

УДК 615.322:547.56

DOI: 10.34215/1609-1175-2025-4-79-85



Оптимизация метода Фолина – Чокальтеу для определения фенольных антиоксидантов в побегах боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida*)

Г.Я. Мечикова, Н.В. Матющенко, Е.В. Слободенюк

Дальневосточный государственный медицинский университет (ДВГМУ), Хабаровск, Россия

Цель: оптимизация метода Фолина – Чокальтеу (ФЧ) для определения фенольных антиоксидантов в побегах боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida*) с привлечением методологии поверхностного отклика и плана Бокса – Бенкена. **Материалы и методы.** Побеги боярышника перистонадрезанного заготавливали в 2025 году в фазу начала цветения в естественной природной популяции на территории Хабаровского края. Работу выполняли на спектрофотометре UV-1700, Shimadzu (Япония). Для поиска комбинации уровней факторов экстракции фенольных соединений, обеспечивающей оптимальный отклик, был использован инструмент поверхностного отклика и план Бокса – Бенкена. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0. **Результаты.** В побегах боярышника перистонадрезанного определены оптимальные параметры реакции ФЧ – 0,5 мл реактива ФЧ и 5 мл 20% раствора натрия карбоната, обеспечивающие точность, воспроизводимость и стабильность продуктов реакции. Методология поверхностного отклика и план Бокса – Бенкена позволили установить, что максимальный выход фенольных соединений достигается при комбинации параметров экстракции: экстрагент – спирт этиловый 54,87%; соотношение массы сырья к объему экстрагента – 1:783, время экстракции – 65,99 мин. **Заключение.** Оптимизированы условия экстракции и разработана методика количественного спектрофотометрического определения фенольных соединений в побегах боярышника перистонадрезанного, которая необходима для стандартизации данного вида сырья.

Ключевые слова: боярышник перистонадрезанный, фенольные соединения, метод Фолина – Чокальтеу, планы Бокса – Бенкена

Поступила в редакцию: 01.11.2025. Получена после доработки: 08.11, 14.11.2025. Принята к публикации: 07.12.2025

Для цитирования: Мечикова Г.Я., Матющенко Н.В., Слободенюк Е.В. Оптимизация метода Фолина – Чокальтеу для определения фенольных антиоксидантов в побегах боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida*). Тихоокеанский медицинский журнал. 2025;4:79–85. doi: 10.34215/1609-1175-2025-4-79-85

Для корреспонденции: Мечикова Галина Ярославовна – доцент кафедры фармации и фармакологии (680000, Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35); e-mail: galina.m.ya@mail.ru

Optimization of the Folin–Ciocalteu method for measuring phenolic antioxidants in the shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge

G.Ya. Mechikova, N.V. Matyushchenko, E.V. Slobodenyuk

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia

Objective. To optimize the Folin–Ciocalteu (FC) method for estimating phenolic antioxidants in the shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge using surface response methodology and the Box–Behnken design. **Materials and methods.** The shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge were harvested in 2025 at the beginning of flowering from a natural population in Khabarovsk Krai. The measurements were performed using a UV-1700 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The response surface tool and the Box–Behnken design were applied to identify the combination of phenolic compound extraction factor levels that would yield the optimal response. Statistical processing of the results was carried out in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 15th edition, OFS.1.1.0013 “Statistical processing of the results of physical, physicochemical, and chemical tests” using the Microsoft Office Excel 2010 and Statistica 6.0 software packages. **Results.** For the shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge, the optimal parameters for the FC reaction have been determined as 0.5 ml of FC reagent and 5 ml of a 20% sodium carbonate solution, which ensure the accuracy, reproducibility, and stability of the reaction products. The response surface methodology and Box–Behnken design revealed that the highest yield of phenolic compounds occurs when the following extraction parameters are combined: extractant is 54.87% ethyl alcohol; raw material to extractant mass ratio is 1:783, and extraction time is 65.99 min. **Conclusion.** Extraction conditions are optimized; a method for quantitative spectrophotometric determination of phenolic compounds in the shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge is developed, which is necessary for standardization of this type of raw material.

Keywords: *Crataegus pinnatifida* Bunge, phenolic compounds, Folin–Ciocalteu method, Box–Behnken plots

Received 1 November 2025; Revised 8, 14 November 2025; Accepted 7 December 2025

For citation: Mechikova G.Ya., Matyushchenko N.V., Slobodenyuk E.V. Optimization of the Folin–Ciocalteu method for measuring phenolic antioxidants in the shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Pacific Medical Journal*. 2025;4:79–85. doi: 10.34215/1609-1175-2025-4-79-85

Corresponding author: Galina Ya. Mechikova, Associate Prof. of Dep. of Pharmacy and Pharmacology, Far Eastern State Medical University (35 Muravyov-Amursky str., Khabarovsk, 680000, Russia); ORCID: 0000-0001-7136-0626; e-mail: galina.m.ya@mail.ru

Природные (поли)фенольные соединения (ФС) – наиболее распространенный класс вторичных метаболитов в царстве растений. Структурно класс фенолов представляют флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества, гидроксикоричные кислоты, проантоцианидины, стильбены, лигнаны, кумарины и другие группы.

В значительной степени положительное влияние ФС на организм человека сводится к антиоксидантному эффекту. Многие исследования доказали взаимосвязь между содержанием ФС и антиоксидантной активностью растений, что является основанием для использования растительных препаратов с высоким содержанием ФС как потенциальных средств для профилактики и лечения заболеваний, в патогенетическом механизме которых лежит окислительный стресс [1, 2]. Следует заметить, что эта группа вторичных метаболитов может предотвращать развитие ряда заболеваний человека и с помощью других механизмов, отличных от антиоксидантной функции. В литературе описана роль ФС в модуляции ферментативной активности и сигнальных путей клеточной передачи, влияние ФС на экспрессию генов, воздействие на транскрипционные факторы и другие механизмы [3–5]. Имеются убедительные доказательства, которые демонстрируют многофункциональную роль ФС в терапии и профилактики сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, эндокринных, инфекционных, воспалительных заболеваний, онкологических, а также заболеваний, связанных с нарушением метаболизма [3–8].

Особый интерес для медицины в качестве источника антиоксидантов, преимущественно фенольных, может представлять Боярышник перистонадрезанный (*Crataegus pinnatifida*) – представитель фитоценозов российского Дальнего Востока [9], не имеющий на сегодня официального статуса. Оценка количества фенольных антиоксидантов в данном виде боярышника может быть очень информативной в перспективе обоснования использования побегов боярышника перистонадрезанного в медицинской практике.

Для определения общего содержания ФС в растительных экстрактах в исследованиях наиболее широко применяется спектрофотометрический метод с использованием реактивов Фолина – Дениса (ФД) и Фолина – Чокальтеу (ФЧ). Фенольный комплекс боярышника перистонадрезанного представлен в значительной степени полимерными ФС – процианидинами, для окисления которых необходимо достаточно высокое значение pH [10]. Использование реактива ФД в щелочных средах приводит к образованию белого осадка [11, 12]. В результате снижаются чувствительность и воспроизводимость методики, что подтверждают предварительные скрининговые пробы. Напротив, реактив ФЧ позволяет работать в области высоких значений pH, так как для предотвращения образования осадка в данный реактив внесен сульфат лития.

В настоящее время используются разные модификации метода ФЧ, связанные с условиями приготовления экстракта и проведения реакции. Важной деталью при проведении реакции ФЧ, которую нельзя игнорировать, является pH реакционной смеси, создаваемая чаще всего добавлением раствора натрия карбоната.

Различные методологические подходы реализации метода ФЧ объясняются многокомпонентным неоднородным составом фенольного комплекса, индивидуальным для конкретного растительного объекта [13–15].

Цель данного исследования состояла в оптимизации метода ФЧ для определения фенольных антиоксидантов в побегах боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida*) с привлечением методологии поверхностного отклика и плана Бокса – Бенкена.

Побеги боярышника перистонадрезанного заготавливали в фазу начала цветения в естественной природной популяции Хабаровского края (п. Николаевка, Сидовичский район, Еврейская автономная область). Сушку сырья проводили воздушно-теньевым способом в хорошо проветриваемом помещении. Далее аналитическую пробу сырья измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 1 мм.

Для разработки методики точные навески измельченного сырья в соответствии с соотношением к объему экстрагента от 1:100 до 1:900 помещали в колбы со шлифом вместимостью 50 мл. Прибавляли по 50 мл спирта этилового определенной концентрации (40, 50, 60, 70 и 80%), закрывали пробкой и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбы присоединяли к системе обратных холодильников и нагревали на кипящей водяной бане в течение определенного в эксперименте времени (15, 30, 45, 60 и 90 мин). Затем колбы охлаждали до комнатной температуры и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым соответствующей концентрации. Извлечение фильтровали через обеззоленный фильтр (красная лента), отбрасывали первые 10 мл фильтрата. Аликвоты (рассчитывались для каждой анализируемой пробы в зависимости от используемого соотношения сырья к объему экстрагента) полученных экстрактов помещали в мерные колбы со шлифом вместимостью 10 мл, прибавляли 2 Н раствор реактива ФЧ (1, 2, 3, 4 и 5 мл) и 2,0 мл дистиллированной воды. Смесь хорошо перемешивали и через 3 минуты добавляли 20% раствор натрия карбоната (1, 2, 3, 4 и 5 мл). Полученную смесь доводили водой до метки, перемешивали и при комнатной температуре выдерживали определенное в эксперименте время. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для приготовления растворов сравнения в мерные колбы со шлифом вместимостью 10 мл помещали вместо экстрактов чистый экстрагент, соотношение реактива ФЧ и 20% раствора натрия карбоната соответствовали анализируемой пробе.

Содержание суммы ФС в пересчете на кислоту галловую в сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X, \% = \frac{C \times W1 \times W2 \times 100 \times 100}{a \times V_a \times (100 - W) \times 1000},$$

где C – массовая концентрация фенольных соединений в исследуемом растворе, найденная по градуировочному графику кислоты галловой, мг/мл; a – навеска сырья, г; $W1$, $W2$ – объемы мерных колб, мл; V_a – объем аликвоты, мл; W – влажность сырья, %; 1000 – коэффициент пересчета для получения конечного результата ФС в процентах.

Построение калибровочного графика кислоты галловой осуществляли с использованием растворов кислоты галловой, соблюдая порядок и условия добавления реактивов аналогичные испытуемым пробам. В диапазоне концентраций кислоты галловой от 0,001 до 0,006 мг/мл калибровочная кривая имеет выраженную линейность, коэффициент корреляции составил 0,9997, что позволяет использовать данный график для расчетов (рис. 1).

Для разработки и оптимизации методики определения фенольных антиоксидантов применительно к исследуемому объекту в работе была использована методология поверхностного отклика и план Бокса – Бенкена как наиболее часто используемая конструкция планов эксперимента. Данный инструмент позволяет оценить эффекты различных факторов и их взаимодействия, влияющих на точность и воспроизводимость анализа и рассчитать их оптимальные значения с минимальным количеством экспериментальных испытаний [16].

Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр UV-1700, Shimadzu (Япония). Каждый опыт в эксперименте повторяли трижды. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических,

физико-химических и химических испытаний» с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

Задачей первого этапа исследований явилось определение оптимальных параметров реакции (рН, количества реактива ФЧ), влияющих на точность, воспроизводимость, стабильность продуктов реакции, а также на кинетику реакции [12]. Для этого был приготовлен ряд испытуемых смесей с различными значениями рН и соотношениями реактивов ФЧ и 20% раствора натрия карбоната и измерена их оптическая плотность.

Установлено, что максимальное значение оптической плотности наблюдается при рН в диапазоне 9,4–10,2. Оптимальный интервал рН для проведения реакции окисления обеспечивается соотношением реактива ФЧ и 20% раствором натрия карбоната 1:(8–10) соответственно. При этом 0,4–0,7 мл реактива ФЧ является достаточным для максимального выхода продуктов реакции. Далее в эксперименте использовали 0,5 мл реактива ФЧ и 5 мл 20% раствора натрия карбоната. В выбранных оптимальных условиях реакция окисления достигает плато поглощения на 15-й минуте. Раствор остается стабильным как минимум 90 минут. Поэтому в качестве аналитического времени было выбрано время реакции 30 минут.

Следующим этапом для достижения цели оптимизации методики определения фенольных антиоксидантов являлся выбор независимых факторов, объективно влияющих на эффективность экстракции ФС из побегов боярышника перистонадрезанного. Скрининговые предварительные исследования показали, что концентрация спирта этилового (X_1), время экстракции (X_2) и соотношение массы сырья к объему экстрагента (X_3) существенно влияют на выход окисляемых фенольных соединений из побегов боярышника перистонадрезанного. Для модели плана Бокса – Бенкена диапазон каждого независимого фактора экстракции определяли

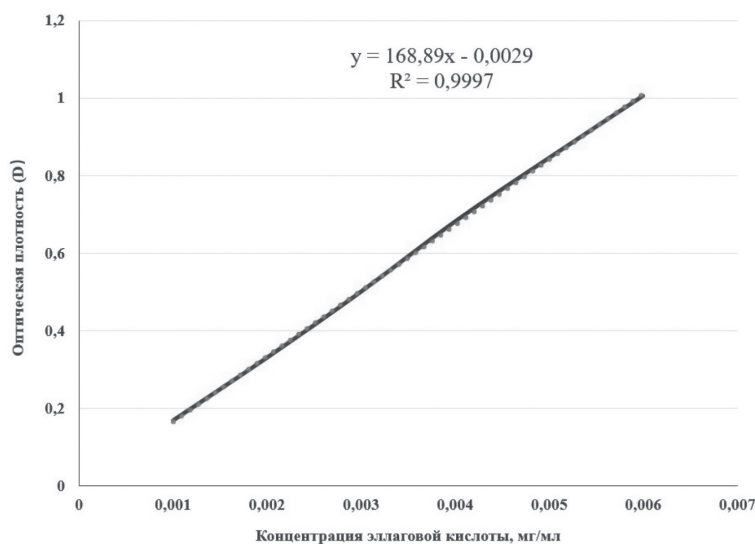


Рис. 1. Градуировочный график взаимодействия кислоты галловой с реактивом Фолина – Чокальтеу.

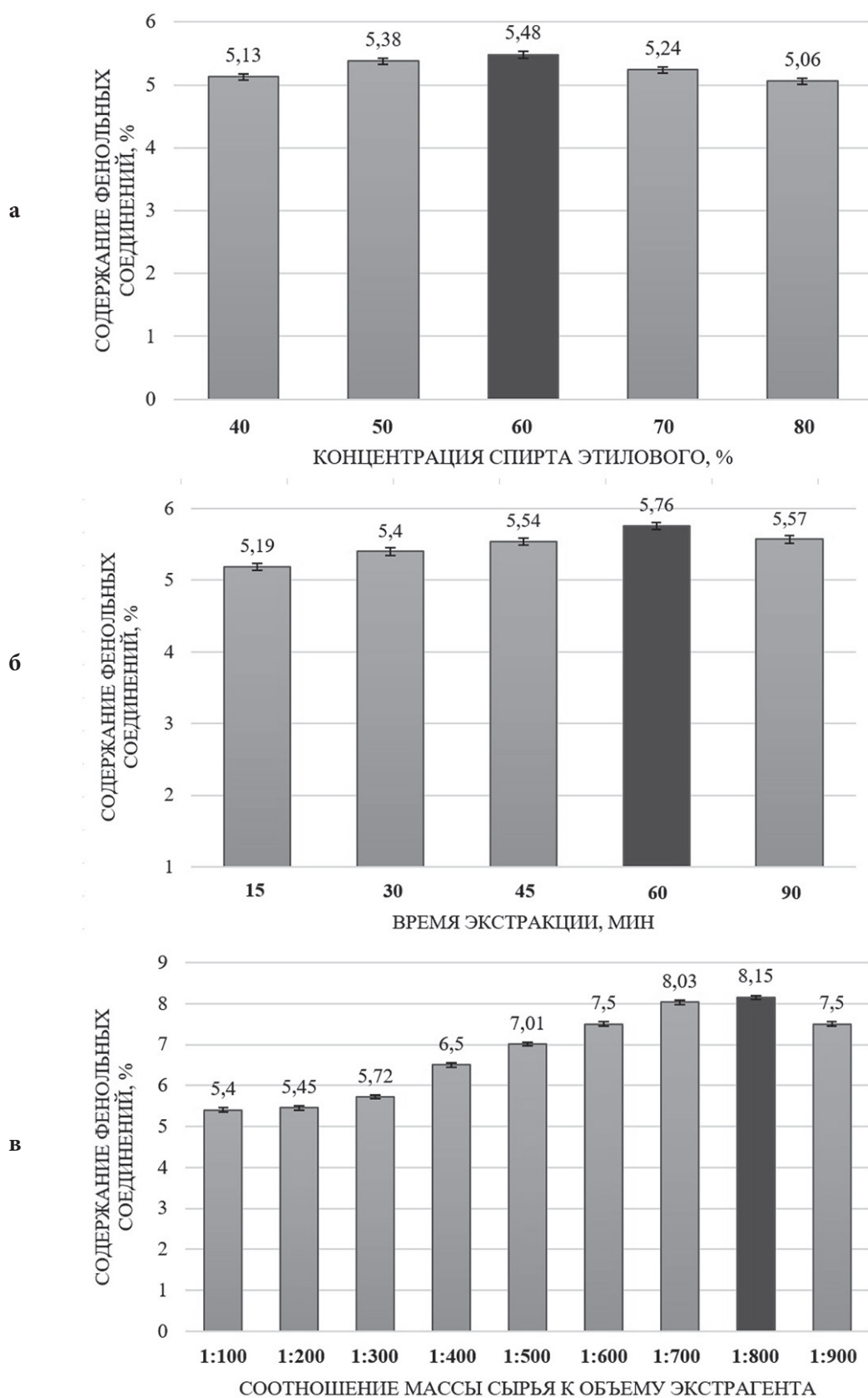


Рис. 2. Однофакторный дисперсионный анализ экстракции ФС из побегов боярышника перистонадрезанного: а – концентрация спирта этилового; б – время экстракции; в – соотношение массы сырья к объему экстрагента.

с помощью серии однофакторных экспериментов. В каждом эксперименте изменяли один независимый фактор экстракции, при этом все остальные оставались постоянными (рис. 2).

Однофакторный экспериментальный анализ показал, что общий выход ФС из сырья достигается при использовании 60% спирта этилового, дальнейшее снижение полярности растворителя уменьшает выход исследуемой группы веществ (рис. 2а). Стабилизация выхода ФС фиксировалась на 60-й минуте, далее количество ФС начало уменьшаться, что связано, вероятно, с длительным воздействием температурного фактора (рис. 2б). Применительно к исследуемому объекту видно, что на процесс экстракции существенно влияет соотношение массы сырья к объему экстрагента (рис. 2в). Увеличение объема растворителя позволяет увеличить площадь поверхности раздела между двумя фазами экстракции – экстрагента и растительного сырья, что, по-видимому, является определяющим фактором экстракции этой группы веществ, объединяющей различные по структурам фенолы.

На основании однофакторного эксперимента для дальнейшей оптимизации методики были определены независимые факторы экстракции, их интервалы и составлен план Бокса – Бенкена. Матрица плана Бокса – Бенкена (15 точек, включая 3 центральных) с кодированными и фактическими значениями уровней независимых факторов экстракции представлена в таблице 1. Эффективность извлечения ФС оценивали по экспериментальному отклику ($Y_{\text{эксп.}}$) – количеству ФС в процентах в сухом сырье боярышника перистонадрезанного.

Проведенные в соответствии с планом Бокса – Бенкена эксперименты (табл.) позволили вывести

полиномиальное регрессионное уравнение второго порядка, описывающее взаимодействия между тремя независимыми факторами экстракции и экспериментальным откликом. Общее уравнение модели, которое иллюстрирует поведение комбинаций независимых факторов в пределах диапазона, заданного дизайном эксперимента, имеет вид:

$$Y_{\text{расч}} = 8,5156 - 0,3654X_1 + 0,1354X_2 - 0,1842X_3 - 0,0325(X_1X_3) + 0,0575(X_2X_3) - 0,3453(X_1)^2 - 0,2903(X_2)^2 - 0,2294(X_3)^2,$$

где $Y_{\text{расч}}$ – рассчитанный отклик, связанный с комбинацией независимых факторов; 8,5156 – свободный член уравнения; X_n – регрессионные коэффициенты линейных факторных эффектов; X_{nm} – регрессионные коэффициенты эффектов взаимодействия между факторами; $(X_n)^2$ – регрессионные коэффициенты квадратичных факторных эффектов.

Все независимые факторы экстракции являются значимыми.

Для оценки эффективности соответствия математической модели было проведено сравнение экспериментальных откликов ($Y_{\text{эксп.}}$) с прогнозируемыми ($Y_{\text{расч.}}$). Последние были получены с помощью полиномиального регрессионного уравнения модели второго порядка. Высокий коэффициент детерминации ($R^2 = 0,9897$) показал, что математическая модель адекватна, экспериментальные и расчетные отклики хорошо коррелируют между собой (рис. 3).

Графические 3D-модели поверхностей отклика отражают влияние исследуемых независимых факторов экстракции на выход ФС из побегов боярышника перистонадрезанного (рис. 4).

Полученные параметры независимых факторов, описывающие оптимальные условия экстракции

Таблица

Конструкция плана Бокса – Бенкена и соответствующие значения откликов при экстракции общей суммы ФС из побегов боярышника перистонадрезанного

№	Кодированные уровни факторов			Фактические уровни факторов			Отклики	
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	$Y_{\text{эксп.}}$, %	$Y_{\text{расч.}}$, %
1	+1	+1	0	70	90	1:800	7,62 ± 0,06	7,65
2	+1	-1	0	70	30	1:800	7,46 ± 0,07	7,38
3	-1	+1	0	50	90	1:800	8,35 ± 0,05	8,38
4	-1	-1	0	50	30	1:800	8,09 ± 0,07	8,11
5	0	0	0	60	60	1:800	8,53 ± 0,05	8,52
6	+1	0	+1	70	60	1:900	7,36 ± 0,07	7,36
7	+1	0	-1	70	60	1:700	7,73 ± 0,06	7,79
8	-1	0	+1	50	60	1:900	8,21 ± 0,06	8,15
9	-1	0	-1	50	60	1:700	8,45 ± 0,05	8,46
10	0	0	0	60	60	1:800	8,51 ± 0,06	8,52
11	0	+1	+1	60	90	1:900	8,00 ± 0,08	8,01
12	0	+1	-1	60	90	1:700	8,32 ± 0,04	8,26
13	0	-1	+1	60	30	1:900	7,56 ± 0,07	7,62
14	0	-1	-1	60	30	1:700	8,10 ± 0,05	8,10
15	0	0	0	60	60	1:800	8,51 ± 0,04	8,52

Примечание: X_1 – концентрация спирта этилового; X_2 – время экстракции; X_3 – соотношение массы сырья к объему экстрагента.

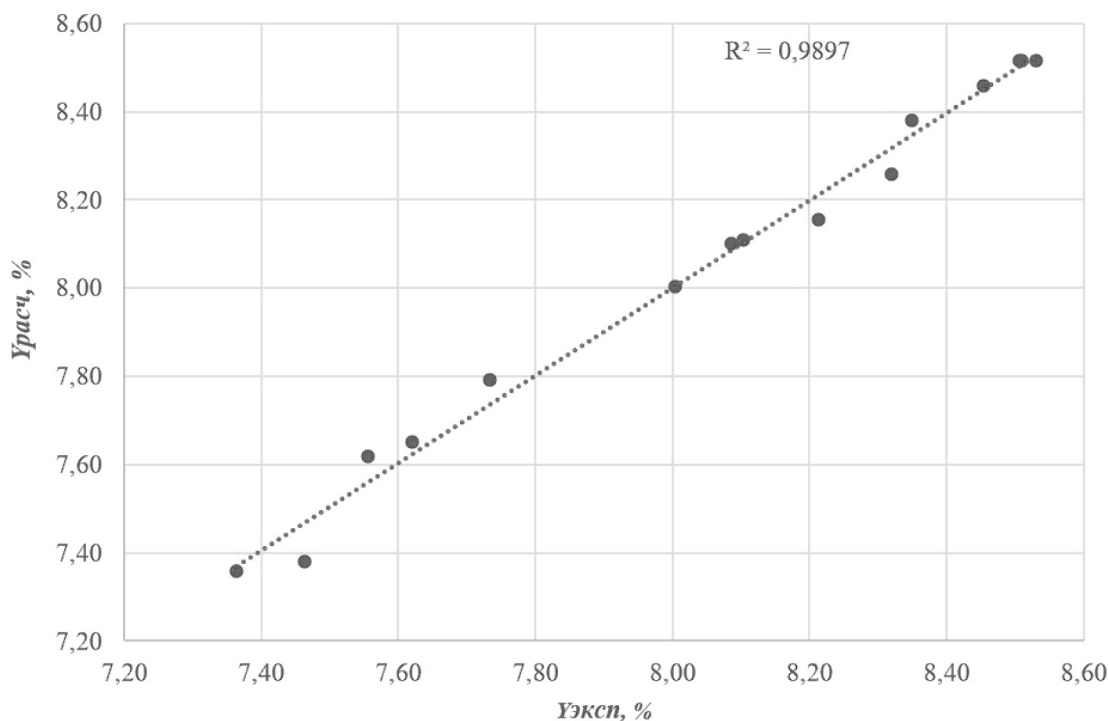


Рис. 3. Сравнение экспериментальных и модельных откликов экстракции ФС из побегов боярышника перистонадрезанного.

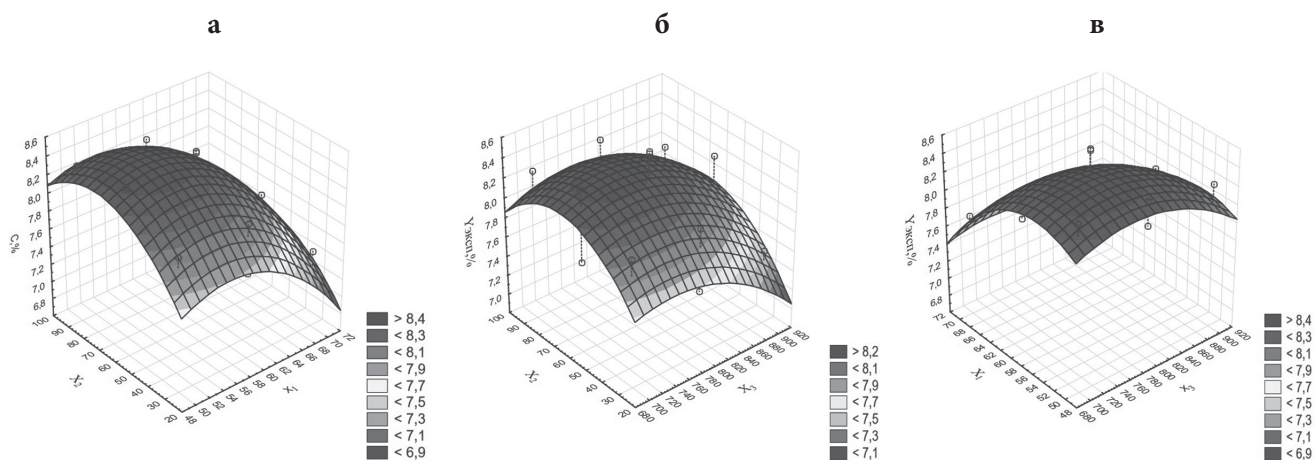


Рис. 4. Графики поверхности отклика, отражающие влияние условий экстракции на выход ФС из побегов боярышника перистонадрезанного: а – зависимость содержания ФС от концентрации спирта этилового и времени экстракции; б – зависимость содержания ФС от времени экстракции и массы сырья к объему экстрагента; в – зависимость содержания ФС от концентрации спирта этилового и массы сырья к объему экстрагента.

фенольных антиоксидантов из побегов боярышника перистонадрезанного, следующие: концентрация спирта этилового – 54,87%; время экстракции – 65,99 мин; соотношение массы сырья к объему экстрагента – 1:783. При этих параметрах экстракции прогнозируемое количество суммы фенольных антиоксидантов составило 8,65%; среднее значение в условиях эксперимента составило $8,71 \pm 0,06\%$. Установлено, что увеличение кратности экстракции не влияет на выход целевой группы веществ.

Применительно к побегам боярышника перистонадрезанного определены оптимальные параметры реакции ФЧ – 0,5 мл реактива ФЧ и 5 мл 20% раствора натрия карбоната, обеспечивающие точность, воспроизводимость и стабильность продуктов реакции.

Методология поверхностного отклика и план Бокса – Бенкена позволили провести оценку одновременного влияния трех независимых факторов на экстракцию ФС из побегов боярышника перистонадрезанного. В результате были достигнуты оптимальные условия

максимального выхода фенольных антиоксидантов из сырья боярышника перистонадрезанного.

На основе полученных данных разработана методика количественного спектрофотометрического определения ФС в побегах боярышника перистонадрезанного, которая будет использована в решении ряда вопросов, связанных со стандартизацией данного вида сырья.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: научное исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания по теме «Изучение перспективных фитокомплексов из лекарственных растений Дальнего Востока и разработка на их основе биологически активных добавок и лекарственных средств».

Участие авторов:

Разработка концепции и дизайна – МГЯ, МНВ, СЕВ

Сбор и обработка материала – МГЯ, МНВ, СЕВ

Статистическая обработка – МГЯ, МНВ

Анализ и интерпретация данных – МГЯ, МНВ, СЕВ

Написание текста – МГЯ, МНВ

Утверждение окончательного варианта рукописи – МГЯ, МНВ

Литература / References

- Asfaw DE. Antioxidant properties of phenolic compounds to manage oxidative stress: A Review. *J. Adv. Agron. Crop. Sci.* 2023;103(2):1–16. doi: 10.17303/jacs.2023.2.103
- Muscolo A, Mariateresa O, Giulio T, Mariateresa R. Oxidative Stress: the role of antioxidant phytochemicals in the prevention and treatment of diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(6):3264. doi: 10.3390/ijms25063264
- Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal.* 2016;15(1):99. doi: 10.1186/s12937-016-0217-2
- Carrillo JA, Zafrilla M.P., Marhuenda J. Cognitive function and consumption of fruit and vegetable polyphenols in a young population: is there a relationship? *Foods.* 2019;8(10):507. doi: 10.3390/foods8100507
- Rahman MM, Rahaman MS, Islam MR, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T, Almikhlaifi MA, Alghamdi SQ, Alruwaili AS, Hossain MS, Ahmed M, Das R, Emran TB, Uddin MS. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules.* 2022;27(1):233. doi: 10.3390/molecules27010233
- Deka H, Choudhury A, Dey BK. An overview on plant derived phenolic compounds and their role in treatment and management of diabetes. *Journal of Pharmacopuncture.* 2022;25(3):199–208. doi: 10.3831/KPI.2022.25.3.199
- Khairnar SJ, Jadhav GB. Neuroprotective action of polyphenols and phenolic compounds: an overview. *Biosci. Biotech. Res. Asia.* 2023;20(3):793–816. doi: 10.13005/bbra/3132
- Tatipamula VB, Kukavica B. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochem Funct.* 2021;39(8):926–44. doi: 10.1002/cbf.3667
- Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Санкт-Петербург: Мир и семья, 1995. 992 с. [Cherepanov SK. *Vascular plants of Russia and neighbouring states (within the former USSR)*. Saint Petersburg: Mir i semya, 1995. 992p. (In Russ.)].
- Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина – Чокальтеу. *Аналитика и контроль.* 2015;19(4):373–80. [Denisenko TA, Vishnik AB, Tsiganok LP. Spectrophotometric determination of sum of phenolic compounds in plants using aluminum chloride, 18-molybdodiphosphate and Folin-Ciocalteu reagents. *Analytics and Control.* 2015;19(4):373–80 (In Russ.)]. doi: 10.15826/analitika.2015.19.4.012
- Мечикова Г.Я., Степанова Т.А., Загузова Е.В. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники. *Химико-фармацевтический журнал.* 2007;41(2):38–41. [Mechikova GYa, Stepanova TA, Zaguzova EV. Quantitative determination of total phenols in strawberry leaves. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2007;41(2):38–41 (In Russ.)]. doi: 10.1007/s11094-007-0021-6
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965;16(3):144–58.
- Palombini SV, Claus T, Maruyama SA, Carbonera F, Montanher PF, Visentainer JV, Gomes STM, Matsushita M. Optimization of a new methodology for determination of total phenolic content in rice employing Fast Blue BB and Quencher procedure. *J. Braz. Chem. Soc.* 2016;27(7): 1188–94. doi: 10.5935/0103-5053.20160013
- Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants.* 2021;10(5):811. doi: 10.3390/antiox10050811
- Martins GR, Monteiro AF, do Amaral FRL, da Silva AS. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. *J. Food Sci. Technol.* 2021;58(12):4693–702. doi: 10.1007/s13197-020-04959-5
- Ferreira SLC., Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta.* 2007;597(2):179–86. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011