

УДК 543.635.6:543.544.5.068.7:543.054

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРЕЧИХИ

© 2022 г. С. С. Алексенко^а, К. О. Казимирова^б, С. Н. Штыков^{б, *}

^аГосударственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии
и. Энтузиастов, 23, Москва, 111024 Россия

^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская 83, к. 1, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: shtykovsn@mail.ru

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принята к публикации 06.09.2021 г.

Во многих странах гречневая крупа считается альтернативным безглютеновым пищевым продуктом с уникальным набором белков и аминокислотным составом, а также высокой антиоксидантной активностью (АОА). Данное исследование посвящено оценке и сравнению АОА и общего содержания свободных фенольных соединений в различных гречневых продуктах, приобретенных в супермаркетах четырех стран. Показано, что оптимальным экстрагентом свободных фенолов из зерна гречихи является 50%-ный водно-этанольный раствор; для извлечения достаточно перемешивания на вортексе без нагревания. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектором на диодной матрице, флуоресцентным и МС-детекторами во всех образцах гречихи количественно определены доминирующие компоненты: рутин ($(6.7-14.1) \times 10^{-2}$ г/кг), флаван-3-олы (катехин $(1.8-8.7) \times 10^{-2}$ г/кг и эпикатехин $(2.5-11.6) \times 10^{-2}$ г/кг). Протокатеховая и галловая кислоты, а также несвязанные витексин и кверцетин детектировались в минорных количествах в основном в термообработанных зернах гречихи. Получены линейные корреляции между суммарным содержанием фенольных соединений, оцененных методом Фолина–Чеколтэу, и АОА, а также между суммой концентраций трех компонентов (рутина, катехина, эпикатехина) и АОА. Проведено сравнение хроматографических профилей и АОА гречихи, пшеницы, ячменя, кукурузы, риса.

Ключевые слова: гречиха (*Fagopyrum esculentum* М.), антиоксидантная активность, фенольные соединения, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС с электрораспылением, хроматографический профиль.

DOI: 10.31857/S0044450222080023

Гречиха обыкновенная (*Fagopyrum esculentum* Moench) широко употребляется во многих странах в пищу в виде зерен и муки для приготовления каши, лапши, хлопьев, блинов и кексов, а также хлеба; цветки гречихи – источник ценного гречишного меда [1, 2]. Гречиха – альтернативная злакам культура с высоким содержанием биологически активных веществ; она привлекает все большее внимание потребителей в связи с важностью проблемы здорового питания [2]. Привлекательная пищевая ценность гречихи определяется наличием высокого уровня белков, полиненасыщенных незаменимых жирных кислот, пищевых волокон, стойкого крахмала, витаминов (В1, В2, С и Е), антиоксидантов, глутатиона и минералов, содержащих Zn, Cu, Mn, Mg, Se [2, 3], а также ее сбалансированным уникальным аминокислотным составом. Кроме того, гречневая мука не содержит глютена и может быть использована для

приготовления безглютеновых продуктов, например, хлеба [1, 4–6]. В связи с этим в последние два десятилетия значительно вырос интерес к возделыванию гречихи и исследованию ее состава и свойств.

Наряду с указанными достоинствами гречневой крупы внимание исследователей и потребителей привлекает высокое содержание полифенолов и флавоноидов, обладающих высокой антиоксидантной активностью (АОА). Рутин является основным флавоноидным компонентом, обладающим гипотензивным действием, а также другими терапевтическими свойствами, направленными против заболеваний, связанных с наличием свободных радикалов [2, 7–9]. Помимо рутина гречиха может содержать катехины [10–12], кверцетин [9, 11–13], ориентин, изоориентин [11, 14], витексин [11, 14] и др. Наличие флавоноидов и полифенолов является основной причиной того,

что гречиха обладает более высокой АОА, чем другие злаки [15–17].

Основной аналитический метод, применяемый для определения флавоноидов в гречихе, – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с использованием спектрофотометрического детектора на диодной матрице и УФ- [8, 14, 18], масс-спектрометрического (МС) [11, 13, 19, 20] и электрохимического [21] детекторов. В различных публикациях содержание основного антиоксидантного компонента рутина, количественно определенного в зерне гречихи обыкновенной, варьировалось от 7 до 218 мг/кг [8, 16, 22, 23]. Флавоноиды присутствуют в гречихе также в связанной форме, причем количественно такие формы могут доминировать по сравнению со свободными соединениями [24], а фенольные кислоты существуют преимущественно в связанном состоянии [13]. До недавнего времени о наличии флаван-3-олов (катехинов) в экстрактах семян гречихи (*Fagopyrum esculentum* М.) практически не сообщалось. Однако в последних публикациях говорится о содержании катехина или/и эпикатехина на уровне рутина. Оно варьируется от 6 до 116 мг/кг [21, 23, 25, 26] для катехина и от 23 до 205 мг/кг [21, 26] для эпикатехина. Присутствие витексина в гречихе-ядрище доказано несколькими научными группами [11–14, 23]. Кверцетин обнаружен как в зернах татарской гречихи [23], так и в обыкновенной [9, 11, 13]. Несмотря на большое количество идентифицированных фенольных соединений в гречихе [11–13], количественный анализ зерен проводят в основном на содержание шести и менее соединений [8, 21, 22]. Круг фенолов, определяющих антиоксидантную активность гречихи, на сегодня не определен. Выраженная широкая вариабельность содержания флавоноидов и фенолов связана как с условиями выращивания и различными технологическими процессами (например, термической или механической обработкой), которые могут влиять на антиоксидантную активность и потребительские качества продуктов из гречихи [2, 27, 28], так и со способами подготовки пробы. Показано, что термообработка отрицательно влияет на количество фенолов: их общее содержание в цельной гречихе снижалось с 12.0 до 3.50 г-экв рутина/кг после термической обработки [14], а в процессе производства спагетти из гречихи потери фенолов составили 46% [20]. Существующие работы посвящены фенольным соединениям и АОА обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* М.) гречихи [8, 10, 11, 13, 22], оценке содержания фенолов в хлебобулочных изделиях на основе гречихи или с добавками гречневой муки [5, 6], сравнению фенольного состава семян гречихи в зависимости от сорта и условий выращивания [29]. Публикации, в которых проводилось бы сравнение качественного состава и содержания свобод-

ных фенольных соединений зерновых продуктов гречихи, в том числе случайно приобретенных на рынках разных стран, авторами не найдены.

Цель данной работы – изучение и сравнение антиоксидантной активности, общего содержания фенолов и состава свободных фенольных соединений, хроматографических профилей в различных образцах гречихи, а также антиоксидантной активности пшеницы, ячменя, кукурузы и риса в условиях экстракции, оптимизированных для гречихи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В качестве растворителей использовали ацетонитрил (Merck, Германия), этанол (Solvaco, Швеция), реагенты для определения АОА – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота) (АБТС), реагент Фолина–Чеколтэу, стандарты антиоксидантов – рутин, катехин, эпикатехин, кверцетин, галловую, протокатеховую кислоты (Sigma-Aldrich, США), витексин (Fluka, Швейцария). Для приготовления растворов использовали воду, очищенную на системе Milli-Q. Стандартные растворы полифенолов и фенольных кислот готовили в 95%-ном этаноле с концентрацией 0.5 мг/мл и хранили при –18°C. Рабочие растворы и смеси веществ получали разбавлением исходных стандартных растворов этанолом непосредственно перед экспериментами.

Объекты исследования. Использовали образцы гречихи обыкновенной термообработанной (ядрища, от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, обозначенные как ТГ1–ТГ4) и не подвергавшейся термообработке, “зеленую” гречиху (хлопья светло-зеленого цвета, мука и ядрища), ячменную, кукурузную, рисовую, пшеничную крупы, приобретенные на рынках России, Швеции, Польши и Литвы. Образцы (за исключением муки) измельчали на лабораторной мельнице ZM 1 (Retsch, Наап, Германия) с получением частиц диаметром 0.5 мм и хранили при –18°C в пакетах в атмосфере азота. Для экстракции образцы смешивали с соответствующим растворителем при соотношении массы молотого образца и объема экстрагента 1 : 10. Все образцы после экстракции центрифугировали в течение 3 мин при 2500 g. Для экстракции свободных фенолов из ячменя, кукурузы, риса и пшеницы использовали условия, оптимизированные для образцов гречихи.

Оборудование и условия экспериментов. Спектрофотометрические измерения проводили в видимой области спектра на спектрофотометре Jasco (V-530) при комнатной температуре. Использовали кюветы из оргстекла с длиной оптического пути 1 см. ВЭЖХ-эксперименты проводили на установке Agilent 1100 (Agilent, США), снабженной спек-

трофотометрическим детектором на диодной матрице и флуоресцентным детектором. Для хроматографирования использовали колонку Atlantis C₁₈, 150 × 4.6 мм, диаметр частиц 3 мкм (Waters, Ирландия) с термостатированием при 20°C и установкой длин волн 210 и 280 нм. Для обработки данных применяли программу ChemStation. Объем вводимого образца составлял 2 мкл. Использовали градиентное элюирование смесью ацетонитрила (А) и 30 мМ фосфатного буферного раствора с рН 2.3, соотношение в которой изменялось по следующей программе: 0–20 мин, А 6–20%; 20–40 мин, А 20–30%; 40–70 мин, А 30–70%; 70–85 мин, А 70%; 85–88 мин, А 70–6%; 88–100 мин, А 6%.

В эксперименте с ВЭЖХ-МС использовали установку Agilent 1100 LC/MSD со спектрофотометрическим детектором и масс-селективным квадрупольным детектором (G1946D) и ионизацией электрораспылением. Масс-спектры записывали при отрицательной и положительной ионизации в интервале m/z 150–1000. Температуру осушающего газа (N₂) устанавливали 350°C, скорость – 9.0 л/мин. Напряжение на капилляре составляло 3500 В при положительной и 3200 В при отрицательной ионизации. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax SB C₁₈, 150 × 4.6 мм, размер частиц 3 мкм (Agilent, США). Подвижная фаза – смесь ацетонитрила и 10 мМ уксусной кислоты при скорости потока 0.35 мл/мин с использованием градиентной программы, аналогичной программе для ВЭЖХ с детектором на диодной матрице. Для идентификации использовали стандартные образцы фенольных соединений.

Количественные расчеты проводили с использованием градуировочного графика. Полученные результаты представляли как средние значения с доверительным интервалом для трех экспериментов, если не указано иное. Предел обнаружения и предел определения рассчитывали при соотношении сигнал/шум 3 : 1 и 10 : 1 соответственно.

Степень извлечения рассчитывали на основе ввода известного количества стандартного вещества в образец ТГ4 ($n = 3$). Для расчета использовали следующую формулу: $(c_1 - c_0)/c_{доб}$, где c_1 – концентрация, определенная в образце после ввода стандартной добавки, c_0 – концентрация в образце до введения стандарта, а $c_{доб}$ – добавленная концентрация. Стабильность флавоноидов в экстрактах при хранении (8°C) оценивали через 24, 48 ч и 7 сут методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице по площадям пиков.

Определение антиоксидантной активности. Стандартный раствор ДФПГ с концентрацией 5×10^{-4} моль/л готовили в 95%-ном этаноле и хранили при –18°C (раствор стабилен в течение ми-

нимум одного месяца). Антиоксидантную активность экстрактов определяли по реакции с ДФПГ⁺ катион-радикалом согласно методу [30] с небольшими изменениями. К рассчитанному объему экстракта добавляли 95%-ный раствор этанола и стандартный раствор ДФПГ; момент смешивания с ДФПГ принимали за начало реакции. Реакционную смесь энергично встряхивали и измеряли изменение оптической плотности во времени при длине волны 515 нм (цвет менялся с фиолетового на бледно-желтый). Антиоксидантную активность (%) выражали уравнением:

$$AOA = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%,$$

где A_0 – оптическая плотность раствора, приготовленного смешиванием 0.3 мл раствора ДФПГ и 2.7 мл этанола; 95%-ный этанол служил раствором сравнения; A_s – оптическая плотность этанольного экстракта.

Во втором способе антиоксидантную активность экстрактов оценивали по реакции с АБТС⁺, оптическую плотность измеряли при 734 нм. Катион-радикал АБТС⁺ получали взаимодействием исходного водного раствора реагента (7 ммоль/л) с персульфатом калия (2.45 ммоль/л, конечная концентрация) и выдерживанием смеси при комнатной температуре в течение 12–16 ч в темноте для проявления цвета [31]. Раствор стабилен в указанных условиях 3 дня. Перед работой раствор разбавляли 95%-ным этанолом до величины оптической плотности 0.70 ± 0.02 при 734 нм в кювете толщиной 1 см. Экстракты гречихи смешивали с 95%-ным этанолом и раствором АБТС в таких пропорциях, чтобы уменьшение оптической плотности достигало 20–80% от исходной величины.

Определение суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов. Содержание суммы фенольных соединений оценивали спектрофотометрически с использованием реагента Фолина–Чеколтэу [14, 18]. Для этого 0.25 мл экстракта смешивали с 0.25 мл реагента Фолина–Чеколтэу (предварительно разбавленного водой в соотношении 1 : 1), 0.5 мл насыщенного водного раствора Na₂CO₃ и 4 мл воды. Смесь выдерживали при комнатной температуре 25 мин, центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g с последующим измерением оптической плотности при 725 нм. Отдельно проводили аналогичные эксперименты с применением растворов рутина разных концентраций с построением градуировочной зависимости. Суммарное содержание фенольных соединений в анализируемых экстрактах рассчитывали в грамм-эквивалентах рутина на 1 кг образца (г/кг).

Содержание флавоноидов в экстрактах гречихи определяли спектрофотометрически, исполь-

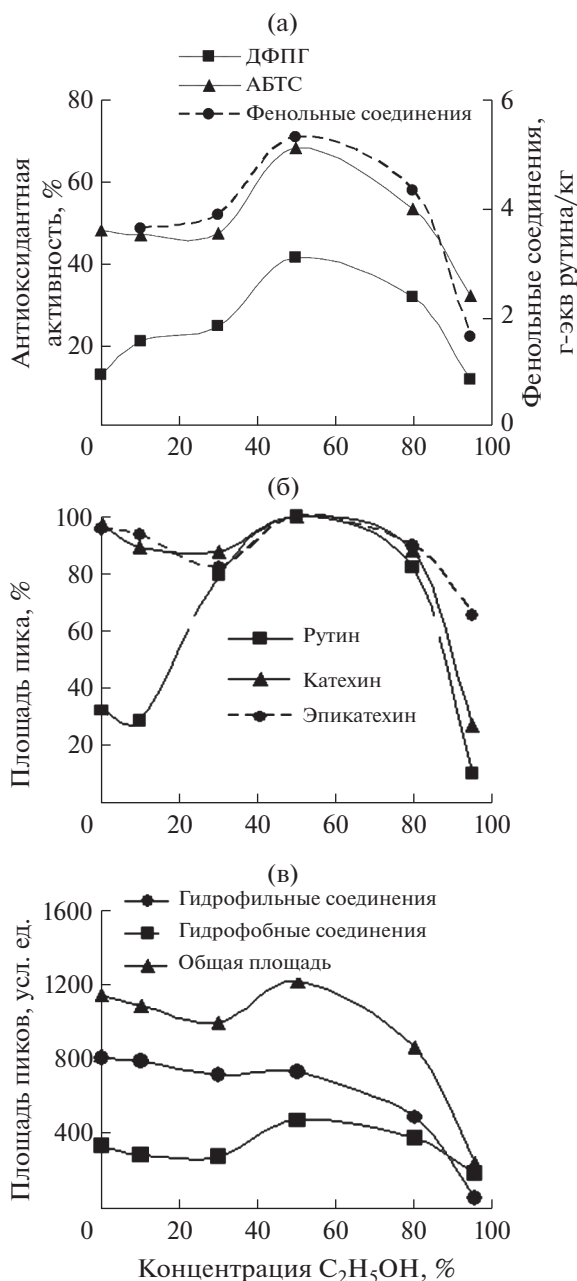


Рис. 1. Влияние концентрации этанола на (а): АОА экстракта гречихи в реакциях ДФПГ и АБТС и общее содержание фенольных соединений по методу Фолина–Чоколтэу; (б): площадь пиков рутина, катехина и эпикатехина; (в): общее количество экстрагируемых гидрофильных и гидрофобных веществ в хроматографическом профиле экстрактов гречихи.

зую методику, описанную в работе [32], с незначительной модификацией. Для этого 1 мл этанольного экстракта смешивали с 0.8 мл воды и 0.2 мл раствора 2-аминоэтилдифенилбората (10 г/л). Поглощение растворов измеряли при 404 нм с использованием дистиллированной воды в качестве раствора сравнения. Оптическую плотность экс-

трактов сравнивали с поглощением стандартных растворов рутина с концентрациями 550 мг/л, а содержание флавоноидов выражали в грамм-эквивалентах рутина на 1 кг пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий экстракции свободных (несвязанных) антиоксидантов. Оценка антиоксидантной активности спектрофотометрическим методом с использованием реагентов ДФПГ и АБТС показала, что максимальная экстракция свободных антиоксидантов достигается с использованием 50%-ного раствора этанола (рис. 1а). Применение 30%-ного и 80%-ного растворов этанола приводило к снижению эффективности экстракции, а при использовании 95%-ного заметно падало количество извлеченных антиоксидантов. Наблюдали подобное влияние концентрации этанола и на суммарное содержание рутина, катехина и эпикатехина, полученное методом ВЭЖХ (рис. 1б), а также на общее количество экстрагируемых соединений (рис. 1в), оцениваемых как сумма площадей пиков в ВЭЖХ-УФ. Особенно заметно снижение эффективности экстракции для гидрофильных веществ, выходящих в начале хроматограммы при использовании 95%-ного этанола. В диапазоне концентраций этанола 0–30% экстракция затруднялась из-за образования вязкой коллоидной суспензии.

В связи с устоявшейся практикой использования водно-метанольных растворов для извлечения фенолов из гречихи [14, 21, 25] нами проведено сравнение водно-метанольных и водно-этанольных экстрактов. Показано, что эффективность экстракции антиоксидантов 80%-ным раствором метанола сопоставима с таковой для 80%-ного этанола; при концентрации 50% метанол оказался менее эффективен. В качестве оптимального и более экологичного варианта извлечения свободных фенолов выбрали 50%-ный раствор этанола.

Для гречихи описаны как быстрый (1.5–2 мин) [14, 21], средней продолжительности (30 мин) при комнатной температуре, так и длительный (более 1 ч) при нагревании варианты экстракции фенольных соединений [13, 15, 18]. Нами рассмотрены условия извлечения при различных температурах и времени, а также ряд подходов [33], влияющих на эффективность экстракции. В настоящей работе оптимальные результаты экстракции достигнуты с помощью встряхивания на орбитальном шейкере (вортекс) в течение 2 мин при комнатной температуре. Применение ультразвуковой обработки не дало преимуществ. Использование повышенных температур (40°C и 55°C) и увеличение времени экстракции (2 ч) незначительно снижало (5–10%) антиоксидантную активность экстрактов гречихи с ДФПГ, что мо-

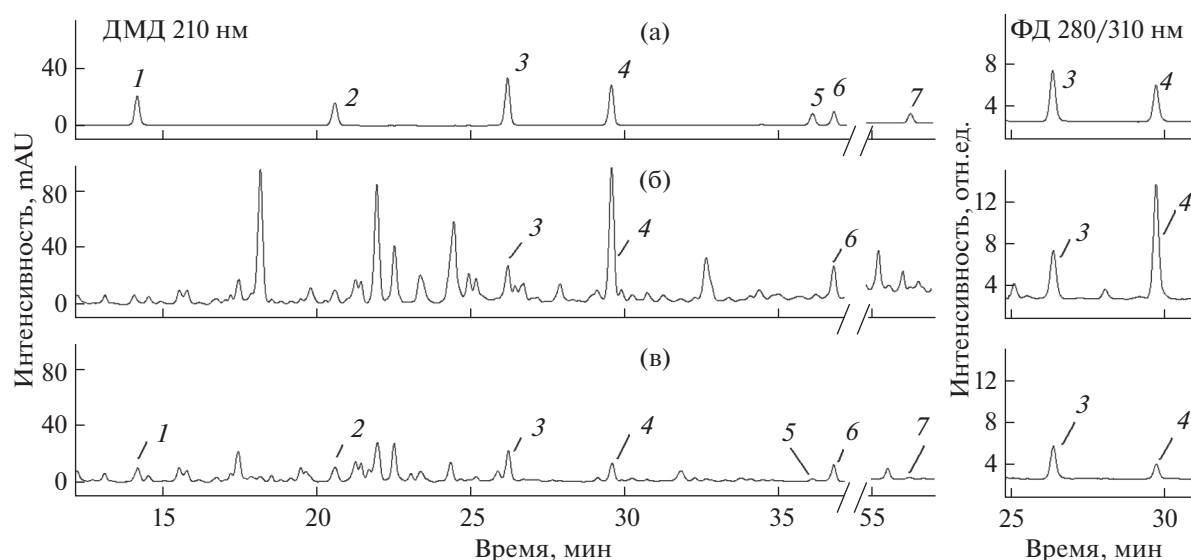


Рис. 2. Хроматограммы стандартных растворов (а) и этанольных экстрактов зерен гречихи, не подвергавшихся термообработке (б), термообработанных (в). 1 – протокатеховая кислота, 2 – галловая кислота, 3 – катехин, 4 – эпикатехин, 5 – витексин, 6 – рутин, 7 – кверцетин. Условия хроматографирования см. в “Экспериментальной части”. ДМД – спектрофотометрический детектор на диодной матрице, ФД – флуоресцентный детектор.

жет быть связано с деградацией веществ при термическом воздействии.

Характеристика этанольных экстрактов методом ВЭЖХ. На рис. 2, 3а, 3б показаны типичные хроматограммы этанольных экстрактов термообработанной крупы (ТГ) и зерен гречихи, не подвергавшихся термообработке (НТГ), с использованием спектрофотометрического, флуоресцентного и масс-спектрометрического детекторов. Для образцов НТГ гречихи в хроматографическом профиле отмечался значительно более высокий уровень экстрагируемых соединений. На основании данных литературы выбрали 16 стандартных веществ с последующей идентификацией семи фенолов в исследованных образцах гречихи (рутин, (–)-эпикатехин, (+)-катехин, витексин, кверцетин, галловая кислота и протокатеховая кислота). Результаты показали, что наряду с рутином несвязанные (–)-эпикатехин и (+)-катехин можно считать веществами, определяющими антиоксидантную активность гречихи. Витексин, кверцетин, протокатеховая и галловая кислоты обнаружены в основном в термообработанных зернах. Другие соединения: катехин-глюкозид (m/z 451, 17.7 мин), 1-О-кофеил-6-О-альфа-рамнопиранозил-бета-гликопиранозид (swertiamacroside) (m/z 487, 20.1 мин), (эпи)афзелихин(эпи)катехин (m/z 561, 27.6 мин), эпикатехин галлат (m/z 441, 33.7 мин), (эпи)афзелихин-(эпи)катехин-О-диметилгаллат (m/z 741, 42.8 мин), эпикатехин-О-3,4-диметилгаллат (m/z 469, 46.7 мин) определены по масс-спектрам, полученным методом ВЭЖХ-МС (рис. 3а, 3б) и сопоставленным с данными [11–13]. Масс-спектр пика со

временем удерживания 50.7 мин (m/z 469), обнаружен во всех термообработанных образцах (рис. 3б). При сопоставлении с масс-спектром пика, выходящего на 46.7 мин, можно предположить изомер эпикатехин-О-3,4-диметилгаллата, что согласуется с результатами [12]. (Эпи)афзелихин(эпи)катехин (m/z 561) детектировали в образцах НТГ гречихи в минорных количествах.

На хроматограмме ячменя (рис. 3в) профиль экстрагированных соединений существенно отличается по составу от гречихи, на что указывали и другие авторы [34, 35]. С применением пробоподготовки, оптимизированной для гречихи, хроматографические профили экстрактов кукурузы, риса и пшеницы (рис. 3г–е) оказались бедны фенольными соединениями, что может быть также связано с существованием фенолов в этих злаковых в связанном виде.

Валидация методики. В табл. 1 представлены результаты валидации методики. Зависимости между площадями пиков, оцененными методом ВЭЖХ, и концентрациями индивидуальных фенольных соединений линейны в интервале 0.05–20 мг/л. Коэффициенты корреляции для градуировочных кривых находились в диапазоне 0.9996–0.9999. Правильность результатов определяли методом добавок путем введения стандартных веществ, идентифицированных в гречихе, в образец ТГ4. Средние значения степени извлечения соединений ($n = 3$) находились в диапазоне 77–89% (табл. 1). Воспроизводимость результатов определения содержания для всех выбранных флавоноидов не превышала 4%.

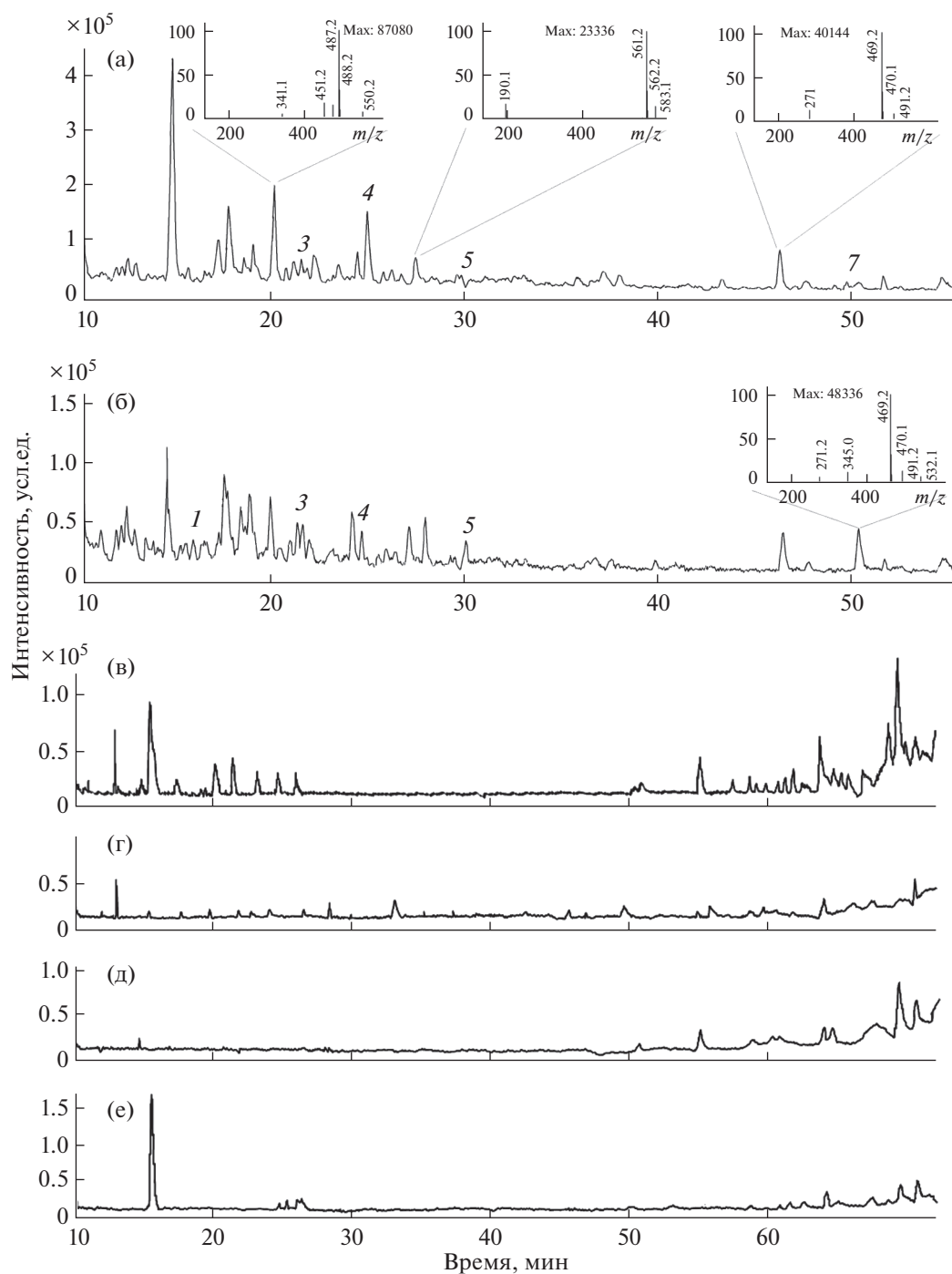


Рис. 3. Хроматограммы этанольных экстрактов “зеленой” гречихи (хлопья) (а), образца гречихи ТГ4 (б), ячменя (в), кукурузы (г), риса (д), пшеницы (е) по полному ионному току (интервал сканирования m/z 150–600) в режиме регистрации отрицательных ионов. Обозначения (а), (б) как на рис. 2.

Флавоноиды и фенольные кислоты в гречихе. На рис. 4 представлены результаты определения концентрации рутина, катехина и эпикатехина, оцененные методом ВЭЖХ-УФ. Так, в образцах содержание рутина варьировалось в диапазоне от $(6.72 \pm 0.27) \times 10^{-2}$ до $(14.1 \pm 0.6) \times 10^{-2}$ г/кг и

было несколько выше для образцов НТГ, по сравнению с ТГ1–ТГ4. Для эпикатехина наблюдали сходную тенденцию и его концентрация варьировалась от $(6.40 \pm 0.12) \times 10^{-2}$ до $(11.6 \pm 0.2) \times 10^{-2}$ г/кг в образцах НТГ и от $(2.46 \pm 0.05) \times 10^{-2}$ до $(4.57 \pm 0.09) \times 10^{-2}$ г/кг для ТГ1–ТГ4.

Таблица 1. Метрологические характеристики определения фенольных соединений

Соединение	Уравнение градуировочного графика ^a	Предел обнаружения, мкг/л	Предел определения, мкг/л	Степень извлечения, %
Катехин	$y = 77.5x - 0.12$	2.0	6.6	83 ± 2
Эпикатехин	$y = 63.1x - 0.022$	2.4	8.1	89 ± 1
Рутин	$y = 22.1x + 0.058$	4.3	14	86 ± 2
Протокатеховая кислота	$y = 47.1x - 1.17$	3.1	10	80 ± 5
Галловая кислота	$y = 41.5x - 0.95$	4.5	15	77 ± 3
Витексин	$y = 20.8x - 0.32$	8.5	28	83 ± 1
Кверцетин	$y = 40.4x - 4.6$	5.3	18	84 ± 2

^a x – концентрация вещества, мг/л.

Содержание катехина, наоборот, было выше во всех образцах термообработанной гречихи ТГ1–ТГ4 от $(4.86 \pm 0.16) \times 10^{-2}$ до $(8.70 \pm 0.28) \times 10^{-2}$ г/кг по сравнению с НТГ (от $1.81 \pm 0.06) \times 10^{-2}$ до $(3.33 \pm 0.11) \times 10^{-2}$ г/кг. Соотношение количества катехина/эпикатехина как маркера термической обработки гречихи было бы интересно оценить на большей выборке. В изученных образцах содержание эпикатехина сопоставимо с таковым для рутина. Значительный вклад в антиоксидантную активность гречихи эпикатехина отмечен также в работе [10], хотя в некоторых случаях [23] эпикатехин не детектировался.

Количество свободных фенольных кислот составило 2.86 и 2.42 мг протокатеховой кислоты/100 г, и 3.27 и 3.88 мг галловой кислоты/100 г ($n = 2$, $\Delta \pm 0.01$) для образцов ТГ3 и ТГ4 соответственно. В других образцах термообработанной гречихи (ТГ1 и ТГ2) имелось следовое содержание этих кислот. Минорные флавоноиды витек-

син и кверцетин обнаружены в образцах ТГ3 и ТГ4 в количестве 0.41 ± 0.05 и 1.13 ± 0.07 мг витексина/100 г, 0.55 ± 0.10 и 0.50 ± 0.05 мг кверцетина/100 г гречихи. Наличие следовых количеств этих соединений в НТГ подтверждено методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС.

Антиоксидантная активность и содержание фенолов в образцах гречихи. В табл. 2 представлены значения антиоксидантной активности экстрактов гречихи, рассчитанные по данным спектрофотометрии. Экстракты зерен, не подвергавшихся термообработке (НТГ), проявляли более высокую активность в реакции с ДФПГ (от 49.4 до 69.6%), по сравнению с ТГ1–ТГ4, характеризующимися значениями АОА от 36.5 до 47.6%. Результаты указывают на уменьшение количества антиоксидантов в зерне гречихи после термообработки, что приводит к снижению АОА (до 1.4 раза). Среди других зерновых можно отметить ячмень, экстракт которого характеризовался в

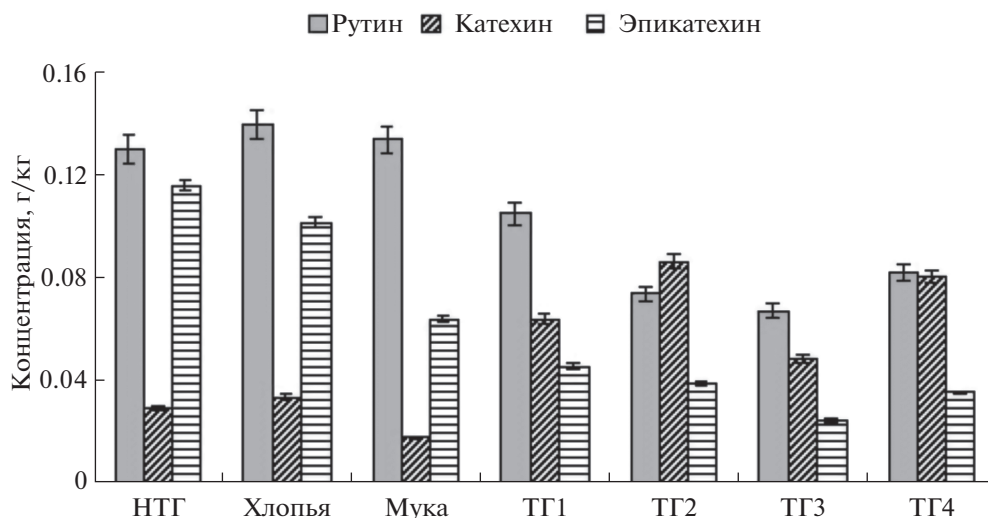
**Рис. 4.** Содержание рутина, катехина и эпикатехина в продуктах гречихи.

Таблица 2. Антиоксидантная активность, содержание фенольных соединений и флавоноидов в продуктах гречихи

Образец гречихи	Антиоксидантная активность ^а , %	Фенольные соединения ^б , г-экв рутина/кг
НТГ ^в	67.8 ± 1.7	7.84 ± 0.07
Хлопья ^в	69.6 ± 2.1	8.72 ± 0.15
Мука гречневая ^в	49.4 ± 1.8	5.56 ± 0.09
ТГ1	47.6 ± 1.3	4.44 ± 0.07
ТГ2	45.3 ± 1.5	4.40 ± 0.07
ТГ3	45.4 ± 1.3	3.77 ± 0.10
ТГ4	36.5 ± 1.1	2.83 ± 0.12

^а Реакция с ДФПГ, ^б оценка по методу Фолина—Чокалтэу, ^в образцы, не подвергавшиеся термообработке, “зеленая” гречиха.

1.5 раза меньшей АОА по сравнению с гречихой, в то время как пшеница, рис и кукуруза практически не проявляли АОА по методу ДФПГ. Это соответствует бедному хроматографическому профилю экстрактов.

Установлено, что содержание общих фенолов, найденных по методу Фолина—Чокалтэу (табл. 2) для продуктов из гречихи без термической обработки больше (от 5.56 до 8.72 г-экв рутина/кг) по сравнению с термообработанными (от 2.83 до 4.40 г-экв рутина/кг), что согласуется с результатами, полученными методом ДФПГ.

Концентрация флавоноидов, определенных с помощью реагента 2-аминоэтилдифенилбората, для всех продуктов из гречихи сопоставима и находится в диапазоне от 0.307 ± 0.006 до 0.40 ± 0.05 г-экв рутина/кг, нивелируя какие-либо различия в образцах.

Корреляция между антиоксидантной активностью и содержанием фенольных соединений и флавоноидов. Найдена линейная корреляция между общим содержанием фенолов в экстрактах гречихи и их АОА в реакции с ДФПГ ($y = 5.61x + 21.6$, $R^2 = 0.971$, где y – АОА в реакции с ДФПГ, %; x – общее содержание фенолов по методу Фолина—Чокалтэу, г-экв рутина/кг). Это позволяет говорить о доминировании фенольных соединений в гречихе среди веществ, вносящих вклад в АОА. Несмотря на неспецифичность, метод Фолина—Чокалтэу широко используется для определения общего количества фенолов [36], коррелируя с АОА для образцов, богатых антиоксидантами. Получена также линейная зависимость между суммарной концентрацией трех (рутина, катехина, эпикатехина) флавоноидов, оцененной методом ВЭЖХ, и АОА в реакции с ДФПГ ($y = 268x + 6.7$, $R^2 = 0.963$, где y – АОА в реакции с ДФПГ, %; x – сумма концентраций, г/кг), что подтверждает доминирование данных соединений среди антиоксидантов гречихи.

С помощью ВЭЖХ с разными детекторами и спектрофотометрического метода сравнили содержание и антиоксидантную активность флавоноидов и фенольных соединений для семи продуктов из гречихи. Экстракция образцов гречихи 50%-ным этанолом позволила добиться более высоких антиоксидантной активности и содержания фенола по сравнению с другими водно-спиртовыми растворами. Для всех образцов гречихи обнаружена линейная корреляция между суммарным содержанием фенольных соединений и их антиоксидантной активностью в реакции с ДФПГ. Рутин, катехин и эпикатехин – доминирующие антиоксиданты, суммарная концентрация которых коррелирует с антиоксидантной активностью. Наибольшие содержание фенольных соединений и флавоноидов и антиоксидантная активность обнаружены у “зеленой” гречихи (крупы, муки, хлопьев), не подвергавшейся термообработке.

Получен хроматографический профиль продуктов из гречихи. По сравнению с экстрактами из других злаков (с применением условий экстракции, оптимизированных для гречихи) ячмень обладал в среднем в 1.5 раза меньшей АОА, чем гречиха, в то время как пшеница, рис и кукуруза – незначительными АОА, свидетельствующими о небольшом количестве свободных фенолов. В подтверждение этого хроматографические профили пшеницы, риса и кукурузы характеризовались ограниченным количеством пиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Шведского Института (Swedish Institute) и гранта РНФ – спектрофотометрическое определение АОА (проект №21-13-00267).

Автор С.С. Алексенко выражает глубокую благодарность к.х.н. Е.А. Ястрбовой, Шведский университет сельскохозяйственных наук (г. Упсала), за предоставленную возможность выполнения работы и критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giménez-Bastida J.A., Piskula M., Zieliński H.* Recent advances in development of gluten-free buckwheat products // *Trends Food Sci. Technol.* 2015. V. 44. № 1. P. 58.
2. *Sytar O., Brestic M., Zivcak M., Tran L.-S.P.* The Contribution of buckwheat genetic resources to health and dietary diversity // *Curr. Genomics.* 2016. V. 17. № 3. P. 193.
3. *Zhang Zh.-L., Zhou M.-L., Tang Y., Li F.-L., Tang Y.-X., Shao J.-R., Xue W.-T., Wu Y.-M.* Bioactive compounds in functional buckwheat food // *Food Res. Int.* 2012. V. 49. P. 389.
4. *Carbo R., Gordun E., Fernandez A., Ginovart M.* Elaboration of a spontaneous gluten-free sourdough with a mixture of amaranth, buckwheat, and quinoa flours analyzing microbial load, acidity, and pH // *Food Sci. Technol. Int.* 2020. V. 26. № 4. P. 344. <https://doi.org/10.1177/1082013219895357>
5. *Stokic E., Mandic A., Sakac M., Misan A., Pestoric M., Simurina O., Sedej I.* Quality of buckwheat-enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients // *LWT Food Sci. Technol.* 2015. V. 63. P. 556.
6. *Verardo V., Glicerina V., Cocci E., Frenich A.G., Romani S., Caboni M.F.* Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb // *LWT Food Sci. Technol.* 2018. V. 87. P. 217.
7. *Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N.A., Latif M.S.Z., Randhawa M.A.* Phytochemicals and bio-functional properties of buckwheat: a review // *J. Agric. Sci.* 2014. V. 152. № 3. P. 349.
8. *Kalinova J., Vrchotová N.* The influence of organic and conventional crop management, variety and year on the yield and flavonoid level in common buckwheat groats // *Food Chem.* 2011. V. 127. № 2. P. 602.
9. *Sedej I., Sakač M., Mandić A., Mišan A., Tumbas V., Čanađanović-Brunet J.* Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain and fractions: Antioxidant compounds and activities // *J. Food Sci.* 2012. V. 77. P. 954.
10. *Kalinova J., Vrchotová N., Trška J.* Phenolics levels in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) achenes // *J. Cereal Sci.* 2019. V. 85. P. 243.
11. *Verardo V., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Marconi E., Fernández-Gutiérrez A., Caboni M.F.* Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS) // *J. Cereal Sci.* 2010. V. 52: P. 170.
12. *Zhang W., Zhu Y., Liu Q., Bao J., Liu Q.* Identification and quantification of polyphenols in hull, bran and endosperm of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds // *J. Funct. Food.* 2017. V. 38. Part A. P. 363.
13. *Inglett G.E., Chen D., Berhow M., Lee S.* Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions // *Food Chem.* 2011. V. 125. № 3. P. 923.
14. *Zielińska D., Szawara-Nowak D., Zieliński H.* Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 6124.
15. *Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinova S.* Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional food // *Food Res. Int.* 2002. V. 35. № 23. P. 207.
16. *Gallardo C., Jiménez L., García-Conesa M.-T.* Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions // *Food Chem.* 2006. V. 99. № 3. P. 455.
17. *Zdunczyk Z., Flis M., Zieliński H., Wroblewska M., Antoszkievicz Z., Juskiewicz J.* In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 4168.
18. *Şensoy İ., Rosen R.T., Ho Ch-T., Karwe M.V.* Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity // *Food Chem.* 2006. V. 99. P. 388.
19. *Ölschläger C., Regos I., Zeller F.J., Treutter D.* Identification of galloylated propylargininidins and procyanidins in buckwheat grain and quantification of rutin and flavanols from homostylous hybrids originating from *F. esculentum* × *F. Homotropicum* // *Phytochemistry.* 2008. V. 69. P. 1389.
20. *Verardo V., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Marconi E., Fernández-Gutiérrez A., Caboni M.F.* Determination of free and bound phenolic compounds in buckwheat spaghetti by RP-HPLC-ESI-TOF-MS: effect of thermal processing from farm to fork // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 7700.
21. *Danila A.-M., Kotani A., Hakamata H., Kusu F.* Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by micro-high-performance chromatography with electrochemical detection // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 4. P. 1139.
22. *Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J.A., Briggs C.J.* Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation // *Food Res. Int.* 2007. V. 40. № 3. P. 356.
23. *Lee L.S., Choi E.J., Kim C.H., Sung J.M., Kim Y.B., Seo D.H., Choi H.W., Choi Y.S., Kum J.S., Park J.D.* Contribution of flavonoids to the antioxidant properties of common and tartary buckwheat // *J. Cereal Sci.* 2016. V. 68. P. 181.
24. *Hung P.V., Morita N.* Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat and their antioxidant capacities // *Food Chem.* 2008. V. 109. № 2. P. 325.
25. *Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E.* Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking // *Food Chem.* 2010. V. 119. № 2. P. 770.
26. *Watanabe M., Ayugase J.* Chiral separation of catechins in buckwheat groats and the effect of phenolic compounds in mice subjected to restraint stress // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 6438.

27. Kim S.-J., Kawaharada C., Suzuki T., Saito K., Hashimoto N., Takigawa S., Noda T., Matsuura-Endo Ch., Yamauchi H. Effect of natural light periods on rutin, free amino acid and vitamin C contents in the sprouts of common (*Fagopyrum esculentum* Moench) and tartary (*F. tataricum* Gaertn.) buckwheats // *Food Sci. Technol. Res.* 2006. V. 12. № 3. P. 199.
28. Sciarini L.S., Steffolani M.E., Fernández A., Paesani C., Pérez G.T. Gluten-free breadmaking affected by the particle size and chemical composition of quinoa and buckwheat flour fractions // *Food Sci. Technol. Int.* 2020. V. 26. № 4. P. 321.
29. Siracusa L., Gresta F., Sperlinga E., Ruberto G. Effect of sowing time and soil water content on grain yield and phenolic profile of four buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) varieties in a Mediterranean environment // *J. Food Composit. Anal.* 2017. V. 62. P. 1.
30. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // *LWT Food Sci. Technol.* 1995. V. 28. P. 25.
31. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. V. 26. P. 1231.
32. Oomah B.D., Cardador-Martínez A., Loarca-Piña G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L) // *J. Sci. Food Agric.* 2005. V. 85. № 6. P. 935.
33. Oroian M., Dranca F., Ursachi F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis // *J. Food Sci. Technol.* 2020. V. 57. № 1. P. 70. doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x
34. Verardo V., Bonoli M., Marconi E., Caboni M.F. Determination of free flavan-3-ol content in barley (*Hordeum vulgare* L.) air-classified flours: comparative study of HPLC-DAD/MS and spectrophotometric determinations // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 6944.
35. Алексенко С.С. Антиоксидантная активность и состав фенольных соединений гречихи и ячменя по данным спектрофотометрии и ВЭЖХ // *Журн. аналит. химии.* 2013. Т. 68. № 5. С. 505. (Aleksenko S.S. Antioxidant activity and phenolic compounds of buckwheat and barley by the data of spectrophotometry and HPLC // *J. Anal. Chem.* 2013. V. 68. № 5. P. 458.)
36. Naczki M., Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1054. P. 95.