Определение суммарного содержания антиоксидантов полифенольного типа по УФ спектру поглощения смеси

И.В. Власова[1]®, Т.Г. Цюпко[2], А.С. Шелпакова[1]

[1]® Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского,
пр. Мира, 55А, Омск, 644077, Россия, vlaso-iri@yandex.ru
[2] Кубанский государственный университет,
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040, Россия

Поступила: *16 августа 2011 г* / Подписана к печати: *3 октября 2011 г*

Суммарное содержание антиоксидантов полифенольного типа в диапазоне 20–300 мкмоль/л можно определять с погрешностью, не превышающей 5% отн., по собственному поглощению исследуемой смеси в УФ области спектра, используя хемометрические методы множественной линейной регрессии или проекции на латентные структуры. Обсуждается возможность развития и применения этого прецизионного метода для анализа смесей с неизвестным качественным составом.

I.V. VLASOVA, T.G. TSYPKO, A.S. SHELPAKOVA. *DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANTS (POLYPHENOLS) CONTENT WITH UV SPECTRA OF MIXTURE. It is possible to determine the total content of antioxidants (polyphenols, 20–300 μmol/l) by chemometric methods - multiple linear regression or projection to latent structures, with UV spectra of mixture. Corresponding errors are less than 5% rel. The possibilities to develop this precision method and to utilize it for analysis of mixtures with unknown qualitative composition are discussed.*

Ключевые слова: антиоксиданты, суммарное содержание, спектрофотометрический анализ, хемометрические методы, анализ пищевых продуктов

Keywords: antioxidants, total content, spectrophotometric analysis, chemometric methods, foodstuff analysis

Непрерывно растущий интерес к антиоксидантам (**АО**) вызван их способностью блокировать воздействие свободных радикалов и защищать человека от ряда опасных заболеваний [1]. Важнейшими антиоксидантами являются полифенолы (рутин, кверцетин, галловая кислота и т.п.). Создано множество методик хроматографического определения индивидуальных АО этого типа в пищевых продуктах, в крови, тканях, лекарственных растениях и биологически активных добавках [2]. Не менее важно точно определить суммарное содержание антиоксидантов (**ΣC_{AO}**, моль/л), однако это более сложная и в целом не решенная аналитическая задача.

Известны экспрессные методики спектрофотометрического определения ΣC_{AO}, не требующие разделения компонентов смеси. Такие методики основаны на регистрации спектра поглощения пробы в ближней ИК области (**БИК**-спектрометрия) и обработке полученных данных с применением хемометрических алгоритмов [3]. Так, используя алгоритмы проекции на латентные структуры (**PLS**), китайские исследователи определяли общее содержание полифенолов в образцах зеленого чая [4]. При этом для построения моделей (многомерных градуировок) индивидуальные полифенолы не использовались, а опорные значения ΣC_{AO} получали, анализируя часть образцов по стандартной методике Фолина-Чиокальтеу [5]. БИК-спектрометрию применяли и при определении некоторых антиоксидантов в винах [6]. В этом случае градуировки строили по опорным значениям, полученным методом ВЭЖХ.

Широкому применению подобных методик мешает низкая чувствительность спектрометрического анализа в БИК области, а также недостаточная изученность качественного состава природных смесей АО, затрудняющая построение многомерных градуировок по индивидуальным соединениям. Поэтому на практике вместо ΣC_{AO} обычно определяют интегральный показатель - суммарную антиоксидантную активность (**АОА**) изучаемых объектов (см. обзоры [7,8]). Показатель АОА нередко определяют спектрофотометрическим методом, обрабатывая исследуемую смесь избытком реагента, одновременно реагирующего с разными АО и дающего одни и те же интенсивно окрашенные продукты. Примером может быть определение суммарного содержания полифенолов по их реакции с избытком Fe^{3+} в присутствии трипиридилтриазина, 1,10-фенантролина, 2,2`-дипиридила и т.п. (так называемый метод FRAP) [9]. Под действием антиоксидантов-восстановителей в растворе образует-

ся окрашенный комплекс железа(II) с фотометрическим реагентом; к сожалению, при этом не исключены побочные реакции и отклонения от аддитивности [10]. Величину АОА рассчитывают по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества $X_{ст}$, например, аскорбиновой кислоты [11]. Как правило, АОА выражают в пересчете на $X_{ст}$, то есть указывают массу или число молей $X_{ст}$, которые в данных условиях дают такой же аналитический сигнал, что и 1 г изучаемого объекта. Естественно, в этом случае величина АОА зависит не только от $\Sigma C_{АО}$, но и от качественного состава пробы, от выбора $X_{ст}$, а также от условий измерения сигнала. Из-за этого АОА может непредсказуемо отличаться от $\Sigma C_{АО}$ (иногда в несколько раз) [12]. Это не мешает использовать АОА для сопоставления однотипных объектов, но не позволяет сравнивать разнотипные объекты или результаты, полученные разными авторами.

Таким образом, актуальной задачей является разработка новых способов определения суммарного содержания антиоксидантов (полифенолов). В этой связи следует рассмотреть возможность определения $\Sigma C_{АО}$ по спектру поглощения раствора пробы в УФ области, без введения дополнительных реагентов.

Известно, что молярные коэффициенты поглощения полифенолов в УФ области значительно выше, чем коэффициенты поглощения тех же соединений в ближней ИК области. Однако УФ спектрометрию для определения суммарного содержания полифенолов в неразделенных смесях ранее не использовали; во всяком случае, в известной нам литературе по антиоксидантам соответствующих публикаций нет. Отметим, что качество коньяков нередко оценивают по величине так называемого «коньячного пика» при 280 нм; этот пик в спектре пробы обусловлен присутствием ряда полифенолов, а также лигнина и продуктов этанолиза [13]. Оценить суммарное содержание полифенолов в подобных объектах трудно, так как спектры поглощения индивидуальных полифенолов в УФ области налагаются друг на друга, хотя и различаются по положению максимумов, а молярные коэффициенты поглощения разных полифенолов при фиксированной аналитической длине волны (**АДВ**) сильно различаются, иногда в 10-20 раз.

Поэтому точное количественное определение $\Sigma C_{АО}$ по интенсивности светопоглощения при 280 нм, как и при любой другой фиксированной АДВ, невозможно. В подобных случаях можно определять концентрации индивидуальных компонентов методами многоволновой спектрофотометрии, используя многомерные градуировки [14,15], а затем суммировать найденные концентрации. Можно ожидать, что «хемометрическое» определение $\Sigma C_{АО}$ по поглощению исследуемой смеси в УФ области будет точнее, чем метод FRAP, и чувствительнее, чем многоволновая БИК-спектрометрия.

Целью настоящего исследования стала проверка вышеприведенных предположений. Объектами исследования были модельные смеси водорастворимых полифенолов. Влияние посторонних веществ на результаты спектрометрического определения $\Sigma C_{АО}$, способы устранения этого влияния и соответствующие методики анализа природных объектов в настоящем сообщении не рассматриваются.

Эти вопросы требуют специального исследования и детального обсуждения в следующих сообщениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе работы использовали водные растворы, содержащие заданные количества индивидуальных антиоксидантов полифенольного типа, а именно, галловой (ГК) и кофейной (КК) кислот, кверцетина (КВ), катехола (пирокатехина, КТ), рутина (РТ) и аскорбиновой кислоты (АК). Последний антиоксидант не относится к полифенолам, но обычно сопутствует этим веществам в реальных объектах [1]. Исходные растворы готовили по точным навескам реактивов х.ч., используя в качестве основного растворителя бидистиллированную воду и/или этанол. Рабочие растворы готовили путем разбавления исходных растворов бидистиллированной водой, подкисленной HCl до pH 3,6. Затем готовили пятикомпонентные смеси, различающиеся по набору и по содержанию индивидуальных антиоксидантов. Концентрации компонентов составляли от 1 до 100 мкмоль/л, а суммарное содержание АО не превышало 340 мкмоль/л. Соотношения компонентов подбирали так, чтобы оптическая плотность смеси при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения, находилась в диапазоне 0.2 – 0.8, а вклады всех компонентов были статистически значимы. Всего было приготовлено более 40 смесей двух основных типов. Часть смесей каждого типа использовали для формирования обучающих выборок (таблица 1) и расчета математических моделей, а остальные в качестве тестовых - для проверки точности результатов анализа.

Спектры поглощения приготовленных растворов регистрировали в диапазоне 190 – 400 нм на спектрофотометре Agilent 8453 с диодной матрицей, в кварцевой кювете толщиной 10 мм. Раствором сравнения служила бидистиллированная вода. Значения оптической плотности (А) измеряли с шагом 1 нм. Повторные измерения оптической плотности одного и того же раствора характеризуются нормальным распределением случайных погрешностей, при $0,2 < A < 0,8$ величина s_r не превышает 0,003 ($n = 5$). При фотометрировании повторно приготовленных растворов s_r возрастает до 0,02 – 0,05. Статистическую обработку результатов вели по Стьюденту по 3-5 параллельным измерениям (P=0,95). Проверку аддитивности сигналов проводили по 3S-

критерию [10], используя бинарные смеси индивидуальных АО, причем молярные концентрации компонентов были одинаковыми - по 30 мкМ.

Математические модели рассчитывали с помощью двух хемометрических методов – множественной линейной регрессии в варианте непрямой градуировки (**MLR**) и проекции на латентные структуры (PLS) [3]. Для реализации MLR использовали разработанную в ОмГУ программу *Optic-MLR* [16], для PLS – известную программу *The Unscrumbler Client 9.8* (лицензионная версия предоставлена компанией CAMO). В рамках каждого метода рассчитывали содержания компонентов тестовых смесей, используя ранее полученные модели (многомерные градуировки), а затем вычисляли суммарное содержание антиоксидантов (мкмоль/л). По разности действительных и рассчитанных значений $\Sigma C_{АО}$ находили относительные погрешности (δC, %). Регистрацию и расшифровку спектра каждой пробы повторяли три раза, что позволяло вычислять относительные стандартные отклонения (s_r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке приведены спектры поглощения однокомпонентных водных растворов индивидуальных антиоксидантов, а также спектр их смеси. Видно, что все соединения поглощают в одном и том же диапазоне длин волн, областей специфического поглощения нет. На всех АДВ растворы индивидуальных АО подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера.

Проверка аддитивности светопоглощения смесей показала, что в области 250-350 нм отклонения от аддитивности (**ΔA**) статистически незначимы для всех исследованных систем. В области 190-240 нм для некоторых бинарных смесей были выявлены небольшие (менее 10%), но статистически значимые **Δ**A, вероятно связанные с образованием полифенольных ассоциатов. Именно поэтому в дальнейшем, независимо от выбора спектрального диапазона, для расчета концентраций использовали алгоритмы MLR и PLS, малочувствительные к **Δ**A [15]. Для большей надежности сумму антиоксидантов лучше определять, не используя «проблемный» спектральный интервал 190-240 нм.

Анализ смесей с применением метода MLR.

Регрессионные коэффициенты всех компонентов вычисляли отдельно для смесей 1 и 2 типа, используя полученные в интервале 230-290 нм спектры поглощения смесей из соответствующей обучающей выборки. Очень важно правильно подобрать состав выборки. В наших экспериментах обучающие выборки включали по 10 пятикомпонентных смесей (таблица 1). Концентрации компонентов этих смесей заранее подбирали с применением алгоритма [16], минимизирующего функционал случайных погрешностей. Регрессионные коэффициенты, вычисленные для каждого соединения, были весьма близки, но не тождественны молярным коэффициентам поглощения того же соединения на тех же длинах волн. Тестовые наборы состояли из 12 смесей 1 типа и 8 смесей 2 типа. Результаты анализа смесей 1 типа представлены в таблице 2. Видно, что в большинстве случаев относительные погрешности составляют всего 1-2%, в целом же оценки суммарных содержаний (на уровне 50-100 мкмоль/л) не превышают 5% отн. (по модулю). Коэффициент линейной корреляции для зависимости «введено-найдено» составил 0,964. Примерно такие же значения метрологических характеристик получали в ходе анализа смесей второго типа.

Таблица 1. Составы смесей, использованных при составлении обучающих выборок

Модель, тип смеси	Аналит	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
MLR, смеси 1 типа	**АК**	71	3	4	28	75	65	7	75	35	3	-
	ГК	6	6	6	38	52	65	64	6	65	64	-
	КВ	30	30	30	2	30	30	2	2	2	30	-
	КК	3	65	65	3	3	20	65	47	65	3	-
	РТ	35	21	3	35	3	3	35	35	3	35	-
	$\Sigma C_{АО}$	**135**	**125**	**108**	**106**	**163**	**183**	**173**	**165**	**170**	**135**	**-**
PLS, смеси 2 типа	**АК**	10	6	42	65	9	45	75	3	75	74	33
	ГК	25	5	40	60	65	65	5	64	5	55	33
	КВ	25	30	15	15	30	1	30	22	2	1	13
	КТ	15	5	10	30	50	10	45	165	65	175	90
	РТ	20	35	7	5	3	35	3	35	35	35	20
	$\Sigma C_{АО}$	**95**	**81**	**114**	**175**	**157**	**156**	**158**	**289**	**182**	**340**	**189**

Примечание. Указаны номера смесей и содержания аналитов (мкмоль/л)

© И.В. Власова, Т.Г. Цюпко, А.С. Шелпакова

Таблица 2. Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов методом MLR в тестовых смесях первого типа

№	ΣC_{AO}, мкмоль/л		δC, %	s_r
	Введено	Найдено		
1.1	67	70.1	4.7	0.002
1.2	70	73.0	4.3	0.001
1.3	73	74.9	2.6	0.002
1.4	83	83.5	0.6	0.006
1.5	89	90.5	1.7	0.005
1.6	77	74.8	-2.8	0.030
1.7	78	74.1	-5.0	0.015
1.8	81	80.8	-0.2	0.006
1.9	69	70.8	-0.5	0.006
1.10	69	70.8	2.7	0.018
1.11	66	67.3	1.9	0.005
1.12	85	86.0	1.2	0.004

Следует отметить, что индивидуальные соединения определяются по методу MLR с гораздо большими погрешностями, чем суммарные содержания антиоксидантов. Как правило, погрешности определения индивидуальных соединений составляли 10-20% отн. (по модулю). В отдельных пробах концентрации микрокомпонентов определялись с 30- и даже 50-процентной погрешностью. Однако неточность определения микрокомпонентов слабо влияет на оценку общего содержания антиоксидантов.

Очевидно, метод множественной линейной регрессии с непрямой градуировкой позволяет достаточно точно определять суммарные содержания антиоксидантов в смесях известного качественного состава, несмотря на возможные отклонения от аддитивности светопоглощения. Тем не менее, данный метод имеет существенный недостаток – содержания индивидуальных АО, прежде всего микрокомпонентов, определяются весьма неточно. Приемлемая точность оценки суммарных содержаний достигается лишь компенсацией случайных погрешностей разного знака, получаемых для компонентов смеси.

Анализ смесей с применением алгоритма PLS.

В этом случае многомерные градуировки получали, используя обучающие выборки, состоящие из 11 смесей известного состава. Обучающие выборки включали так называемую центральную смесь (таблица 1, смесь №11), в которой содержания каждого из антиоксидантов примерно соответствовали средним содержаниям АО в смесях данного типа [14]. В остальных десяти смесях содержания отдельных компонентов меняли по отношению к центральной смеси как в большую, так и в меньшую сторону.

Результаты анализа тестовых смесей второго типа с использованием полученных многомерных градуировок представлены в таблице 3. Аналогичные данные получены и для смесей первого типа. Видно, что погрешности определения суммарных содержаний АО по методу PLS не превышают 3% отн. Это несколько лучше, чем при использовании MLR, но различие нельзя считать статистически достоверным. Зато переход к методу PLS достоверно снижает погрешности определения индивидуальных АО. Как правило, погрешности PLS-определения индивидуальных АО не превышают 10%. Преимущества метода PLS особенно заметны при определении микрокомпонентов, в частности, кверцетина и рутина.

Как показали дополнительные эксперименты, УФ-спектрометрическое определение суммарных содержаний АО возможно, начиная с концентрационного уровня 10-20 мкмоль/л. Пробы с меньшим суммарным содержанием дают слишком низкие значения оптической плотности (в 1-сантиметровой кювете). Это усиливает влияние случайных погрешностей и снижает точность оценки суммарных содержаний. Точность оценки снижается и в случае определения очень высоких содержаний, при ΣC_{AO} > 350 мкмоль/л.

Возможность анализа смесей с не полностью известным качественным составом. Усложнение моделей

При определении суммарного содержания антиоксидантов в пищевых продуктах качественный состав исследуемых смесей обычно известен не полностью. Неизвестно и соотношение концентраций индивидуальных антиоксидантов. Поэтому ни для метода MLR, ни для метода PLS нельзя заранее сконструировать обучающие выборки, точно отвечающие составу будущих объектов анализа. Следовательно, нельзя получить оптимальные математические модели, обеспечивающие (в соответствии с алгоритмом [16]) максимальную точность результатов анализа.

Выходом может быть использование референтных методик, позволяющих установить опорные значения ΣC_{AO} (такой подход использован в работах [4,6, 17]). Если же надежных референтных методик определения ΣC_{AO} нет, выходом может стать построение универсальных многомерных градуировок, не требующих знания качественного состава каждой исследуемой пробы.

Для этого надо будет составить базу данных (**БД**) по регрессионным коэффициентам как можно большего числа антиоксидантов, используя спектры поглощения, полученные для смесей известного состава в одинаковых условиях. Используя эту базу данных, можно будет получить математическую модель, пригодную для оценки содержания индивидуальных АО в смесях произвольного состава. С помощью такой модели по спектру единичной пробы можно будет рассчитывать концентрации всех соединений, входящих в исходную БД.

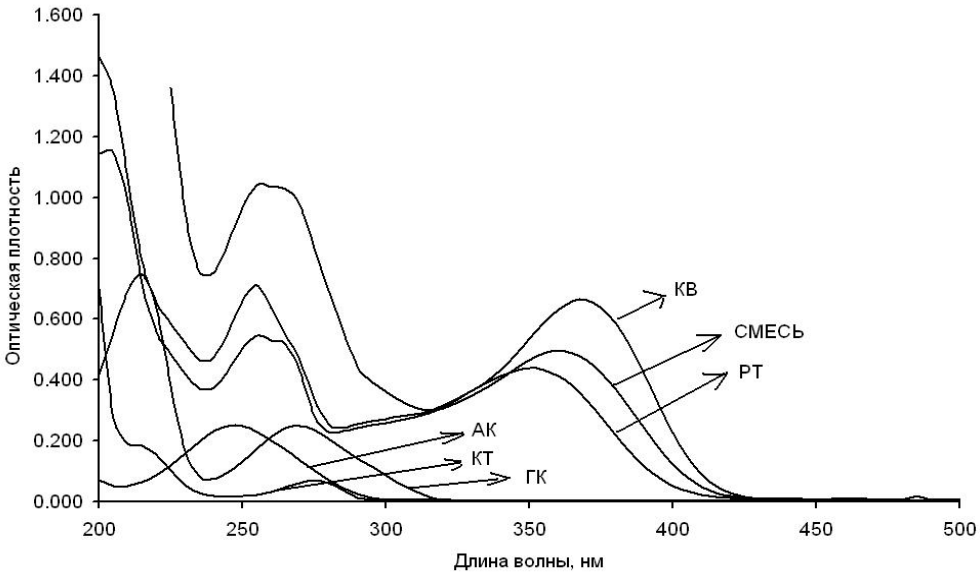
Таблица 3. Относительные погрешности определения индивидуальных АО и их суммы в тестовых смесях 2 типа с применением метода PLS

№ смеси	*δC*, % для индивидуальных АО					Сумма АО		
	АК	ГК	КВ	КТ	РТ	Введено, мкмоль/л	Найдено, мкмоль/л	*δC*, %
2.1	-7.8	3.2	3.6	4.1	-4.5	148.0	161.4	2.8
2.2	10.1	-10.4	1.3	1.7	-2.3	118.0	117.6	-0.3
2.3	10.5	-5.7	9.9	-4.3	-0.3	96.0	95.3	-0.7
2.4	4.4	-5.1	10.5	-0.4	-0.8	235.0	235.0	0.0
2.5	9.6	-2.6	-2.5	1.7	-0.8	190.0	191.3	0.7
2.6	-6.1	4.1	-0.2	4.3	-8.9	222.0	221.9	0.0
2.7	-1.3	-12.9	-1.3	-2.4	6.8	244.0	238.6	-2.2
2.8	-6.3	-5.0	1.9	1.9	-0.6	183.0	181.2	-1.0

Таблица 4. Результаты анализа пятикомпонентных смесей 1 и 2 типа с применением объединенной математической MLR-модели

Тип смеси	№ смеси	Найдено, мкмоль/л							*δC*, %
		АК	ГК	КВ	РТ	**КТ**	**КК**	$\Sigma C_{AO.}$	
1	1.1	5.9	9.0	14.8	7.5	***-3.8***	31.4	68.6	2.3
	1.2	8.7	8.9	15.1	7.2	***-3.0***	31.7	71.6	2.1
	1.6	26.7	9.7	2.6	12.6	***-1.9***	23.8	75.4	2.2
2	2.2	46.5	37.1	13.1	8.8	1.4	***0.1***	106.9	-5.5
	2.3	69.5	56.9	12.9	7.9	18.2	***-0.6***	165.4	-6.7
	2.6	37.7	30.6	10.5	22.3	75.2	***-0.1***	176.3	6.2

Примечание. Названия и содержания полифенолов, отсутствующих в соответствующих смесях, выделены шрифтом.



© И.В. Власова, Т.Г. Цюпко, А.С. Шелпакова

Рис 1. Спектры поглощения растворов индивидуальных АО и их смеси (концентрации: ГК и АК – по 30 мкмоль/л, КВ и РТ – по 15 мкмоль/л, КТ – 85 мкмоль/л)

Для отсутствующих в данной пробе соединений найденные концентрации окажутся нулевыми или отрицательными, а для присутствующих – положительными и приблизительно правильными

Это позволит уточнить качественный состав смеси антиоксидантов. Естественно, суммирование концентраций идентифицированных соединений позволит оценить общее содержание антиоксидантов в данной пробе.

Изложенный способ в спектрофотометрическом анализе смесей антиоксидантов еще не использовался, но его с успехом применяли в других компьютеризированных методах, в частности в рентгенофазовом анализе многокомпонентных неорганических веществ [18,19].

Для проверки применимости этого подхода к определению антиоксидантов (с использованием алгоритма MLR) мы составили объединенную математическую модель, включающую регрессионные коэффициенты шести соединений. Затем эта модель использовалась для анализа пятикомпонентных тестовых смесей 1-го и 2-го типа. Использование коэффициентов АК, ГК, РТ и КВ, вычисленных для 1 типа смесей, к оценке содержания этих АО в тестовых смесях 2 типа (и наоборот) не приводило к снижению точности анализа.

В рамках метода PLS также была построена обобщенная многомерная градуировка. Обучающая выборка состояла из 20 смесей и включала по 10 смесей каждого типа. Содержание отсутствующего АО (КТ или КК) в какой-либо пробе при построении модели считали равным нулю.

Использование полученных моделей для анализа проб с условно неизвестным составом дало вполне приемлемые результаты. Концентрации соединений, отсутствующих в тестовых смесях, а именно – катехола в смесях первого типа и кофейной кислоты в смесях второго типа, неизменно оказывались отрицательными.

Суммирование найденных неотрицательных концентраций остальных АО приводило к приблизительно правильным оценкам суммарных содержаний.

Так, расчет ΣC_{AO} по обобщенной многомерной PLS-градуировке привел к погрешностям, не превышающим 10% отн. Погрешности анализа с применением метода MLR, как правило, не превышали 7% (таблица 4).

Таким образом, наличие «лишних» (не входящих в состав исследуемых проб) соединений в БД и соответствующее усложнение математических моделей не мешает правильной оценке суммарных содержаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно утверждать, что УФ спектрометрия неразделенных смесей антиоксидантов полифенольного типа является перспективным способом точного определения суммарного содержания антиоксидантов. Для расчета результатов анализа можно использовать как метод множественной линейной регрессии с непрямой градуировкой, так и алгоритм проекции на латентные структуры. Определять суммарное содержание антиоксидантов полифенольного типа в смесях известного качественного состава с погрешностью порядка 3-5% отн. можно, если это содержание находится в интервале 20 – 300 мкмоль/л.

Для сравнения укажем, что БИК-спектрометрия не позволяет определять столь малые концентрации, нижняя граница определяемых содержаний для этого метода примерно на порядок выше [6]. С другой стороны, методом FRAP суммарное содержание полифенолов можно определять даже на уровне 1-2 мкмоль/л [12].

Точность УФ-спектрометрического определения суммы антиоксидантов примерно соответствует точности БИК-спектрометрии [6] и намного выше, чем точность оценки суммарного содержания антиоксидантов по методу FRAP [12].

Переход к спектрометрическому определению суммарного содержания антиоксидантов полифенольного типа в природных объектах и пищевых продуктах (вина, соки, чай, кофе и т.п.) требует преодоления двух трудностей:

1) построению математических моделей в отсутствие надежных референтных методик мешает неопределенность качественного состава смесей антиоксидантов;

2) получению точных результатов анализа мешает присутствие соединений, поглощающих УФ излучение, но не являющихся антиоксидантами.

Перспективным способом решения первой проблемы является создание баз данных по УФ спектрам основных антиоксидантов, расчет обобщенных (компонентно-избыточных) математических моделей и их применение к анализу реальных объектов. Решить вторую проблему можно путем предварительного фракционирования пробы.

Авторы благодарят д.х.н. Вершинина В.И. за участие в обсуждении результатов работы и редактировании статьи. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках единого заказ-наряда, а также Госконтракта П-1103.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. Москва: ТрансЛит, 2009. С.212.

2. Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии. *Журн. аналит. химии.* 2005, 60(7), 678-691.

3. Родионова О.Е., Померанцев А.Л. Хемометрика в аналитической химии. URL: http://www.chemometrics.ru/materials/articles/chemometrics_review.pdf

4. Quansheng C., Jiewen Z., Muhua L., Jianrong C., Jianchua L. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *J. of pharm. biomed. analsis.* 2008, 46(3), 568-573.

5. Determination of individual catechins and total polyphenols in tea - ISO TC 34/SC, 8N 444, 1994.

6. Cozzolino D., Kwiatkovski M. J, Parker M., Cunkar W.U., Dambergs R.G., Gishen M., Gerderich M.J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*. 2004, 513 (1), 73-80.

7. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robarts K. Methods for testing of antioxidant activity. *Analyst.* 2002, 127(1), 183-198.

8. Karadag A., Oscelic B., Saner S. Benzie I.F.F., Strain J.J.Review of methods to determine antioxidants capacities. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 1996, 239 (1), 70-76.

9. Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г. Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей. *Методы и объекты химического анализа*. 2010, 5(4), 226-234.

10. Цюпко Т.Г., Темердашев З.А., Воронова О.Б., Храпко Н.В., Переверзева Е.В., Перекотий В.В. Определение антиоксидантной активности сухих красных вин для оценки их качества. *Зав. лаборатория. Диагностика материалов*. 2008, 74 (6), 14-20.

11. Цюпко Т.Г., Петракова И.С., Бриленок Н.С., Н.А. Николаева, Д.А. Чупрынина, З.А. Темердашев, В.И. Вершинин. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP. *Аналитика и контроль*. 2011, 15 (3), 287-299.

12. Скурихин И.М. Химия коньяка и бренди. Москва: ДеЛи Принт, 2005. С.296.

13. Шелпакова А.С. Применение методов множественной линейной регрессии и пррекции на латентные структуры в спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей (лекарственных и витаминных препаратов). Автореф. Дис.. канд.хим.наук. Томск. 2010, 22.

14. Власова И.В., Шелпакова А.С., Вершинин В.И. Спектрофотометрический анализ неразделенных смесей органических веществ с применением метода PLS: оптимизация обучающей выборки. *Зав. лаборатория. Диагностика материалов*. 2011, 75(4), 19-22.

15. Власова И.В., Шелпакова А.С., Нагаев А.А. Формирование градуировочных наборов для спектрофотометрического анализа многокомпонентных смесей с применением метода множественной линейной регрессии. *Вестник Омского гос. ун-та*. 2010, 2, 99-105.

16. Вершинин В.И., Коптева Е.В, Троицкий В.В. Определение суммарных содержаний парафинов, нафтенов и аренов по светопоглощению бензинов в ближней ИК-области. *Заводская лаборатория*. 2005, 71(11), 10-15.

17. Fiala J. Optimization of powder diffraction identification. *J. Appl. Cryst*. 1976, 9(6), 429-432.

18. Консон Е.Д., Нахмансон М.С., Степанова Н.В. Система качественного рентгенофазового анализа на основе алгоритмов линейного программирования. В кн. Аппаратура и методы рентгеновского анализа. Ленинград: Машиностроение, 1983. С.54-61.