

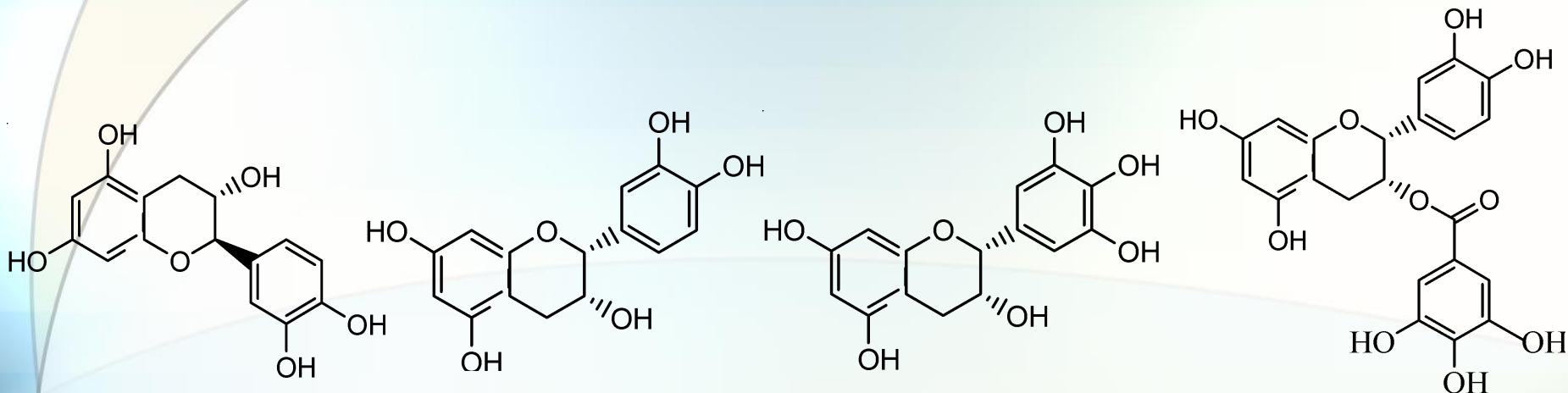
**Алексеева Анна Владимировна**

**РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО И  
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО СПОСОБОВ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ И  
КОФЕИНА В РАЗЛИЧНЫХ СОРТАХ  
ЗЕЛЕНОГО И ЧЕРНОГО ЧАЯ**

**Научные руководители:  
проф., д.х.н. Карцова А. А.,  
асп. Ганжа О. В.**

**2007**

# Важнейшие биологически активные компоненты чая

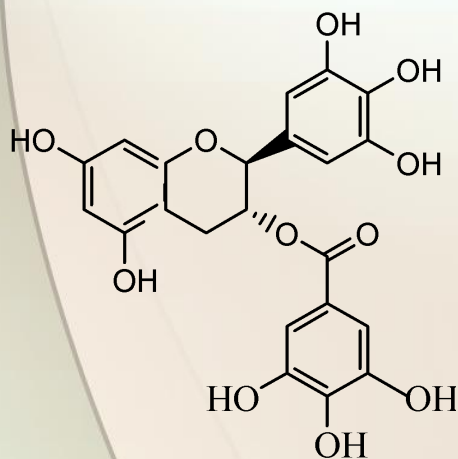


**(+)-Катехин**  
**(+)-C**

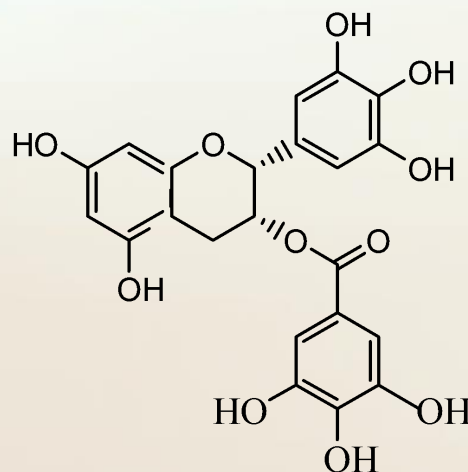
**(-)-Эпикатехин**  
**(-)-EC**

**(-)-Эпигаллокатехин**  
**(-)-EGC**

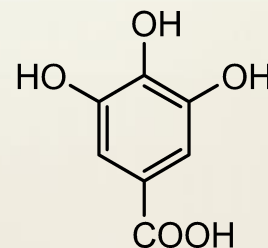
**(-)-Эпикатехин галлат**  
**(-)-ECG**



**(-)-Галлокатехин галлат**  
**(-)-GCG**



**(-)-Эпигаллокатехин галлат**  
**(-)-EGCG**

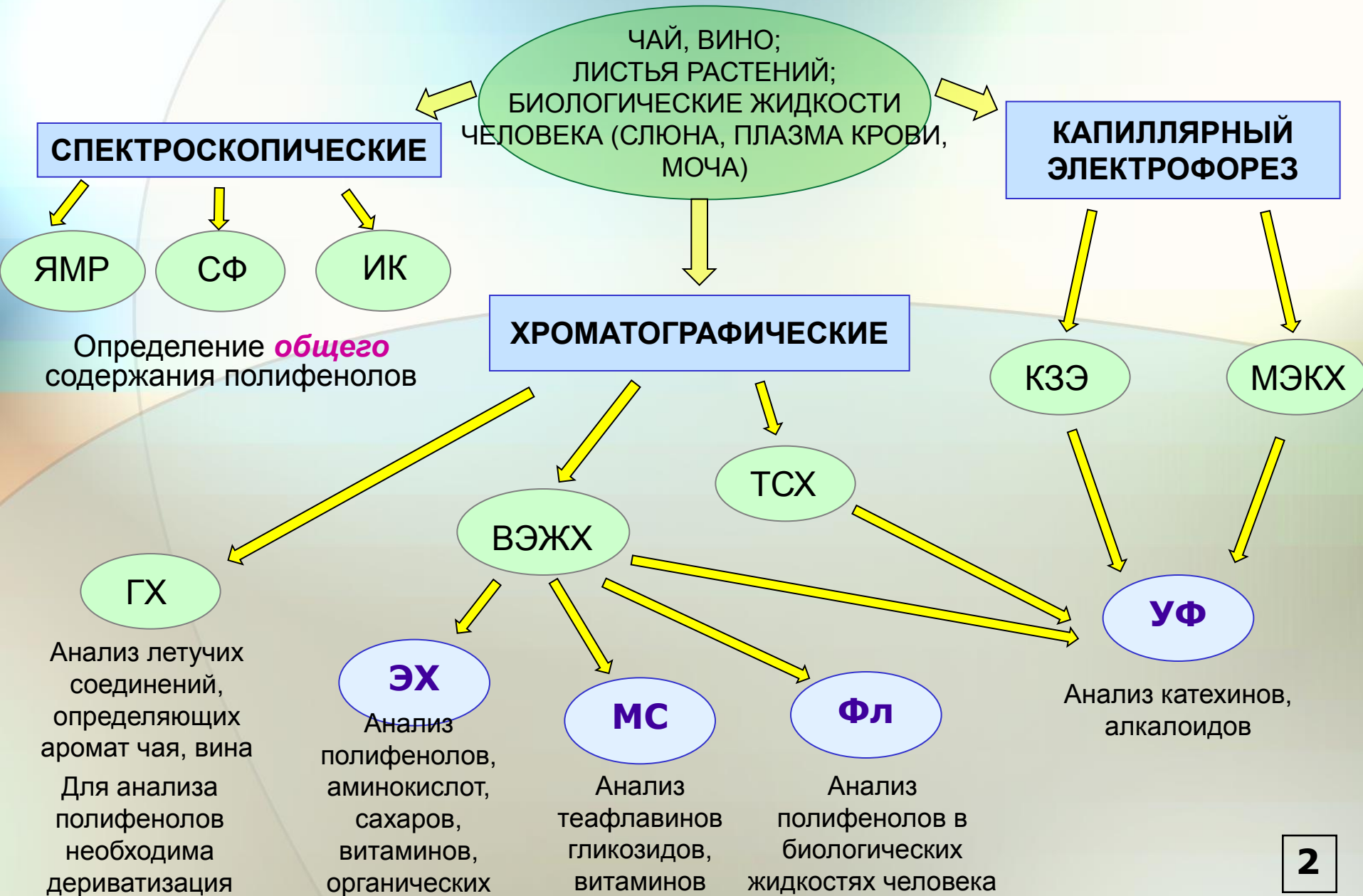


**Галловая кислота**  
**(GA)**

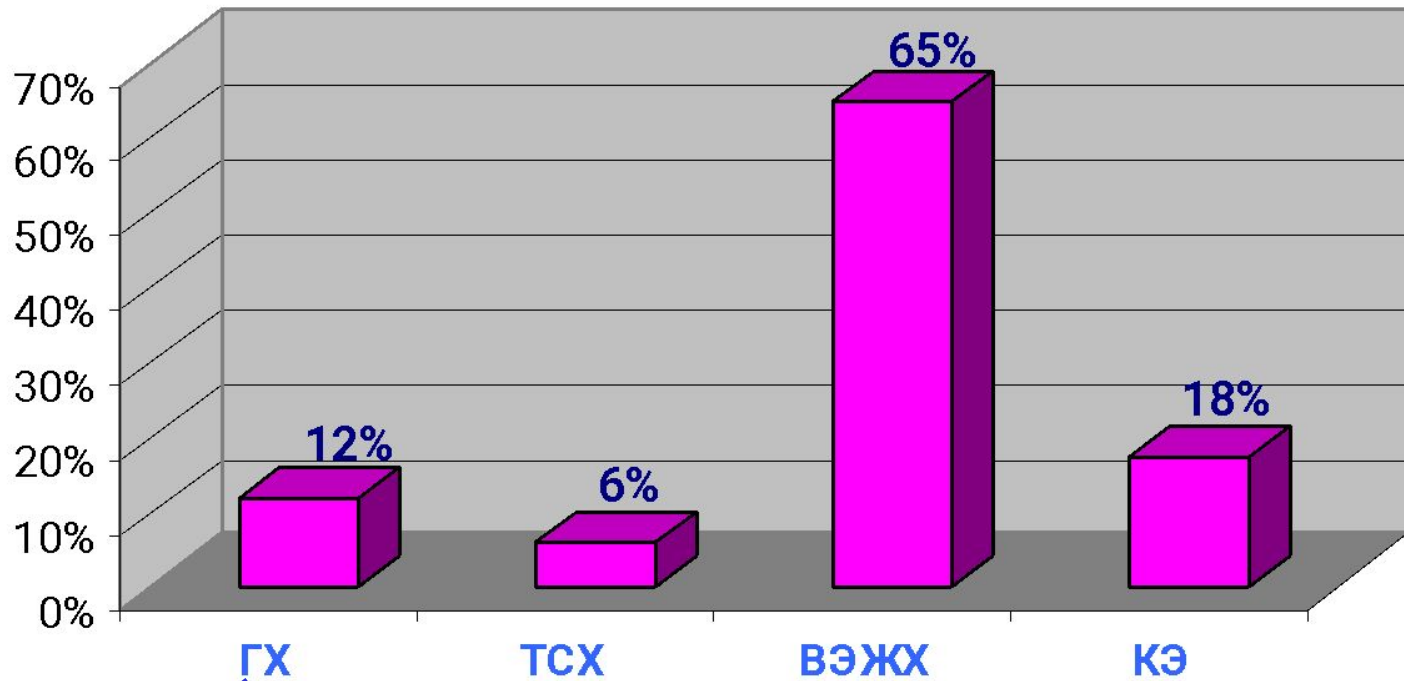


**Кофеин**  
**(Caf)**

# Методы анализа реальных объектов, содержащих полифенольные соединения



## Полифенолы



• МС

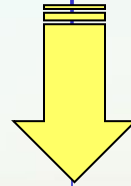
• 70 % УФ,  
20 % МС,  
10 % ЭХ

• УФ  
• 50 % КЗЭ, 50 % МЭКХ

# МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

★ Определение *ионогенных* и *нейтральных* соединений

★ Концентрирование пробы в режиме *on-line*



Цель работы:

**Выяснение возможностей одновременного определения полифенолов и кофеина в различных сортах чая методом капиллярного электрофореза**

# Поставленные задачи:

★ Получение спектрофотометрических характеристик полифенолов и кофеина

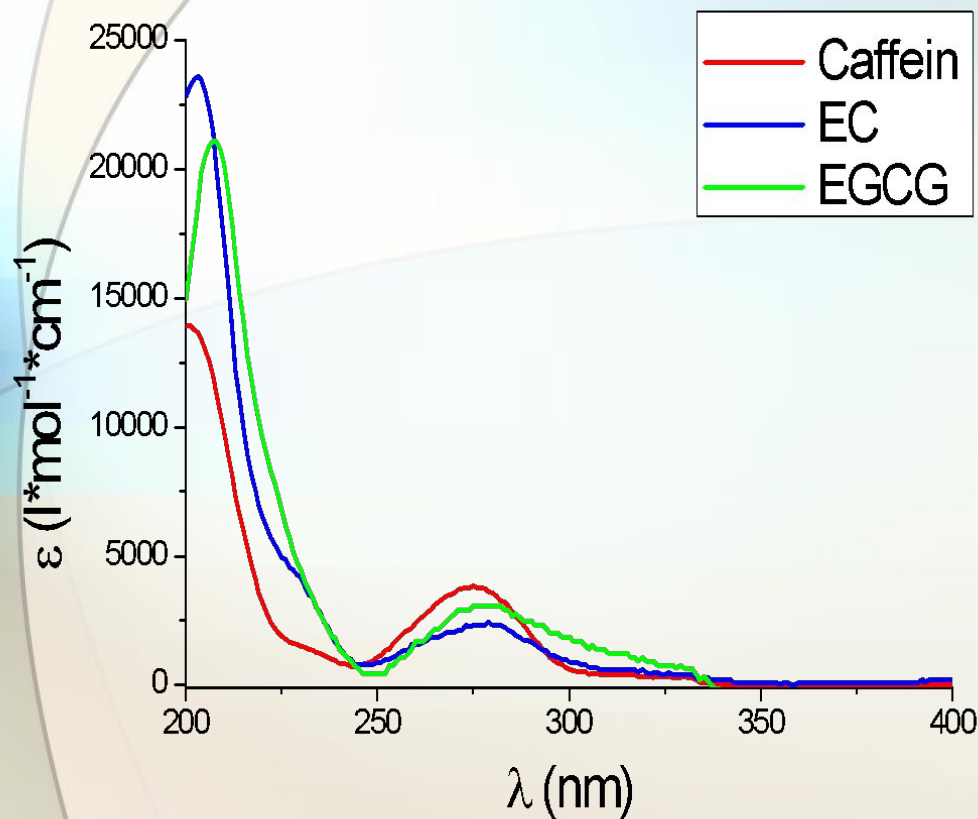
★ Оптимизация условий разделения модельной смеси полифенолов в режиме капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ)

★ Выяснение возможностей мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) для одновременного разделения полифенолов и кофеина. Установление факторов, влияющих на селективность и эффективность разделения в этом режиме

★ Количественный анализ реальных объектов и получение характеристических профилей

★ Использование метода ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием как референтного для решения этой задачи

# Оптимизация условий детектирования



Соединение	$\lambda$ , нм	$\epsilon$ , $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
<b>Caf</b>	<b>200</b>	<b>13900</b>
	201	13900 (max)
	275	3800 (max)
<b>EC</b>	<b>200</b>	<b>22800</b>
	203	23600 (max)
	279	2400(max)
<b>EGCG</b>	<b>200</b>	<b>14900</b>
	207	21100 (max)
	280	3100 (max)

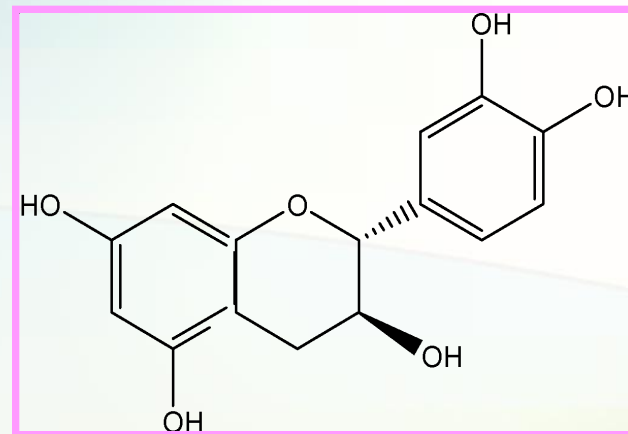
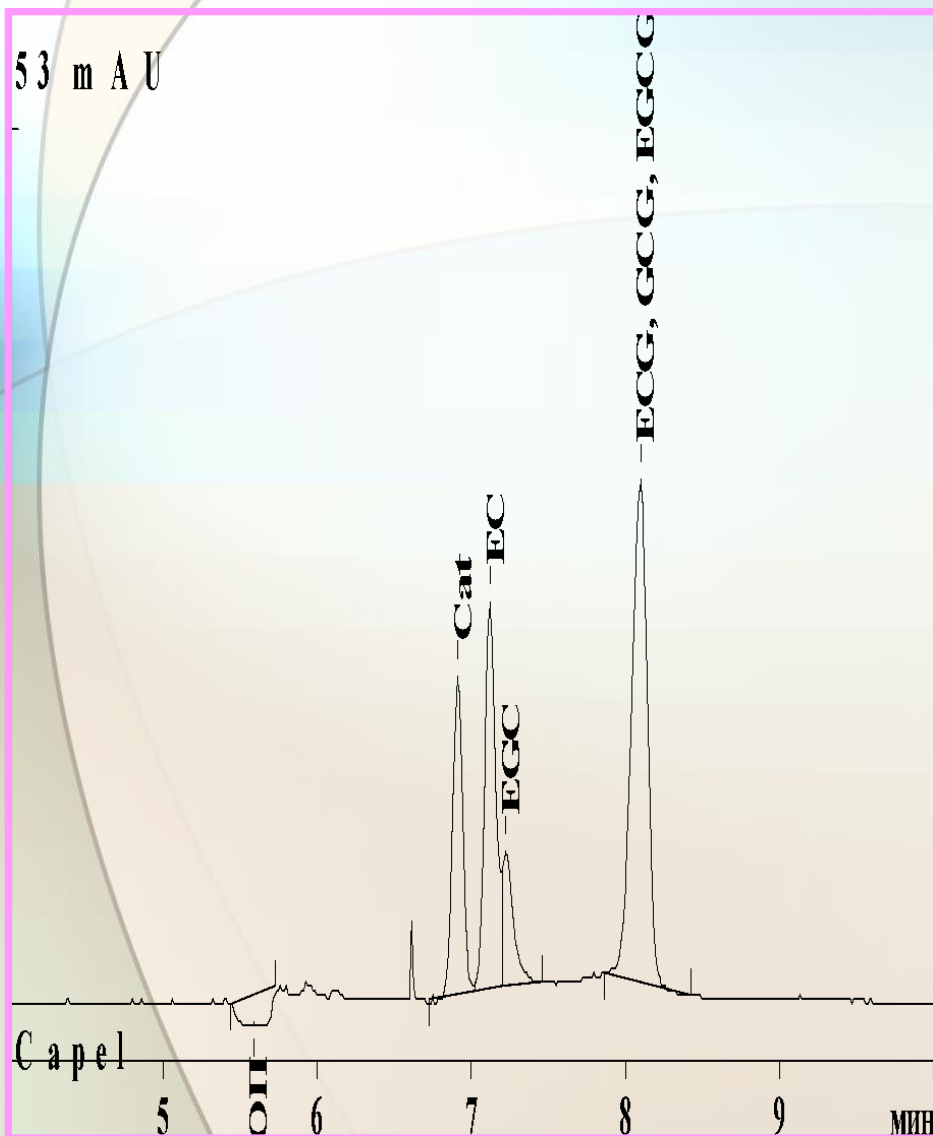
В качестве рабочей была выбрана длина волны детектирования **200 нм**

Условия: спектрофотометр Shimadzu UV-1700;

длина оптического пути = 1 см;

концентрации водных растворов Caf, EC, EGCG –  $2 \cdot 10^{-5}$  М

# Электрофореграмма модельной смеси катехинов в КЗЭ



**pKa: 8.64, 9.41, 11.26, 13.26**

**КАПЕЛЬ 105, Капилляр:  $L_{\text{общ}} = 60$  см,  $L_{\text{эфф}} = 50$  см,  $d_{\text{внутр}} = 75$  мкм.**

**Длина волны:  $\lambda = 200$  нм**

**Буферный электролит:**

**12,5 мМ тетрабората натрия (pH 9.2),  
8 мМ  $\beta$ -циклодекстрина**

**Проба: Cat, EC – по 10 мг/л,**

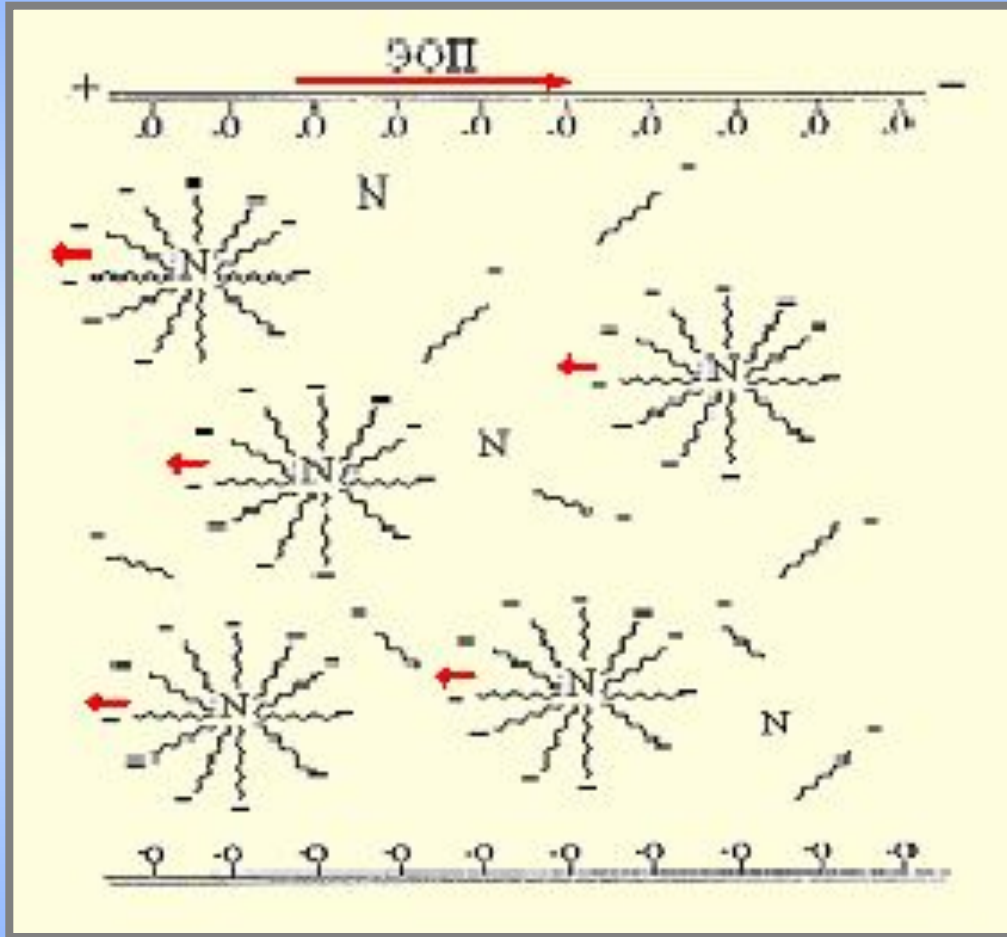
**EGC, ECG, GCG, EGCG – по 20 мг/л**

**Ввод: 30 мбар, 10 сек**

**Напряжение: 20 кВ**



# Вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии



Мицеллы и ЭОП движутся в противоположных направлениях. Компоненты пробы распределяются между фазой раствора и мицеллярной фазой, при этом константа распределения специфична для каждого сорта молекул пробы.

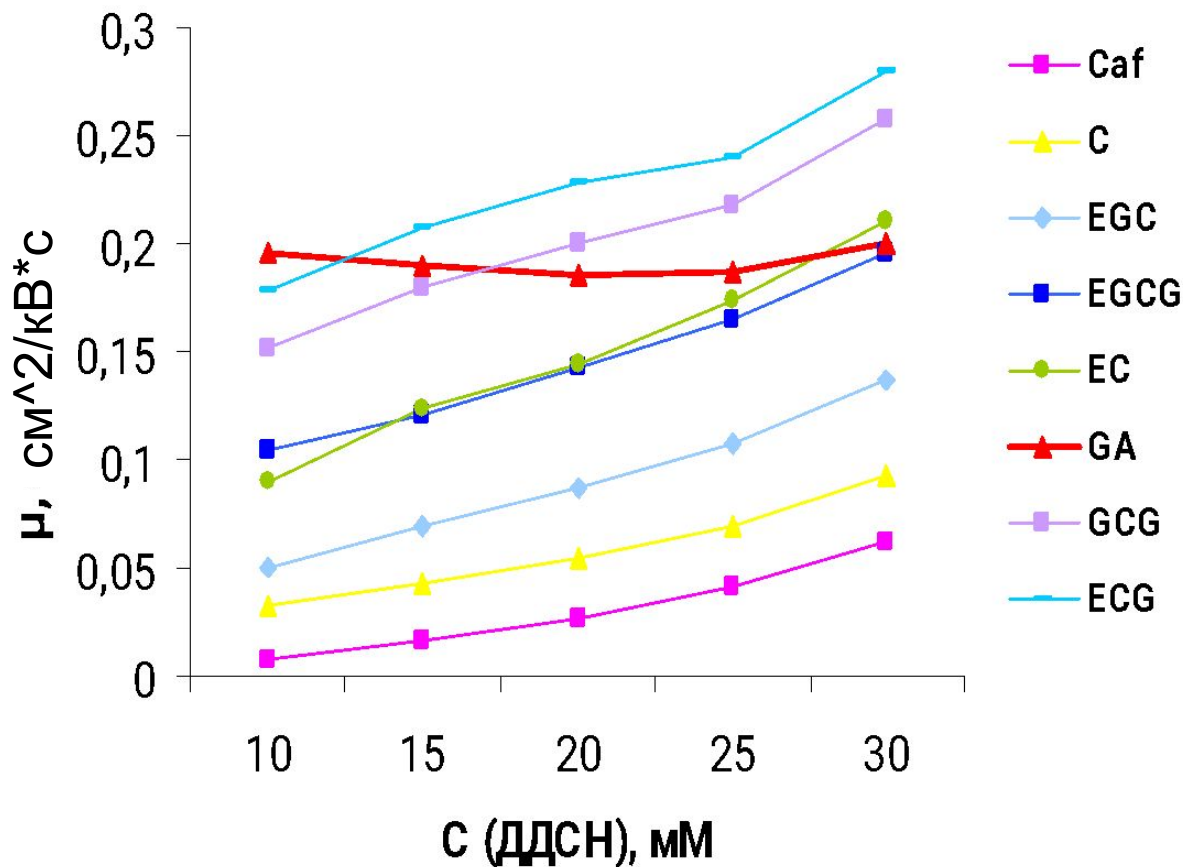


Додецилсульфат натрия

ККМ = 8,3 мМ

N – компоненты пробы, взаимодействующие с мицеллами

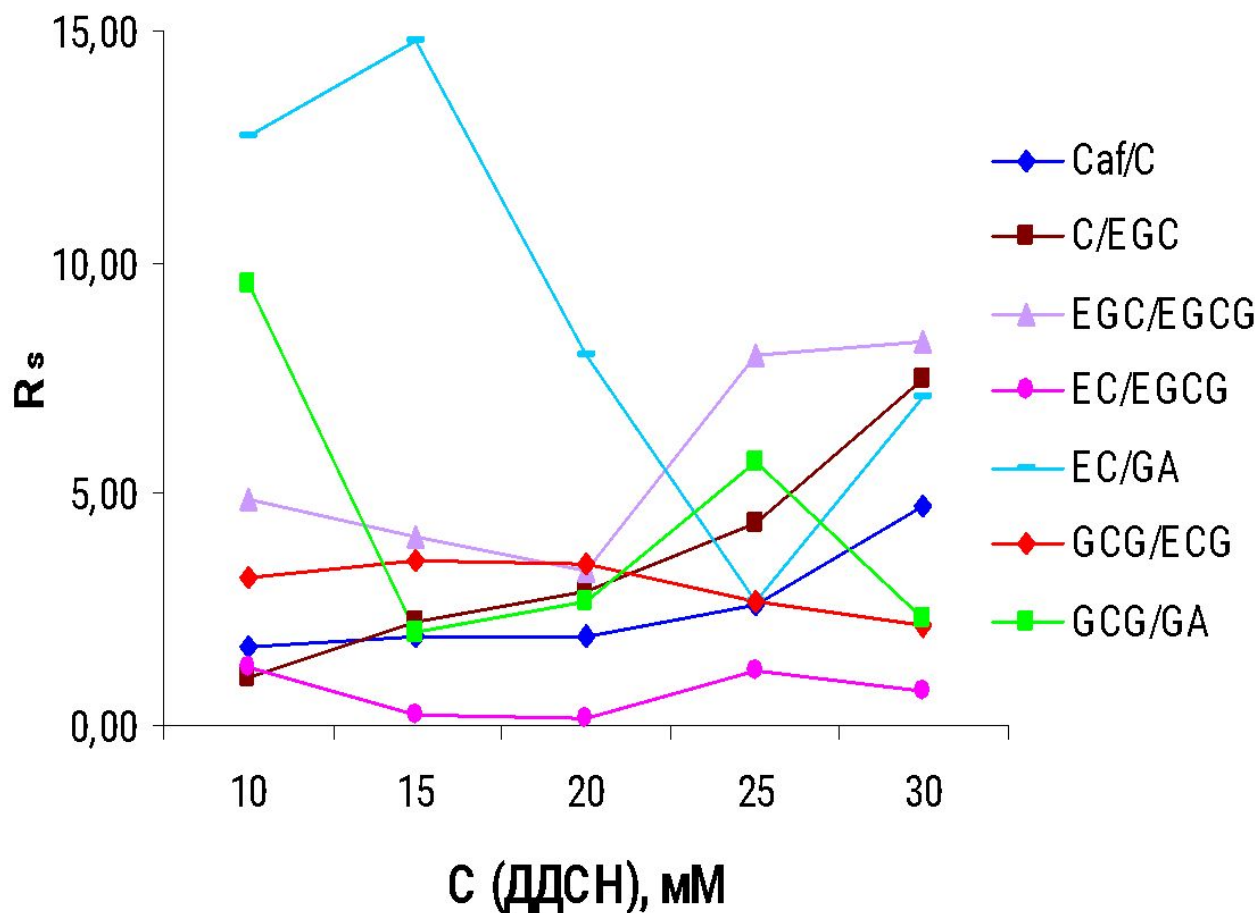
# Зависимость электрофоретических подвижностей аналитов от концентрации детергента в буферном электролите



$$\mu = \frac{L_{эфф} \cdot L_{общ}}{U \cdot t_{мигр}}$$

где  $L_{общ}$  – общая длина капилляра, см  
 $L_{эфф}$  – эффективная длина капилляра, см  
 $U$  – величина рабочего напряжения, В  
 $t_{мигр}$  – время миграции компонента, с

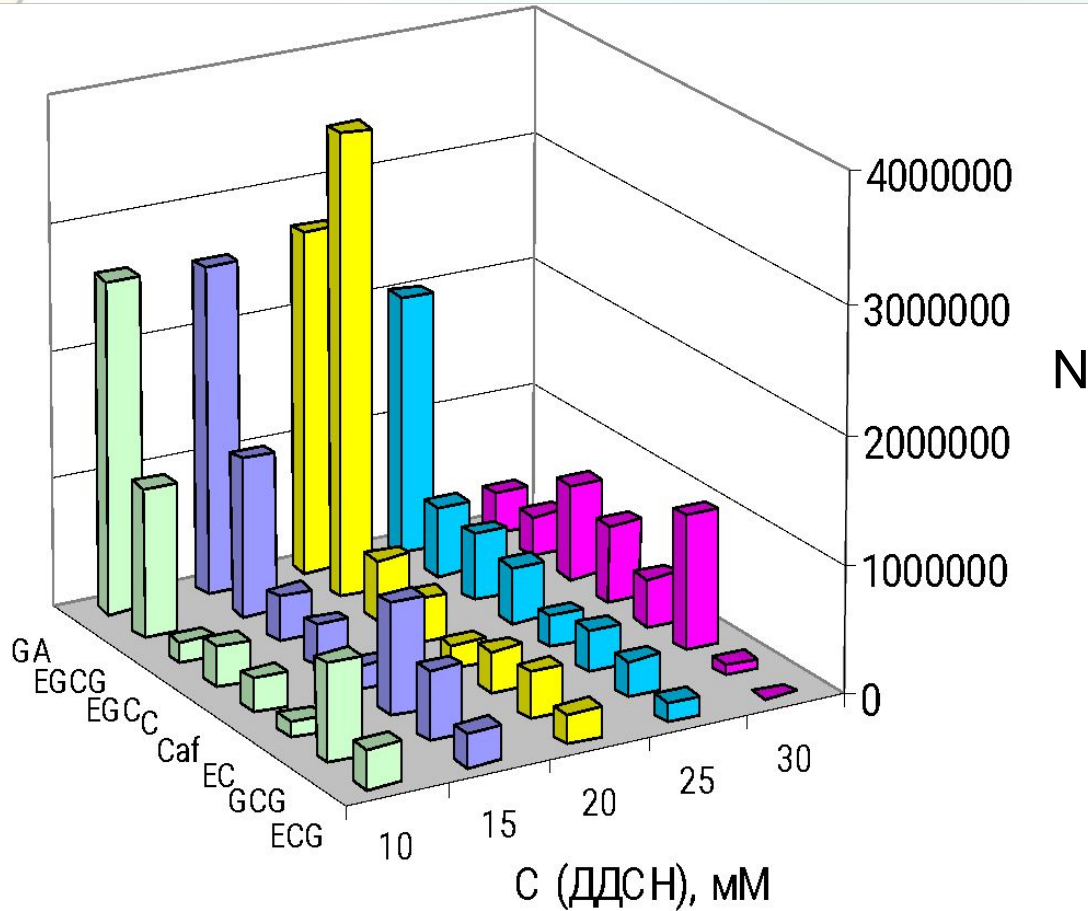
# Зависимость коэффициента разрешения от концентрации детергента в буферном электролите



$$R_s = \frac{1,77 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1^{0,5} + w_2^{0,5}}$$

где  $t_1$  и  $t_2$  – времена миграции первого и второго компонента, соответственно, мин  
 $w_1^{0,5}$  и  $w_2^{0,5}$  – ширина пиков на полувысоте, мин

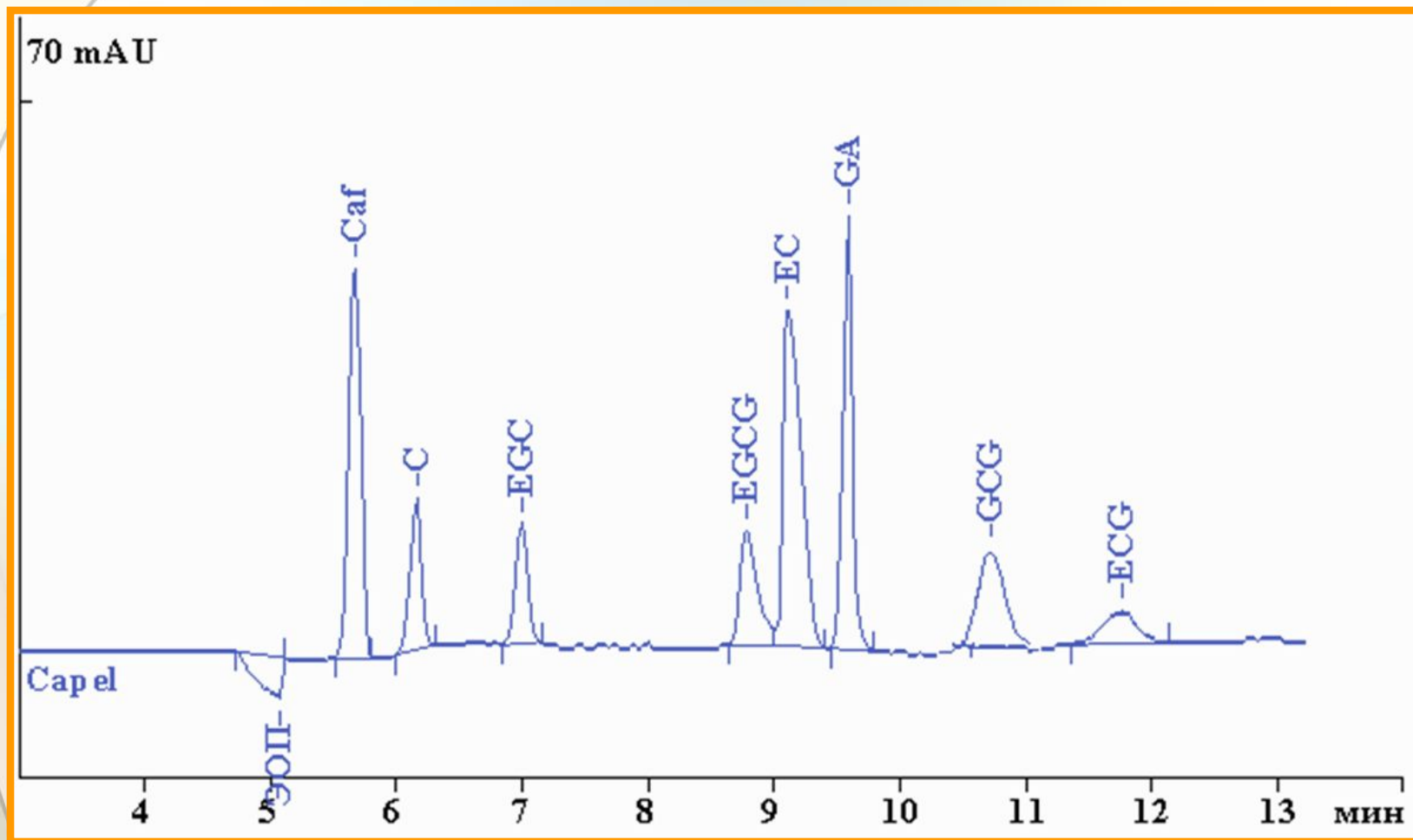
# Зависимость эффективности разделения от концентрации детергента в буферном электролите



$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t'_R}{W_{0.5}} \right)^2$$

где  $t_R$  – времена миграции аналита, соответственно, мин  
 $W_{0.5}$  – ширина пика аналита на полувысоте, мин

# Электрофореграмма модельной смеси катехинов, галловой кислоты и кофеина в МЭКХ



Ведущий электролит: 25 мМ фосфатный буфер pH 7,0, 25 мМ додецилсульфата натрия

Проба: смесь стандартов: C, EC – по 25 мг/л, Caf – 12,5 мг/л, EGC, ECG, GCG, EGCG, GA – по 50 мг/л

Ввод: 30 мбар, 10 сек. Напряжение: 25 кВ. Длина волны:  $\lambda = 200$  нм

# Характеристические профили образцов чая



- 1 – Caf,
- 2 – EGC,
- 3 – EGCG,
- 4 – EC,
- 5 – GA,
- 6 – ECG

# Количественный анализ различных сортов чая

ПО 1 мкг/мл

Аналит	Концентрация, % масс.		
	Белый чай	Зеленый чай	Черный чай
<b>Caf</b>	0,79 ± 0,11	1,40 ± 0,22	1,21 ± 0,10
<b>EGC</b>	1,24 ± 0,05	1,58 ± 0,10	0,24 ± 0,05
<b>EGCG</b>	1,89 ± 0,11	1,45 ± 0,10	1,74 ± 0,12
<b>EC</b>	0,37 ± 0,05	0,49 ± 0,06	0,26 ± 0,05
<b>GA</b>	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,04
<b>ECG</b>	1,12 ± 0,10	0, 81± 0,12	0,10 ± 0,04

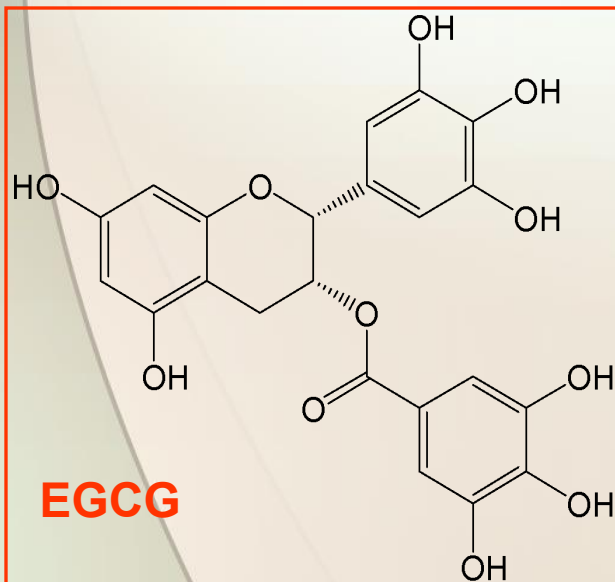
P = 0.95, n = 5

# Взаимодействие полифенолов с органическими и неорганическими соединениями

Полифенол + Казеин



Комплекс

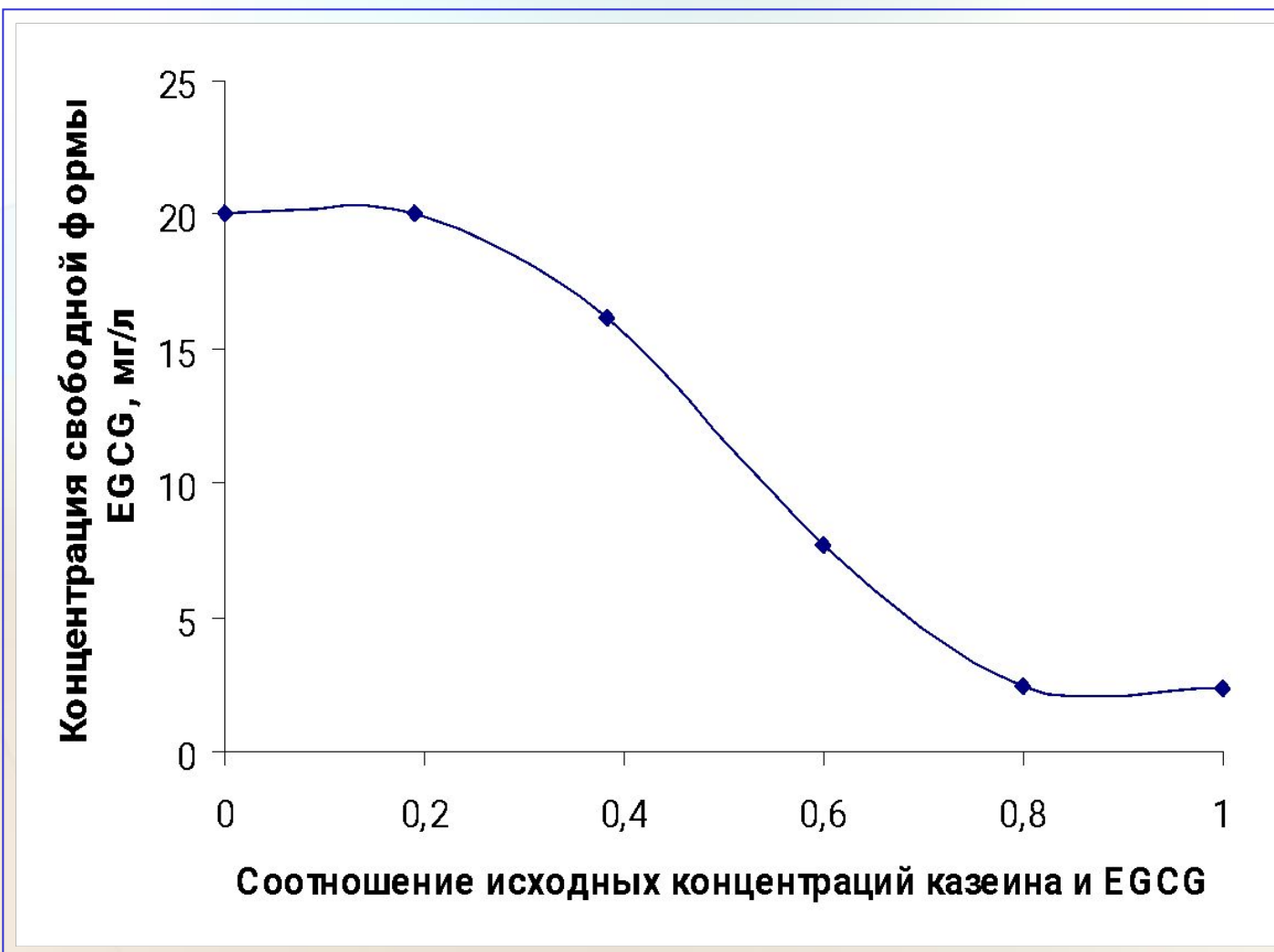


*Максимальная антиоксидантная активность  
(потенциал окисления – 720 мВ)*

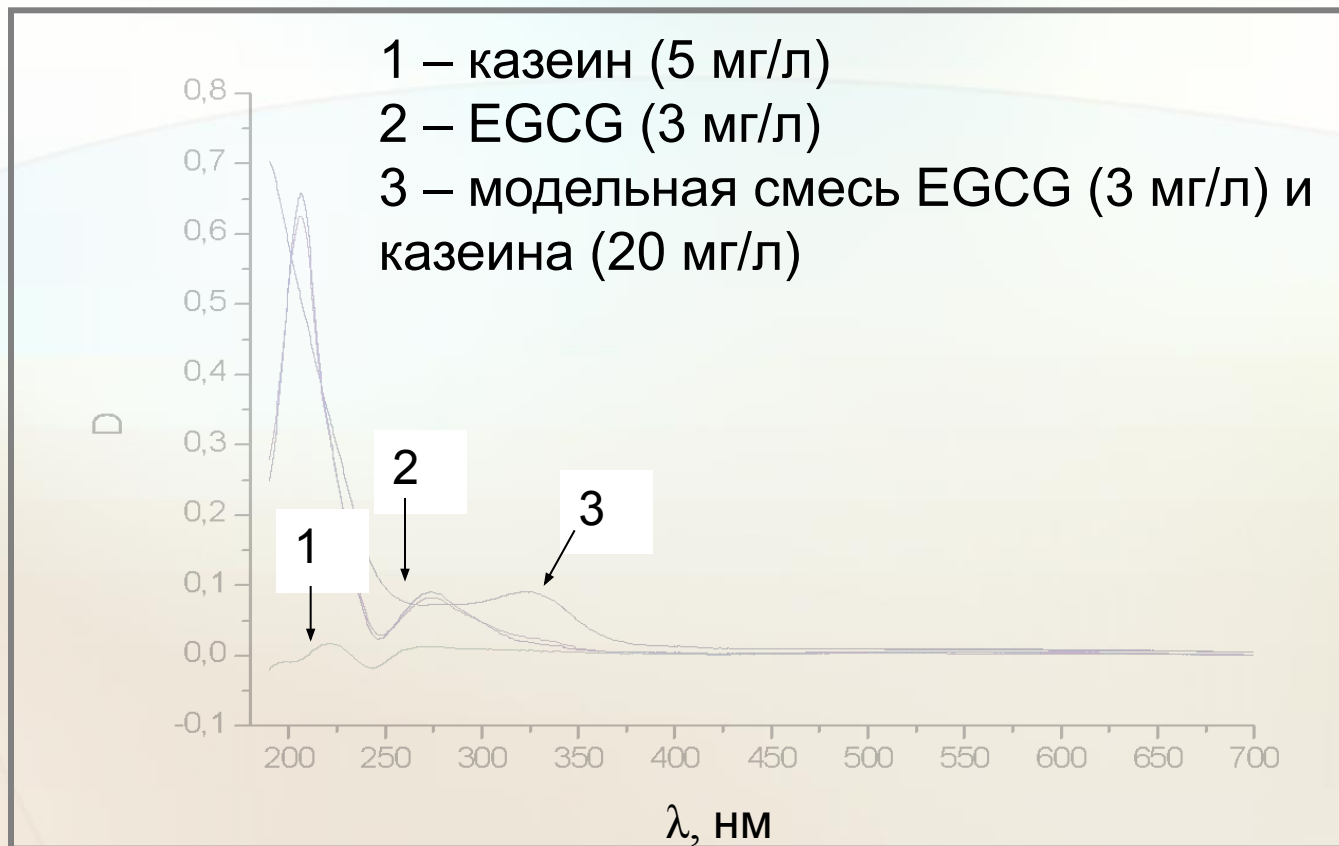
*Наибольшее содержание в чае  
(до 40 % от общего содержания полифенолов)*



# Изменение концентрации свободной формы EGCG от мольного соотношения белок/полифенол

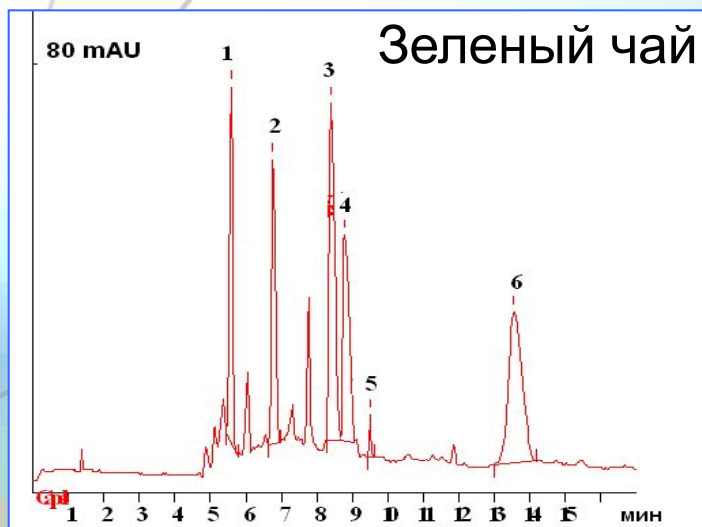


# Электронные спектры поглощения эпигаллокатехин галлата, казеина и их комплекса

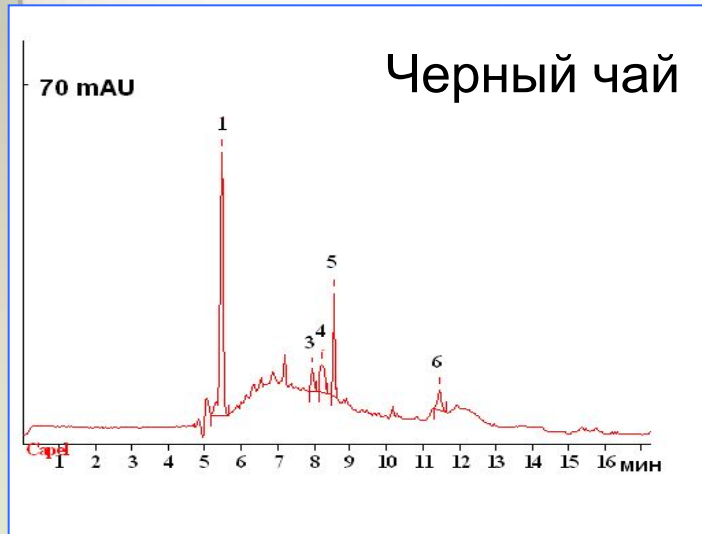
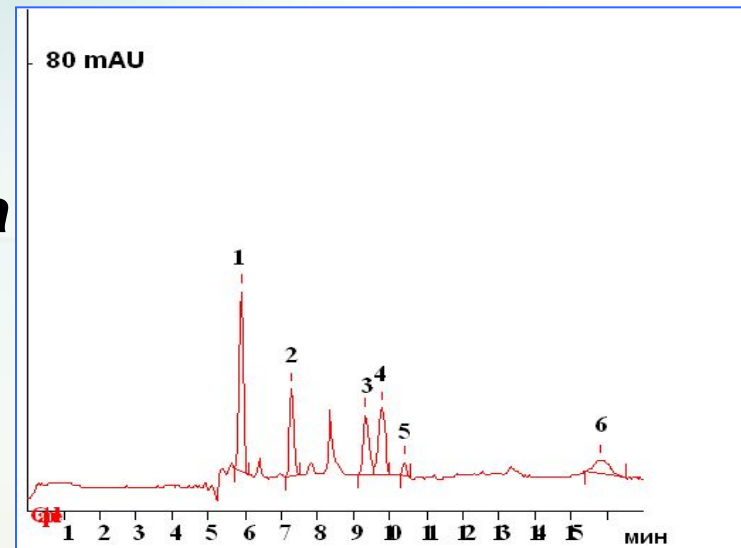
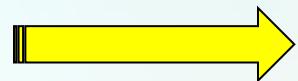


Условия: спектрофотометр Shimadzu UV-1700;  
длина оптического пути = 1 см;  
концентрации водных растворов Caf, EC, EGCG –  $2 \cdot 10^{-5}$  М

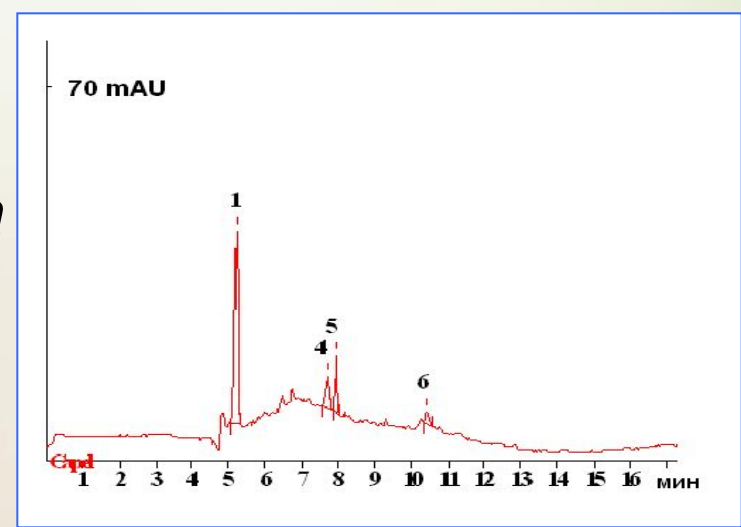
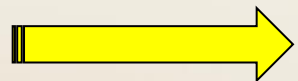
# Влияние добавки молока в чай на его электрофоретический профиль



**5 % молока**



**5 % молока**



1 – Caf, 2 – EGC, 3 – EGCG, 4 – EC, 5 – GA, 6 – ECG

# Влияние добавки в чай молока на содержание полифенолов

19

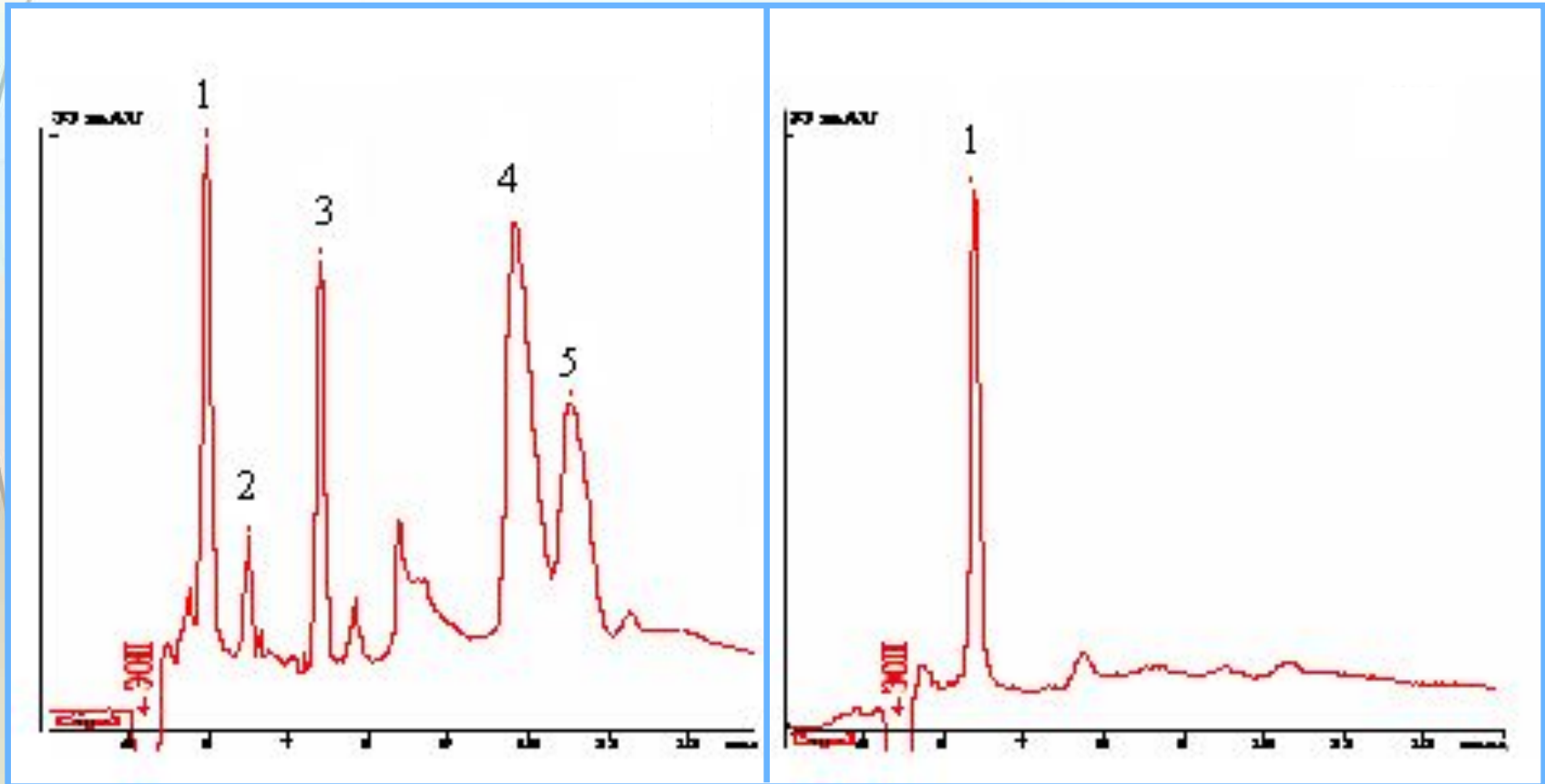
Аналит	Концентрация, масс %		Концентрация, масс %	
	Зеленый чай	Зеленый чай с добавкой 5% молока	Черный чай	Черный чай с добавкой 5% молока
Caf	2,08 ± 0,19	1,10 ± 0,09	1,50 ± 0,11	0,95 ± 0,09
EGC	1,71 ± 0,14	0,57 ± 0,06	< 0.01	< 0.01
EGCG	3,40 ± 0,30	0,55 ± 0,06	0,10 ± 0,01	< 0.01
EC	0,83 ± 0,08	0,28 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
GA	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,06 ± 0,01
ECG	2,32 ± 0,22	0,41 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,11 ± 0,02

**P = 0.95, n = 5**

# Изменение электрофоретического профиля чая при добавлении соли железа (III)

*Экстракт зеленого чая*

*Экстракт зеленого чая с добавкой соли железа (III)*



1 – Caf, 2 –С, 3 – EGC, 4 – EGCG, 5 - EC

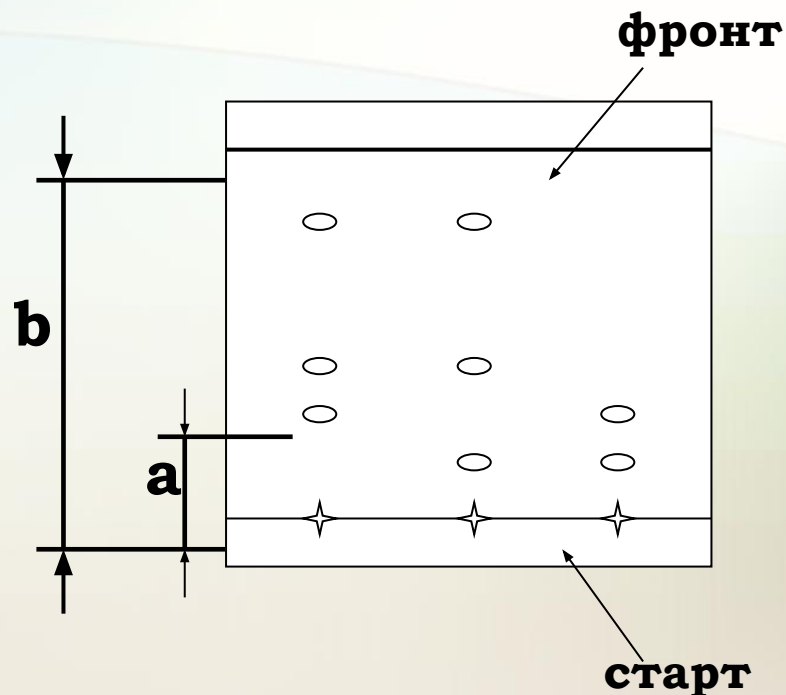
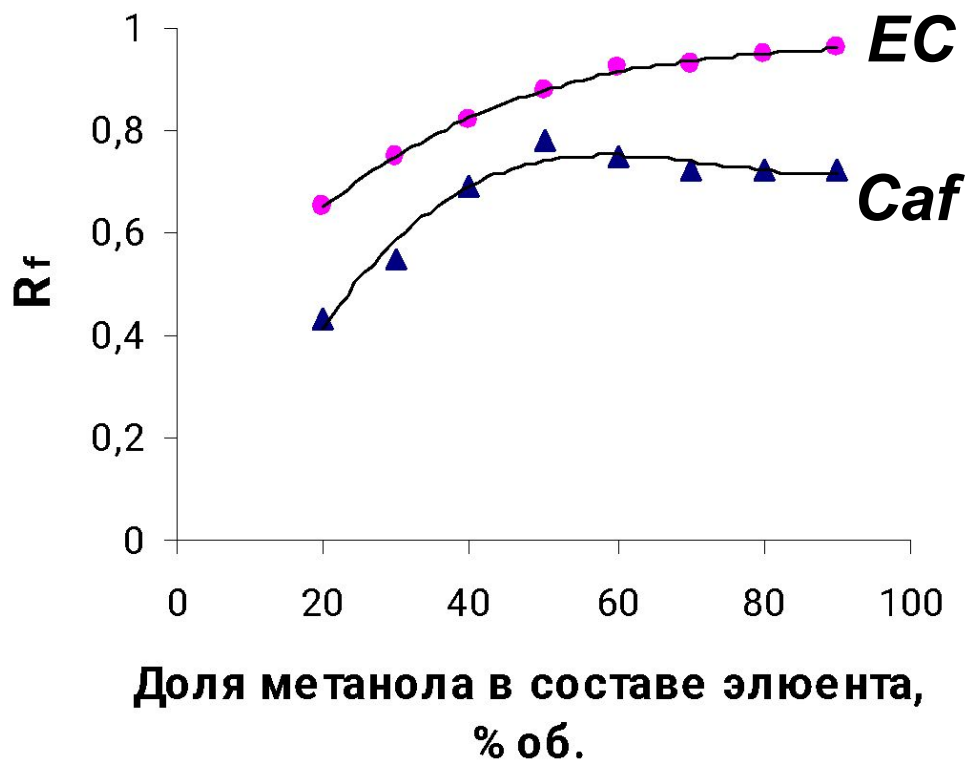
# Изменение площади пика EGCG на электрофореграмме при добавлении в пробу соли железа (III)



# Зависимость $R_f$ аналитов от концентрации метанола в составе подвижной фазе

22

**ПО (Caf) 100 нг**



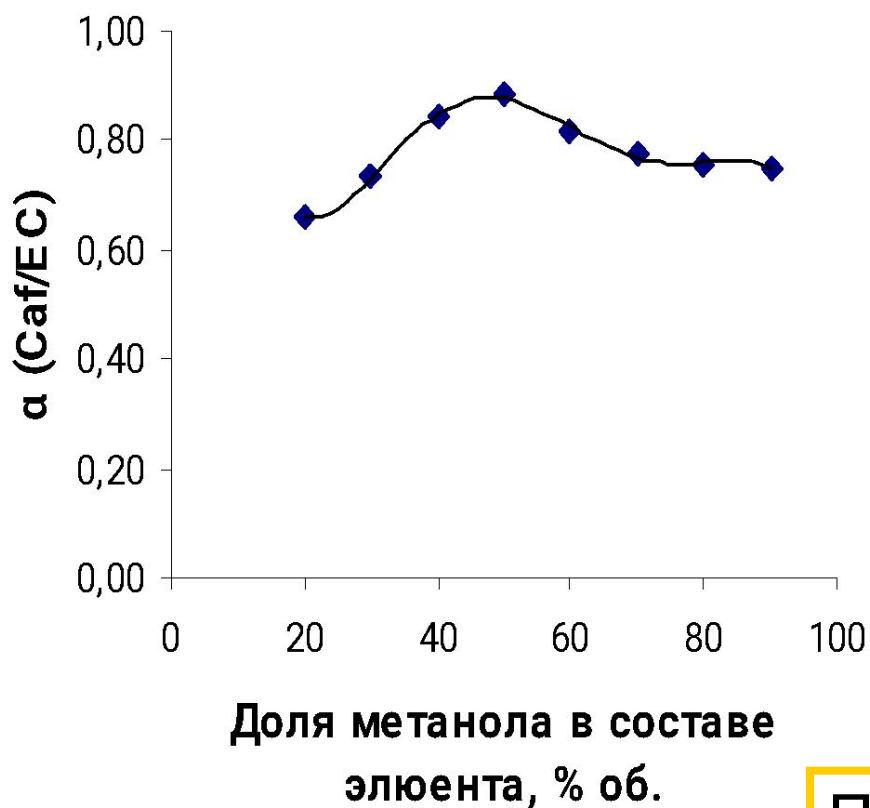
П.ф. метанол - этилацетат

Пластины «Sorbfil» ПТСХ-АФ-В-УФ  
(ООО «Имид», г. Краснодар)

$$R_f = a/b$$

$$R_h = R_f \cdot 100$$

# Влияние состава элюента на селективность разделение кофеина и эпикатехина



$$\alpha(Caf / EC) = \frac{R_f(Caf)}{R_f(EC)}$$

Содержание метанола в п.ф., % об.	$\alpha (Caf/EC)$
< 30	< 0,73
> 70	< 0,78

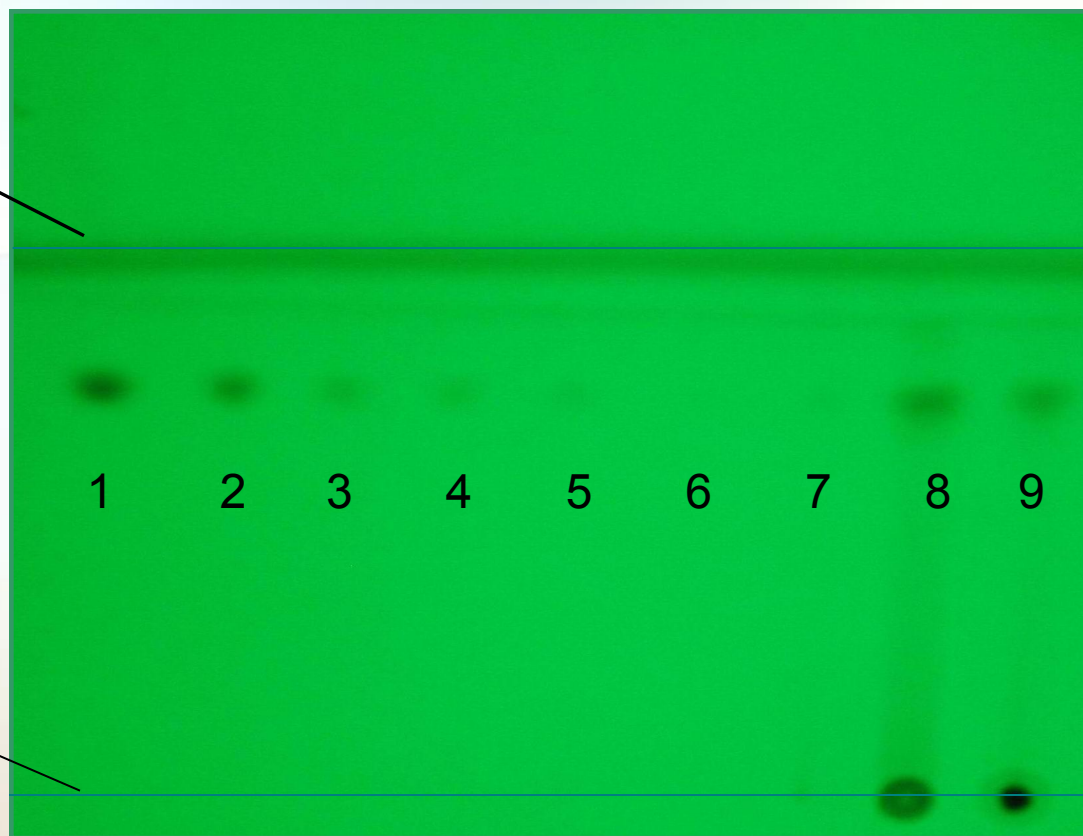
При содержании метанола **10%**  
 $R_f(Caf) = 0,17$

Оптимальный состав элюента:  
метанол – этилацетат = 25 : 75 % об.



# Влияние добавки соли железа (III) на хроматографический профиль реального объекта

Линия фронта  
растворителя



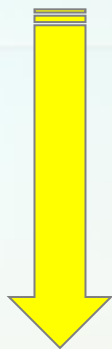
Линия старта

(1 – 7) – стандартные растворы кофеина,  
8 – проба чая,  
9 – проба чая с добавкой хлорида железа (III)



$\text{Fe}^{3+}$

**Проверка корректности результатов  
количественного определения полифенолов и  
кофеина, полученных в режиме КЭ**



**ОФ ВЭЖХ-  
УФ**

**Колонка:** *Supelco C<sub>18</sub>; 150 × 4 мм*

**Элюент:** *ацетонитрил – 1 % муравьиная кислота*

# Варианты изократического и градиентного элюирования в режиме ОФ ВЭЖХ

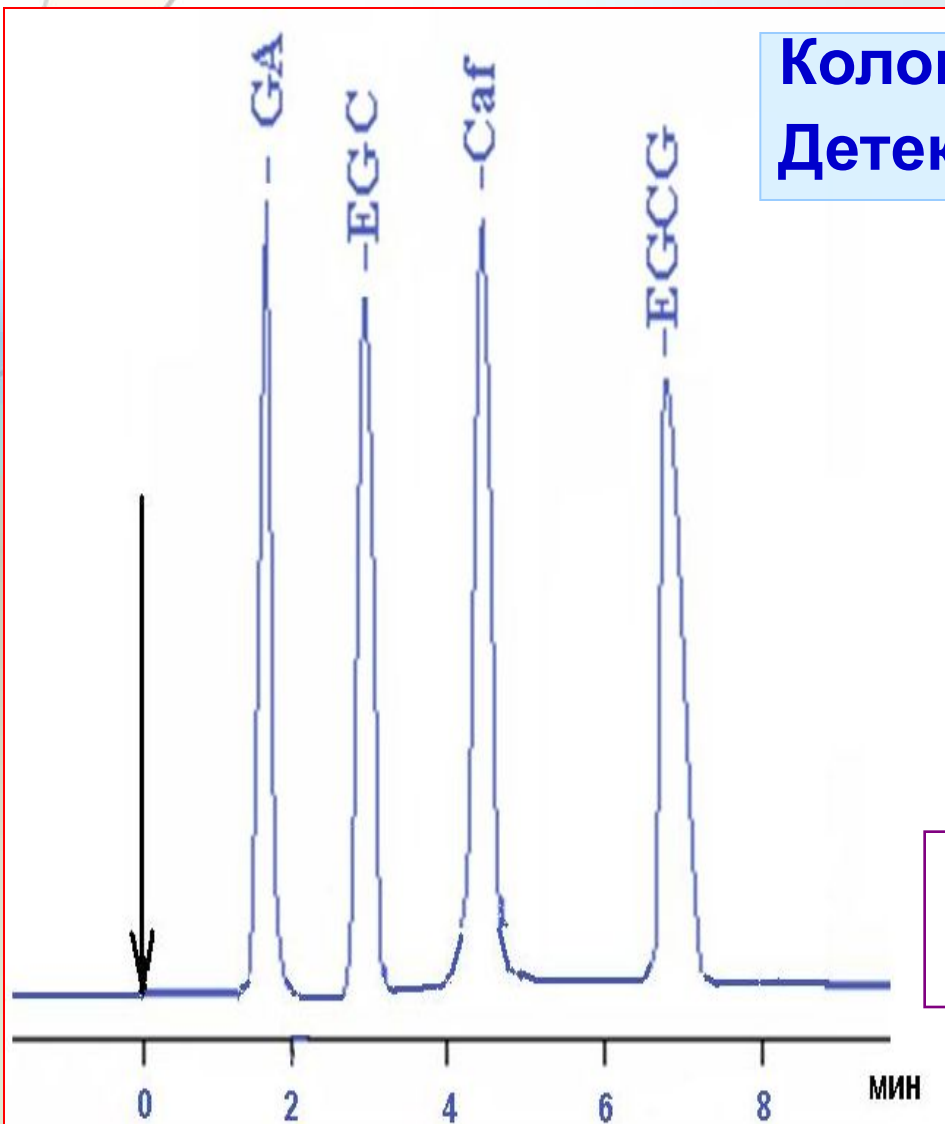
## Режим элюирования (элюент А : элюент В, об.%)

0.0 мин	15.0 мин
80 : 20	80 : 20
15 : 85	15 : 85
15 : 85	60 : 40
15 : 85	5 : 95

**Элюент А** – ацетонитрил

**Элюент В** – 1% муравьиная кислота

# Оптимальные условия разделения модельной смеси кофеина и полифенолов в режиме ВЭЖХ



Колонка: Supelco C<sub>18</sub>; 150 x 4 мм  
Детектирование: 254 нм

Линейный градиент  
элюирования:

0.0 мин – 15% элюента А

15.0 мин – 5 % элюента А

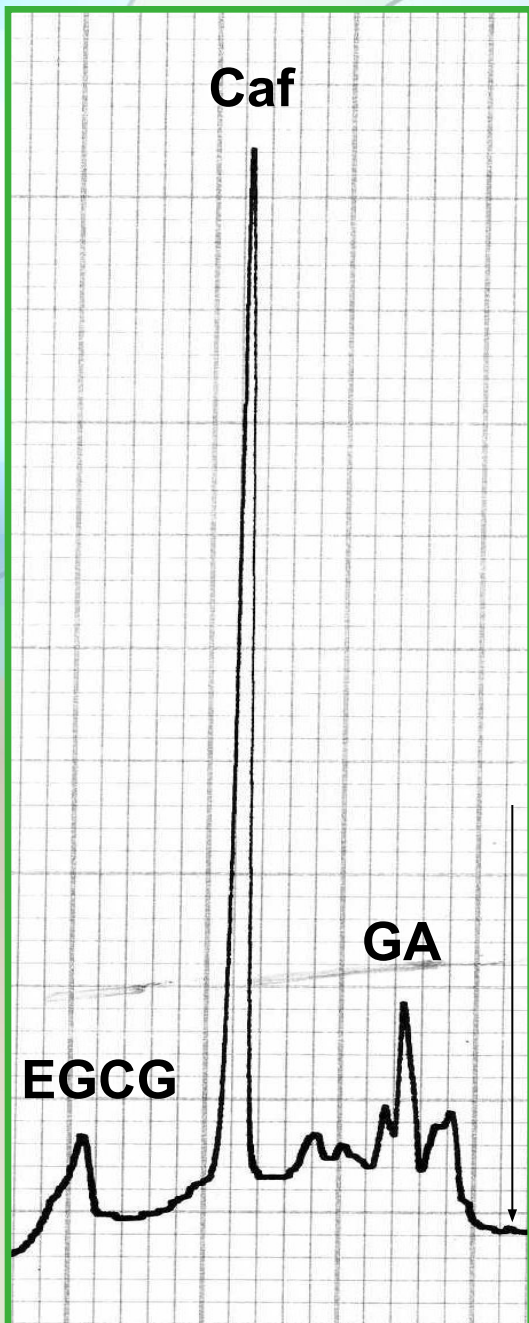
Элюент А – CH<sub>3</sub>CN

Элюент В – 1% HCOOH

**ПО (Caf, GA) 1 мкг/мл**

**ПО (EGC, EGCG) 10 мкг/мл**

# Использование метода ВЭЖХ в качестве референтного



Образец чая	Метод количественного определения кофеина	
	<i>МЭКХ</i>	<i>ОФ ВЭЖХ</i>
<i>Чёрный чай «Ришехат» (Дарджилинг, Индия)</i>	$1,21 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,05$
<i>Белый чай «Серебряные иглы» (Китай)</i>	$2,43 \pm 0,11$	$2,33 \pm 0,10$

(P = 0.95, n = 3)

# Сопоставление с литературными данными

Образец	Caf	EC	EGC	ECG	EGCG	Метод	Ссылка
Зеленый	2,66	0,55	2,25	0,57	4,68	ВЭЖХ- УФ	[1]
Зеленый	3,36	0,69	3,23	0,94	5,68		
Черный	3,29	—	0,50	0,38	0,37		
Зеленый	—	0,73	3,56	0,53	2,31	КЭ-УФ	[2]
Зеленый	—	0,69	2,46	1,27	3,10		
Черный	—	0,22	0,32	0,89	0,92		
Белый	2,43	0,36	0,77	3,28	4,30	КЭ-УФ	Наши данные
Зеленый	1,27	0,53	2,28	0,77	1,30		
Черный	1,21	0,26	0,24	0,10	1,74		

Концентрация выражена в % масс

[1] P.L. Fernandez, M.J. Martin, etc. The Analyst. 2000. V. 125. P.421-425.

[2] B.-L. Lee, C.-N. Ong. J. Chromatogr. A. 2000. V. 881. P.439-447.

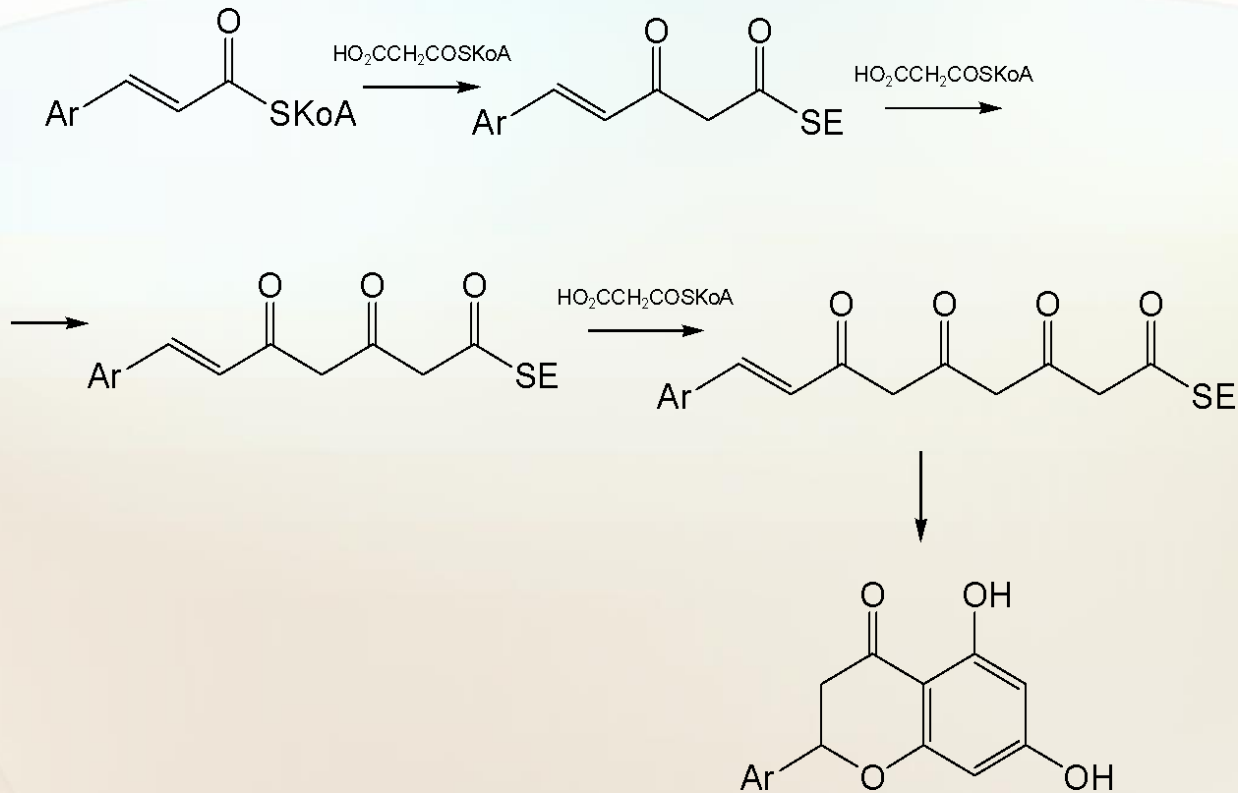
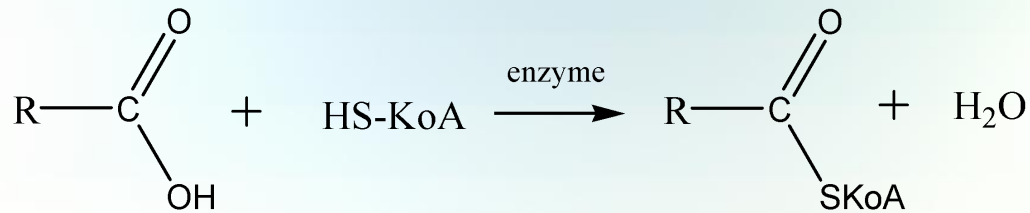
# Выводы

1. Изучены возможности различных вариантов капиллярного электрофореза с УФ-детектированием (КЗЭ и МЭКХ) для одновременного разделения смеси полифенолов и кофеина. Показано, что использование мицеллярного режима позволяет проводить их количественное определение с пределом обнаружения 1 мкг/мл. В качестве референтного использовался метод ОФ ВЭЖХ
2. Установлены зависимости электрофоретических подвижностей, эффективности и селективности разделения аналитов от концентрации мицеллообразующего агента – додецилсульфата натрия. Найдена оптимальная концентрация детергента - 25 мМ
3. В режиме МЭКХ (буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер (рН 7.0), 25 мМ ДДСН; 25 кВ; 200 нм) получены характеристические профили и проведен количественный анализ реальных объектов – различных сортов зеленого и черного чая.
4. Показано, что процессы комплексообразования полифенолов чая с казеином и ионами  $Fe^{3+}$  приводит к заметному снижению содержания полифенольных соединений.
5. Предложен экспресс-вариант определения кофеина в составе чая методом ВЭТСХ с пределом обнаружения 100 нг

Спасибо за внимание!

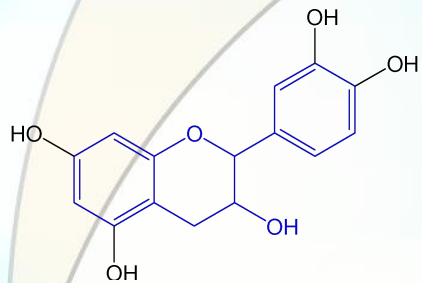


# Схема биосинтеза полифенолов



**Нарингенин (Ar = п-гидроксифенил)**

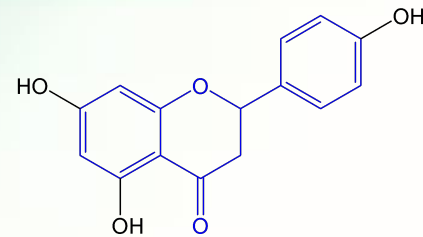
# Типичные представители флавоноидов



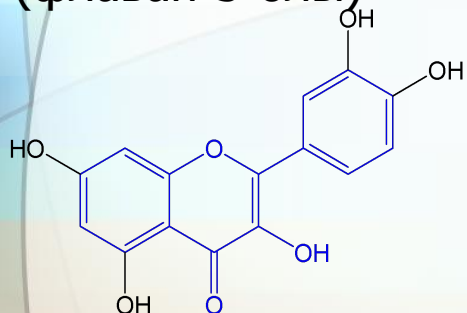
**Катехин**  
(флаван-3-олы)



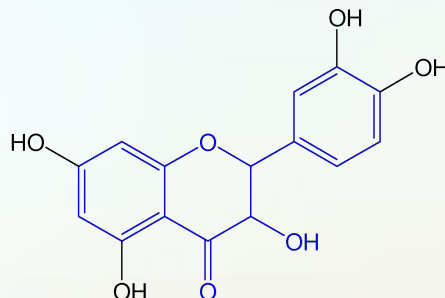
**Лейкофизетинидин**  
(флаван-3,4-диолы)



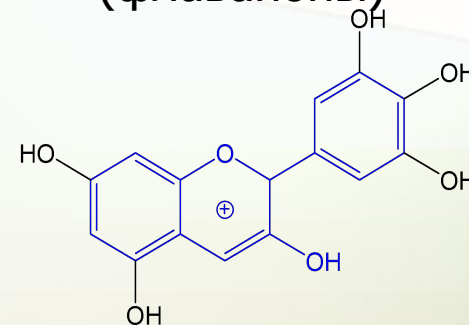
**Нарингенин**  
(флаваноны)



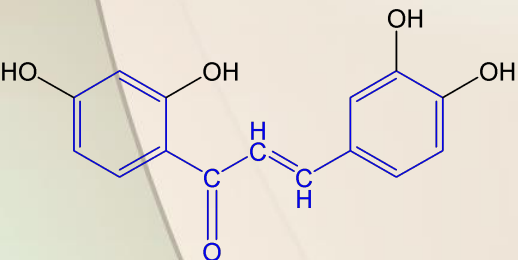
**Кверцетин**  
(флаван-3-олы)



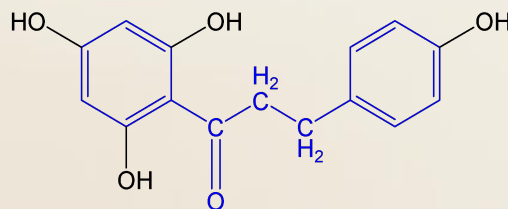
**Таксифолин**  
(флаванолы)



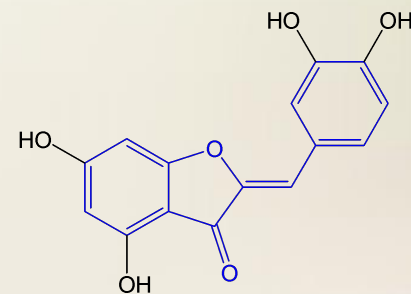
**Дельфинидин**  
(антоцианидины)



**Бутеин**  
(халконы)

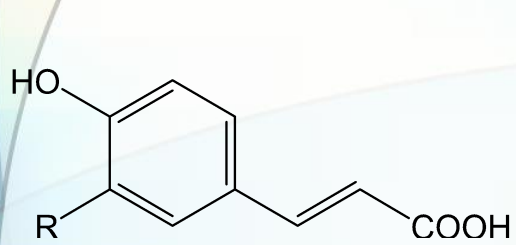


**Флоретин**  
(дигидрохалконы)

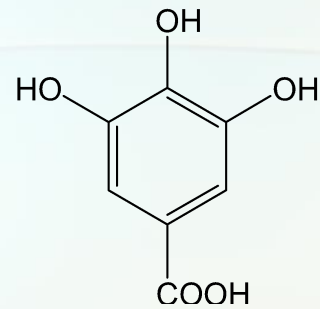


**Ауреузидин**  
(ауроны)

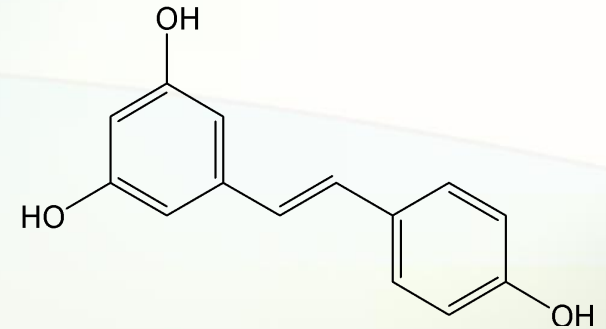
# Типичные представители *нефлавоноидов*



*p*-Кумаровая кислота ( $R = H$ )  
Кофейная кислота ( $R = OH$ )



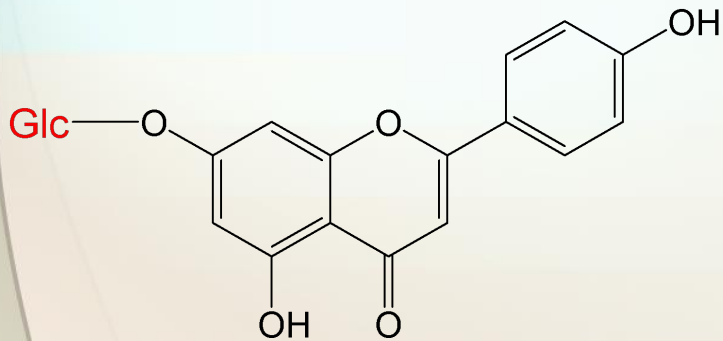
Галловая кислота



Ресвератрол

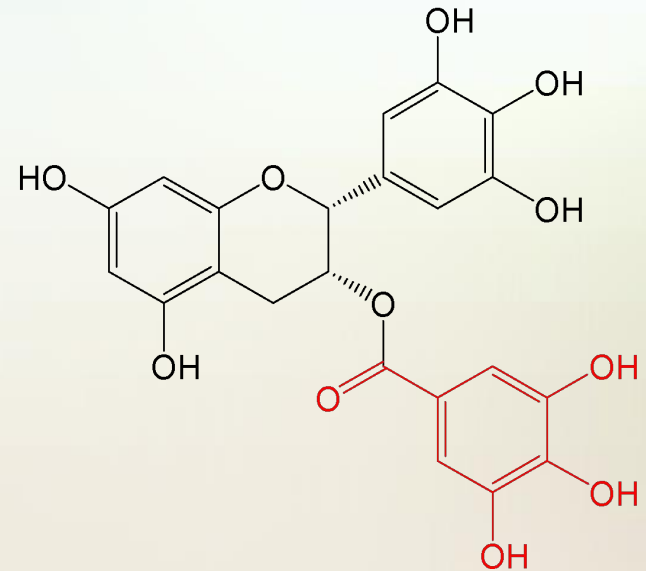
# Полифенолы

Простые эфиры



*Нарингенин-7-глюкозид*

Сложные эфиры



*(-)-Эпигаллокатехин галлат*

# Компоненты чая

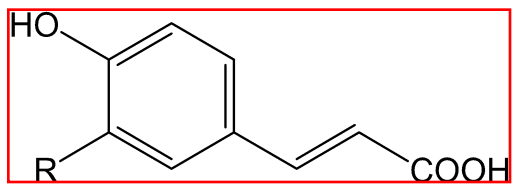
- ★ **Фенольные вещества**  
(до 30 %)
- ★ **Эфирные масла**  
(0,02%)
- ★ **Алкалоиды**  
(1-5 %)
- ★ **Аминокислоты и белки**  
(16-25 %)
- ★ **Пектиновые вещества**  
(2-6%)
- ★ **Пигменты**  
(1-12 %)
- ★ **Минеральные вещества**
- ★ **Витамины**

# Среднее содержание флаван-3-олов в побеге цейлонского чая

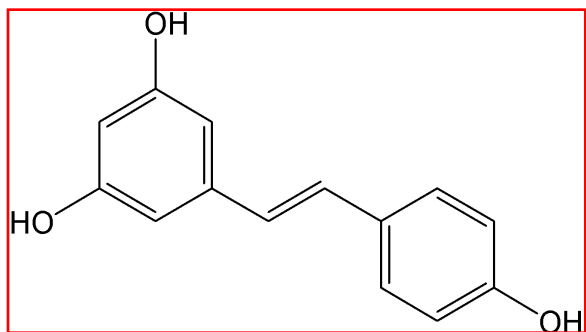
<i>Катехин</i>	<i>г /100 г</i>
<b>(-)-Эпигаллокатехин</b>	<b>2,35</b>
<b>(-)-Галлокатехин</b>	<b>0,37</b>
<b>(-)-Эпикатехин</b>	<b>0,63</b>
<b>(+)-Катехин</b>	<b>0,35</b>
<b>(-)-Эпигаллокатехин галлат</b>	<b>10,55</b>
<b>(-)-Эпикатехин галлат</b>	<b>2,75</b>

# Важные соединения, содержащие фенольные гидроксилы

## Полифенолы нефлавоноидной группы

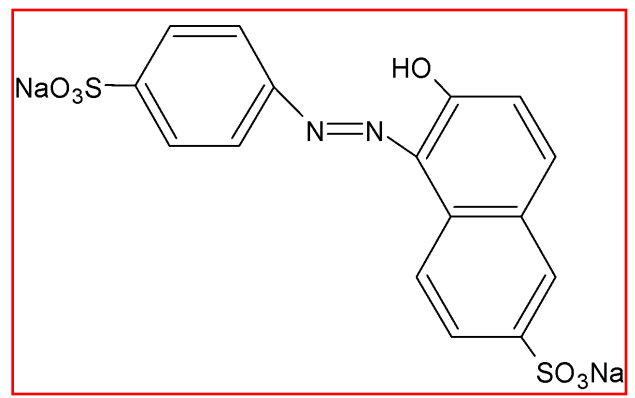


**п-Кумаровая кислота (R = H)**  
**Кофейная кислота (R = OH)**

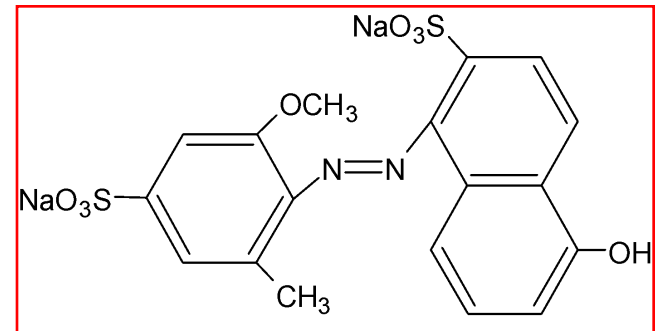


**Ресвератрол**

## Синтетические пищевые красители

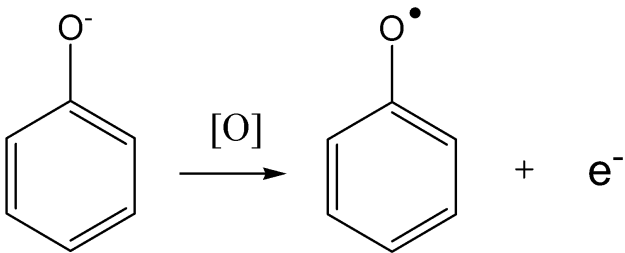
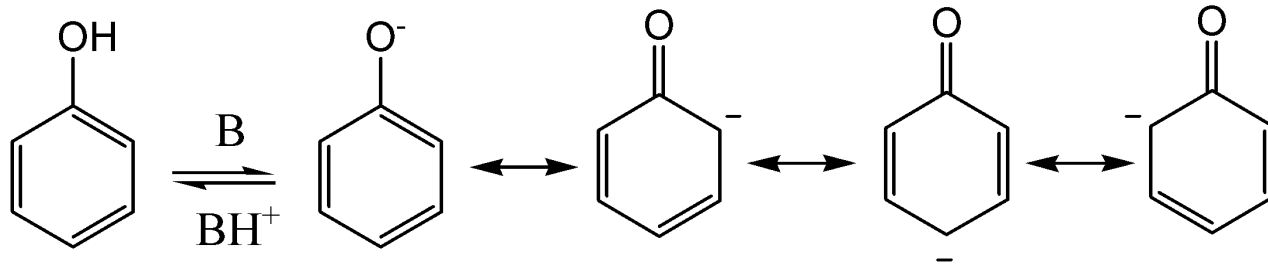


**Желтый солнечный закат (E110)**

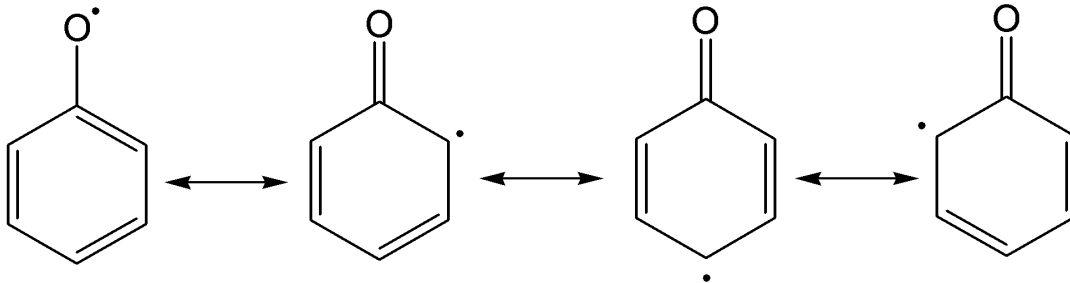


**Красный очаровательный (E129)**

# Окисление полифенолов

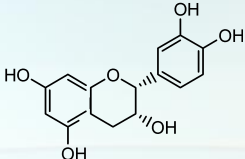
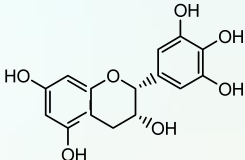
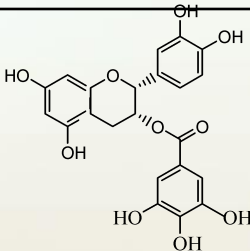
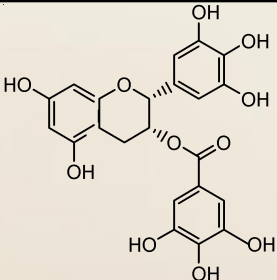


$[O]$  – ферменты, радикалы, катионы металлов



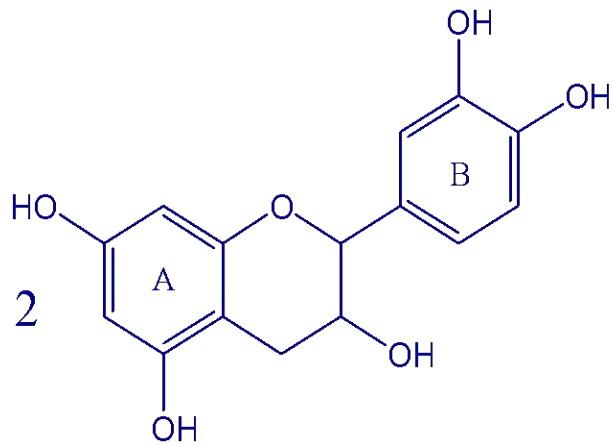


# Потенциалы окисления катехинов

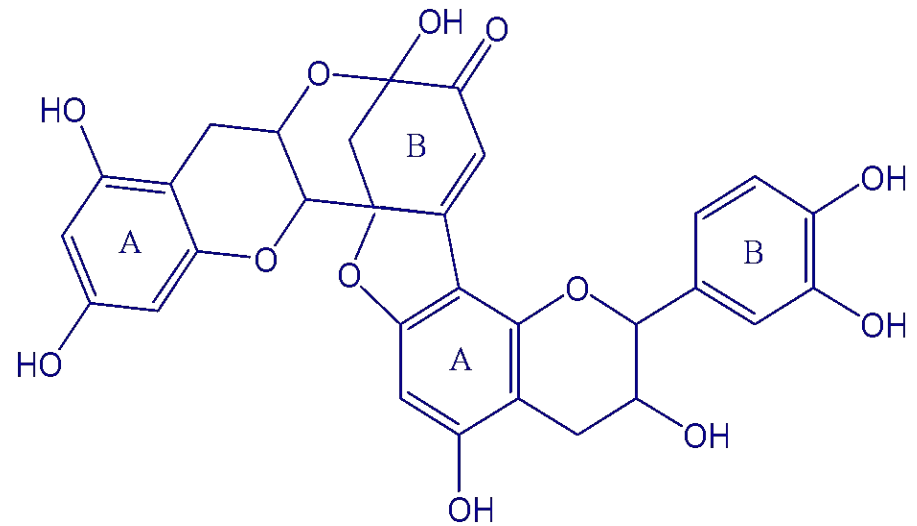
Катехин	Структурная формула	Потенциал окисления, мВ
(-)-эпикатехин		835
(-)-эпигаллокатехин		760
(-)-эпикатехин галлат		740
(-)-эпигаллокатехин галлат		720

# Окисление катехина ферментом пероксидазой в растительных объектах

---

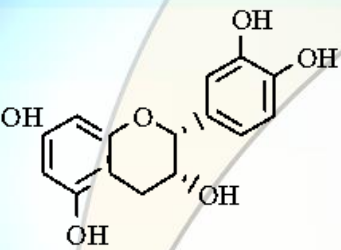


**Катехин**

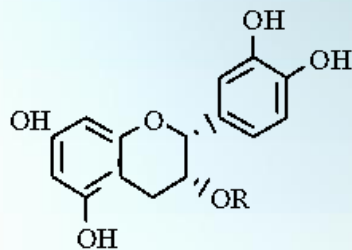


**Дегидрокатехин**

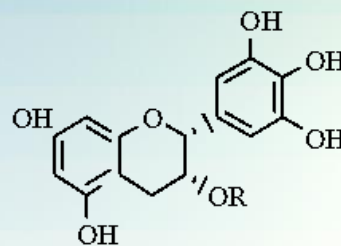
---



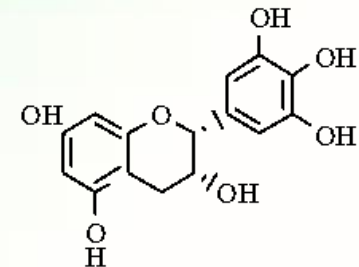
*(-)-Epicatechin*



*(-)-Epicatechin gallate*



*(-)-Epigallocatechin gallate*

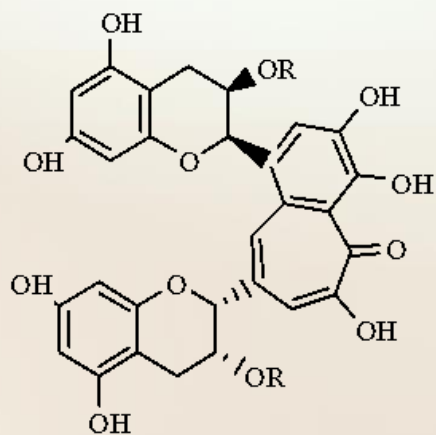


*(-)-Epigallocatechin*

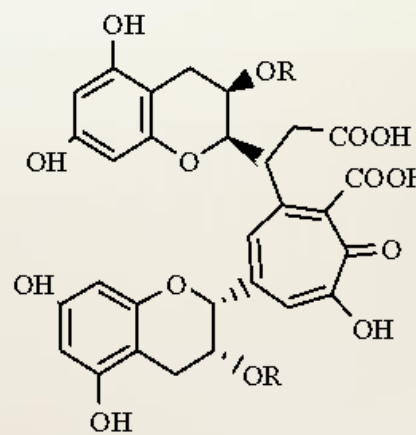
**Major green tea components**

*Fermentation*

*Tea Polyphenol Oxidase*



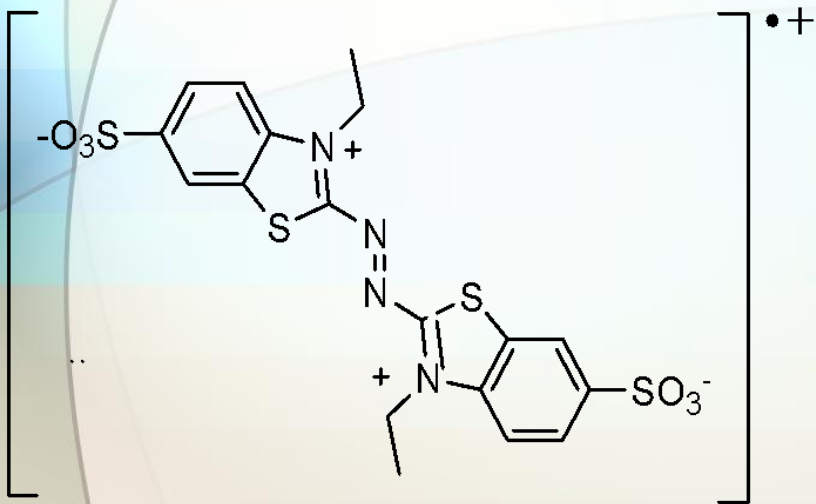
*Theaflavins*



*Thearubigins*

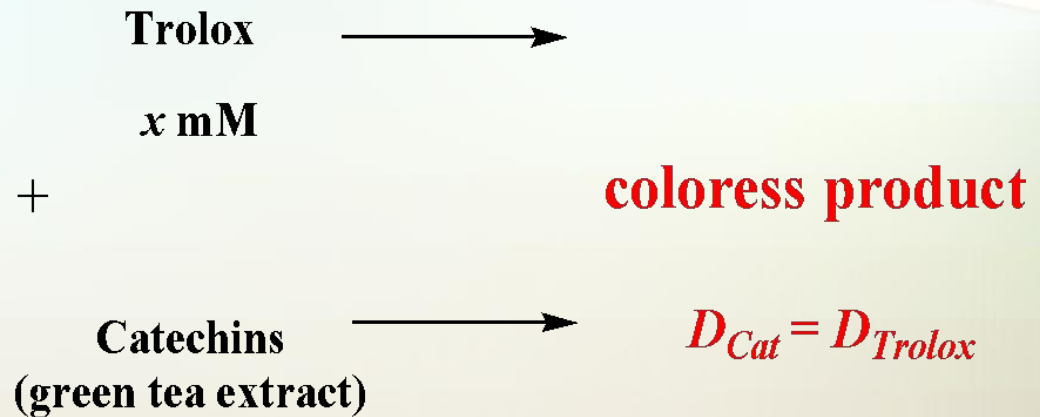
*R = galloyl*

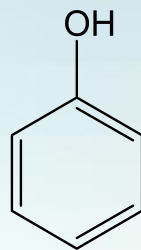
# Определение общей антиоксидантной активности зеленого чая



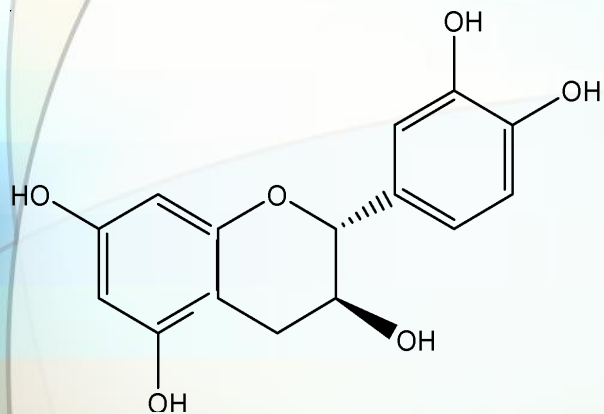
*blue-green ABTS*

fixed concentration

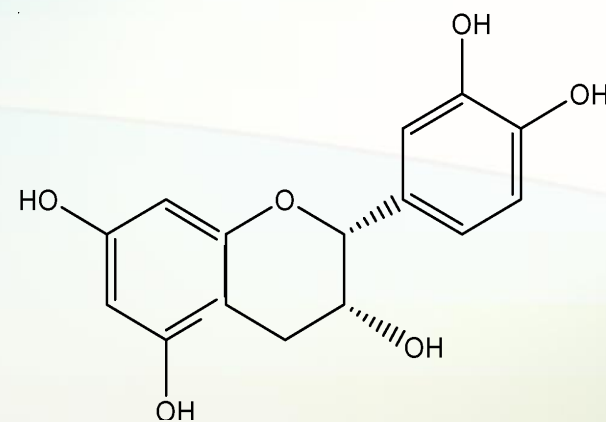




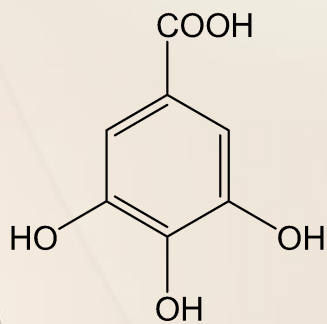
**pKa: 9.98**



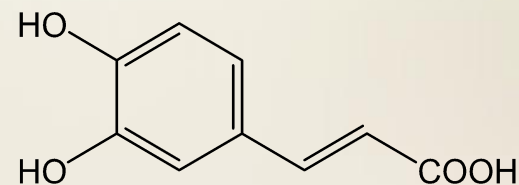
pKa: 8.64, 9.41, 11.26, 13.26



pKa: 8.72, 9.49, 11.23, 13.40

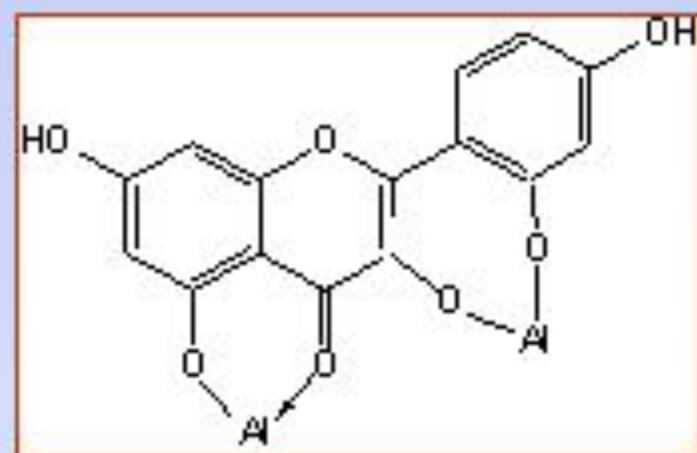
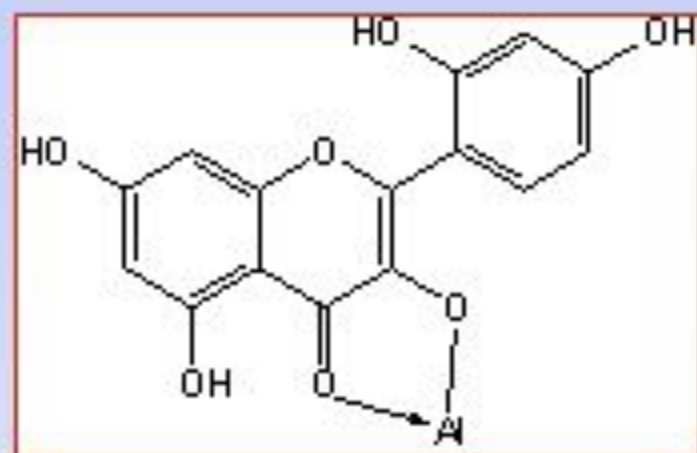


pKa: 4,27, 8,68, 11,45



pKa: 4,62 , 9,07

## Комплексы полифенолов с ионами металлов



Комплекс морина с алюминием 1:1

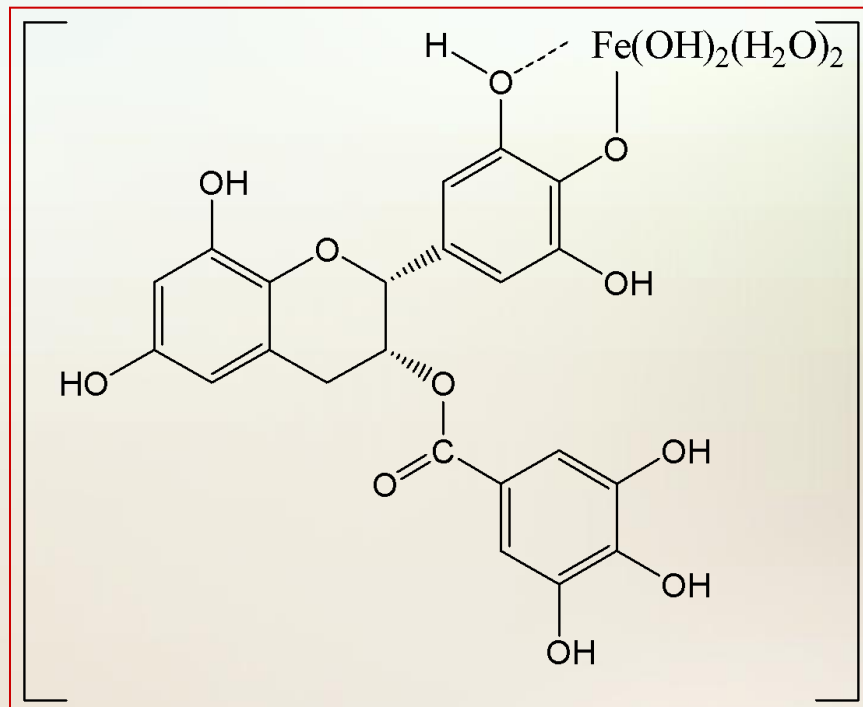
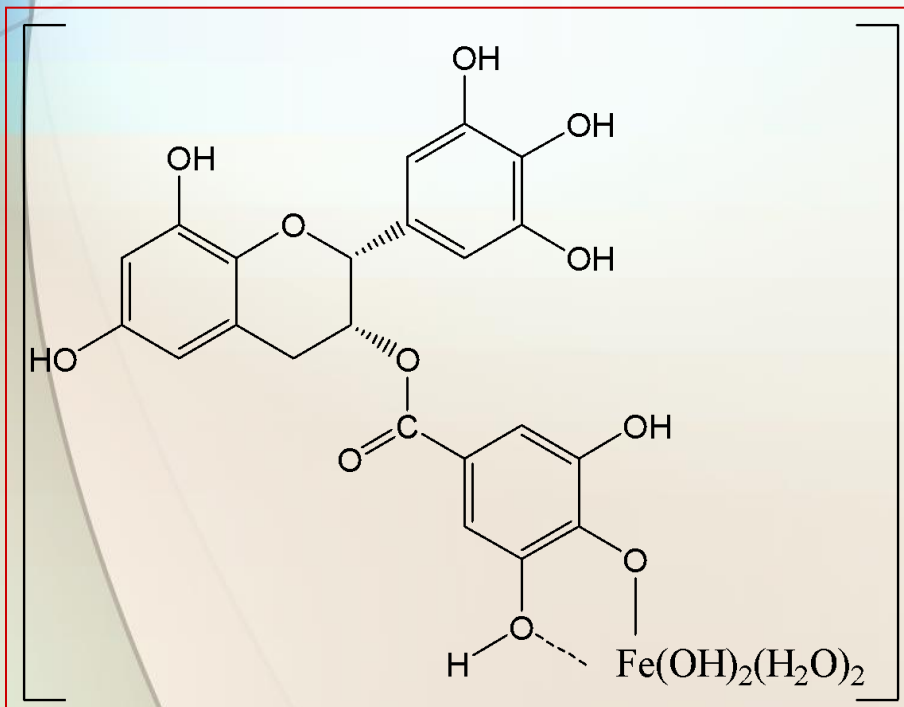
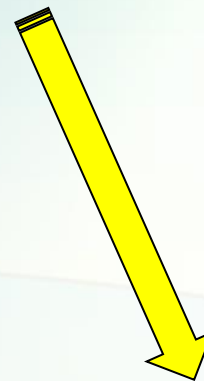
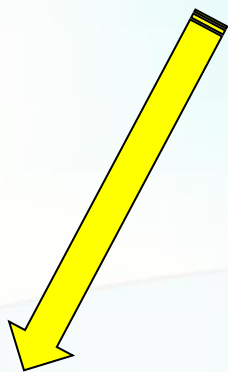
Комплекс морина с алюминием 1:2

ВЭЖХ / Фл

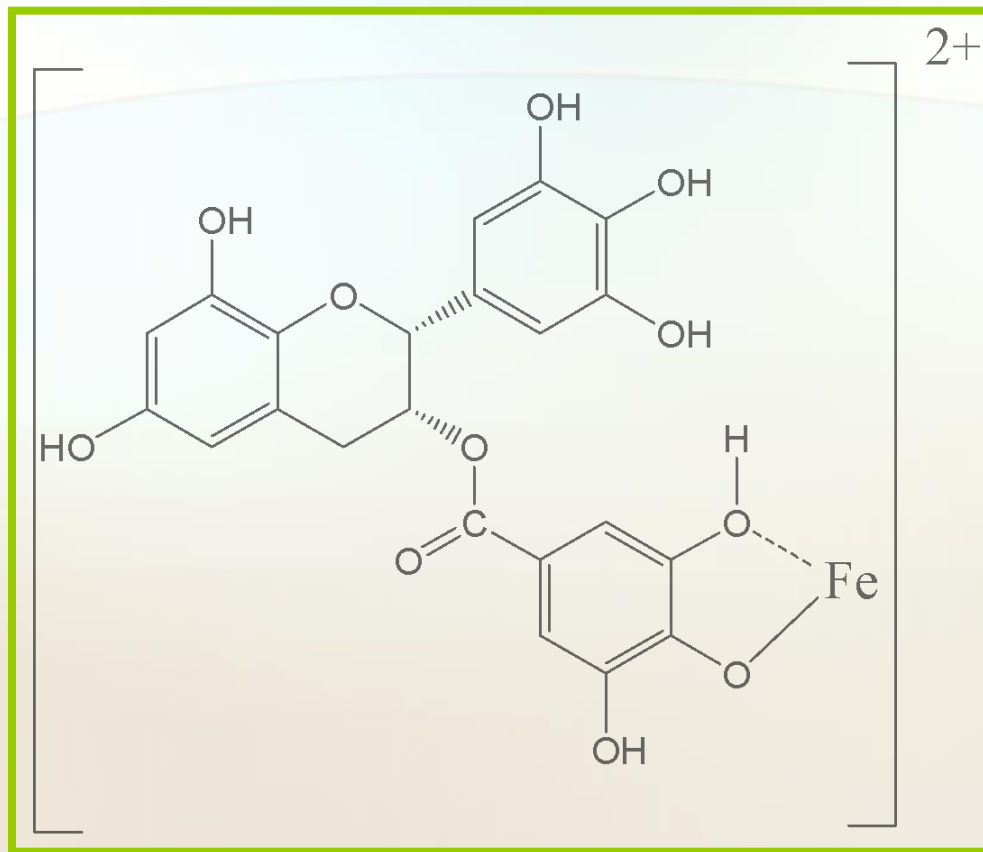
418/490нм

ПО  $10^{-10}$  М

# Предполагаемые структуры комплексов полифенол – Fe<sup>3+</sup>

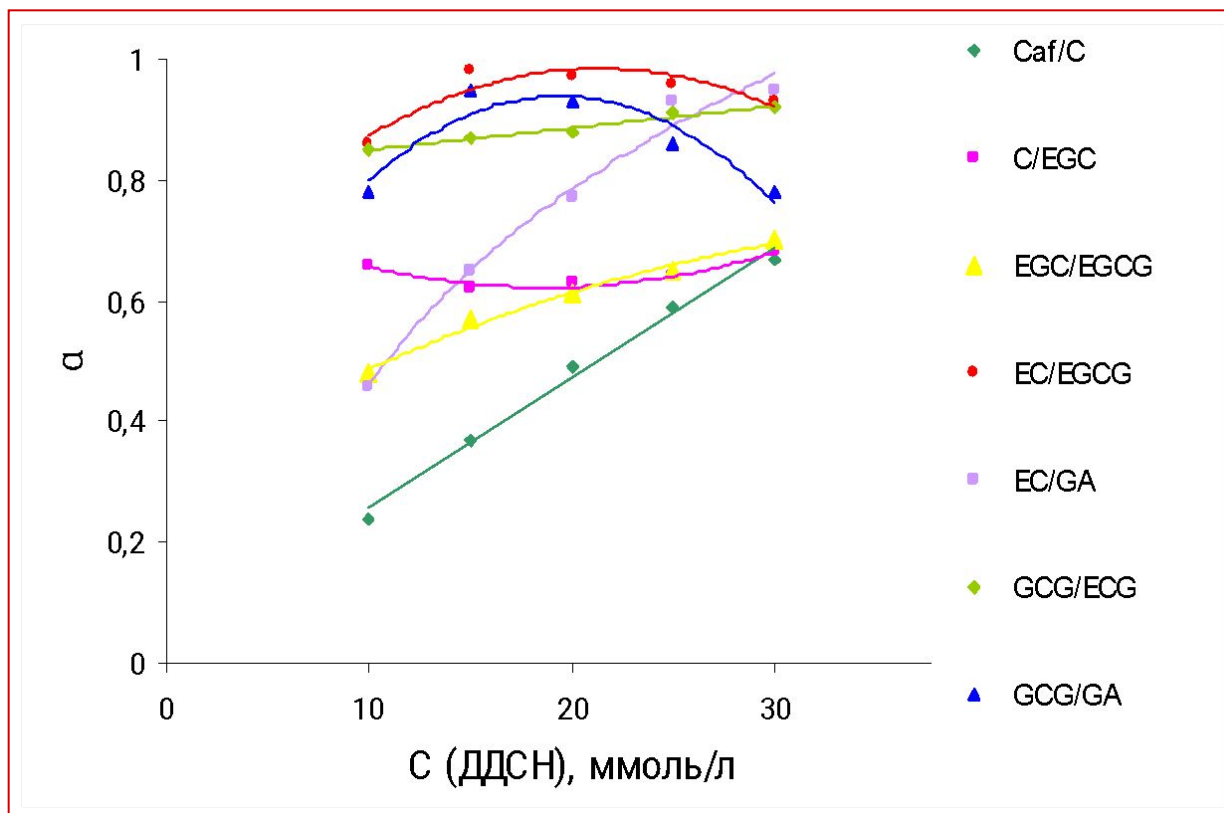


# Строение комплекса EGCG – Fe<sup>3+</sup>

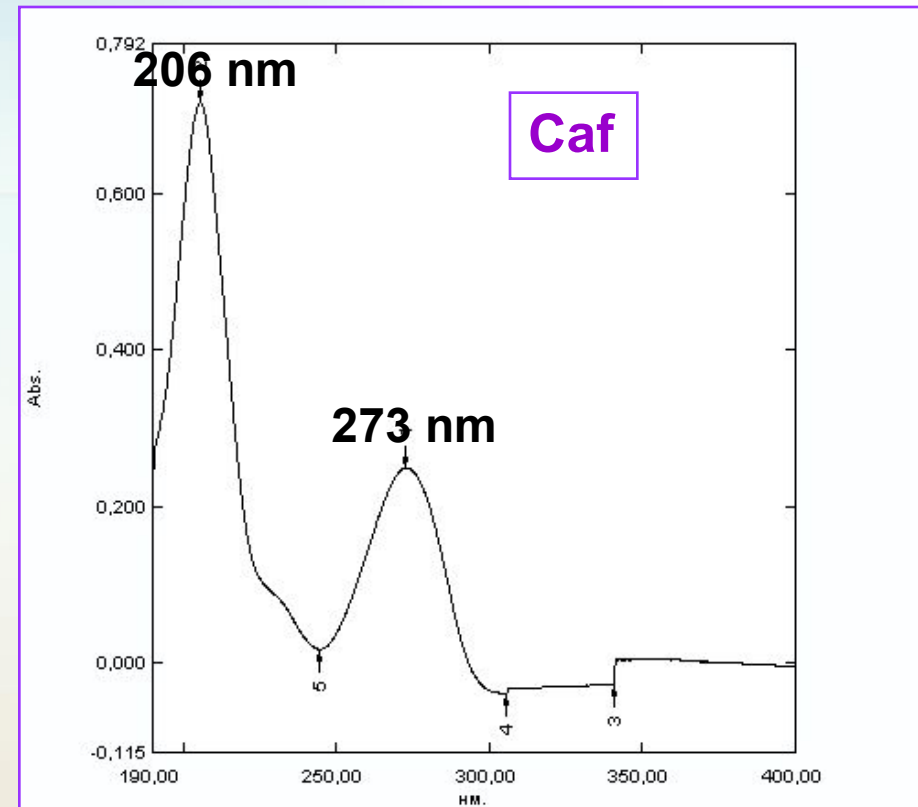
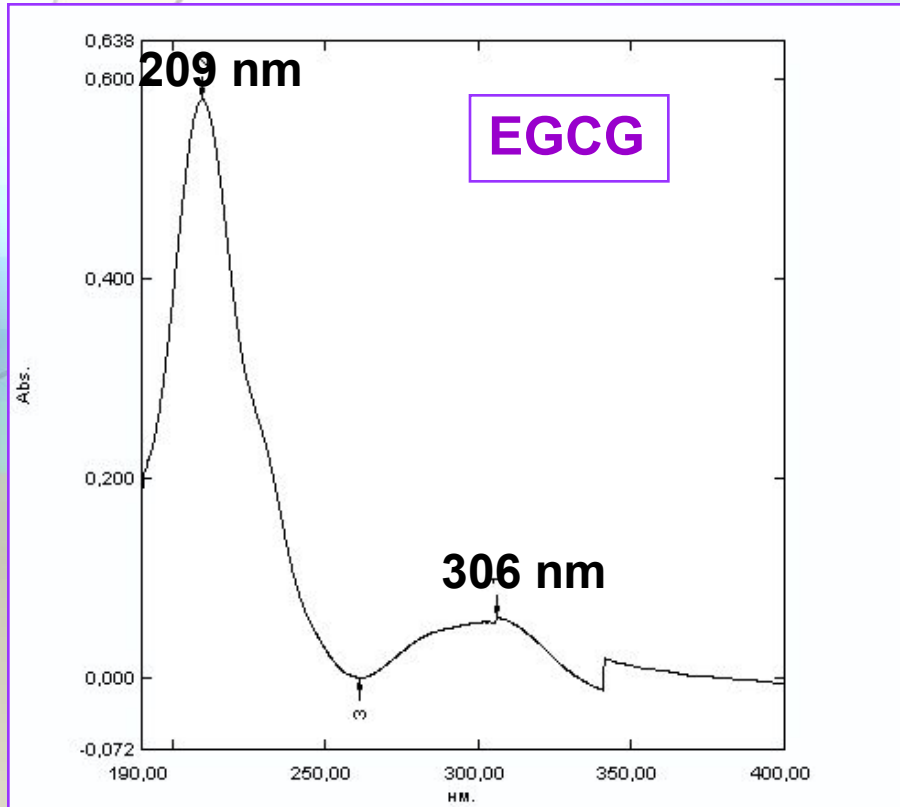




# Зависимость селективности разделения аналитов от концентрации ДДСН в буферном электролите

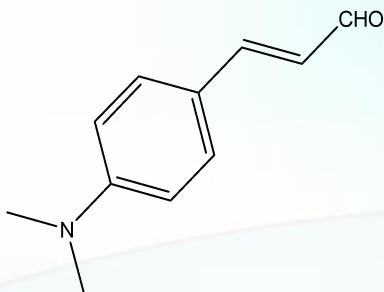


# УФ-спектры анионов эпигаллокатехин галлата и кофеина



**Условия:** растворы EGCG (400 мкг/л) и Caf (1 мг/л) в 10 mM боратном буфере pH 9,2  
Спектрофотометр **UV-1700** «Shimadzu»

# Спектрофотометрическое определение полифенолов



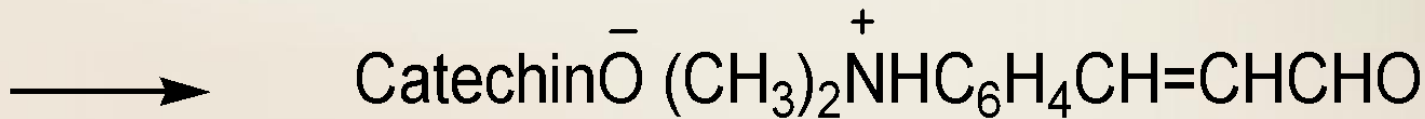
4-диметиламиноцинамальдегида (ДМАЦА)



*colorless*

*yellow*

200 nm



*green*

637 nm

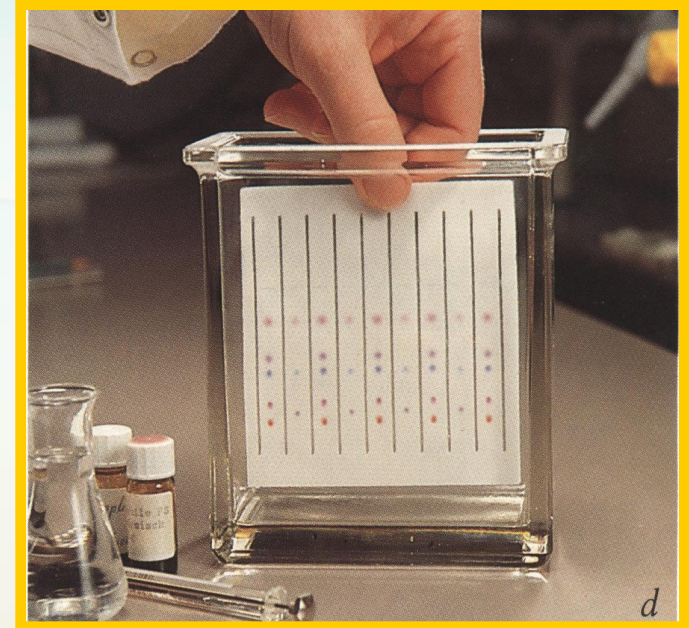
# Преимущества ВЭТСХ

★ *Экспрессность*

★ *Легкость смены элюента*

★ *Высокая эффективность*

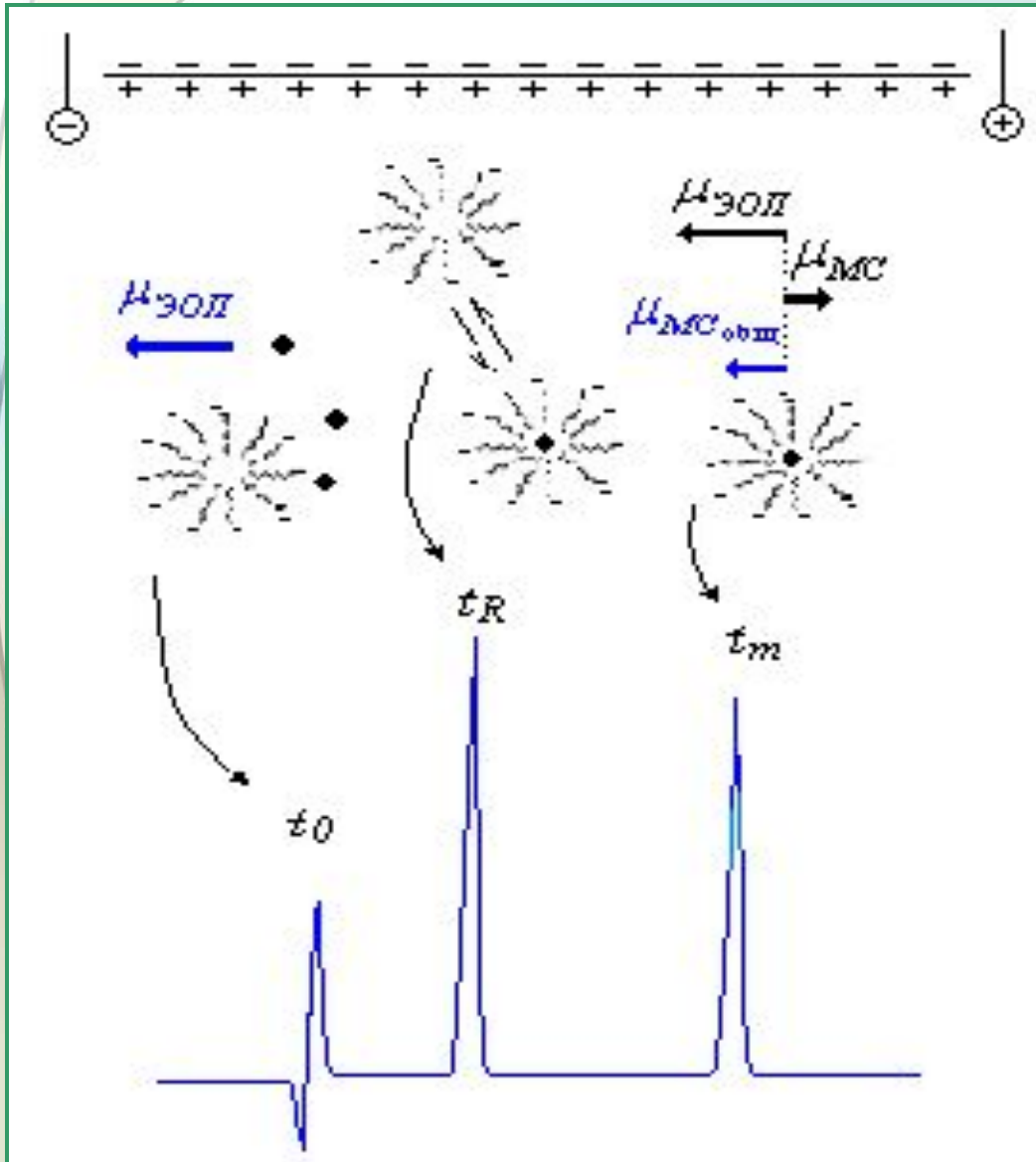
★ *Возможность параллельно проводить анализ нескольких образцов*



# Сравнение ТСХ и ВЭТСХ

Характеристика пластины	ТСХ	ВЭТСХ
Толщина слоя сорбента, мкм	200-300	100-250
Размер зерен, мкм	5-20	5-7
Длина пробега п.ф., см	3-7	10-15
Время разделения, мин	5-30	15-20
Предел детектирования, нг	100	1000

# Механизм разделения в МЭХК

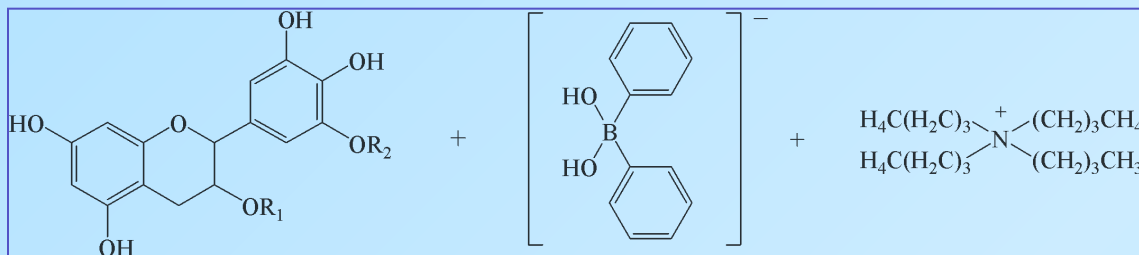


$t_0$  – время выхода **нейтральных сильно полярных** соединений

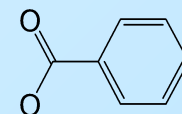
$t_R$  – время выхода соединений с **промежуточной гидрофобностью**

$t_m$  – время выхода **сильно гидрофобных** соединений

Водная фаза  
pH > 7.0

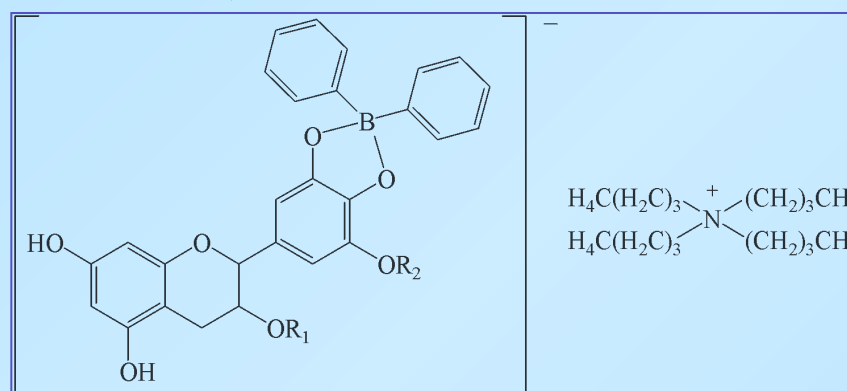


OR<sub>1</sub> = Н или

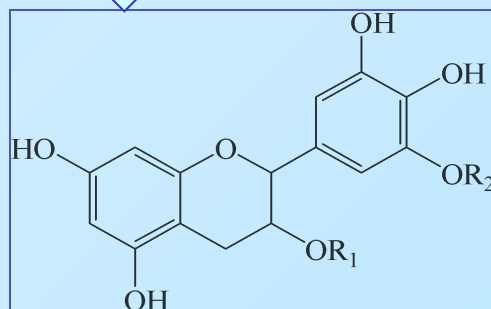


R<sub>2</sub> = Н или ОН

Органическая фаза



Водная фаза  
pH < 7.0

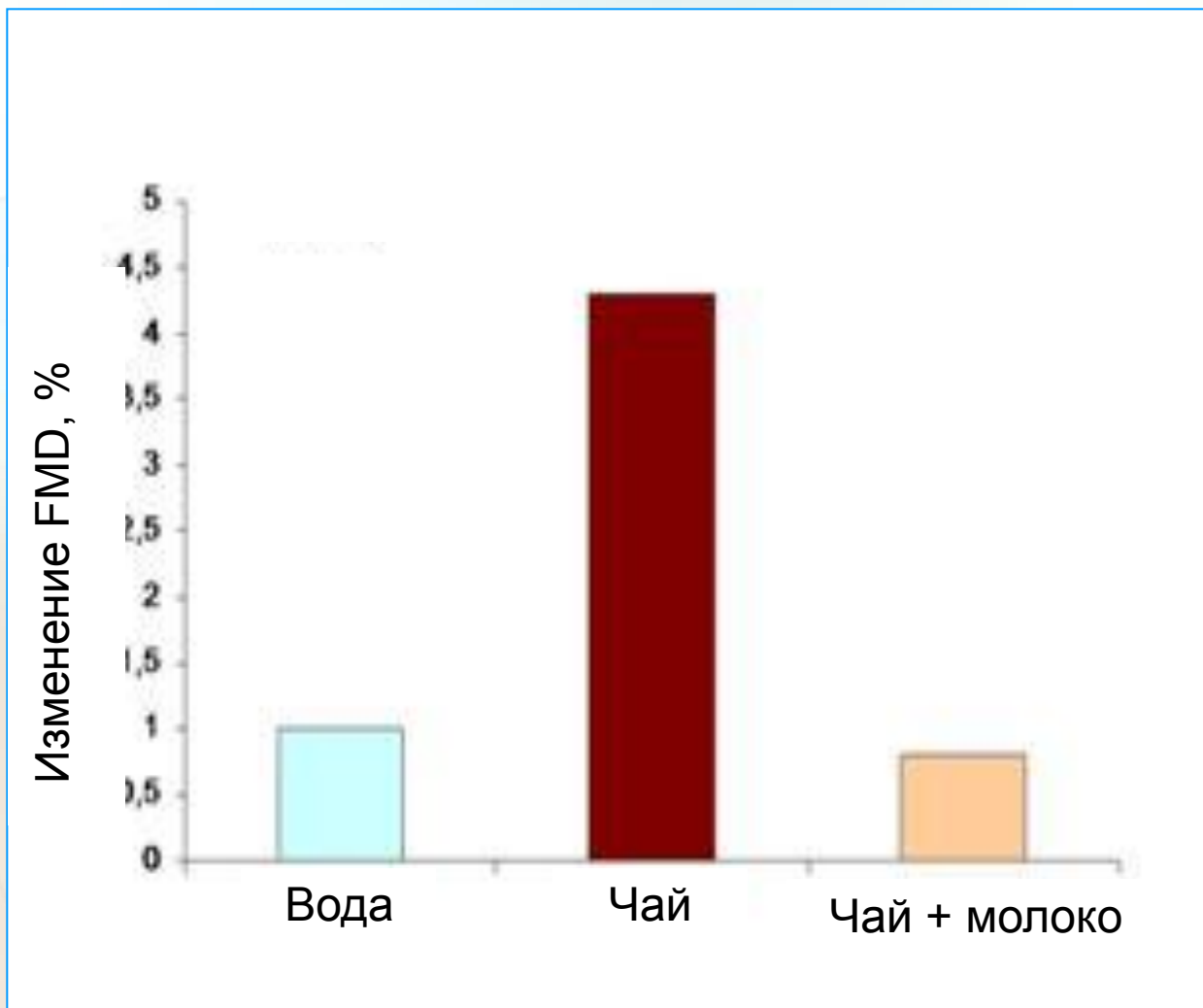


**ВЭЖХ  
анализ**

Фл 282 / 314 нм

**ПО 7 нг/мл**

**Влияние потребления кипяченой воды, свежесваренного чая и свежесваренного чая, содержащего 10% молока, на кровоток, обусловленный расширением сосудов (flow-mediated dilation (FMD))**

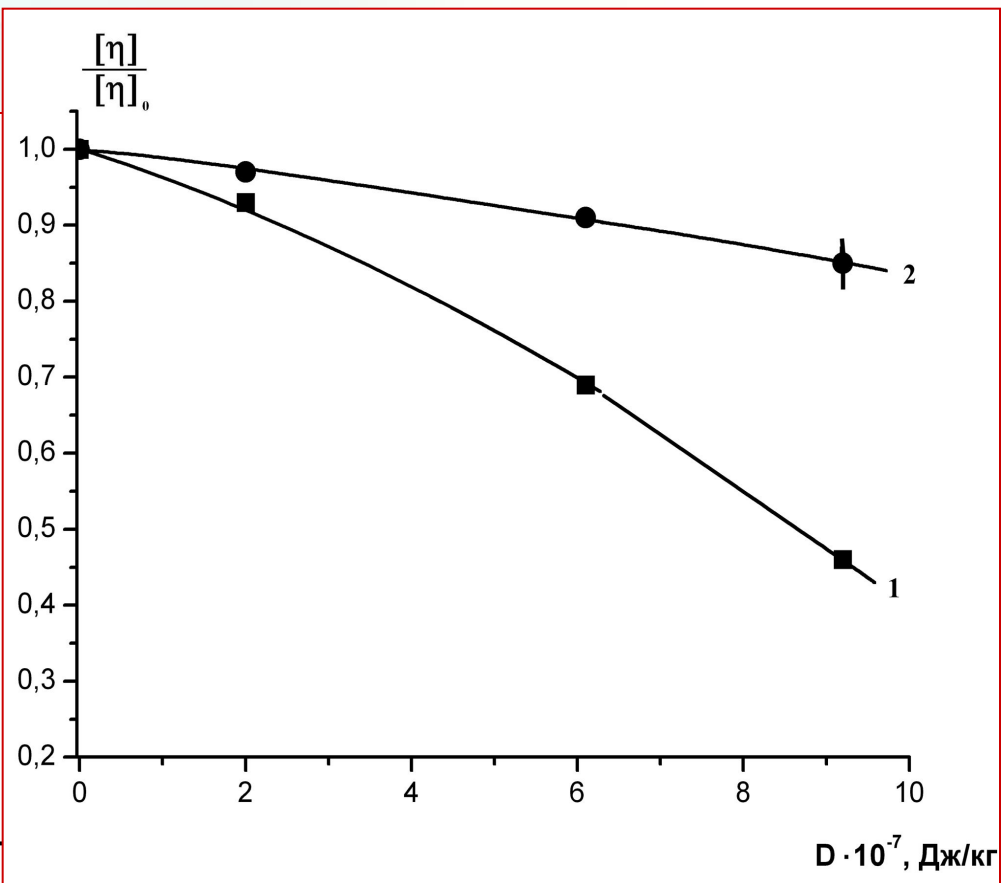
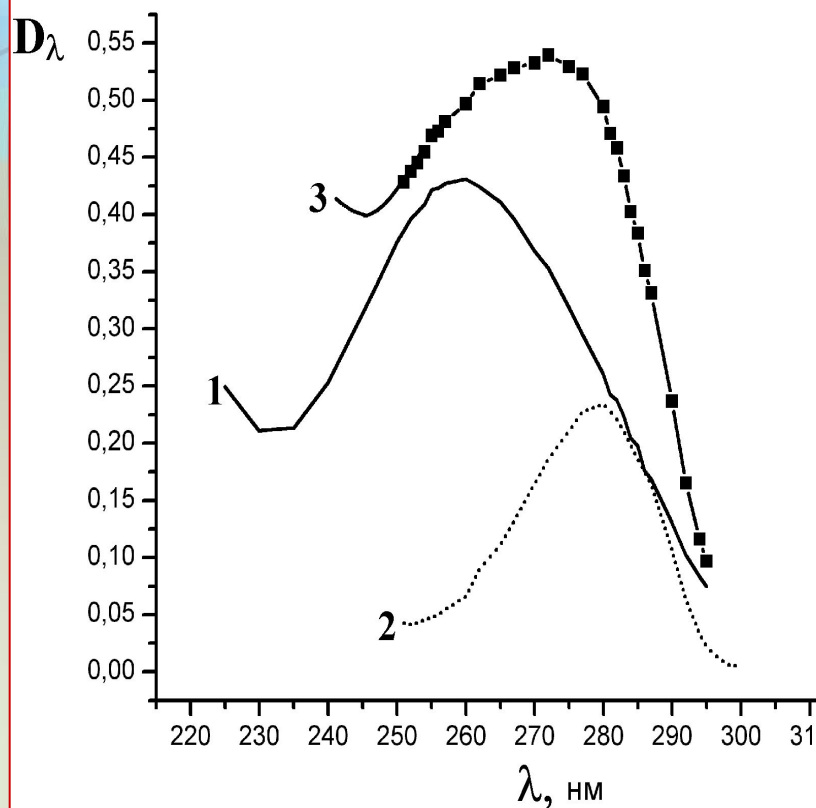




# Влияние катехинов на свойства растворов ДНК

Дозовая зависимость характеристической вязкости ДНК при УФ-облучении в отсутствии (1) и в присутствии (2) (+)-катехина в растворе

Спектры поглощения ДНК (1), (+)-катехина (2) и их смеси (3)



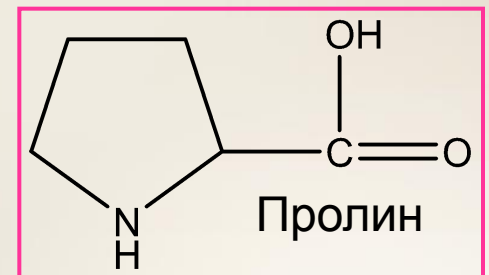
Точками показана сумма спектров (1) и (2)

# Определение кофеина в реальных объектах

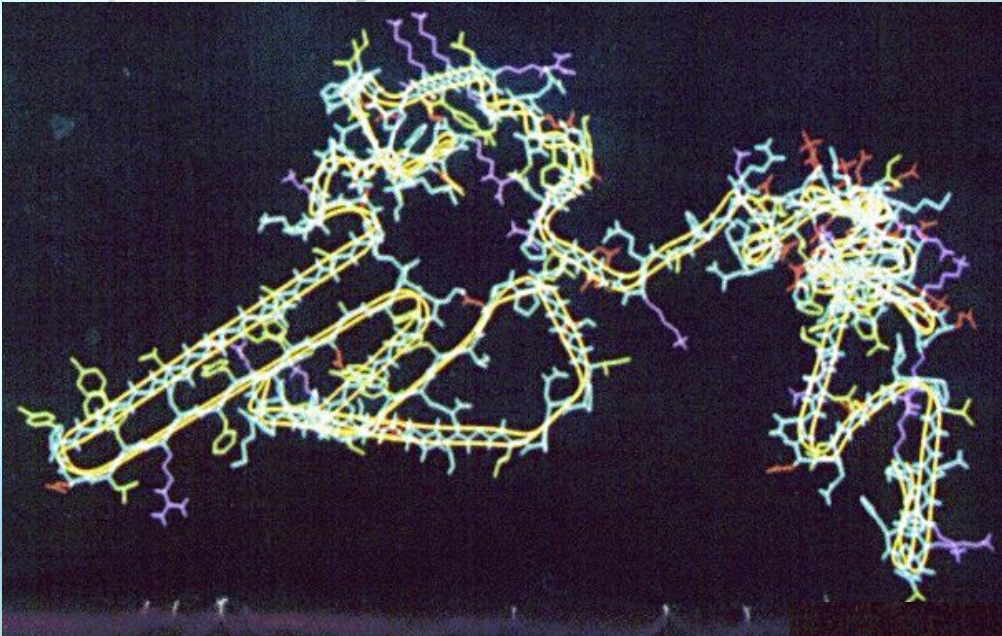
Метод разделения	Детектирование	Рабочая длина волны, нм	Объекты анализа
ОФ ВЭЖХ	Детектор на диодной матрице	210	Кофеин, никотиновая, хинолиновая кислоты и др. в кофе
ОФ ВЭЖХ	Детектор на диодной матрице	229	Кофеин, 8-хлоротеофиллин
ОФ ВЭЖХ	Фотометрический детектор	254	Кофеин, индопрофен, кетопрофен, и др. фармакологические препараты
ОФ ВЭЖХ	Детектор на диодной матрице	272	Кофеин в чайных листьях
ОФ ВЭЖХ	Детектор на диодной матрице	231	Пуриновые алкалоиды и катехины в чае
ОФ ВЭЖХ	Спектрофотометрический детектор	230, 254, 280	Кофеин, кетопрофен, пропранолол
МЭКХ	Спектрофотометрический детектор	274	Кофеин и его метаболиты в напитках; таблетках; крови
ОФ ВЭЖХ	Спектрофотометрический детектор	272	Кофеин, теофиллин, теобромин в коле; плазме крови
ОФ ВЭЖХ	Спектрофотометрический детектор	280	Кофеин и его 14 метаболитов в моче

# Казеин

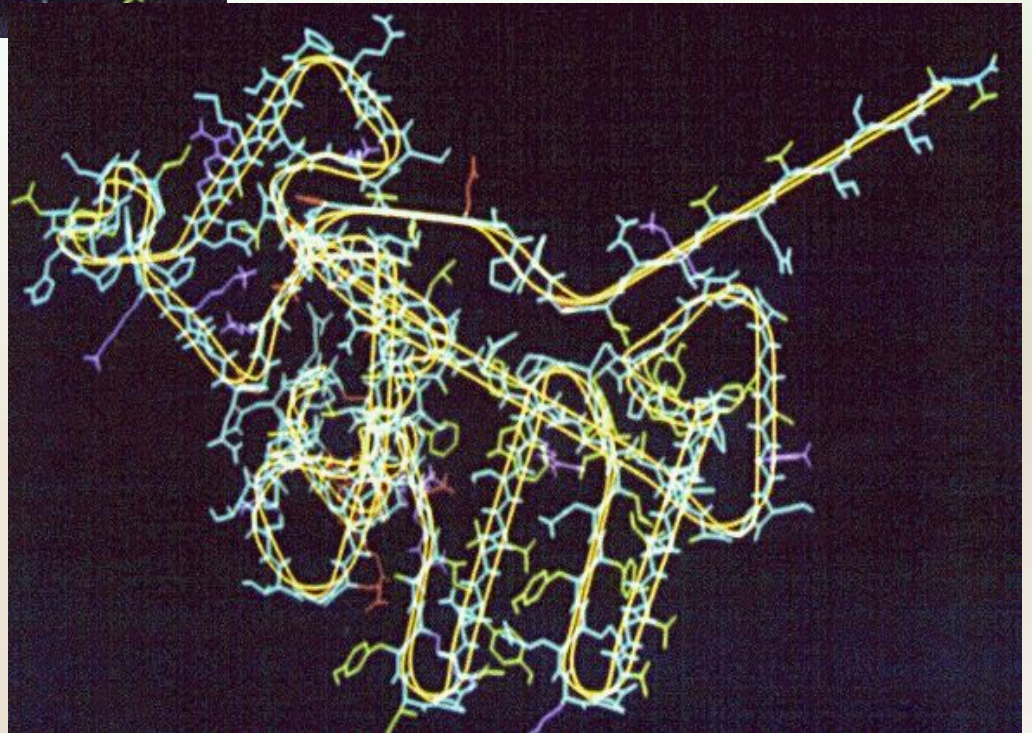
Белок	Содержание, %	Молекулярный вес	Число аминокислотных остатков (пролин)
Общий белок	100		
Общий казеин	80		
$\alpha_{s1}^-$	31	23000	199 (17)
$\alpha_{s2}^-$	8	25000	207 (10)
$\beta^-$	28	24000	209 (35)
$\kappa^-$	10	19000	169 (20)



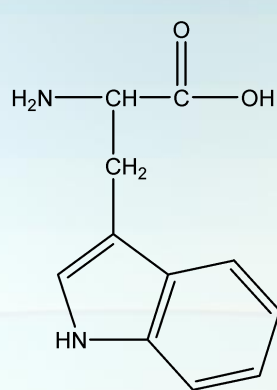
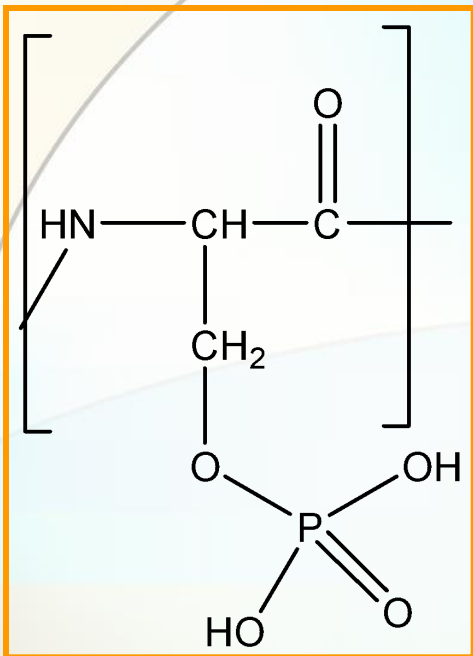
**$\alpha$ 1-Казеин**



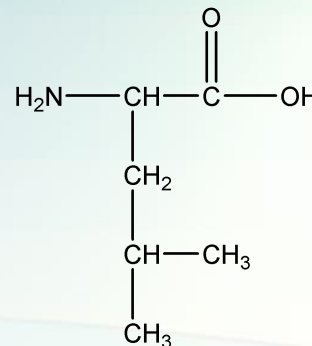
**к-Казеин**



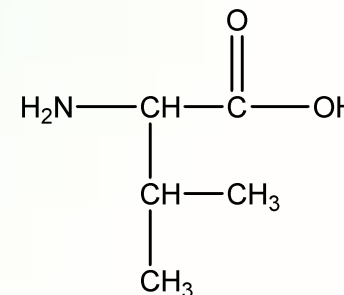
# Серинфосфат



**Trp**

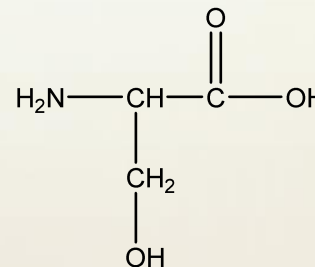


**Leu**

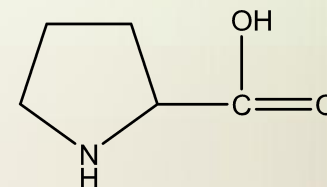


**Val**

Белок	Число остатков фосфорной кислоты
$\alpha_{s1}^-$	11
$\alpha_{s2}^-$	8
$\beta^-$	5
$\kappa^-$	1

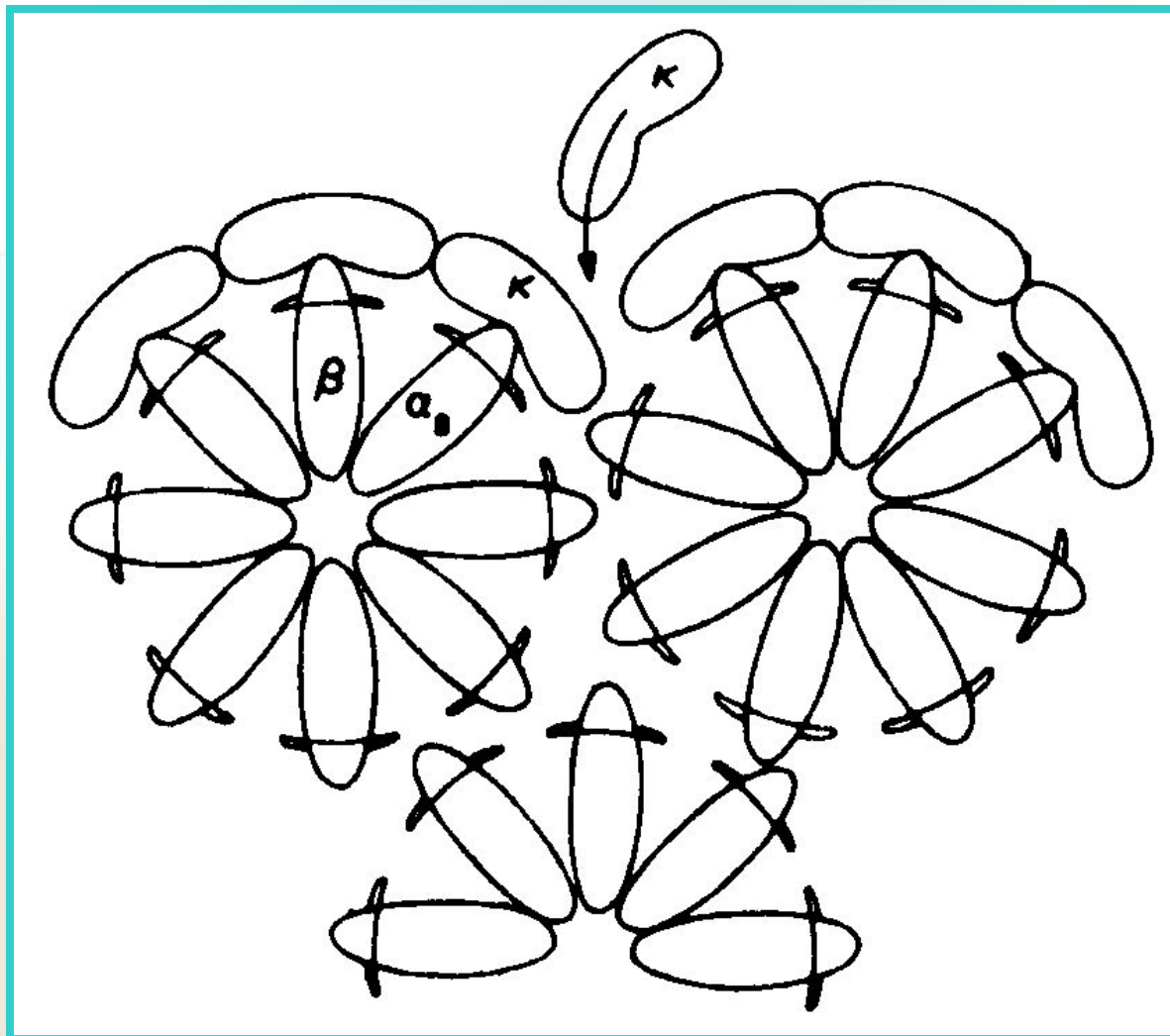


**Ser**



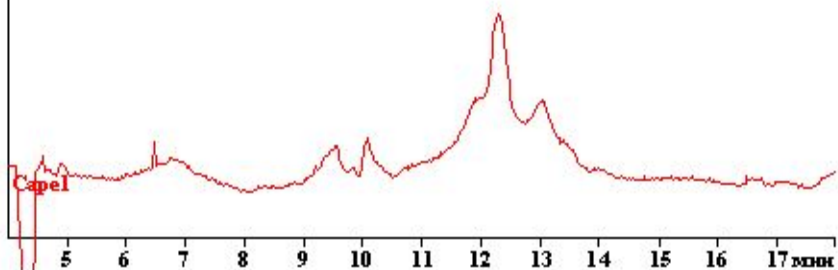
**Pro**

# Казеин в форме мицелл



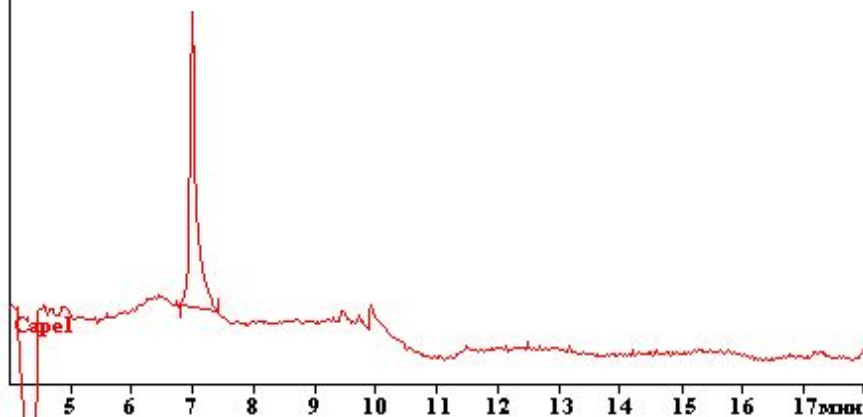
15 mAU

Казеин 150 мг/л



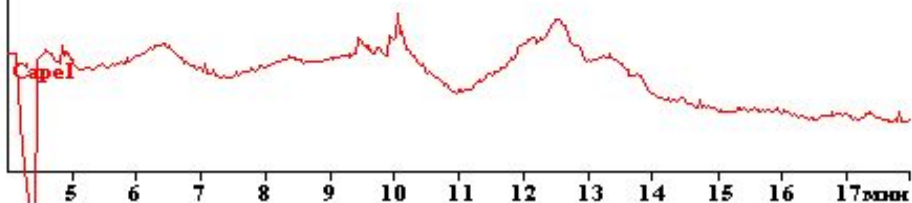
15 mAU

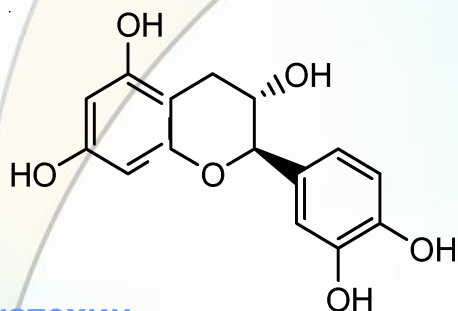
EGCG 20 мг/л



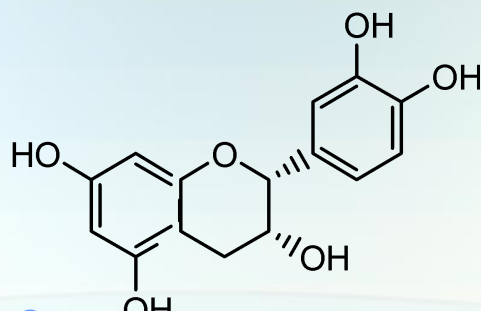
15 mAU

Казеин (150 мг/л) + EGCG (20 мг/л)

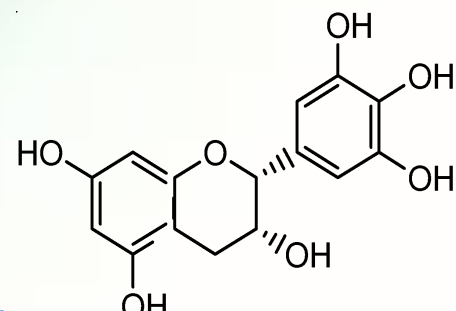




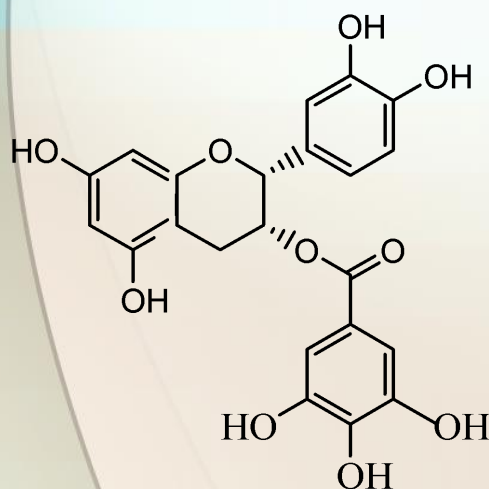
**(+)-катехин**  
 [2R,3S]-2-[3,4-  
 дигидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-  
 бензопиран-3,5,7-триол



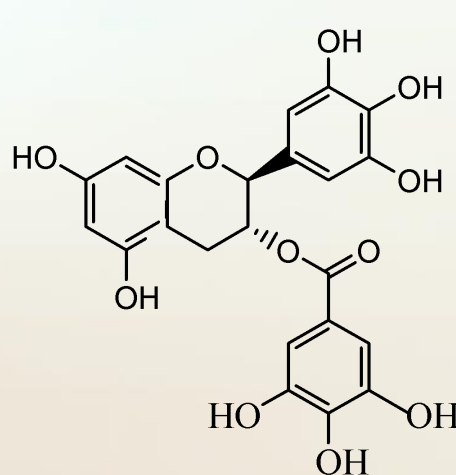
**(-)-Эпикатехин**  
 [2R,3R]-2-[3,4-  
 дигидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-  
 бензопиран-3,5,7-триол



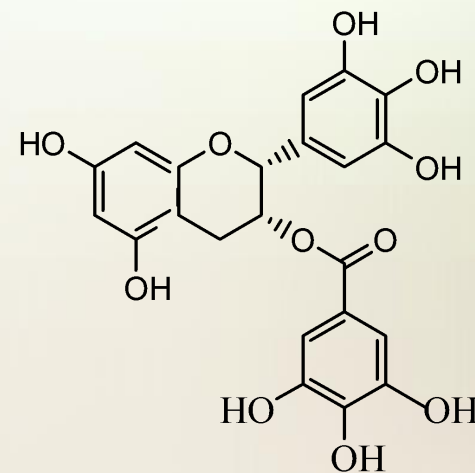
**(-)-эпигаллокатехин**  
 [2R,3R]-2-[3,4,5-  
 тригидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-  
 триол



**(-)-Эпикатехин галлат**  
 [2R,3R]-2-[3,4-  
 дигидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-  
 бензопиран-3,5,7-триол 3-[3,4,5-  
 тригидроксибензоат

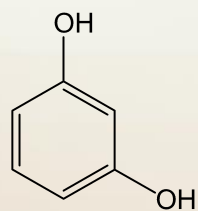
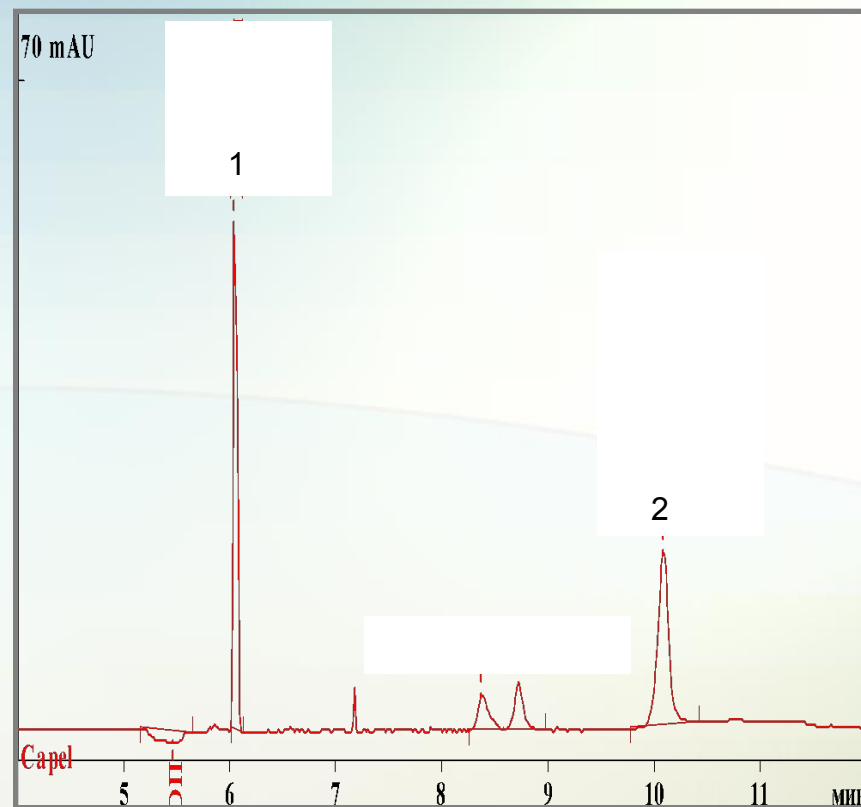
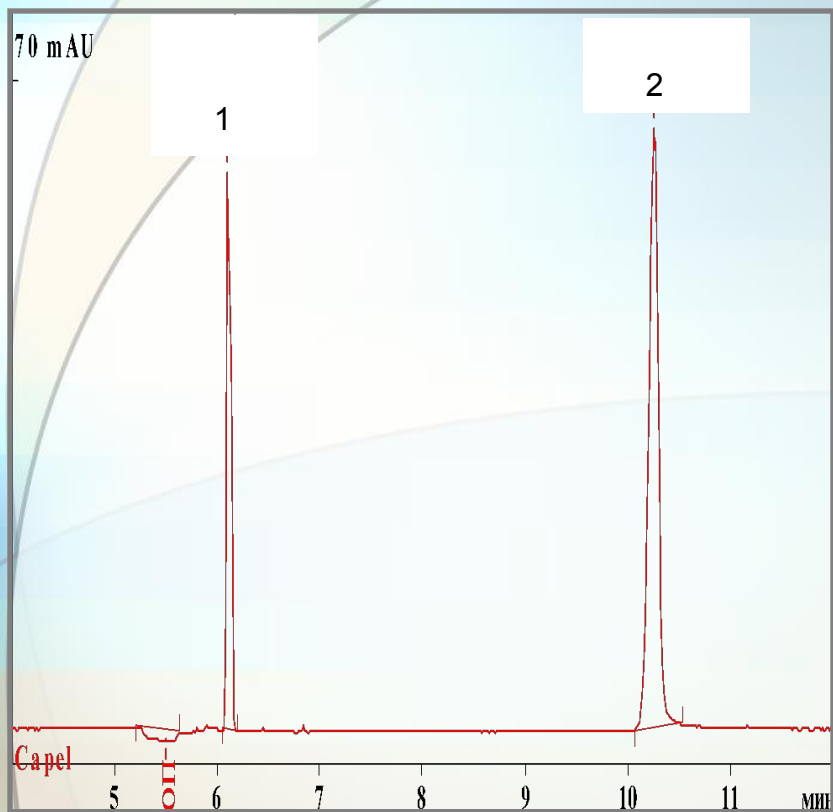


**(-)-галлокатехин галлат**  
 [2S,3R]-2-[3,4,5-  
 тригидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-  
 триол 3-[3,4,5-тригидроксибензоат

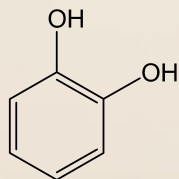


**(-)-эпигаллокатехин галлат**  
 [2R,3R]-2-[3,4,5-  
 тригидроксифенил]-3,4-  
 дигидро-1[2H]-бензопиран-3,5,7-  
 триол 3-[3,4,5-тригидроксибензоат





*Резорцин*



*Пирокатехин*

Концентрация органических лигандов –  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Концентрация ионов железа –  $1 \cdot 10^{-4}$  М  
 1 – Резорцин, 2 - Пирокатехин

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'}$$

$$R_s = \frac{1.77 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1^{0,5} + w_2^{0,5}}$$

$$\mu_{\text{эфф}} = \frac{L_{\text{эфф}} \cdot L_{\text{общ}}}{U \cdot t_{\text{мигра}}}$$

$$N = \frac{L_{\text{эфф}} \cdot U \cdot \mu}{2 \cdot D \cdot L_{\text{общ}}}$$

$$N = 5.54 \cdot \left( \frac{t_m}{w^{0,5}} \right)^2$$

$$\alpha = \frac{\mu_A}{\mu_B} = \frac{t'_A}{t'_B}$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \cdot (1 - t_R / t_{mc})}$$

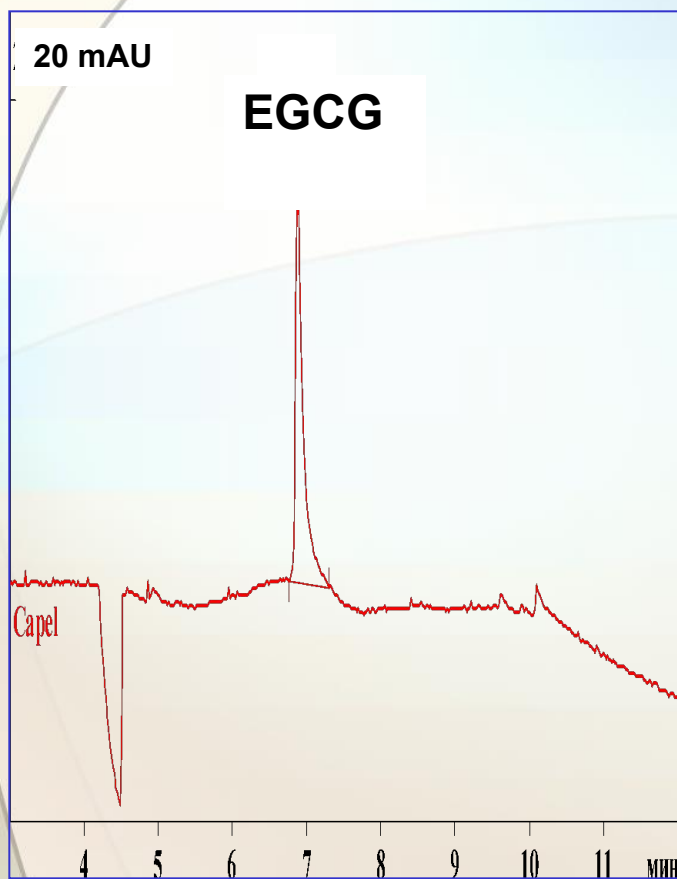
# Оптимальные условия электрофоретического разделения смеси полифенолов и кофеина

- Система капиллярного электрофореза Капель-105;
- Капилляр:  $L_{\text{общ}} = 60$  см,  $L_{\text{эфф}} = 50$  см,  $d_{\text{внутр}} = 75$  мкм;
- Буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер рН 7.0, 25 мМ додецилсульфата натрия;
- Ввод: 30 мбар, 10 с; Напряжение: 25 кВ
  - Рабочая температура - 20°C
    - Длина волны:  $\lambda = 200$  нм

# Факторы, влияющие на содержание полифенолов в чайном напитке

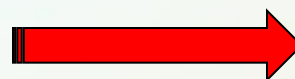


# Влияние добавки казеина на электрофоретический профиль полифенолов



Проба: EGCG (20 мг/л)

*Казеин*

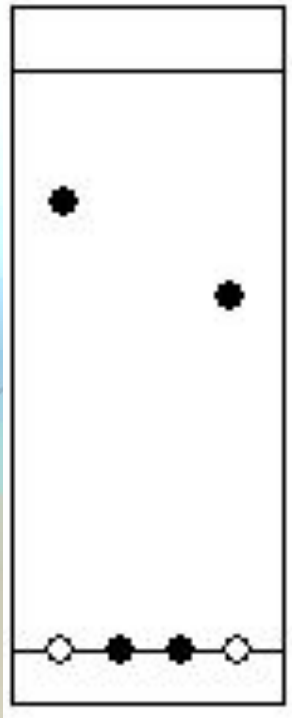


Проба: смесь EGCG (20 мг/л) и казеина (6 мг/л)

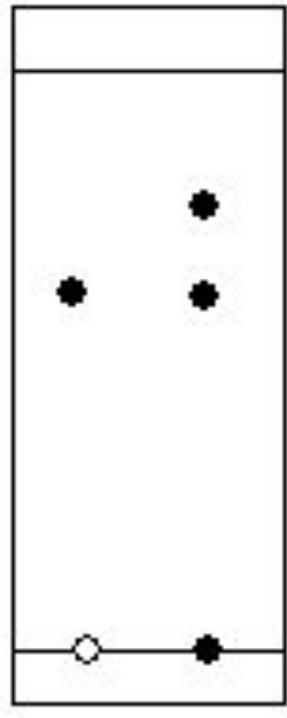
Ведущий электролит: 25 мМ фосфатный буфер (pH 7,0), 25 мМ ДДСН

Ввод: 30 мбар, 10 сек. Напряжение: 25 кВ. Длина волны:  $\lambda = 200$  нм

# Адсорбционная ТСХ



EC  
ECG  
EGCG  
Caf



Caf  
Реальный объект

$R_f = a/b$  – параметр удерживания аналита

$N = 16 \cdot (a/w)^2$  – число теоретических тарелок на разделяющем участке

$H = a/N$  – высота, эквивалентная теоретической тарелке

$\alpha = a_1/a_2$  – коэффициент селективности двух аналитов (1-й аналит – более удерживаемый)

$R_s = 2 \cdot (a_2 - a_1) / (w_1 + w_2)$  – коэффициент разрешения двух аналитов (1-й аналит – более удерживаемый)

$a_1, a_2$  – пути, пройденные аналитами

$b$  – путь, пройденный элюентом от линии старта до линии фронта

$w_1, w_2$  – ширина пятна аналитов

Аналит	EC	ECG	EGCG	Caf
$R_f$	$0,73 \pm 0,02$	0,00	0,00	$0,50 \pm 0,02$

$H = 0,02$  мм

$\alpha(\text{Caf}/\text{EC}) = 0,68$

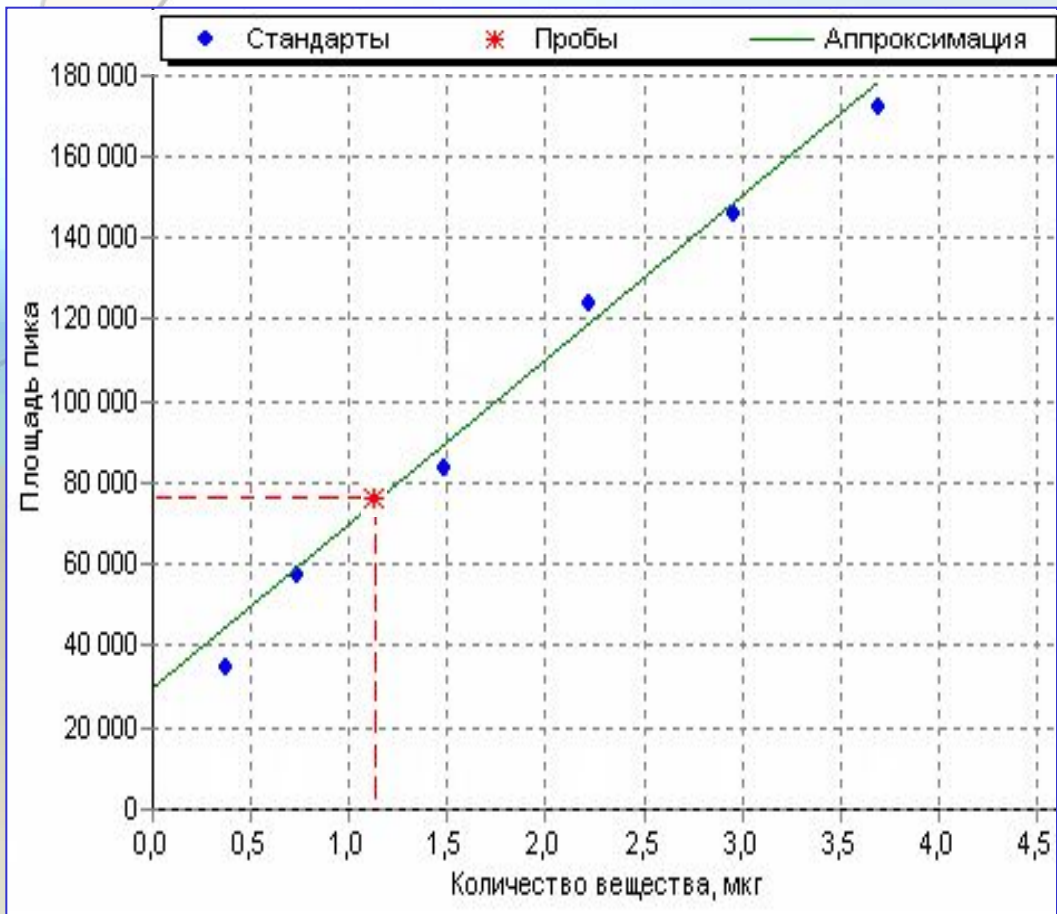
$R_s(\text{Caf}/\text{EC}) = 3,3$

Условия:

Пластины ПТСХ-АФ-В-УФ «Сорбфил»

п.ф. -  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 = 1 : 3$

# Количественное определение кофеина в чае методом ВЭТСХ



Содержание кофеина в чае «Кольца Джейд» (Китай)

МЭКХ	ВЭТСХ
2,81 ± 0,10	2,97 ± 0,13

$P = 0.95, n = 3$

Условия:

Пластины ПТСХ-АФ-А-УФ «Сорбфил»

п.ф. -  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 = 1 : 3$

Объем пробы чая - 4 мкл