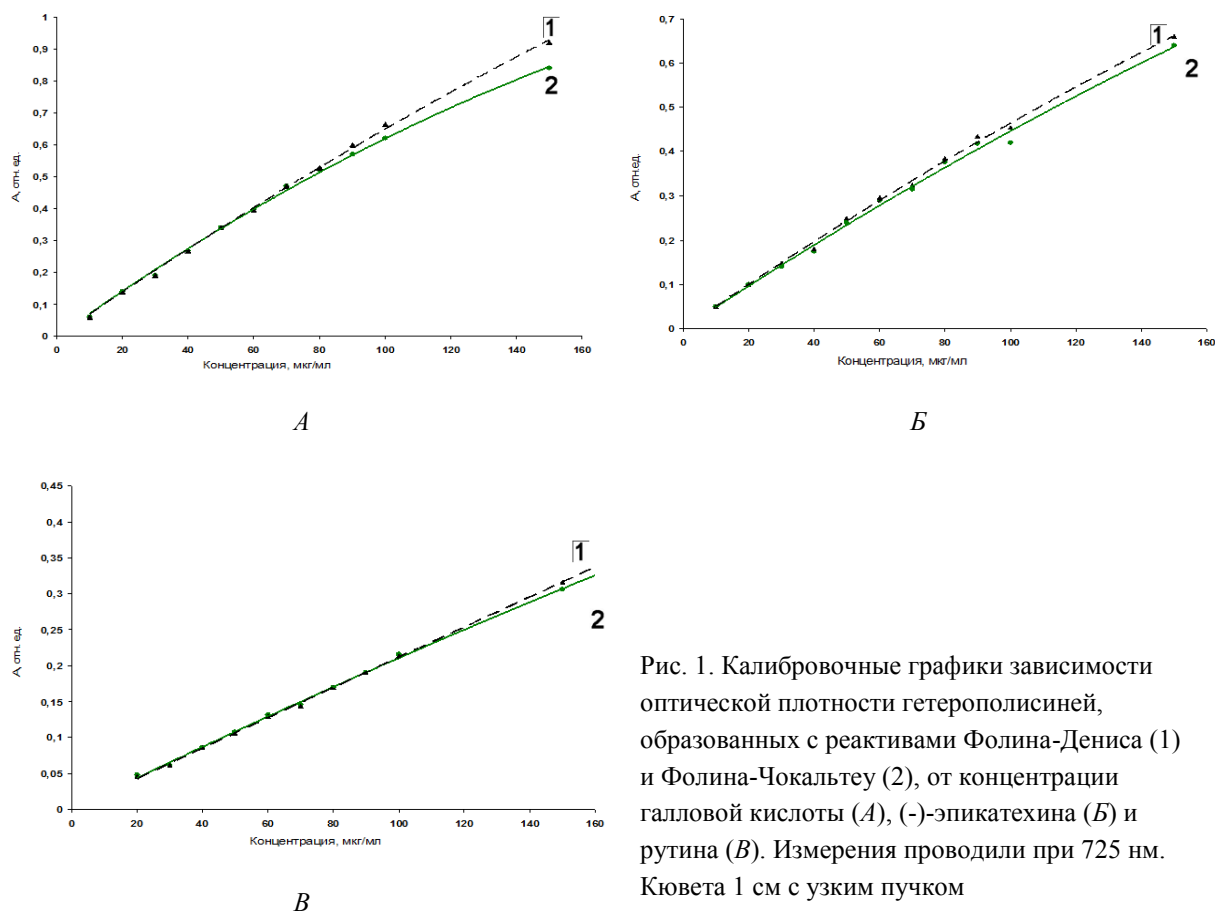


Рис. 1. Калибровочные графики зависимости оптической плотности гетерополисиней, образованных с реактивами Фолина-Дениса (1) и Фолина-Чокальтеу (2), от концентрации галловой кислоты (А), (-)-эпикатехина (Б) и рутина (Б). Измерения проводили при 725 нм. Кювета 1 см с узким пучком

Суммарное содержание фенольных соединений (ФС) в этанольных экстрактах, полученных из различных растительных тканей и проанализированных с использованием реактива Фолина-Дениса или реактива Фолина-Чокальтеу

Растительный объект	Суммарное содержание ФС (мг-экв. галловой кислоты/г сырой массы)	
	реактив Фолина-Дениса	реактив Фолина-Чокальтеу
Пшеница	0.937±0.068 ^a	0.937±0.069 ^a
Гречиха	2.625±0.193 ^b	2.490±0.182 ^b
Каллусная культура чая	1.050±0.076 ^c	1.0540±0.074 ^c

Примечание. Представлены средние значения определений и их стандартные ошибки (n=5). Величины, достоверно различающиеся при $p < 0.05$, обозначены разными буквами (a, b, c).

Как было указано выше, измерение оптических плотностей гетерополисиней во всех случаях проводили при длине волны 725 нм – стандартной при использовании реактива Фолина-Дениса, тогда как в стандартном методе с реактивом Фолина-Чокальтеу используется диапазон длин волн 760–765 нм. Известно, что спектры поглощения гетерополисиней, образованных с реактивом Фолина-Дениса и с реактивом Фолина-Чокальтеу, имеют довольно широкие максимумы, располагающиеся в пределах длин волн 560–750 нм и 740–800 нм соответственно [8, 14]. Эти отличия объясняются тем, что структура образовавшихся гетерополисиней зависит от соотношения фенольное соединение-реактив. При увеличении доли фенольных соединений образуются гетерополисини другой структуры, максимум спектра поглощения которых постепенно смещается в коротковолновую область [23, 24]. Это и наблюдалось при использовании стандартных методов с реактивами Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу, когда соотношение фенольное соединение-реактив составляло 1 : 1 и 1 : 5 соответственно. При использовании стандартного метода с реактивом Фолина-Чокальтеу измерение оптической плотности гетерополисиней в большинстве случаев проводят при длине волны 760–765 нм [6, 13, 25]. При работе с реактивом Фолина-Чокальтеу нами был использован состав реакционной смеси, идентичный таковому с реактивом Фолина-Дениса, и, соответственно, соотношение фенольные соединения – реактив составляло 1 : 1.

В связи с этим необходимо было проанализировать спектры поглощения гетерополисиней, образованных с реактивом Фолина-Чокальтеу в использованной нами концентрации, в сравнении со спектрами гетерополисиней, образованных с реактивом Фолина-Дениса, и выяснить, насколько они совпадают.

Нами были проанализированы спектры гетерополисиней, образованных этими реактивами с фенольными соединениям этанольных экстрактов пшеницы, гречихи, каллусной культуры ткани чайного растения, а также галловой кислотой, рутином и (-)-эпикатехином (рис. 2). Все максимумы поглощения этих растворов располагаются в одной и той же области спектра (680–770 нм) и имеют схожий характер.

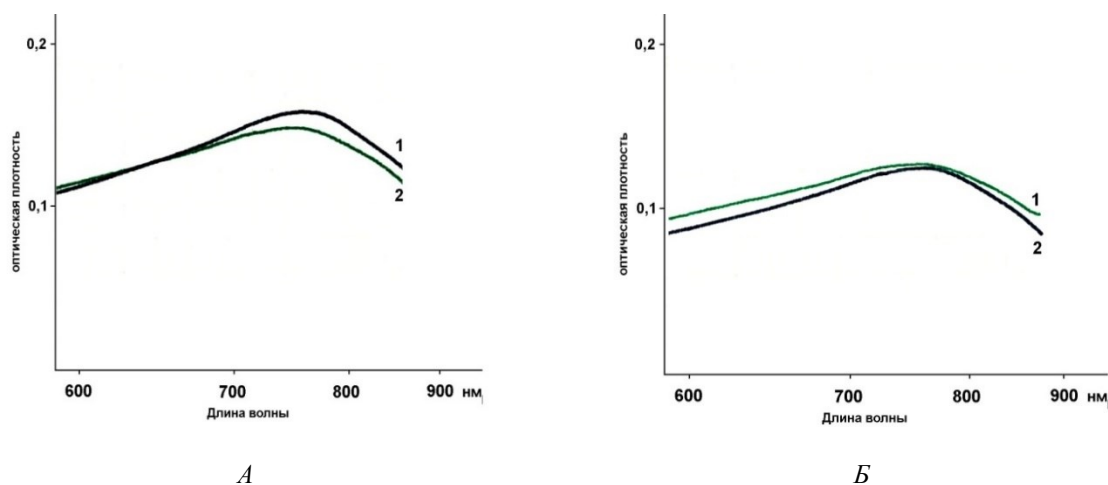


Рис. 2. Спектры поглощения гетерополисиней, образованных реактивами Фолина Дениса (1) и Фолина-Чокальтеу (2) при окислении галловой кислоты (А), рутина (Б), (-)-эпикатехина (В) и содержащих полифенолы этанольных экстрактов пшеницы (Г), гречихи (Д) и каллусной культуры чая (Е) (Окончание рис. 2 на С. 296)

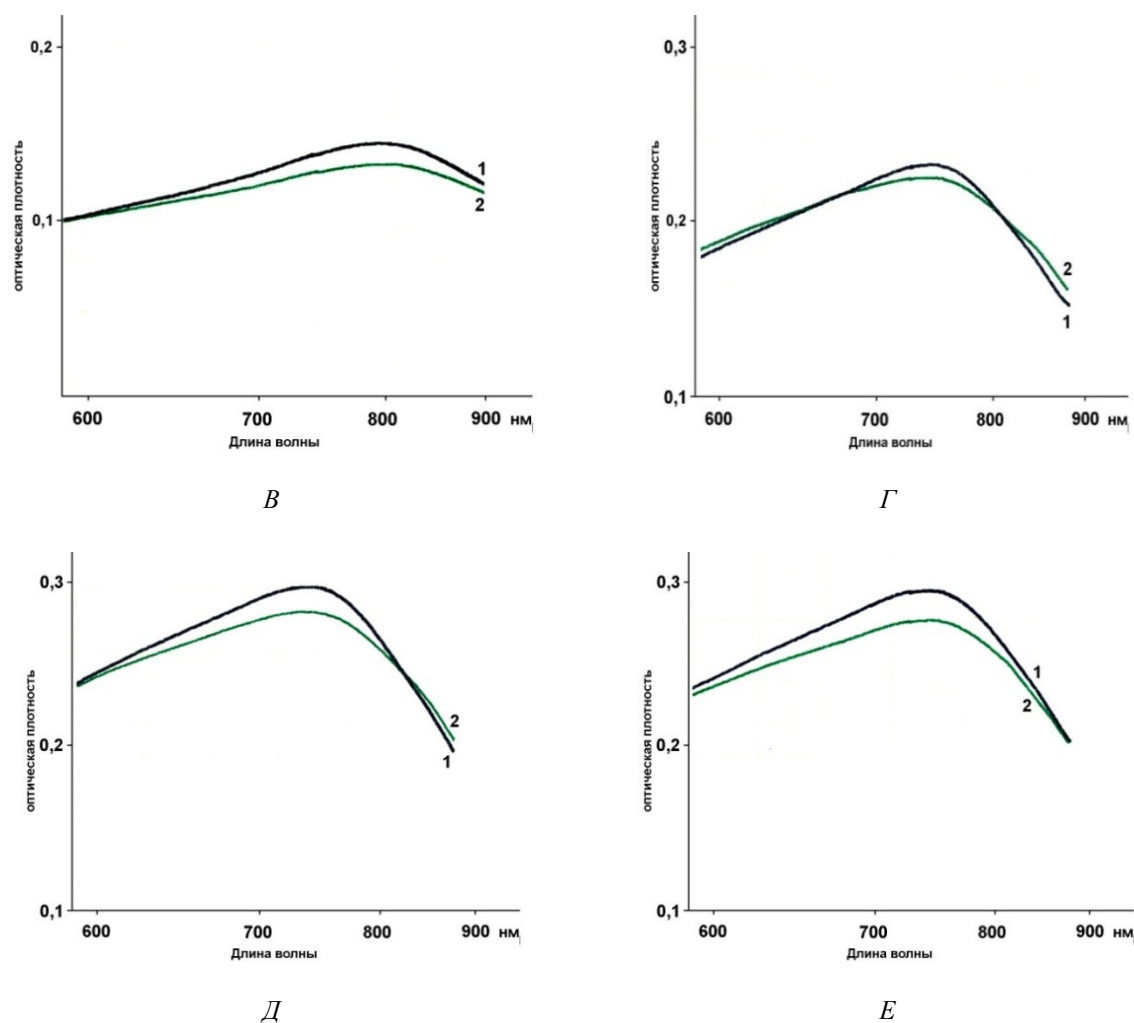


Рис. 2. (Окончание) Спектры поглощения гетерополисиней, образованных реактивами Фолина Дениса (1) и Фолина-Чокальтеу (2) при окислении галловой кислоты (А), рутина (Б), (-)-эпикатехина (В) и содержащих полифенолы этанольных экстрактов пшеницы (Г), гречихи (Д) и каллусной культуры чая (Е)

Таким образом, несмотря на отличия в содержании и составе фенольных соединений использованных в нашей работе растительных объектов, образовавшиеся гетерополисини с реактивами Фолина-Дениса и Фолина-Чокальтеу, вероятно, близки по своей структуре, которая в большей степени зависит от соотношения фенольное соединение-реактив и не зависит от состава реактива, использованного в реакционной смеси. О сдвиге максимума поглощения гетерополисиней, образованных с реактивом Фолина-Чокальтеу, при изменении доли фенольных соединений по соотношению к последнему сообщалось и другими авторами [16, 26, 27].

Выводы

1. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах растительных тканей с использованием реактива Фолина-Дениса адаптирован для измерения в микрообъемах.
2. Модифицирован метод определения суммарного содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах растительных тканей с использованием реактива Фолина-Чокальтеу (измерение в микрообъемах).
3. Показана сопоставимость результатов определения содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах растений при использовании модифицированного метода с реактивом Фолина-Дениса или с реактивом Фолина-Чокальтеу.

Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М., 1993. 250 с.
2. Ramawat K.G., Mérillon J.M. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Heidelberg, Germany: Springer, 2013. 4037 p.

3. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology // Plant physiology and biochemistry. 2013. Vol. 72. Pp. 1–20. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
4. Naikoo M.I., Dar M.I., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Naushin F. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview // Plant Signaling Molecules. Woodhead Publ.: Springer Netherlands, 2013. Pp. 15–30. DOI: 10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5.
5. Belscak-Cvitanovi A., Durgo K., Hudek A., Bacun Druzina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties // Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Duxford, UK: Woodhead Publ., 2018. Pp. 3–44.
6. Dudonne S., Vitrac X., Coutiere Ph., Woillez M., Merillon J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays // J. Agric. Food Chem. 2009. Vol. 57. Pp. 1768–1774. DOI: 10.1021/jf803011r.
7. Tungmunthum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview // Medicines. 2018. Vol. 5. 93. DOI: 10.3390/medicines5030093.
8. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. Vitic. 1965. Vol. 16. Pp. 144–158.
9. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М., 2004. 240 с.
10. Folin O., Denis W. On phosphotungstic-phosphomolibdic compound of a color reagents // J. Biol. Chem. 1912. Vol. 12. Pp. 239–243.
11. Swain T., Hillis W.E. The phenolic constituents of *Prunus Domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents // J. Sci. Food Agr. 1959. Vol. 10. Pp. 63–68.
12. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971. С. 185–197.
13. Folin O., Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins // J. Biol. Chem. 1927. Vol. 73. Pp. 627–650.
14. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // Meth. Enzymol. 1999. Vol. 299. Pp. 152–178.
15. Li M., Pare P.W., Zhang J., Kang T., Zhang Zh., Yang D., Wang K., Xing H. Antioxidant Capacity Connection with Phenolic and Flavonoid Content in Chinese Medicinal Herbs // Rec. Nat. Prod. 2018. Vol. 12. Pp. 239–250. DOI: 10.25135/rnp.24.17.08.138.
16. 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. Pp. 107–110. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011.
17. Wabaidur S.M., Obbed M.S., Alothman Z.A., Alfari N.A., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Siddiqui M.R., Altamim J.Z., Aldayel T.S. Total phenolic acids and flavonoid contents determination in Yemeni honey of various floral sources: Folin-Ciocalteu and spectrophotometric approach // Food Science and Technology. 2020. Vol. 40. Pp. 647–652. DOI: 10.1590/fst.33119.
18. Загоскина Н.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Гончарук Е.А. Углеводы питательной среды и их влияние на каллусные культуры чайного растения (*Camelliasinensis* L.) // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер. Естественные науки. 2016. Т. 37. №5 (246). С. 45–55.
19. Олениченко Н.А., Загоскина Н.В. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-аммиак-лиазы // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. №6. С. 681–685.
20. Подолова Е.А., Ханина М.А., Рудаков О.Б., Небольсин А.Е. Спектрофотометрическое определение фенольных соединений из травы василька синего // Химия растительного сырья. 2019. №3. С. 145–152. DOI: 10.14258/jcrpm.2019034675.
21. Зубова М.Ю., Николаева Т.Н., Нечаева Т.Л., Малюкова Л.С., Загоскина Н.В. О содержании пигментов, фенольных соединений и антирадикальной активности молодых побегов чая (*Camellia sinensis* L.) // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 249–257. DOI: 10.14258/jcrpm.2019046065.
22. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Широкова А.В. Накопление фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с различным уровнем плоидности (на примере *Fagopyrum esculentum*) // Известия РАН. Серия биологическая. 2018. №2. С. 191–199.
23. Wu H. Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances // J. Biol. Chem. 1920. Vol. 43. Pp. 189–220.
24. Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. Особенности взаимодействия 18-молибдофосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. №3. С. 242–251. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.3.001.
25. Fuentes J., Montoya P., Vio F., Speisky H. Total Phenolics and Antioxidant Capacity of Vegetables Grown in the Southwestern Andes Region of South America // J. Food Nutr. Res. 2016. Vol. 4. N12. Pp. 760–772. DOI: 10.12691/jfnr-4-12-1.

26. Swieca M. Hydrogen Peroxide Treatment and the Phenylpropanoid Pathway Precursors Feeding Improve Phenolics and Antioxidant Capacity of Quinoa Sprouts via an Induction of L-Tyrosine and L-Phenylalanine Ammonia-Lyases Activities // *Journal of Chemistry*. 2016. Vol. 2016. Article ID 1936516. DOI: 10.1155/2016/1936516.
27. Ferreira V.B., Costa da Silva T.C., Silvia Regina Magalhães Couto S.R.M., Srur A.U.O.S. Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Organic Vegetables Consumed in Brazil // *Food N. Sci.* 2015. Vol. 6. Pp. 798–804. DOI: 10.4236/fns.2015.69083.

Поступила в редакцию 14 июля 2020 г.

После переработки 12 декабря 2020 г.

Принята к публикации 4 февраля 2021 г.

Для цитирования: 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: модификация и сравнение // *Химия растительного сырья*. 2021. №2. С. 291–299. DOI: 10.14258/jcrpm.2021028250.

*Nikolaeva T.N.**, *Lapshin P.V.*, *Zagoskina N.V.* METHOD FOR DETERMINING THE TOTAL CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT EXTRACTS WITH FOLIN-DENIS REAGENT AND FOLIN-CHOCALTEU REAGENT: MODIFICATION AND COMPARISON

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, ul. Botanicheskaya, 35, Moscow, 127276 (Russia), e-mail: nik-tat2011@mail.ru

A modification of the method for determining the total content of phenolic compounds in plant tissue extracts with the Folin-Denis reagent and the Folin-Ciocalteu reagent has been carried out, allowing to establish the correspondence of the results obtained when using them. The method using the Folin-Denis reagent is adapted for conducting determinations in microvolumes. For the method using the Folin-Ciocalteu reagent, the concentration of the latter (0.4 N, a 5-fold dilution of the standard reagent) and the composition of the reaction mixture were selected, using which the optical densities of the reduction products of the Folin-Denis and Folin-Ciocalteu reagents containing polyphenols in ethanol extracts from wheat, buckwheat and calus tissue of tea were almost the same. The absorption spectra of the reduction products of these reagents by gallic acid, rutin, (-)-epicatechin, as well as ethanol extracts from wheat, buckwheat, and tea calus tissue, were located in the same region (680–770 nm) and had similar characteristics. Calibration graphs of the dependence of the optical density of solutions on the concentration of standard substances (gallic acid, (-)-epicatechin, rutin), constructed using the Folin-Denis and Folin-Ciocalteu reagents, had a linear character within the concentration range of 10–100 µg/ml and practically coincided. The results of determining the content of phenolic compounds in ethanol extracts of plants, differing in their ability to accumulate, showed very similar and statistically significant values when using these two reagents.

Keywords: method, phenolic compounds, Folin-Denis reagent, Folin-Ciocalteu reagent, ethanol extracts of plants.

* Corresponding author.

References

1. Zaprometov M.N. *Fenol'nyye soyedineniya. Rasprostraneniye, metabolizm i funktsii v rasteniyakh*. [Phenolic compounds. Distribution, metabolism and function in plants]. Moscow, 1993, 250 p. (in Russ.).
2. Ramawat K.G., Mérillon J.M. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Heidelberg, Germany: Springer, 2013, 4037 p.
3. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. *Plant physiology and biochemistry*, 2013, vol. 72, pp. 1–20. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
4. Naikoo M.I., Dar M.I., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Naushin F. *Plant Signaling Molecules*. Woodhead Publ.: Springer Netherlands, 2013, pp. 15–30. DOI: 10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5.
5. Belscak-Cvitanovi A., Durgo K., Hudek A., Bacun Druzina V., Komes D. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Duxford, UK: Woodhead Publ., 2018, pp. 3–44.
6. Dudonne S., Vitrac X., Coutiere Ph., Woillez M., Merillon J.-M. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, vol. 57, pp. 1768–1774. DOI: 10.1021/jf803011r.
7. Tungmunthum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. *Medicines*, 2018, vol. 5, 93. DOI: 10.3390/medicines5030093.
8. Singleton V.L., Rossi J.A. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, vol. 16, pp. 144–158.
9. *Rukovodstvo po metodam kontrolya kachestva i bezopasnosti biologicheskii aktivnykh dobavok k pishche*. [Guidance on methods of quality control and safety of biologically active food additives]. Moscow, 2004, 240 p. (in Russ.).
10. Folin O., Denis W. *J. Biol. Chem.*, 1912, vol. 12, pp. 239–243.
11. Swain T., Hillis W.E. *J. Sci. Food Agr.*, 1959, vol. 10, pp. 63–68.
12. Zaprometov M.N. *Biokhimicheskiye metody v fiziologii rasteniy*. [Biochemical methods in plant physiology]. Moscow, 1971, pp. 185–197. (in Russ.).
13. Folin O., Ciocalteu V. *J. Biol. Chem.*, 1927, vol. 73, pp. 627–650.
14. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. *Meth. Enzymol.*, 1999, vol. 299, pp. 152–178.
15. Li M., Pare P.W., Zhang J., Kang T., Zhang Zh., Yang D., Wang K., Xing H. *Rec. Nat. Prod.*, 2018, vol. 12, pp. 239–250. DOI: 10.25135/rnp.24.17.08.138.
16. Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. *Microchem. J.*, 2009, vol. 91, pp. 107–110. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011.
17. Wabaidur S.M., Obbed M.S., Alothman Z.A., Alfaris N.A., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Siddiqui M.R., Altamim J.Z., Aldayel T.S. *Food Science and Technology*, 2020, vol. 40, pp. 647–652. DOI: 10.1590/fst.33119.
18. Zagoskina N.V., Nechayeva T.L., Nikolayeva T.N., Lapshin P.V., Goncharuk Ye.A. *Nauch. vedomosti Belgorod. gos. un-ta. Ser. Yestestvennyye nauki*, 2016, vol. 37, no. 5 (246), pp. 45–55. (in Russ.).
19. Olenichenko N.A., Zagoskina N.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2005, vol. 41, no. 6, pp. 681–685. (in Russ.).
20. Podolina Ye.A., Khanina M.A., Rudakov O.B., Nebol'sin A.Ye. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 145–152. DOI: 10.14258/jcprm.2019034675. (in Russ.).
21. Zubova M.Yu., Nikolayeva T.N., Nechayeva T.L., Malyukova L.S., Zagoskina N.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 249–257. DOI: 10.14258/jcprm.2019046065. (in Russ.).
22. Zagoskina N.V., Kazantseva V.V., Fesenko A.N., Shirokova A.V. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*, 2018, no. 2, pp. 191–199. (in Russ.).
23. Wu H. *J. Biol. Chem.*, 1920, vol. 43, pp. 189–220.
24. Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Tsyganok L.P. *Analitika i kontrol'*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 242–251. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.3.001. (in Russ.).
25. Fuentes J., Montoya P., Vio F., Speisky H. *J. Food Nutr. Res.*, 2016, vol. 4, no. 12, pp. 760–772. DOI: 10.12691/jfnr-4-12-1.
26. Swieca M. *Journal of Chemistry*, 2016, vol. 2016, article ID 1936516. DOI: 10.1155/2016/1936516.
27. Ferreira V.B., Costa da Silva T.C., Silvia Regina Magalhães Couto S.R.M., Srur A.U.O.S. *Food N. Sci.*, 2015, vol. 6, pp. 798–804. DOI: 10.4236/fns.2015.69083.

Received July 14, 2020

Revised December 12, 2020

Accepted February 4, 2021

For citing: Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 291–299. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021028250.

