

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТЫСЯЧЕЛИСТНИКЕ ОБЫКНОВЕННОМ

Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев

Кубанский государственный университет
Россия, 350040 г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149
analyt@chem.kubsu.ru

Поступила в редакцию 19 марта 2012 г

Предложена схема анализа водных экстрактов тысячелистника обыкновенного, включающая идентификацию фенольных соединений и флавоноидов методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии и их определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЖХ-МС). На основе предложенной схемы методом газовой хромато-масс-спектрометрии в тысячелистнике идентифицированы фенольные соединения, относящиеся к классам фенолкарбоновых, коричневых и кофеилхинных кислот. Методом ЖХ-МС идентифицированы 6 соединений группы кофеилхинных кислот. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием на диодной матрице определено содержание 8 фенольных соединений: протокатеховой, *транс*-кофейной, 3-О-кофеилхинной, 5-О-кофеилхинной, 4-О-кофеилхинной, 3,4-О-дикофеилхинной, 3,5-О-дикофеилхинной и 4,5-О-дикофеилхинной кислот.

Ключевые слова: хроматография, фенольные соединения, кофеилхинные кислоты, тысячелистник обыкновенный.

Верниковская Наталья Андреевна – кандидат химических наук, преподаватель кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – фенольные соединения и флавоноиды, лекарственное растительное сырье, хроматография.

Автор 3 опубликованных работ.

Темердашев Зауаль Ахлоевич – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ объектов окружающей среды, разработка аналитических схем контроля.

Более 180 опубликованных работ, в том числе ряда монографий и патентов.

Введение

Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*) является одним из самых распространенных растений, используемых для отваров, настоек и фармацевтических препаратов. Спектр фармакологического действия тысячелистника очень широк: его применяют как ранозаживляющее, антимикробное, противовоспалительное, спазмолитическое средство, он также эффективен при профилактике заболеваний желудочно-кишечного тракта и варикозного расширения вен. Химический состав тысячелистника представлен различными классами соединений: витаминами, терпеноидами, эфирными маслами, фенольными соединениями, лигнанами и жирными кислотами [1-7]. Требования к качеству сырья регламентируются различными фармакопеями, в которых установлены лимиты на содержание эфирных масел, проазуленов, показатели влажности, зольности и т.д. [8-10]. Однако требования к содержанию фенольных соединений и флавоноидов, являющихся фармакологически весьма активной группой тысячелистника

обыкновенного и обуславливающих противовоспалительное, противораковое, кардиопротекторное и антиоксидантное действие лекарственных средств на его основе, зачастую отсутствуют.

Фенольные соединения, содержащиеся в тысячелистнике, представлены флавонолами, флавоноидами, фенолкарбоновыми, коричневыми, кофеилхинными кислотами и т.д. Оценка содержания фенольных соединений в растениях обычно осуществляют суммарно методами титриметрии и спектрофотометрии. В последнее время большинство исследований посвящено определению индивидуальных фенольных веществ в лекарственных растениях, пищевых продуктах, напитках методами хроматографии [2, 3, 5-7, 11-15]. Наиболее распространённым методом анализа является высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием на диодной матрице (ВЭЖХ-УФ-ДМД), с помощью которой, при наличии стандартных веществ, возможна идентификация и определение фенольных соединений в тысячелистнике. Так, например, в водных и водно-спиртовых экстрактах тысячелистника обыкновенного

методом ВЭЖХ-УФ-ДМД были обнаружены виценин-2, лютеолин, лютеолин-7-О-гликозид, лютеолин-3',7-ди-О-гликозид, апигенин, рутин, апигенин-7-О-гликозид, 5-О-кофеилхинная, 3-О-кофеилхинная, 4-О-кофеилхинная, 3,4-О-дикофеилхинная, 4,5-О-дикофеилхинная, *транс*-кофейная и протокатеховая кислоты [3, 6]. При отсутствии стандартов фенольных соединений альтернативой ВЭЖХ-УФ-ДМД является жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС), с помощью которой возможно определение структуры фенольных соединений. R. Jaiswal с сотрудниками [5] при помощи ЖХ-МС в метанольных экстрактах тысячелистника обыкновенного идентифицировали 1-О-кофеилхинную, 3-О-кофеилхинную, 4-О-кофеилхинную, 5-О-кофеилхинную, 5-О-ферулоилхинную, 1,5-О-дикофеилхинную, 3,5-О-дикофеилхинную, 3,4-О-дикофеилхинную, 4,5-О-дикофеилхинную и 1-кофеил-3-ферулоилхинную кислоты. Кроме того, в отсутствие стандартных веществ при анализе методом ВЭЖХ или невозможности установления структуры соединений с помощью ЖХ-МС идентификация фенольных веществ с достаточно высокой степенью достоверности в тысячелистнике возможна с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) по библиотеке масс-спектров.

Литературные данные по содержанию фенольных соединений [7, 16-19] в тысячелистнике обыкновенном носят разрозненный характер и, в основном, касаются содержания этих соединений в спиртовых экстрактах лекарственного растения. С другой стороны наиболее распространенной рекомендуемой формой употребления лекарственных растений являются их водные экстракты, сведения о компонентном составе индивидуальных соединений в которых практически отсутствуют.

Настоящая работа посвящена идентификации и хроматографическому определению фенольных соединений в водных экстрактах тысячелистника обыкновенного.

Материалы и оборудование

Фенольные соединения: галловая, протокатеховая, 4-гидроксibenзойная, салициловая, миндальная, *p*-анисовая, ванилиновая, сиреневая, корициная, *p*-кумаровая кислоты, дигидрокверцетин, рутин, кверцетин и нарингин были приобретены в «Сигмабиосинтез» (Георгиевск, Россия), *транс*-кофейная кислота – Panreac Sintesis, (Barselona, Spain), *транс*-феруловая – Aldrich (Steinheim, Germany), (-)-эпикатехин – Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Растворы фенольных соединений готовили растворением точных навесок индивидуальных соединений в ацетонитриле сорта 0, «Криохром» (Санкт-Петербург, Россия). Использовали 85 % фосфорную кислоту производства «Реактив» (Санкт-Петербург, Россия), дигидрофосфат калия – «НеваРеактив» (Санкт-Петербург, Россия), дериватизирующий агент N,O-бис-триметилсилилтрифторацетамид (БСТФА) 99.99 % чистоты – «Macherey-Nagel» (Duren, Germany).

ВЭЖХ-УФ-ДМД анализ тысячелистника обыкновенного проводили с использованием хроматографа «Shimadzu LC-20 Prominence» с УФ детектором на основе диодной матрицы SPD-M20A, оснащенный дегазатором DGU-20A5, насосом LC20AD, автоматическим дозатором SIL-20A и термостатом колонок CTO-20AC (Shimadzu, Япония). Анализ проводили по методике, предложенной в работе [20]. Обработку данных осуществляли в среде программы LCSolution (Shimadzu, Japan). Использовали колонку Zorbax SB C18 (55 мкм, 150×2.1 мм, Agilent, США) и предколонку Zorbax SB C8 (5 мкм, 20×2.1 мм, Agilent, США). Подвижная фаза состояла из элюента А – ацетонитрил, элюента Б – 0.04M K₂HPO₄, подкисленного H₃PO₄ до pH 2.8. Режим элюирования градиентный: 0-3 мин 3 % элюент А, 3-4 мин 3-5 % А, 4-8 мин 5 % А, 8-15 мин 5-20 % А, 15-18 мин 20 % А, 18-25 мин 20-40 % А, 25-28 мин 40 % А. Термостатирование колонки при 40 °С. Расход подвижной фазы 0.25 мл/мин. Объем пробы 1 мкл.

Для ВЭЖХ-МС анализа использовали систему ВЭЖХ на основе Shimadzu LC-20 Prominence с МС детектором LCMS2010EV (Shimadzu, Япония). Использовали колонку Zorbax SB C18 (5 мкм, 150×2.1 мм, Agilent, США) и предколонку Zorbax SB C8 (5 мкм, 20×2.1 мм, Agilent, США). Подвижная фаза состояла из элюента А – ацетонитрил, элюента Б – 0.1 % муравьиная кислота. Программа элюирования аналогична программе ВЭЖХ-УФ-ДМД. Термостатирование колонки при 40 °С. Расход подвижной фазы 0.25 мл/мин. Объем пробы 1 мкл.

МС-детектирование веществ осуществляли методом ионизации электроспреем (ESI). Спектры регистрировали в режиме отрицательной ионизации в диапазоне 50-600 m/z с частотой сканирования 1.25 скан/с. Напряжение интерфейса 2.5 кВ, напряжение линии десольватации – 40 В, температура линии десольватации 300 °С. Скорость потока азота 750 л/ч.

Анализ методом ГХ-МС проводили на хроматографе Shimadzu GC 2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) [21]. Использовали капиллярную колонку HP-Ultra 2 (толщина пленки 0.52 мкм, 25 м x 0.32 мм, Agilent, США). В качестве газа-носителя использовали гелий. Температурная программа: изотерма 100 °С в течение 3 мин, подъем до 150 °С со скоростью 10.5 °С/мин, изотерма 2 мин, подъем до 300 °С со скоростью 10.0 °С/мин, изотерма 8 мин. Температура инжектора – 280 °С, интерфейса – 280 °С, ионного источника – 200 °С. Поток газа в колонке 2.41 мл/мин, время анализа составило 32 мин, режим ввода – Split 1:35, объем вводимой пробы 1 мкл. Задержка на выход растворителя составляла 8 мин. Идентификацию веществ проводили по параметрам удерживания и масс-спектрам библиотек NIST07, WILEY8. Диапазон сканирования m/z = 33-900, скорость сканирования 1111 скан/с. Обработка первичных данных и расчеты проводились в среде программы GCMSsolution.

Подготовка проб

Для анализа методом ВЭЖХ-УФ-ДМД и ЖХ-МС 2.0 г измельченного лекарственного растительного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл с обратным холодильником, заливали 250 мл горячей воды, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем пробу охлаждали до комнатной температуры без доступа света, после чего процеживали через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили раствор до метки дистиллированной водой. Раствор фильтровали через мембранный фильтр SFCA (диаметр пор 0.45 мкм, Corning, Germany).

Для идентификации веществ методом ГХ-МС навеску растительного сырья 5.0 г помещали в коническую колбу (250 мл) и готовили отвар также как для ВЭЖХ анализа. Затем 1 мл полученного фильтрата пропускали через картридж Диапак

С18 (Москва, Россия), который элюировали 25 мл ацетонитрила для полного извлечения фенольных соединений. Элюат сушили в токе азота, осадок растворяли в 1 мл ацетонитрила. К 100 мкл полученного раствора добавляли 100 мкл БСТФА и выдерживали смесь при 80°C в термостате в течение 30 минут.

Результаты и обсуждение

Идентификация фенольных соединений.

При анализе водных экстрактов тысячелистника методом ВЭЖХ-УФ-ДМД по времени удерживания и УФ-спектрам были идентифицированы *транс*-кофейная ($T_R = 17.0$ мин) и протокатеховая кислоты ($T_R = 9.8$ мин) (рис. 1). Согласно ВЭЖХ-хроматограмме время удерживания не идентифицированных пиков 2, 3, 4, 6, 7 и 8 составило 11.6, 16.0, 16.2, 21.5, 22.5 и 23.5 мин соответственно. УФ-спектры этих

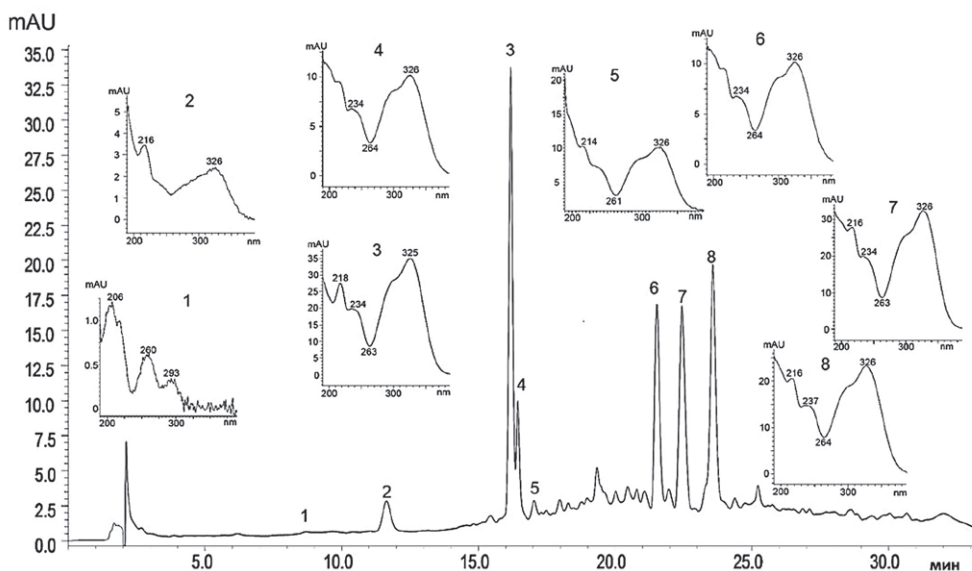


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма водного экстракта тысячелистника обыкновенного и УФ-спектры фенольных соединений: 1 – протокатеховая кислота, 5 – *транс*-кофейная кислота, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – неизвестные соединения

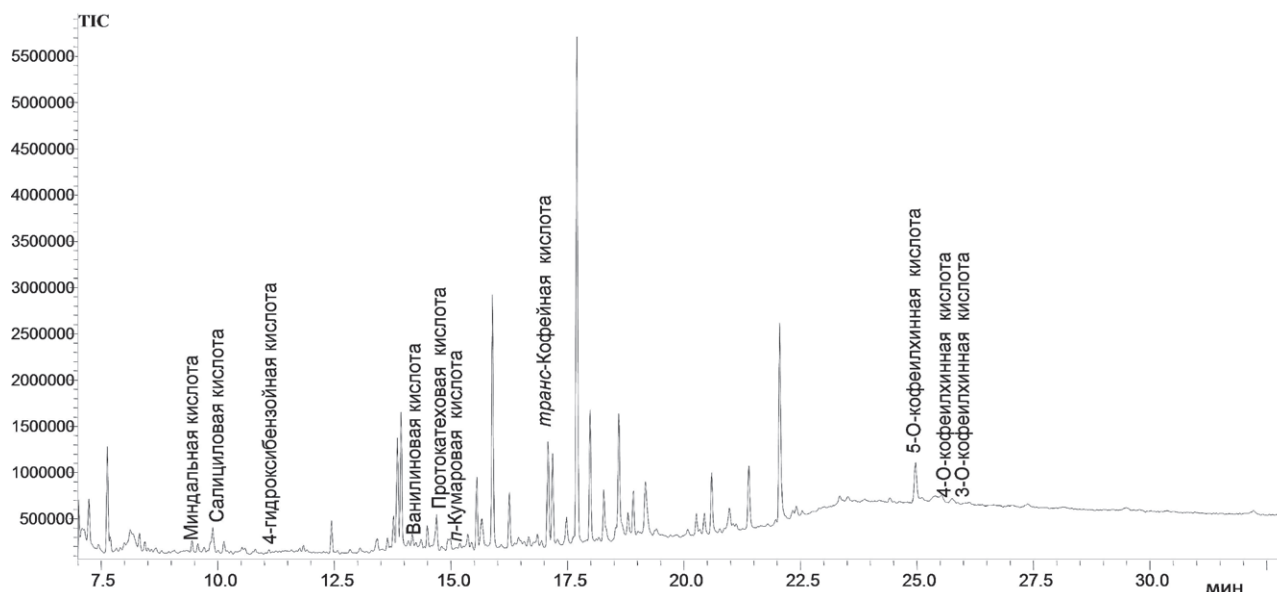


Рис. 2. ГХ-МС хроматограмма водного экстракта тысячелистника обыкновенного. Соответствующие пики приведены в табл. 1

Таблица 1

ГХ-МС идентификация ТМС-производных фенольных соединений тысячелистника обыкновенного

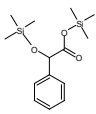
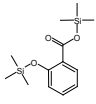
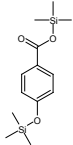
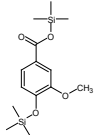
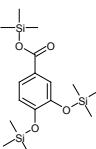
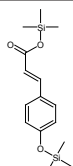
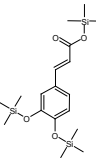
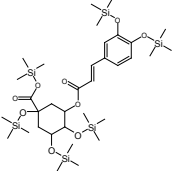
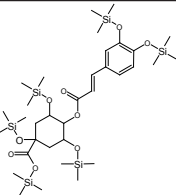
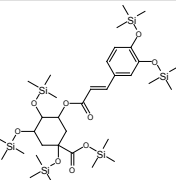
№ пика	ТМС-производное фенольного соединения	Структура	Время удерживания, мин	Характеристичные m/z (интенсивность)
1	Миндальная кислота		9.71	179 (100.0), 73 (92.0), 147 (26.8), 180 (16.8), 45 (14.4), 253 (8.8), 74 (8.4), 75 (7.6)
2	Салициловая кислота		10.13	267 (32.4), 73 (100.0), 45 (24.8), 135 (10.4), 43 (10.0), 74 (8.8), 268 (8.4), 75 (8.0)
3	4-Гидроксibenзойная кислота		11.44	267 (90.0), 193 (60.0), 73 (100.0), 223 (58.8), 282 (25.6), 268 (21.2), 45 (20.8), 126 (16.4)
4	Ванилиновая кислота		13.05	312 (67.2), 297 (100.0), 73 (76.4), 267 (64.4), 223 (53.2), 253 (41.2), 282 (35.2), 298 (25.2)
5	Протокатеховая кислота		13.77	370 (55.2), 193 (100.0), 73 (59.2), 355 (35.2), 311 (20.4), 371 (20.4), 194 (14.4), 45 (12.4)
6	<i>p</i> -Кумаровая кислота		14.94	308 (38.8), 219 (55.6), 73 (100.0), 293 (47.2), 75 (24.0), 249 (24.0), 45 (22.4), 294 (12.8)
7	<i>транс</i> -Кофейная кислота		16.86	396 (48.8), 73 (100.0), 219 (64.8), 45 (19.2), 397 (17.6), 381 (13.6), 75 (11.6), 220 (11.2)
8	3-О-Кофеилхинная кислота		24.97	345 (100.0), 307 (42.0), 255 (41.2), 73 (34.0), 786 (19.2), 787 (13.2), 219 (12.0)
9	4-О-Кофеилхинная кислота		25.53	307 (100.0), 255 (50.8), 324 (24.0), 73 (17.2), 489 (14.0), 373 (12.0), 447 (12.0), 396 (11.2)
10	5-О-Кофеилхинная кислота		25.75	307 (100.0), 345 (94.8), 447 (38.0), 255 (28.0), 73 (21.2), 219 (16.0), 396 (14.0)

Таблица 2

Идентификация фенольных соединений в водном экстракте тысячелистника обыкновенного методом ЖХ-МС

№ пика	Фенольное соединение	Время удерживания, мин	Характеристичные m/z
1	4-О-Кофеилхинная кислота	17.9	353, 191, 173, 161
2	3-О-Кофеилхинная кислота	19.9	353, 191, 173, 183, 161
3	5-О-Кофеилхинная кислота	20.4	353, 173, 191
4	3,4-О-Дикофеилхинная кислота	26.8	515, 135, 353, 173,
5	3,5-О-Дикофеилхинная кислота	27.1	515, 353, 135, 191, 173
6	4,5-О-Дикофеилхинная кислота	27.7	515, 353, 179

соединений характеризуются двумя максимумами поглощения 215-220 нм с плечом в области 230-240 нм и 325-330 нм с плечом в области 295-300 нм. Полосы 215-220 и 325-330 нм относятся к бензольному кольцу. Полоса в области 295-300 нм принадлежит двойной связи $-C=C-$, а полоса 230-240 нм относится к карбоксильной группе [22, 23]. Эти полосы поглощения характерны для кофейной кислоты, содержащей в своем составе ароматическое кольцо с сопряженной двойной связью боковой цепи, карбоксильную группу и две гидроксильные группы в *мета*- и *пара*-положении. Таким образом, по УФ спектрам соединений 2, 3, 4, 6, 7 и 8 можно заключить, что они относятся к производным кофейной кислоты.

Для установления достоверной информации о структуре этих соединений нами был проведен анализ отваров тысячелистника методом газовой хромато-масс-спектрометрии. На рис. 2 приведена хроматограмма обнаруженных в экстракте растения триметилсилил-производных (ТМС) фенольных соединений, идентификацию которых проводили по характеристичным m/z (табл. 1). Первоначально качественный анализ проводили в режиме полного ионного тока, но в дальнейшем идентификацию ионов малой интенсивности (8, 9 и 10) проводили в режиме селективно-заданных масс.

С использованием библиотеки NIST07, встроенной в программную оболочку аналитического

оборудования, был идентифицирован ряд производных кофейной кислоты: 5-О-кофеилхинная, 4-О-кофеилхинная, 3-О-кофеилхинная. Известно также [5, 6], что в траве тысячелистника могут присутствовать димерные и тримерные формы кофеилхинных кислот. Однако массы молекулярных ионов триметилсилил-производных ди- и трикофеилхинных кислот довольно велики, поэтому их идентификация с помощью ГХ-МС лимитируется возможностями масс-спектрометра (в данной работе диапазон $m/z = 33-1100$). С другой стороны, определение структуры этих соединений по осколочным ионам может быть затруднено ввиду сходства путей фрагментации.

С помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии устанавливали структуры фенольных соединений по характеристичным m/z . На рис. 3 приведена масс-хроматограмма водного экстракта лекарственного растения в режиме селективно заданных масс. Соединения 1, 2 и 3 по молекулярному иону ($m/z = 353$) были отнесены нами к монокофеилхинным кислотам, а соединения 4, 5 и 6 – к дикофеилхинным кислотам ($m/z = 515$). Соединения 1, 2 и 3 образуют вторичные ионы $m/z = 191$ [хинная кислота- H^+] и $m/z = 173$ [хинная кислота- H_2O] (табл. 2). У соединений 1 и 3 наблюдается также ион $m/z = 161$ [кофейная кислота- H_2O], а у соединения 2 – дополнительный ион $m/z = 183$ [кофейная кислота+ $Na-H^+$]. Исходя

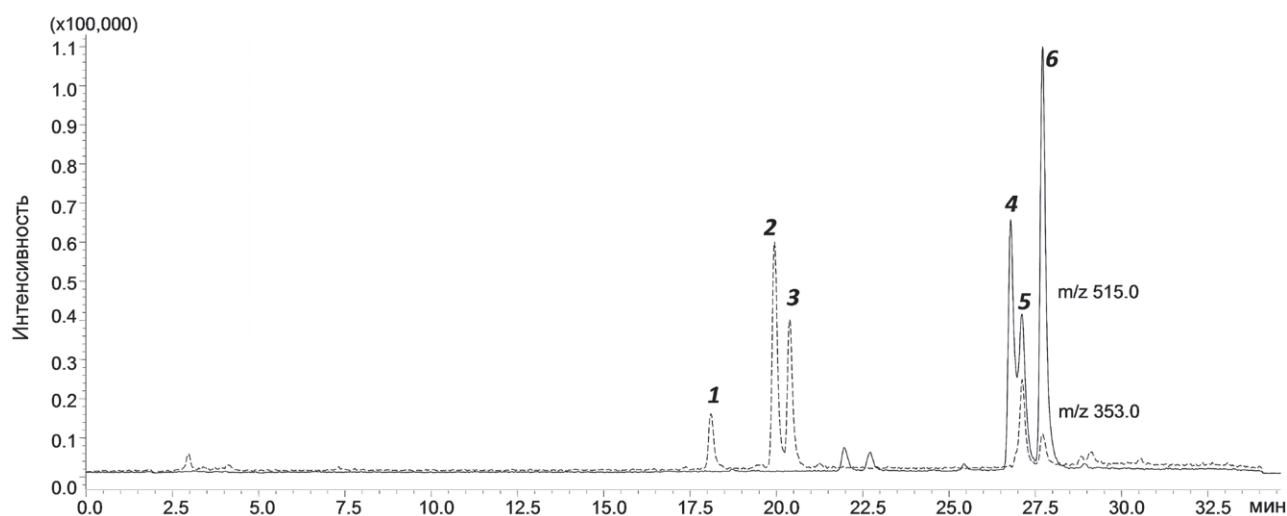


Рис. 3. ЖХ-МС хроматограмма водного экстракта тысячелистника обыкновенного

Таблица 3

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

Фенольное соединение	Диапазон концентраций, мг/л	Уравнение регрессии	R^2	Предел обнаружения C_{min} , мг/л	Предел определения, C_{lim} , мг/л
Протокатеховая кислота	2.5 - 100	$S = (12.3 \pm 0.2) \times 10^3 \times C$	0.99	1.2	3.6
<i>транс</i> -Кофейная кислота	1 - 100	$S = (-7.5 \pm 5.9) \times 10^3 + (23.4 \pm 0.1) \times 10^3 \times C$	1.00	0.2	0.6
<i>транс</i> -Феруловая кислота	1 - 100	$S = (22.6 \pm 0.4) \times 10^3 \times C$	0.99	0.4	1.1

Примечания: S – площадь пика; C – концентрация соединений, мг/л.

из данных об осколочных ионах, соединение 1 было идентифицировано как 4-О-кофеилхинная кислота, соединение 2 – 3-О-кофеилхинная кислота, а соединение 3 – 5-О-кофеилхинная кислота. Соединения 4, 5, 6 образуют осколочный ион $m/z = 353$ [кофеилхинная кислота- H^+]. Для соединения 6 кроме того характерен ион $m/z = 179$ [кофейная кислота- H^+]. Соединениям 4 и 5 также принадлежат осколочные ионы $m/z = 135$ и 173 , относящиеся к ионам [кофейная кислота- CO_2-H^+] и [хинная кислота- H_2O], помимо этого, соединение 5 образует ион хинной кислоты [хинная кислота- H^+] [24-27].

Таким образом, пики 2, 3, 4, 6, 7 и 8 на рис.1 соответствуют 4-О-кофеилхинной, 3-О-кофеилхинной, 5-О-кофеилхинной, 3,4-О-дикофеилхинной, 3,5-О-дикофеилхинной и 4,5-О-дикофеилхинной кислот.

Определение фенольных соединений. Для определения идентифицированных фенольных соединений в водном экстракте тысячелистника обыкновенного с помощью ВЭЖХ-УФ-ДАД были выбраны длины волн детектирования: 260 нм для протокатеховой кислоты и 325 нм для *транс*-кофейной, 4-О-кофеилхинной, 3-О-кофеилхинной,

5-О-кофеилхинной, 3,4-О-дикофеилхинной, 3,5-О-дикофеилхинной и 4,5-О-дикофеилхинной кислот. Для протокатеховой и *транс*-кофейной кислот устанавливали зависимости аналитического сигнала от концентрации (табл. 3). Концентрацию кофеилхинных кислот определяли методом внешнего стандарта – по феруловой кислоте, имеющей в своем составе идентичные хромофорные группы и близкий к кофеилхинным кислотам коэффициент экстинкции.

Установлено содержание фенольных кислот в аптечных образцах тысячелистника обыкновенного: протокатеховой – (0.59 ± 0.07) , *транс*-кофейной – (0.72 ± 0.07) , 4-О-кофеилхинной – (1.90 ± 0.03) , 3-О-кофеилхинной – (7.1 ± 0.1) , 5-О-кофеилхинной – (5.1 ± 0.1) , 3,4-О-дикофеилхинной – (7.0 ± 0.1) , 3,5-О-дикофеилхинной – (9.3 ± 0.1) и 4,5-О-дикофеилхинной – (10.7 ± 0.1) .

На основании полученных результатов для анализа водных экстрактов лекарственных растений на содержание фенольных соединений и флавоноидов методами хроматографии предложена следующая схема анализа (рис. 4):

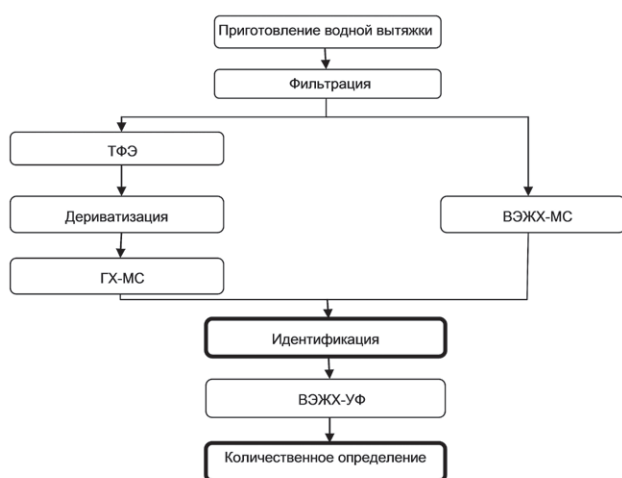


Рис. 4. Схема анализа водных экстрактов лекарственных растений

Заключение

По предложенной схеме анализа лекарственных растений с помощью методов жидкостной хромато-масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием идентифицированы и определены в тысячелистнике протокатеховая, *транс*-кофейная, 3-О-кофеилхинная, 4-О-кофеилхинная, 5-О-кофеилхинная, 3,4-О-дикофеилхинная, 3,5-О-дикофеилхинная, 4,5-О-дикофеилхинная кислоты. Методом ГХ-МС в анализируемом образце идентифицированы миндальная, салициловая, 4-гидроксibenзойная, ванилиновая, протокатеховая, *p*-кумаровая, *транс*-кофейная, 5-О-кофеилхинная, 4-О-кофеилхинная и 3-О-кофеилхинная кислоты.

Установлено, что минорными фенольными компонентами данного объекта анализа являются

протокатеховая и транс-кофейная кислоты, а доминирующими – 5-О-кофеилхинная, 3,5-О-дикофеилхинная и 4,5-О-дикофеилхинная кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта № 16.552.11.71013, выполняемого в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» и ведомственной аналитической научно-технической программы. Авторы благодарят Т.Н. Шевченко за помощь в проведении ЖХ-МС анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chemical constituents of the plants in the genus *Achillea* / X.-T. Si et [al.] // Chem. Biodiversity. 2006, № 3. P. 1163-1180.
2. Влияние экологических факторов на химический состав некоторых дикорастущих растений Красноярского края / А.А. Ефремов и [др.] // Химия растительного сырья. 2002. № 3. С. 53–56.
3. Quantitative HPLC determination of phenolic compounds in yarrow / R. Benetis et [al.] // Pharm. Chem. J. 2008. V. 42. P. 153-156.
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae) / [Под ред. П.Д. Соколова] // СПб.: Наука, 1993. 352 с.
5. Jaiswal R., Kiprotich J., Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family // Phytochemistry. 2011. V. 72. P. 781-790.
6. Schulz H., Albroscheit G. High-performance liquid chromatographic characterization of some medicinal plant extracts used in cosmetic formulas // J. Chromatogr. 1988. V. 442. P. 353-361.
7. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions / S. Trumbeckaite et [al.] // Food Chem. 2011. V. 127. P. 1540-1548.
8. Фармакопея СССР. Изд. 11. Вып. 2. Москва, 1990.
9. European pharmacopoeia, 5th edition, Yarrow. Millefolii herba. 01/2005:1382. 2005.
10. British Pharmacopoeia. Volume III. Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. Monograph 1382. Yarrow. 2009.
11. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O.A. Zaporozhets et [al.] // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. P. 21–25.
12. Шаршунова М., Шварц В., Михалец И. Тонкослойная хроматография в фармации и биохимии. М., 1980. 260 с.
13. Betaines and free proline within the *Achillea millefolium* group / M. Mehlführer et [al.] // Phytochemistry. 1997, V. 44. P. 1067-1069.
14. Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. / C.I.G. Tuberoso et [al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. 2009. V. 50. P. 440-448.
15. A rapid densitometric method for the quantification of luteolin in medicinal plants using HPTLC / H. Srinivasa et [al.] // Chromatographia. 2004, V. 60, № 1-2. P. 131-134.
16. Separation of Sesquiterpenes from Yarrow (*Achillea millefolium* L. s. l.) by LC-MS on non-porous columns / G. Montsko et [al.] // Chromatographia. 2008. V. 67. P. 467-470.
17. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants / I. Parejo et [al.] // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 6882–6890.
18. Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group / W. Kubelka et [al.] // Biochemical Systematics and Ecology. 1999. V. 27. P. 437–444.
19. Guidon D., Abbe Ph., Lamaison J.L. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies // Biochemical Systematics and Ecology. 1993. V. 21, № 5. P. 607-611.
20. Темердашев З.А., Фролова Н.А., Колычев И.А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращено-фазовой ВЭЖХ // Ж. аналит. химии. 2011. V. 66. P. 417-424.
21. Определение фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах лекарственных растений / З.А. Темердашев и [др.] // Зав. Лаборатория. Диагностика материалов. 2011. № 11. С. 18-22.
22. Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection / L. Bengoechea et [al.] // Chromatographia. 1995. V. 41, № 1-2. P. 94-98.
23. Cheynier V., Moutounet M. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase // J. Ark. Food Chem. 1992, V. 40. P. 2038-2044.
24. Chemical characterization of phenolic compounds in erigeron injection by rapid-resolution LC coupled with multi-stage and quadrupole-TOF-MS / Y. Zhang et [al.] // Chromatographia. 2010. V. 72. P. 651-658.
25. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and H-NMR methods / A. Tolonen et [al.] // J. Phytochem. Anal. 2002, V. 13. P. 316-328.
26. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee / A. Stalmach et [al.] // Braz. J. Plant Physiol. 2006. V. 18. P. 253-262.
27. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI-MS / B.S. Inbaraj et [al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 51. P. 549-556.

IDENTIFICATION AND CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN YARROW

N.A. Vernikovskaya, Z.A. Temerdashev

*Kuban State University
149 Stavropolskaya St., 350040 Krasnodar, Russia
analyt@chem.kubsu.ru*

A scheme for analysis of aqueous extracts of yarrow including the identification of phenolic compounds and flavonoids by gas and liquid chromatography mass spectrometry and their determination by high performance liquid chromatography was proposed. On the basis of the scheme phenolic compounds (phenolcarbonic, cinnamic and caffeoylquinic acids) were identified in yarrow by GC-MS. Six caffeoylquinic acids were identified by LC-MS. The content of eight phenolic compounds (protocatechuic, *trans*-caffeic, 3-O-caffeoylquinic, 5-O-caffeoylquinic, 4-O-caffeoylquinic, 3,4-O-caffeoylquinic, 3,5-O-caffeoylquinic and 4,5-O-caffeoylquinic acids) were determined in yarrow using HPLC-UV-DAD.

Keywords: chromatography, phenolic compounds, caffeoylquinic acid, yarrow.