ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2021, том 76, № 9, с. 819–831

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.054

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЙ ИЗОФЛАВОНОИДОВ В КЛЕВЕРЕ ЛУГОВОМ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ИЗ СЕМЕЙСТВА БОБОВЫЕ (*FABACEAE*) В УСЛОВИЯХ ЭКСТРАКЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ

© 2021 г. З. А. Темердашев[a], *, Т. К. Чубукина[a], Е. А. Виницкая[a], М. В. Нагалевский[a], Н. В. Киселева[a]

[a] *Кубанский государственный университет*
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия
**e-mail: temza@kubsu.ru*

Поступила в редакцию 29.03.2021 г.
После доработки 07.04.2021 г.
Принята к публикации 15.04.2021 г.

Проведена хроматографическая оценка извлечения нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты в условиях экстракции различными способами из разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Проанализированы водно-спиртовые экстракты клевера лугового, полученные мацерацией, микроволновым, ультразвуковым, субкритическим и фармакопейными способами. Из соцветий клевера лугового максимально извлекаются формононетин (0.260 мг/г) и генистеин (0.051 мг/г) мацерацией, биоканин А – субкритической экстракцией (0.340 мг/г), а дайдзеин – ультразвуковым способом (0.034 мг/г). Оптимизированы условия ВЭЖХ-определения дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в водно-спиртовых экстрактах клевера лугового. Определены концентрации изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового. Максимальное суммарное содержание изофлавоноидов (0.190 мг/г) наблюдается в водно-этанольном экстракте соцветий.

Ключевые слова: изофлавоноиды, клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), ультразвуковая экстракция, микроволновая экстракция, субкритическая экстракция, мацерация.

DOI: 10.31857/S0044450221090115

Изофлавоноиды и их производные иногда называют фитоэстрогенами – природными гормоноподобными веществами растительного происхождения, принадлежащими к классу флавоноидов, многие из которых являются биологически активными веществами [1]. По строению фитоэстрогены сходны с эстрадиолом и могут проявлять себя как эстрогены, связываясь с эстрогеновыми рецепторами [1, 2].

Распространенными источниками природных аналогов эстрогенов являются растения из семейства Бобовые (*Fabaceae)* – клевер (*Trifolium)*, люцерна (*Medicágo)*, донник (*Melilótus)* [3, 4]. Род *Trifolium* насчитывает порядка 300 видов, произрастающих в Европе, Азии, Северной Америке, Австралии и некоторых районах Африки [5]. В настоящее время содержание изофлавоноидов исследовано в 37 природных и гибридных видах клевера (*Trifolium),* наиболее полно изученным и распространенным из которых является клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) [6–10]. При изучении 23 видов клевера Висневски-Некрасова с соавт. [10] обнаружили, что наибольшее количество изофлавоноидов содержится в клевере подземном (*Trifolium subterraneum* L.), клевере александрийском (*Trifolium alexandrinum* L.), клевере луговом (*Trifolium pratense* L.), клевере репейниковом (*Trifolium lappaceum* L.), подвиде клевера подземного (*Trifolium subterr. subsp. brachycalycinum* L.). Ренда с соавт. [9] считают, что самыми богатыми по содержанию изофлавоноидов среди 11 изученных ими видов являются клевер седоватый (*Trifolium canescens* L.) и одна из разновидностей клевера лугового (*Trifolium pratense var. pratense* L.).

На содержание изофлавоноидов в клевере влияет не только вид, но и условия произрастания: влажность климата, характер почв, район произрастания, температура, режим полива и др. [6, 10]. Накоплению изофлавоноидов способствует более мягкий климат и влажность. Кроме того, их содержание зависит от времени сбора, а также от частей растения [11–14]. В период роста растения изофлавоноиды в большей степени накапливаются в листьях и стеблях, в период цветения их концентрация повышается и часть из них

накапливается в цветах [11, 15, 16]. Так как при использовании клевера в фитотерапии наиболее важной является фаза максимального содержания изофлавоноидов, наибольший интерес для исследования представляют растения, собранные на стадии цветения. Основными изофлавоноидами, определяющими биологическую активность клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), считаются дайдзеин (**ДЗ**), генистеин (**ГН**), формононетин (**ФН**) и биоканин А (**БКА**) [17] – соединения с фенильным радикалом в положении С3 (схема 1). Формононетин может метаболизироваться до дайдзеина, а биоканин А до генистеина в процессе роста растения, что повышает его эстрогенную активность [2].

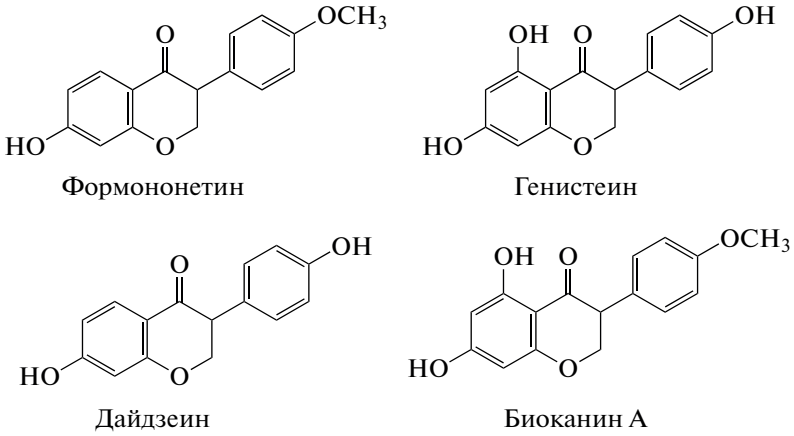

Схема 1. Основные изофлавоноиды, определяющие биологическую активность клевера лугового (*Trifolium pratense* L.).

Чаще всего извлечение изофлавоноидов из клевера лугового проводят жидкостной экстракцией (**ЖЭ**) с различными видами физического воздействия (табл. 1), в качестве растворителей обычно используют водно-спиртовые смеси различного состава [15, 16, 18]. При необходимости перевода гликозидных форм в агликоны проводят кислотный гидролиз добавлением трифторуксусной [11, 19, 20] или соляной кислоты [8, 9, 12, 14]. Некоторые примеры способов извлечения, а также содержания основных изофлавоноидов в различных частях *Trifolium pratense* L. приведены в табл. 1.

Для определения изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового наибольшее распространение получили хроматографические методы [21]. Для разделения и идентификации изофлавоноидов можно использовать планарную хроматографию (бумажную и тонкослойную). Несмотря на ряд преимуществ данного метода (простота, возможность сравнения со стандартными образцами, экспрессность и низкая стоимость), его применяют нечасто из-за ограниченного круга выделяемых компонентов [22]. Применение метода газовой хроматографии при определении изофлавоноидов ограничено из-за трудностей, связанных с работой при высоких температурах, что может привести к разложению аналитов, а также с необходимостью их дериватизации, усложняющей анализ [23, 24].

Наиболее эффективным методом разделения и определения изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового является ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [25]. Метод ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием позволяет получить наиболее полную информацию о качественном составе и количественном содержании изофлавоноидов в исследуемых экстрактах и позволяет определять как агликоны, так и гликозиды без применения дополнительных операций пробоподготовки (табл. 1). Для получения правильных результатов важно подобрать оптимальные условия хроматографирования: режим элюирования, состав подвижной фазы, температуру колонки, длину колонки, состав и размер частиц сорбента. ВЭЖХ-определение изофлавоноидов, как правило, проводят в обращенно-фазовом режиме [26, 27] с использованием хроматографических колонок, заполненных химически модифицированным силикагелем с привитыми октадецильными группами [7, 9, 22], в качестве подвижной фазы применяют смесь воды с метанолом или ацетонитрилом [28, 29].

Целью данной работы является хроматографическая оценка извлечения нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты в условиях экстракции различными способами из разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.).

Таблица 1. Некоторые приемы извлечения и данные по месту, времени сбора образцов и содержанию изофлавоноидов из различных морфологических частей клевера лугового (мг/г)*

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Листья	УЗЭ, MeOH–вода–ацетон (40 : 32 : 28) + 0.05% ТФУ	УВЭЖХ-МС	Декабрь 2015 (лето в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	н.о.	н.о.	12.689	1.832	[11]
			Май 2015 (осень в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	0.368	0.198	15.407	0.763	
	ЖЭ, 50% EtOH + 2 M HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.786	0.452	1.51	–	[14]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.490	0.276	2.930	6.958	[15]
			Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.639	0.110	1.934	1.372	
	ЖЭ, 80% MeOH + + ТФУ, перерастворение в ДМСО, 80°C, рефлюксная система	ВЭЖХ-ДМД	Образцы от компании Мелброзин, Вена, Австрия	0.11	0.10	2.04	2.89	[19]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	Ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.42	0.54	10.58	6.81	[16]
			Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.08	0.07	12.72	11.63	
	УЗ + ЖЭ, 80% MeOH + 2 M HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.11	0.64	5.77	5.76	[12]
	MSPD, C18, дихлорметан–метанол (25 : 75)	ВЭЖХ-ДМД	Февраль–июнь; опытный участок аграрной станции Вайрао в Университете Порту, Португалия	0.0017	0.0095	0.2912	0.3248	[10]

Таблица 1. Продолжение

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Стебли	УЗ + ЖЭ, 80% MeOH + 2 M HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.13	0.48	1.76	0.56	[12]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	Ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.29	0.36	15.49	3.79	[16]
			Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.62	0.24	8.64	1.81	
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	1.291	0.104	н.о.	н.о.	[15]
			Стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.630	0.199	0.319	0.158	
	ЖЭ, выдерживание последовательно в деион. воде, 100%-ном и 70%-ном EtOH	ВЭЖХ-ДМД	Июнь-октябрь; полевая станция Фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.13–0.33	0.14–0.68	2.1–5.9	0.7–3.3	[18]
	ЖЭ, 50% EtOH + + 2 M HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.947	0.181	2.19	–	[14]

Таблица 1. Окончание

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Цветы	УЗ + ЖЭ, 80% MeOH + 2 M HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.001	0.11	0.52	0.78	[12]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	н.о.	0.025	0.893	0.192	[15]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	н.о.	0.11	0.88	0.98	[16]
	ЖЭ, выдерживание последовательно в деион. воде, 100%-ном и 70%-ном EtOH	ВЭЖХ-ДМД	Июнь–октябрь; полевая станция фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.025–0.079	0.18–0.19	0.47–1.2	0.70–1.4	[18]
	ЖЭ, 50% EtOH + + 2 M HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.324	0.231	1.66	–	[14]
	ЖЭ + УЗ, 80% MeOH + 2M HCl, 80°C	ВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; экспериментальные сады Университета Анкары, биологического факультета и факультета естественных наук	н.о.	0.020	0.249	0.072	[9]
Корни	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.681	0.116	0.054	н.о.	[15]
			Стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	1.656	0.040	0.075	0.011	
Наземные части	УЗЭ, 75% MeOH, 35–38% HCl, 75°C, ТФЭ на C_6H_{11}	ВЭЖХ-ДМД-ФЛД	Стадия цветения; различные регионы Польши	0.113	0.239	0.877	1.060	[8]
	80% MeOH + ТФУ, 75°C, перерастворение в ДМСО	ВЭЖХ-УФ	Лето; Анатолия, Турция	0.0147	0.3742	0.1125	0.0711	[9]

* ДЗ – дайдзеин, ГН – генистеин, ФН – формононетин, БКА – биоканин А, н.о. – не обнаружено, "–" – не исследовано, УЗЭ – ультразвуковая экстракция, MeOH – метанол, ТФУ – трифторуксусная кислота, ЖЭ – жидкостная экстракция, EtOH – этанол, МС – масс-спектрометрический детектор, УФ – спектрофотометрическое детектирование в ультрафиолетовой области, Vis – спектрофотометрическое детектирование в видимой области, ДМСО – диметилсульфоксид, ДМД – диодно-матричный детектор, MSPD – матричная твердофазная дисперсия, C18 – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми октадецильными группами, деион. вода – деионизованная вода, ТФЭ – твердофазная экстракция, C_6H_{11} – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми циклогексильными группами, ФЛД – флуориметрический детектор, наземные части – листья, стебли, цветы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал. Объект исследования – образцы клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), собранные на территории ботанического сада Кубанского госуниверситета (Краснодар, средняя высота над уровнем моря 36 м). Исходное сырье предварительно сушили путем его раскладки в затемненном помещении на ровной поверхности тонким слоем при 30°C до воздушно-сухого состояния. Затем сырье измельчали и просеивали, выделяя фракции 0.5–1.0 мм [30], после чего усредняли путем перемешивания.

Реактивы и стандартные образцы. Из растворителей использовали ацетонитрил (HPLC-S, Biosolve BV, Нидерланды), муравьиную кислоту (85%, ЛенРеактив, Россия), этанол (ректифицированный, высшей очистки), метанол х. ч. (Вектон, Россия) и изопропанол х. ч. (Экос 1, Россия). Деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм · см (25°C) получали на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция).

Для идентификации аналитов использовали стандартные образцы дайдзеина, генистеина и формононетина (Sigma-Aldrich, Германия).

Сорбционные материалы. В качестве сорбентов использовали картриджи для твердофазной экстракции с массой сорбента 100 мг: Strata X (размер частиц 33 мкм, диаметр пор 85 нм) и Strata C18-E (размер частиц 55 мкм, диаметр пор 7 нм) (Phenomenex, США), Oasis HLB (размер частиц 30 мкм, диаметр пор 82 нм) (Waters, США) и Isolute ENV+ (размер частиц 90 мкм, диаметр пор 80 нм) (Biotage, Швеция).

Экстракция изофлавоноидов из клевера лугового. Извлечение изофлавоноидов из клевера лугового проводили регламентированными фармакопейной статьей способами [30], а также с интенсификацией процесса ультразвуком [31, 32], микроволновым излучением [33–35] и при повышенном давлении [23, 36, 37]. Данные по извлечению изофлавоноидов различными способами представляли в пересчете на единицу массы воздушно-сухого сырья, мг/г.

Изофлавоноиды экстрагировали по методике согласно *Государственной Фармакопее РФ* (**ГФ**). Навеску сырья (1.0000 г) помещали в круглодонную колбу, растворяли в 96%-ном этаноле (30 мл) с добавлением 10%-ной соляной кислоты (2 мл), подключали к обратному холодильнику и проводили экстракцию на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 100 мл и доводили объем до метки 96%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Микроволновую экстракцию (**МВЭ**) изофлавоноидов из клевера лугового проводили с использованием микроволновой системы ETHOS EX (Milestone, Италия). Навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в ячейку-экстрактор, куда добавляли 70%-ный этиловый спирт (25 мл). Продолжительность экстракции составляла 30 мин при мощности микроволнового излучения 300 Вт и температуре 75°C [38]. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл и доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Для *ультразвуковой экстракции* (**УЗЭ**) изофлавоноидов из клевера лугового навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в коническую колбу со шлифом емк. 100 мл. В качестве растворителя использовали 70%-ный этиловый спирт (25 мл). Экстракцию проводили в ультразвуковой ванне УЗВ–4.0/1 ТТЦ (Сапфир, Россия) с частотой ультразвукового излучения 35 кГц в течение 30 мин. Затем экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл, доводили до метки 70%-ным этанол, пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и анализировали.

Для экстракции изофлавоноидов из клевера лугового *мацерацией* навеску пробы (1.2500 г) помещали в коническую колбу со шлифом емк. 100 мл, добавляли 70%-ный этанол (25 мл) и оставляли на 24 ч отстаиваться. Затем экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл и при необходимости доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Субкритическую экстракцию (**СЭ**) фитоэстрогенов из клевера лугового в динамических условиях при повышенных температуре и давлении проводили на экспериментальной установке, включающей термостат с регулируемым электронным электронагревателем. Экстрагент подавали насосом от жидкостного хроматографа LC20AD (Shimadzu, Япония), в качестве ячейки-экстрактора использовали стальной корпус хроматографической колонки размером 150 × 4.6 мм, которую подключали к установке двумя стальными капиллярами. Для предотвращения закипания экстрагента и поддержания требуемого давления в системе использовали ограничитель противодавления. Высушенную и измельченную навеску пробы (0.2000 г) помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Экстрагент – 70%-ный этанол – предварительно продували азотом для удаления растворенного кислорода и с помощью насоса заполняли им систему. Затем останавливали поток экстрагента и включали нагрев термостата. По достижении термостатом заданной температуры (120°C) выдерживали систему в течение 10 мин при постоянной температуре и остановленном потоке экстрагента, после чего

Таблица 2. Параметры ВЭЖХ-ДМД-МС-определения* изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах соцветий клевера лугового

Соединение	t_R, мин	m/z	λ_{max}, нм	$c_{мин}$, мкг/мл	$c_н$, мкг/мл
Дайдзеин	6.1	253	249; 301	0.03	0.10
Генистеин	11.0	269	260; 328	0.02	0.07
Формононетин	14.0	267	249	0.03	0.10
Биоканин А	18.6	283	261; 326	0.02	0.07

* t_R – время удерживания; λ_{max} – длина волны поглощения; $c_{мин}$ – предел обнаружения; $c_н$ – предел определения; $c_{мин}$ и $c_н$ рассчитаны согласно рекомендациям [39].

его подавали в систему со скоростью 1 мл/мин. Давление в системе по показаниям манометра насоса составляло 80–150 атм. На выходе собирали 5 мл экстракта в стеклянные емкости. Перед ВЭЖХ с диодно-матричным (**ДМД**) и масс-спектрометрическим (**МС**) детектированием полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Твердофазную экстракцию (**ТФЭ**) изофлавоноидов проводили из экстракта клевера лугового, предварительно полученного с использованием метода УЗЭ. Для концентрирования изофлавоноидов и очистки экстрактов использовали сорбенты Strata X, Oasis HLB, Isolute ENV+ и Strata C18-E. Для этого пропускали 1 мл экстракта через кондиционированный сорбент, который затем сушили в токе азота, и далее элюировали аналиты с картриджа метанолом.

Хроматографическое определение изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового. ВЭЖХ-определение изофлавоноидов в полученных экстрактах проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), состоящем из дегазатора DGU-20A$_5$, насоса LC20AD, автоматического дозатора SIL-20A, термостата колонок CTO-20AC, спектрофотометрического детектора на основе диодной матрицы SPD-M20A, масс-спектрометрического детектора LCMS2010EV. Изофлавоноиды разделяли на хроматографической колонке Luna C18 100A, 250 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) в режиме градиентного элюирования. Подвижной фазой являлась смесь ацетонитрил (A)–0.1%-ная муравьиная кислота (B): 0.01–7 мин от 70 до 65% B, 7–15 мин от 65 до 50% B, 15–20 мин от 50 до 40% B, 20–22 мин от 40 до 5% B, 22–23 мин 5% B, 23–28 мин от 5 до 70% B. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.35 мл/мин при температуре термостата колонки 30°C и объеме вводимой пробы 5 мкл. Сбор данных на диодно-матричном детекторе проводили в диапазоне длин волн 190–800 нм. При МС-детектировании веществ применили ионизацию электрораспылением: напряжение на детекторе 2 кВ, температура ионного источника 250°C, скорость потока азота 0.18 л/мин, скорость сканирования масс-спектра 2000 а. е. м./с, диапазон сканируемых масс 120–700 m/z. Анализ проводили в режиме отрицательной ионизации. Сбор и последующую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Изофлавоноиды идентифицировали сопоставлением времен удерживания, спектров поглощения и масс-спектров с аналогичными характеристиками стандартов индивидуальных соединений (табл. 2).

Градуировочные зависимости для дайдзеина, генистеина и формононетина в методе ВЭЖХ-ДМД-МС получали с использованием соответствующих стандартных образцов. Линейность отклика сигнала определяли для 10 уровней концентраций всех соединений в 70%-ном этаноле; в каждом случае проводили не менее трех параллельных определений одной концентрации раствора. Все градуировочные кривые строили по данным шести параллельных измерений. Для всех соединений градуировочный график линеен в диапазоне концентраций аналитов 0.1–10 мкг/мл с коэффициентами корреляции ≥0.999. Параметры ВЭЖХ-ДМД-МС-определения изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах соцветиях клевера лугового приведены в табл. 2. Концентрацию биоканина А определяли методом одного эталона, в качестве последнего использовали генистеин с учетом схожести спектральных характеристик этих соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор условий хроматографирования экстрактов клевера лугового. Высокая гидрофобность изофлавоноидов требует использования при хроматографических исследованиях подвижной фазы (**ПФ**) с большей долей неполярного элюента. В настоящей работе использовали хроматографическую колонку Luna C18 100A (250 × 2.0 мм, 5 мкм), которая обеспечивала разделение изофлавоноидов за 28 мин в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижных фаз опробовали смеси ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота и метанол–0.1%-ная муравьиная кисло-

Таблица 3. Некоторые хроматографические характеристики компонентов водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового, полученные для подвижных фаз различного состава и стандартных образцов дайдзеина, генистеина, формононетина

Хроматографический параметр	Ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота			Метанол–0.1%-ная муравьиная кислота		
	ДЗ	ГН	ФН	ДЗ	ГН	ФН
Стандартные образцы						
Разрешение (аналит/предшествующий пик)	9.7	11.5	8.5	12.1	5.2	7.0
Нагрузочный коэффициент	2.9	5.9	7.7	2.8	25.7	5.3
Экстракт соцветий клевера						
Разрешение (аналит/предшествующий пик)	1.3	2.2	21.2	0.27	2.0	0.9
Нагрузочный коэффициент	3.7	7.1	9.4	50.1	62.5	86.3

та. Некоторые хроматографические характеристики стандартных образцов ДЗ, ГН, ФН и компонентов экстракта соцветий клевера лугового, полученные с применением подвижных фаз различного состава, представлены в табл. 3.

Помимо целевых аналитов в экстрактах соцветий клевера присутствует большое количество компонентов матрицы, поэтому особого внимания требует разрешающая способность ПФ, учитывающая влияние ширины пика и размывания зоны на селективность разделения соседних веществ. Если величина разрешающей способности ПФ <1, то разделение веществ считается неполным, и наоборот. Альтернативным параметром, позволяющим оценить степень удерживания растворенного вещества по степени его взаимодействия с неподвижной фазой (**НФ**), является нагрузочный коэффициент, определяемый по отношению числа молекул вещества в НФ к числу молекул, находящихся в ПФ. Оптимальные значения данного параметра лежат в диапазоне от 2 до 10 [40]. Совокупность полученных данных по разрешающей способности ПФ и нагрузочному коэффициенту позволила выбрать в качестве оптимальной ПФ смесь состава ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота. Полученные в оптимальных условиях разделения хроматограммы водно-этанольного экстракта клевера лугового и смеси стандартных веществ приведены на рис. 1.

Подбор оптимального состава растворителя для экстракции изофлавоноидов. Эффективность извлечения изофлавоноидов оценивали по концентрациям дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в водно-спиртовых системах при УЗЭ из соцветий клевера лугового с различным содержанием этанола и метанола (30, 50, 70 и 100%, по объему). Из полученных диаграмм (рис. 2) видно, что качественный и количественный выход изофлавоноидов при использовании водно-спиртовых смесей различного состава в качестве

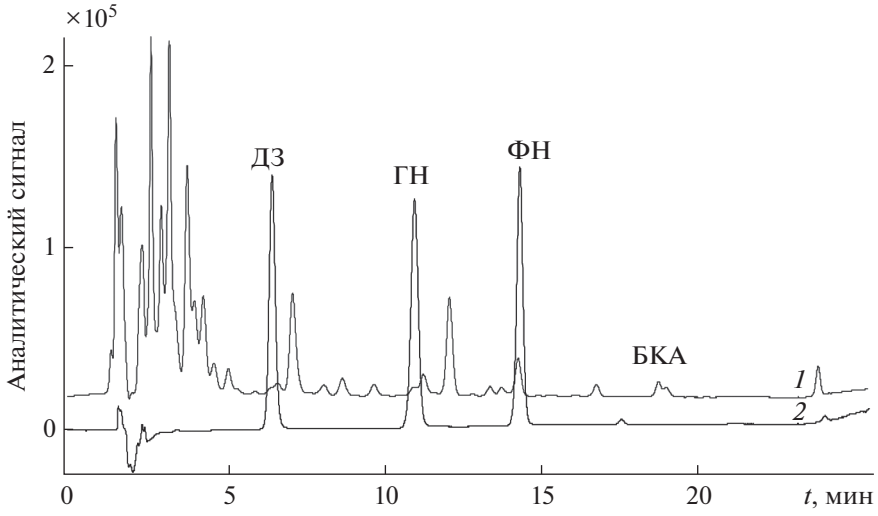

Рис. 1. Хроматограмма водно-этанольного экстракта клевера лугового (*1*) и стандартных образцов изофлавоноидов (*2*) в условиях ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа.

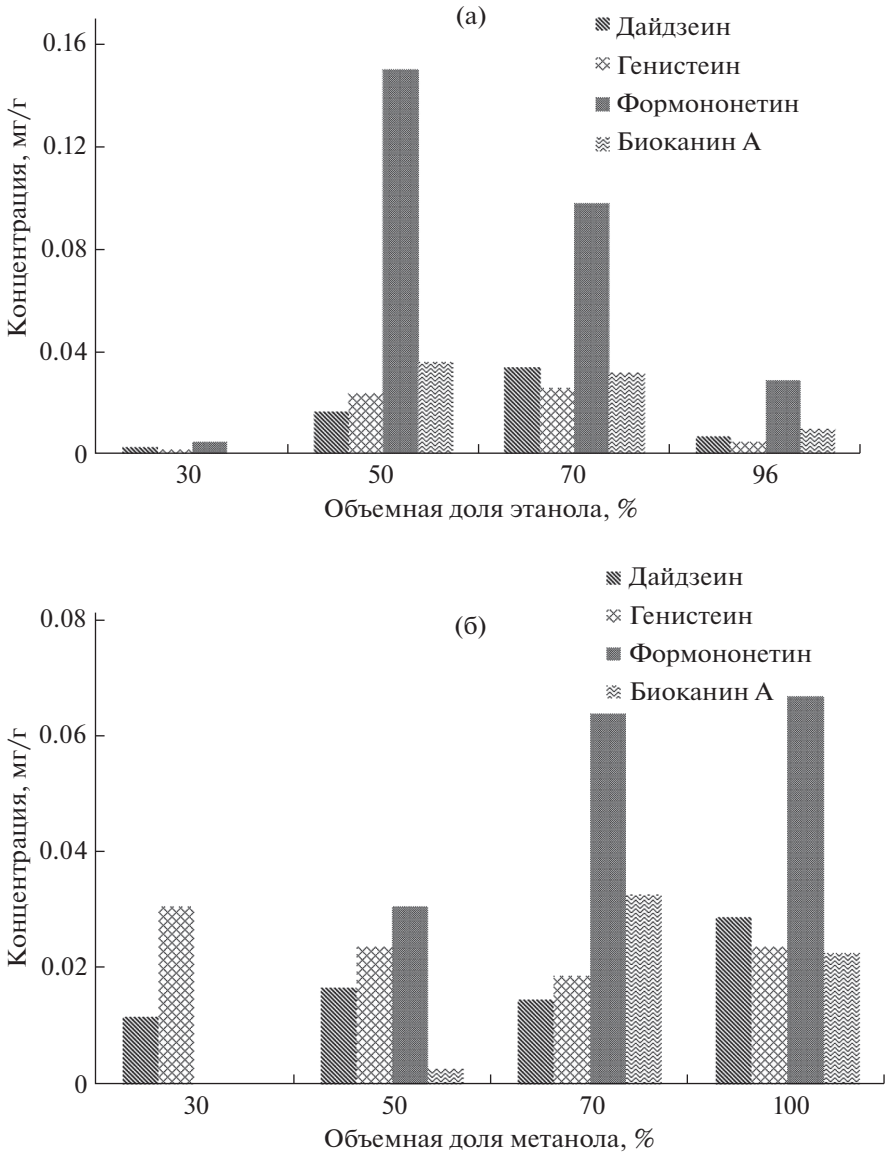

Рис. 2. Концентрации дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в этанольных (а) и метанольных (б) экстрактах соцветий клевера лугового, полученных с помощью ультразвуковой экстракции.

экстрагента разный. Максимальное суммарное извлечение изофлавоноидов метанолом достигается при его 100%-ном содержании и составляет 0.143 мг/г, включая 0.029 мг/г дайдзеина, 0.024 мг/г генистеина, 0.067 мг/г формононетина и 0.023 мг/г биоканина А. При использовании в качестве экстрагента этанола характер выхода изофлавоноидов иной. Максимальное суммарное извлечение изофлавоноидов (0.227 мг/г) наблюдается при использовании водно-этанольной системы с 50% этанола, причем 66% составляет формононетин – 0.150 мг/г. Выход изофлавоноидов более сбалансированный при экстракции 70%-ной водно-этанольной системой, которая суммарно извлекает 0.190 мг/г, включая 0.034 мг/г ДЗ, 0.026 мг/г ГН, 0.098 мг/г ФН и 0.032 мг/г БКА. Видно, что извлечение дайдзеина максимально при использовании 70%-ного этанола (0.034 мг/г), а генистеина – 30%-ного метанола (0.031 мг/г). С учетом полученных результатов 70%-ную водно-этанольную систему выбрали в качестве оптимального растворителя.

Эффективность экстракции изофлавоноидов из соцветий клевера лугового различными способами. Изучали и сравнивали различные способы экстракции – мацерацию, субкритическую, ультразвуковую, микроволновую и твердофазную экстракцию, а также экстракцию по Государственной фармакопее РФ. Полученные результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Концентрации (мг/г) изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах клевера лугового, полученных различными способами ($n = 6$, $P = 0.95$)

Соединение	Ультразвуковая экстракция	Микроволновая экстракция	Субкритическая экстракция	Мацерация	Экстракция по ГФ*
Дайдзеин	0.034 ± 0.005	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.029 ± 0.003	0.007 ± 0.001
Генистеин	0.026 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.003	0.051 ± 0.004	0.009 ± 0.002
Формононетин	0.098 ± 0.007	0.129 ± 0.003	0.210 ± 0.020	0.260 ± 0.020	0.043 ± 0.009
Биоканин А	0.032 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.340 ± 0.050	0.032 ± 0.009	0.041 ± 0.008
Суммарное содержание изофлавоноидов	0.190 ± 0.010	0.225 ± 0.009	0.598 ± 0.030	0.372 ± 0.010	0.100 ± 0.009

* Экстрагент – 96%-ный этанол.

В Государственной фармакопее РФ отсутствует способ экстракции фенольных соединений флавоноидного ряда из клевера лугового, но описан способ экстракции 96%-ным этанолом кипячением с обратным холодильником фенольных соединений флавоноидного ряда из высушенной и измельченной травы Донника (*Melilotus*), относящейся к семейству бобовые. Исходя из их принадлежности к одному семейству, этот способ экстракции применили по отношению к клеверу луговому. Согласно ГФ РФ, в экстракционную систему добавляют соляную кислоту, разрушающую гликозидные связи, что затрудняет определение нативных форм изофлавоноидов. В данных условиях из клевера лугового извлекли 0.007 мг/г ДЗ, 0.009 мг/г ГН, 0.043 мг/г ФН и 0.041 мг/г БКА (табл. 4). Сравнивая результаты, приведенные в табл. 1 и в табл. 4, можно отметить, что суммарное содержание изофлавоноидов в водно-этанольном экстракте ниже, что связано, по-видимому, с большим сродством ГН, ФН и БКА к метанолу. Степень экстракции ДЗ водно-этанольной смесью оказалась выше, чем 80%-ным метанолом. Недостатком данного способа являются длительность и трудоемкость, а также извлечение в экстракт большого количества посторонних компонентов.

Традиционно применяемым способом экстракции является мацерация. Основным недостатком данного способа извлечения изофлавоноидов является длительность, которая может достигать нескольких часов, а иногда и суток. С другой стороны, суммарное извлечение изофлавоноидов этим способом достаточно высокое и достигает 0.372 мг/г.

Наличие в изофлавоноидах полярных групп позволяет применить микроволновое излучение для их извлечения. Экстракцию целевых соединений проводили при 300–450 Вт; при более высокой мощности возможен разрыв клеточной стенки и извлечение в растворитель матричных компонентов. Выход целевых компонентов повышается с увеличением продолжительности микроволновой экстракции, но при этом возрастает и риск их деструкции. При микроволновом излучении выход дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А оказался более высоким по сравнению с ГФ. Суммарное содержание изофлавоноидов в полученных при МВЭ и ГФ извлечениях составило 0.225 и 0.100 мг/г соответственно. С другой стороны, МВЭ по эффективности уступает способам субкритической экстракции и мацерации (табл. 4).

Субкритическую экстракцию изофлавоноидов проводили 70%-ным этанолом при повышенных температуре и давлении. Величина суммарного извлечения изофлавоноидов (0.598 мг/г) показала, что такой способ является наиболее эффективным. По количеству извлеченного дайдзеина субкритическая экстракция сопоставима с МВЭ (0.015 и 0.014 мг/г соответственно), но почти в два раза менее эффективна, чем УЗЭ и мацерация (табл. 4). Низкие содержания дайдзеина в экстрактах при использовании МВЭ и СЭ возможны из-за его вероятной деструкции под воздействием микроволнового излучения, нагревания или повышенного давления.

Одним из распространенных способов извлечения изофлавоноидов из растительного сырья считается ультразвуковая экстракция, которая более экспрессна и позволяет использовать широкий набор растворителей. Дайдзеин и биоканин А в условиях УЗЭ извлекаются в количествах, сопоставимых с экстракцией мацерацией. Содержание генистеина в извлечении (0.026 мг/г) сопоставимо с результатами МВЭ (0.031 мг/г) и субкритической экстракции (0.033 мг/г), а также с полученными другими авторами и приведенными в табл. 1 данными по ЖЭ 80%-ным метанолом, но меньше, чем при использовании мацерации (0.051 мг/г).

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что наиболее эффективным способом извлечения изофлавоноидов является субкритиче-

Таблица 5. Степень извлечения (%) изофлавоноидов из водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового различными сорбентами ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Strata X	Strata C18-E	Oasis HLB	Isolute ENV+
Дайдзеин	92 ± 6	н.о.*	17.3 ± 0.5	н.о.
Генистеин	56 ± 4	н.о.	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.3
Формононетин	40 ± 6	1.7 ± 0.6	3.3 ± 0.6	н.о.
Биоканин А	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	н.о.	н.о.

*н.о. – не обнаружено.

ская экстракция. Наибольшее количество формононетина извлекается из соцветий клевера лугового способами мацерации (0.260 мг/г) и субкритической экстракции (0.210 мг/г). Наибольшее количество биоканина А содержится в экстрактах, полученных субкритической экстракцией (0.340 мг/г). Полученный нами результат в два раза выше значений, полученных авторами работы [15], но в три раза меньше данных [16], приведенных в табл. 1. Генистеин более эффективно извлекается мацерацией (0.051 мг/г), а экстракция дайдзеина под действием сильного внешнего воздействия падает. Можно заключить, что способ экстракции необходимо выбирать, исходя из поставленных конкретных задач.

Для концентрирования целевых компонентов и очистки экстрактов можно использовать твердофазную экстракцию изофлавоноидов с сорбентами различных типов. Изучена ТФЭ изофлавоноидов из водно-этанольных экстрактов соцветий клевера с использованием различных сорбентов – Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB и Isolute ENV+. Десорбцию аналитов проводили 100%-ным метанолом, который наиболее часто применяется для этих целей. В выбранных условиях наблюдаются низкие степени реэкстракции целевых соединений (табл. 5), что может быть связано с необратимой сорбцией аналитов на материалах сорбентов. Исключением по отношению к ДЗ является сорбент Strata X, который количественно его извлекает ($R = 92\%$) при незначительном концентрировании и обеспечивает очистку экстракта от мешающих компонентов (рис. 3). Полученные на сегодняшний день данные по ТФЭ не позволяют рекомендовать данный способ для концентрирования всех целевых компонентов, здесь, по-видимому, требуется проведение дальнейших изысканий.

Определение содержания изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового. В оптимизированных условиях извлечения изофлавоноидов анализировали водно-этанольные экстракты различных частей клевера лугового – листья, стебли и соцветия (табл. 6). Содержание изофлавоноидов (0.190 мг/г) максимально в водно-этанольном экстракте соцветий. Концентрации изофлавоноидов в морфологических частях клевера лугового отличны от данных, приведенных в табл. 1. Объективно прокомментировать данные отличия не представляется возможным,

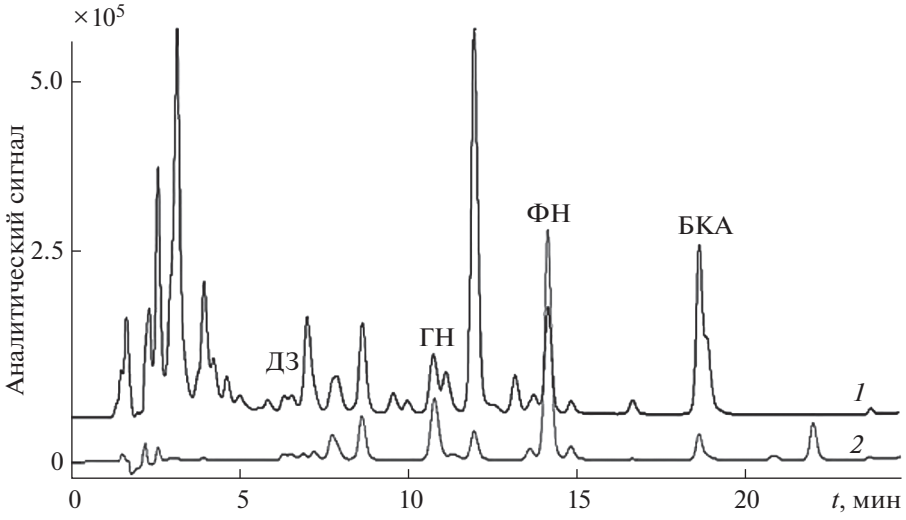

Рис. 3. Хроматограмма водно-этанольного экстракта клевера лугового до (*1*) и после (*2*) твердофазной экстракции в условиях ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа.

Таблица 6. Концентрации (мг/г) изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах разных морфологических частей клевера лугового ($n = 3$, $P = 0.95$)

Часть растения	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Суммарное содержание изофлавоноидов
Соцветия	0.034 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.098 ± 0.007	0.032 ± 0.006	0.190 ± 0.010
Листья	0.003 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.021 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.070 ± 0.006
Стебли	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.022 ± 0.004

так как полную идентичность условий произрастания, времени сбора, получения экстрактов клевера лугового из публикаций установить не удалось.

Для повышения выхода некоторых изофлавоноидов ряд исследователей в состав экстракционных систем добавляли соляную или трифторуксусную кислоту, которые разрушают гликозидные связи. Такой подход искажает данные о количественном содержании нативных форм изофлавоноидов.

* * *

Таким образом, изучено извлечение нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), полученные мацерацией, микроволновым, ультразвуковым, субкритическим и фармакопейными способами. Наибольшую эффективность по извлечению изофлавоноидов показали ультразвуковая и субкритическая экстракция. Максимально формононетин (0.260 мг/г) и генистеин (0.051 мг/г) извлекаются мацерацией, биоканин А – субкритической экстракцией (0.340 мг/г), а дайдзеин – ультразвуковым способом (0.034 мг/г) из соцветий клевера лугового. Установлены содержания изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового – максимальное суммарное содержание которых (0.190 мг/г) наблюдается в водно-этанольном экстракте соцветий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (проект № FZEN-2020-0022) с использованием научного оборудования ЦКП "Эколого-аналитический центр" Кубанского госуниверситета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meghwal M., Sahu C.K.* Soy isoflavonoids as nutraceutical for human health: An update // J. Cell Sci. Ther. 2015. V. 6. № 1. P. 1.
2. *Беркегейм М.Л.* Фитоэстрогены // Проблемы репродукции. 2000. № 3. С. 12.
3. *Карпук В.В.* Фармакогнозия. Минск: БГУ, 2011. 334 с.
4. *Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П.* Фармакогнозия. М.: Медицина, 2007. 656 с.
5. *Дренин А.А., Ботиров Э.Х.* Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium* L. Структурное разнообразие и биологическая активность // Химия растительного сырья. 2017. № 3. С. 39.
6. *Krenn L., Unterrieder I., Ruprechter R.* Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 2002. № 777. P. 123.
7. *Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J.C., McRae K.* Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 5797.
8. *Lemeziene N., Padarauskas A., Butkute B., Ceseviciene J.* The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage // Zemdirbyste. 2015. V. 4. № 102. P. 443.
9. *Ercetin T., Toker G., Kartal M., Colgecen H.* In vitro isoflavonoid production and analysis in natural tetraploid *Trifolium pratense* (red clover) calluses // Rev. Bras. Farmacogn. 2012. V. 5. № 22. P. 964.
10. *Visnevschi-Necrasov T., Faria M., Cunha S., Harris J., Meimberg H., Curto M., Pereira M., Oliveira M., Nunes E.* Isoflavone synthase (IFS) gene phylogeny in *Trifolium* species associated with plant isoflavone contents // Plant Syst. Evol. 2013. № 299. P. 299.
11. *Reis A., Scopel M., Zuanazzi J. Trifolium pratense*: Friable calli, cell culture protocol and isoflavones content in wild plants, in vitro and cell cultures analyzed by UPLC // Rev. Bras. Farmacogn. 2018. № 28. P. 542.
12. *Lemeziene N., Padarauskas A., Butkute B., Ceseviciene J., Taujenis L., Norkeviciene E., Mikaliuniene J.* The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage // Zemdirbyste-Agriculture. 2015. V. 102. № 4. P. 443.
13. *Carlsen S., Pedersen H., Spliid N., Fomsgaard I.* Fate in soil of flavonoids released from white clover (*Trifolium repens* L.) // Appl. Environ. Soil Sci. 2011. V. 2012. P. 1.
14. *Dabkeviciene G., Butkute B., Lemeziene N., Jakstas V., Vilcinskas E., Janulis V.* Distribution of formononetin, daidzein and genistein in *Trifolium* species and their aerial plant parts // Chemija. 2012. V. 23. № 4. P. 306.
15. *Colgecen H., Koca Caliskan U., Kartal M., Buyukkartal H.* Comprehensive evaluation of phytoestrogen accumulation in plants and in vitro cultures of *Medicago sativa* L. 'Elçi' and natural tetraploid *Trifolium pratense* L. // Turk. J. Biol. 2014. № 38. P. 619.
16. *Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J.C., McRae K.* Isoflavone profiles of red clovers and their distribution

in different parts harvested at different growing stages // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 5797.

17. *Zgorka G.* Ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with photodiode-array and fluorescence detection for chemotaxonomy of isoflavone phytoestrogens in *Trifolium* L. (Clover) species // J. Sep. Sci. 2009. № 32. P. 965.
18. *Booth N., Overk C., Yao P., Totura S., Deng Y., Hedayat A., Bolton J., Pauli G., Farnsworth N.* Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) Isoflavones and estrogenic activity // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 1277.
19. *Krenn L., Unterrieder I., Ruprechter R.* Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 2002. № 777. P. 123.
20. *Renda G., Yalcın F., Nemutlu E., Akkol E., Suntar I., Keles H., Ina H., Calıs I., Ersoz T.* Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients // J. Ethnopharmacol. 2013. № 148. P. 423.
21. *Wu Q., Wang M., Simon J.E.* Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds // J. Chromatogr. B. 2004. № 812. P. 325.
22. *Kowalska I., Jedrejek D., Ciesla L., Pecio L., Masullo M., Piacente S., Oleszek W., Stochmal A.* Isolation, chemical and free radical scavenging characterization of phenolics from *Trifolium scabrum* L. aerial parts // J. Agric. Food Chem. 2013. № 61. P. 4417.
23. *Huie C.W.* A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants // Anal. Bioanal. Chem. 2002. № 373. P. 23.
24. *Benedetti B., Carro M. Di, Mirasole C., Magi E.* Fast derivatization procedure for the analysis of phytoestrogens in soy milk by gas chromatography tandem mass spectrometry // Microchem. J. 2018. V. 137. P. 62–70.
25. *Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H.* Techniques for analysis of plant phenolic compounds // Molecules. 2013. № 18. P. 2328.
26. *Jeong S., Chang M., Choi S., Oh S., Wu H., Zhu Y., Gao X., Wang X., Zhang B., Lim D., Lee J., Kim S., Song Y.* Estrogenic effects of phytoestrogens derived from *Flemingia strobilifera* in MCF-7 cells and immature rats // Arch. Pharm. Res. 2018. V. 41. № 5. P. 57.
27. *Spagnuolo P., Rasini E., Luini E., Legnaro M., Luzzani M., Casareto E., Carreri M., Paracchini S., Marino F., Cosentino M.* Isoflavone content and estrogenic activity of different batches of red clover (*Trifolium pratense* L.) extracts: An in vitro study in MCF-7 cells // Fitoterapia. 2014. № 94. P. 62.
28. *Zarena A.S., Sankar K.U.* Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia Mangostana* L.) pericarp // J. Food Biochem. 2012. № 36. P. 627.
29. *Yingngam B., Brantner A., Jinarat D., Kaewamatawong R., Rungseevijitprapa W., Suksamrarn A., Piyachaturawat P., Chokchaisiri R.* Determination of the marker diarylheptanoid phytoestrogens in Curcuma comosa Rhizomes and selected herbal medicinal products by HPLC-DAD // Chem. Pharm. Bull. 2018. № 66. P. 65.
30. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. 14. Москва, 2018. Т. 4. С. 6020.
31. *Vinatoru M.* An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs // Ultrason. Sonochem. 2001. № 8. P. 303.
32. *Biesaga M.* Influence of extraction methods on stability of flavonoids // J. Chromatogr. A. 2011. № 1218. P. 2505.
33. *Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A.* New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources // Planta Med. 2013. № 79. P. 514.
34. *Ekezie F., Sun D., Cheng J.* Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments // Trends Food Sci. Technol. 2017. № 67. P. 160.
35. *Lauberts M., Lauberte L., Arshanitsa A., Dizhbite T.* Structural transformations of wood and cereal biomass components induced by microwave assisted torrefaction with emphasis on extractable value chemicals obtaining // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2018. № 134. P. 1.
36. *Kronholm J., Hartonen K., Riekkola M.* Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures // Trends Anal. Chem. 2007. V. 26. № 5. P. 396.
37. *Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi A., Casabianca H.* Essential oils: From extraction to encapsulation // Int. J. Pharm. 2015. № 483. P. 220.
38. *Милевская В.В., Статкус М.А., Темердашев З.А., Киселева Н.В., Бутыльская Т.С., Шилько Е.А.* Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 7. С. 768. (*Milevskaya V.V., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Butyl'skaya T.S., Shil'ko E.A., Statkus M.A.* Extraction and determination of biologically active components of St. John's wort and its pharmaceutical preparations // J. Anal. Chem. 2016. V. 71. № 7. P. 741.)
39. Представление результатов химического анализа (рекомендации IUPAC 1994 г.) // Журн. аналит. химии. 1998. Т. 53. № 9. С. 999.
40. *Рили С.М.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы и решение прикладных задач. Пер. с англ. Лапина Б.П. / Под ред. Лоу У.Дж., Уайнер И.У. М.: Мир, 1982, 271 с.