



УДК 544

ВЭЖХ фенольных кислот – антиоксидантов с амперометрическим детектированием

Яшин А.Я.

ООО «Интерлаб», Москва

Поступила в редакцию 3.03.2014 г.

Аннотация

Фенольные кислоты – производные бензойной и коричной кислот, наряду с флавоноидами, сильные антиоксиданты. Они широко распространены в растительном мире. Фенольные кислоты содержатся в пищевых продуктах и напитках, как антиоксиданты защищают человека от опасных болезней и преждевременного старения. Один из лучших методов разделения и определения фенольных кислот ВЭЖХ. В качестве детекторов используются УФ, СПФ диодноматричный, МС и амперометрический. В последние годы наибольший интерес вызывает амперометрический детектор из-за низкого предела обнаружения (10^{-9} – 10^{-12} г) и селективности. В статье приведены данные по условиям разделения типовых фенольных кислот – антиоксидантов, пределы детектирования их, вольтамперограммы разных фенольных кислот и возможность определения их в кофе, ржи, ячмене.

Ключевые слова: Фенольные кислоты, антиоксиданты, ВЭЖХ, амперометрический детектор, вольтамперограммы

Phenolic acids - derivatives benzoic and cinnamic acids, along with flavonoids, strong antioxidants. They widespread in flora. Phenolic acids contain in foodstuff and drinks as antioxidants protect human from dangerous illnesses and aging. One of the best methods of separation and determination of phenolic acids is HPLC. As detectors are used UV, DAD, MS and amperometric. Last years the greatest interest causes amperometric detector because of a low limit of detection (10^{-9} - 10^{-12} g) and selectivity. In article data on conditions of separation of typical phenolic acids - antioxidants, limits of their detection, voltamperograms different phenolic acids and possibility of their determination in coffee, a rye, barley are showed.

Keywords: Phenolic acids, antioxidants, HPLC, amperometric detector, voltamperograms

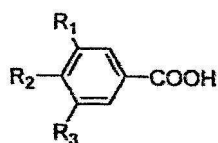
Введение

На рис.1 приведены структурные формулы наиболее распространенных бензойных и коричных кислот. Кроме указанных кислот в растительном мире встречаются фенольные кислоты с сахарными функциональными группами, эфиры кислот и другие их производные.

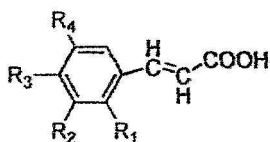
Фенольные кислоты в разных количествах присутствуют практически во всех растениях и пищевых продуктах растительного происхождения: овощах, фруктах, ягодах, зернах. Среди полифенолов фенольные кислоты преобладают в зерновых и бобовых культурах [1-9], в частности в ячмене [3], ржи [4], рисе [5], овсе [6] и пшенице [7].

В зернах ржи, пшеницы, ячменя, проса, риса, кукурузы, овса, маиса, сорго обнаружены как производные бензойной кислоты (галловая, салициловая, ванилиновая, сиреневая, протокатехиновая и п-гидроксibenзойная), так и

производные коричной кислоты (феруловая, кофейная, о-, м- и п- кумаровая, синаповая) [2].



Галловая кислота $R_1=R_2=R_3=OH$
 п-гидроксибензойная $R_1=R_3=H, R_2=OH$
 Протокатехиновая $R_3=H, R_1=R_2=OH$
 Ванилиновая $R_3=H, R_2=OH, R_1=OCH_3$
 Сиреневая $R_2=OH, R_1=R_3=OCH_3$



Феруловая $R_1-R_2=H, R_3=OH, R_4=OCH_3$
 п-Кумаровая $R_1-R_2-R_4=H, R_3=OH$
 Кофейная $R_1-R_2=H, R_3=R_4=OH$
 Синаповая $R_1=H, R_3=OH, R_2=R_4=OCH_3$

Рис.1. Структурные формулы фенольных кислот

Больше всего фенольных кислот в разных сортах ржи [2], во ржи больше всего феруловой кислоты [4]. В окрашенных злаках содержится также антоцианины. Больше всего антоцианинов в черном рисе и черном сорго, в пурпурной и красной кукурузе.

В работе [10] нами определено суммарное содержание антиоксидантов в разных злаках (соя, ячмень, овес, пшеница, кукуруза, просо и рис). Больше всего антиоксидантов в сое. Содержание антиоксидантов в пшенице сильно зависело от сорта культуры. В свободном виде фенольные кислоты присутствуют в незначительном количестве, большая часть их связана с белками, целлюлозой, лигнинами. Для выделения их используют гидролиз кислотами, щелочами или ферментами. Свободные фенольные кислоты экстрагируются из растительной матрицы спиртовыми или другими органическими растворителями. Описаны методы экстракции чистым метанолом, хлороформом, смесью метанол – ацетон – вода (7:7:6) [8], твердофазная экстракция применяется для отделения нежелательных примесей.

Кислый гидролиз производится 1-2 N HCl (вода со спиртом) в течение 30-60 минут. Лучшие результаты получены (меньше разложение фенольных кислот) при 2 N HCl с метанолом в соотношении 1:1. При водных HCl разрушаются гидроксикоричные кислоты [8]. При щелочном выделении используют 1-4 N NaOH при разных температурах. Для разрыва связи фенольных кислот с сахарными остатками используют ферменты (амилаза, целлюлаза, пектиназа) [8].

Эксперимент

В работе использовался жидкостный хроматограф «ЦветЯуза» с амперометрическим детектором в окислительном режиме при потенциале на рабочем электроде – стеклоуглероде +1,3В. Были исследованы разные колонки с C18, наилучшей колонкой оказались колонка фирмы «Феноменекс» Луна C18 250x4,6 мм, заполненная сорбентом зернением 5 мкм.

В качестве элюента использовали смесь бидистиллированной воды с ацетонитрилом, скорость потока элюента 1 мл/мин, использовались режимы как изократический, так и градиентный. Градиентный режим обеспечивался двумя

насосами К-120 фирмы «Кнауэр» Для построения вольтамперограмм использовали инъекционно-проточную систему (ЦветЯуза-01-АА) с амперометрическим детектором. Для градуировки и измерений использовались чистые кислоты фирмы “Fluka”.

Обсуждение результатов

ВЭЖХ с УФ-детектором чаще других методов используются для определения фенольных кислот в растительных продуктах [7, 9]. Однако, в последние годы все более привлекательным становится амперометрическое детектирование, т.к. оно селективно определяет только фенольные кислоты – антиоксиданты, в отличие от УФ – детектора. Пределы амперометрического детектирования фенольных кислот иногда на порядок ниже пределов детектирования УФ-детектора [11, 12]. Вышли обзоры по применению амперометрического детектора для определения разных полифенольных соединений в природных объектах [10, 12-14].

В таблице 1 приведены некоторые из этих работ.

Таблица 1. Перечень работ по определению фенольных кислот в некоторых пищевых продуктах методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием

Типы фенольных кислот	Пищевые продукты	Ссылки
Галловая, прокатехиновая, сиреневая, п-кумариновая, кофейная, феруловая, хлорогеновая	Вино	15
Кофейная, п-кумаровая, феруловая, ванилиновая, хлорогеновые и др.	Абрикосы разных сортов	16-18
Феруловая, кофейная, сиреневая	Ячмень	19
Кофейная, п-кумаровая, феруловая и др.	Цитрусовый мед	20
Производные фенольных кислот	Мед	21, 22
Коричные кислоты	Солод, пиво	23
Фенольные кислоты	Фрукты	24, 25
Фенольные кислоты	Клубника	26
Ванилиновая, протокатехиновая и др.	Луговой мед	27
Фенольные кислоты	Миндаль	28
Фенольные кислоты	Продукты из клена	29
Фенольные кислоты	Эхинацея	30

В работе [15] определено семь фенольных кислот в пяти типах красных вин методом обращено-фазового варианта ВЭЖХ в градиентном режиме.

После оптимизации условий нами был выбран градиентный режим, позволяющий полностью разделять тестовую смесь из девяти фенольных кислот за 40 минут (рис. 2). Используя эти условия, можно проводить быстрый скрининг на присутствие этих кислот в растительных объектах.

По чистым фенольным кислотам (дозирование определенного количества) были определены: чувствительность (площадь пика) и пределы детектирования. Пределы детектирования определялись по стандартной формуле:

$$C_{\min} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot m}{S \cdot U}, \quad (1)$$

где Δx - величина уровня флукуационных шумов, нА; m - масса введенного вещества, г; S - площадь пика, нА·с; U - расход элюента, см³/с.

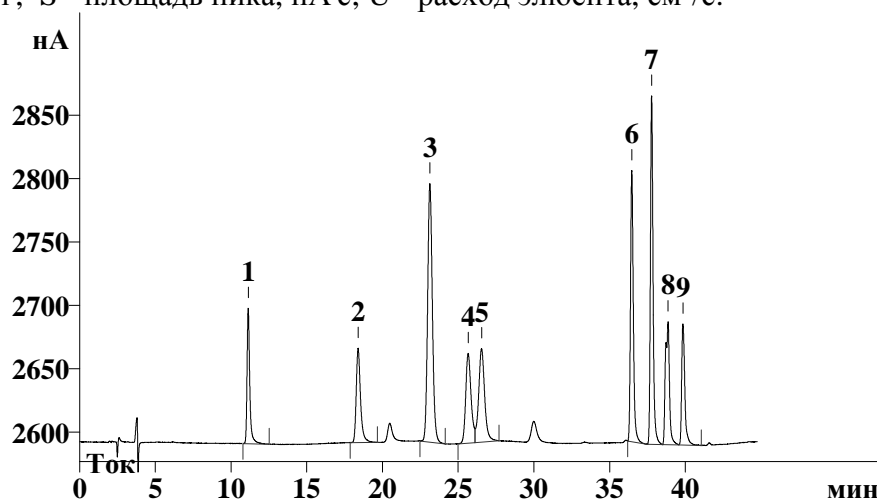


Рис. 2 Хроматограмма стандартной смеси фенольных кислот:

1. 3,4-дигидроксibenзойная, 2. хлорогеновая, 3. транс-4-гидроксibenзойная,
4. ванилиновая, 5. 3,4-дигидроксикоричная, 6. сиреневая,
7. транс-4-гидроксикоричная, 8. 4-гидроки 3-метоксикоричная,
9. 3,5-диметокси-4-гидроксикоричная.

Колонка: Феноменекс Луна С18(2) 4,6x250 мм 5 мкм. элюент А: бидистиллированная вода рН=2,6, В: 80% ацетонитрил рН=2,6 Градиент: 0-10 мин 10-13% В, 10-23 мин 13% В, 23-40 мин 13-40 % В. Скорость элюента: 1.00 мл/мин.

Массу m , г, введенного вещества рассчитать по формуле

$$m = C_o \cdot V_g, \quad (2)$$

где C_o - концентрация вещества в растворе, г/см³; V_g - объем вводимого вещества, см³.

В таблице 2 приведены значения пределов детектирования для девяти фенольных кислот. Пределы детектирования можно снизить, если уменьшить уровень шума.

Таблица 2. Пределы амперометрического детектирования некоторых фенольных кислот

№	Название кислоты	Площадь пика, нА·с	Предел детектирования, г/мл
1	3,4-дигидроксibenзойная	1338.19	1.8×10^{-9}
2	Хлорогеновая	1461.94	1.7×10^{-9}
3	Транс-4-гидроксibenзойная	4429.52	5.3×10^{-10}
4	Ванилиновая	1743.99	1.3×10^{-9}
5	3,4-дигидроксикоричная	2029.89	1.2×10^{-9}
6	Сиреневая	2816.91	8.4×10^{-10}
7	Транс-4-гидроксикоричная	3319.87	7.1×10^{-10}
8	4-гидроки 3-метоксикоричная	1779.53	1.3×10^{-9}
9	3,5-диметокси-4-гидроксикоричная	1388.29	1.7×10^{-9}

Хроматограмма (рис. 2) стандартной смеси фенольных кислот позволяет быстро обнаружить присутствие этих кислот в пищевых и растительных объектах. В

последнее время для быстрого скрининга получают так называемые «профильные» хроматограммы [31, 32] Для этих целей амперометрическое детектирование весьма перспективно, т.к. оно определяет профиль только антиоксидантов. Для идентификации можно использовать вольтамперограммы и отношения сигналов, записанные при разных потенциалах. Для примера на рисунке 3 приведены вольтамперограммы производных бензойной кислоты. Были получены вольтамперограммы и других кислот.

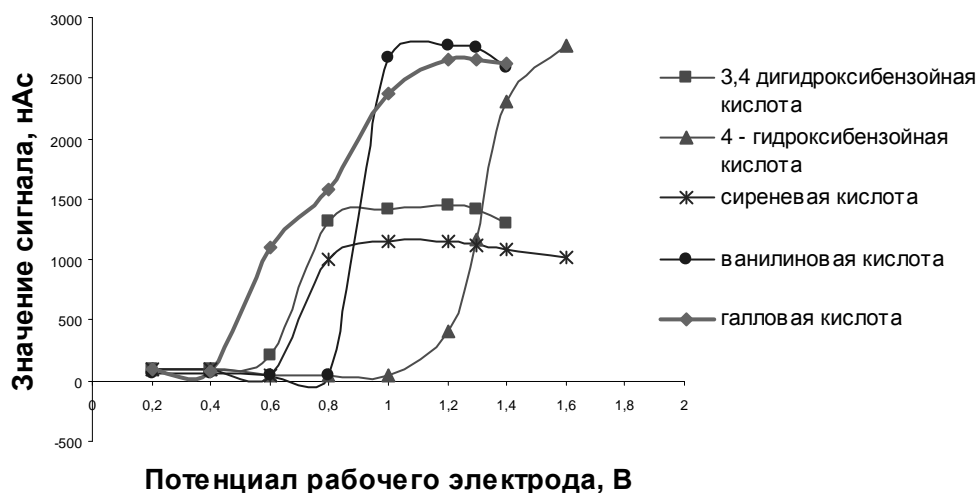


Рис. 3. Вольтамперограмма бензойных кислот, полученные на приборе «ЦветЯуза-01-АА»

Из вольтамперограмм были определены начальные и максимальные потенциалы окисления (таблица 3) для десяти фенольных кислот.

Таблица 3. Значения диапазонов потенциалов окисления (начальных и максимальных) фенольных кислот

№ п/п	Название кислоты	Потенциал окисления, В	
		Начальный	Максимальный
1	3,4 – дигидроксикоричная кислота	0.4	1.3
2	3,4 – дигидроксибензойная кислота	0.4	1.2
3	4 – гидроксibenзойная кислота	1	1.6
4	Транс – 4 - гидроксикоричная кислота	0.8	1.6
5	Сиреневая кислота	0.6	1
6	Ванилиновая кислота	0.8	1.2
7	3,5 – диметокси 4 – гидроксикоричная кислота	0.4	1
8	Хлорогеновая кислота	0.4	1.3
9	Транс – 4 – гидроксi 3 – метоксикоричная кислота	0.6	1.3
10	Галловая кислота	0.4	1.3

Наблюдается сильное различие начальных потенциалов окисления. Многие кислоты можно определять даже при потенциалах 0,4 В. Нами измерены десятки

образцов разных сортов озимой ржи, представленных ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Содержание феруловой кислоты колебалось в пределах 400-1000 мкг. Типичная хроматограмма фенольных кислот во ржи приведена на рис.4. Градуировочный график получен с коэффициентом корреляции 0,999.

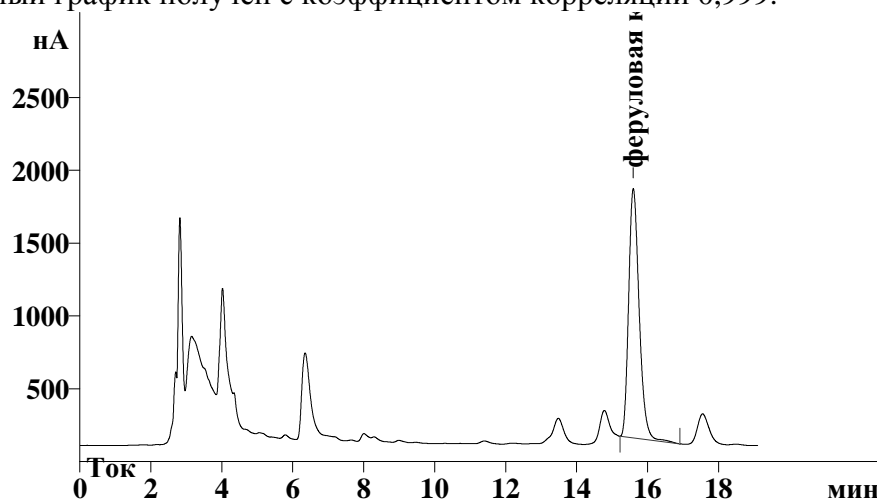


Рис. 4. Хроматограмма содержания феруловой кислоты в зернах ржи, полученная на хроматографе «ЦветЯуза» с амперометрическим детектором

Из хроматограммы видно, что содержание феруловой кислоты преобладает. Значительное количество феруловой кислоты в ячмене, хотя и меньше, чем во ржи. Основные полифенолы-антиоксиданты в кофе – это фенольные кислоты. В кофе больше всего содержится хлорогеновых кислот (более пятнадцати типов). Хлорогеновые кислоты представляют собой моно- или диэфиры хинной и коричной кислот. Кофеил-3-хинную кислоту часто называют хлорогеновой. В кофе идентифицированы изохлаорогеновые (дикофеилхинные в разном положении), а также ферулоилхинные, кумароилхинные и др. В кофе также идентифицированы следующие фенольные кислоты: феруловая, п-кумаровая, 3,4-диметоксикоричная, 3,4,5-триметоксикоричная, синаповая и др. [33]. На рис.5 а,б приведены хроматограммы фенольных кислот в кофе «арабика» и кофе «робуста». Идентифицированы кофейная, галловая и хлорогеновая кислоты.

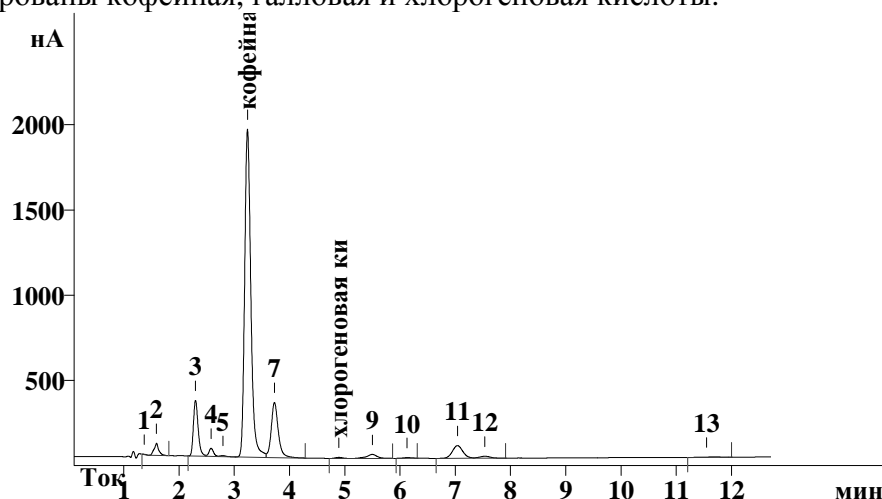


Рис. 5а. Хроматограмма оксиароматических кислот в кофе «арабика» на колонке GL WAKOSIL C18AR.

Хроматограф ЦветЯуза с амперометрическим детектором.

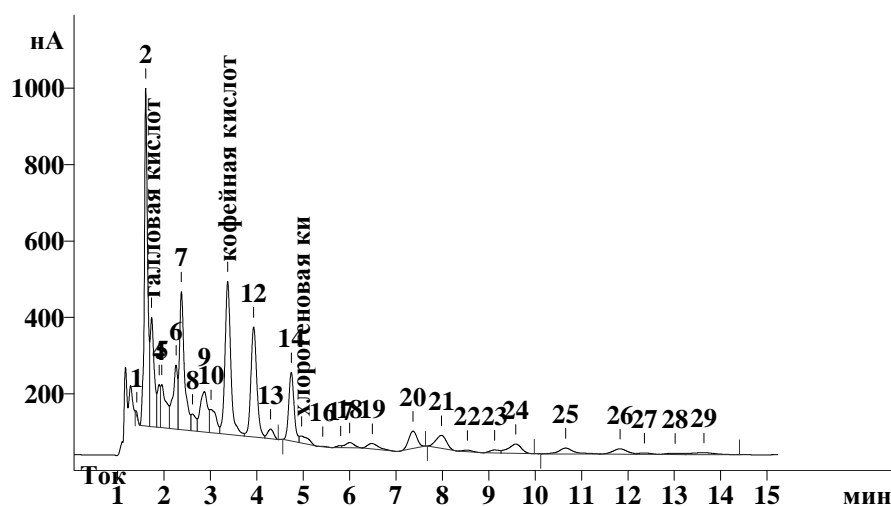


Рис. 5б. Хроматограмма оксиароматических кислот в кофе «робуста» на колонке GL WAKOSIL C18AR. Хроматограф ЦветЯуза с амперометрическим детектором.

Заключение

Приведен краткий обзор применения амперометрического детектирования в ВЭЖХ для определения фенольных кислот. Выбраны оптимальные условия разделения девяти часто встречающихся в растениях фенольных кислот. Впервые получены вольтамперограммы фенольных кислот и оценены их пределы амперометрического детектирования.

Список литературы

1. Jones J.M. Grain-based foods and health // *Cereals Food World*. 2006. V. 51. P. 108.
2. Dykes L., Rooney L.W. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits // *Cereal Foods World*. 2007. V. 32. P. 105–111.
3. Holtekjolen A. K., Kimitz C., Knutsen S. H. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V.54. P. 2253-2260.
4. Andreasen M.F., Christensen L.P., Meyer A.S., Hansen A. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye varieties // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 2837.
5. Zhou Z., Roberds K., Helliwell S. and Blanchard C. The distribution of phenolic acids in rice // *Food. Chem.* 2004. V. 87. P. 401.
6. Kovaioka M., Malinova E. Ferulic and Coumaric Acids, total phenolic compounds and their correlation in selected oat Genotypes // *Crech. J. Food. Sci.* 2007. V. 25. P. 325–332.
7. Adom K, Sorrells M, Liu R. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties // *J Agric Food Chem.* 2005. V.53. P.2297–2306.
8. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology // *J.Agric.Food Chem.* 2003. V.51. P. 2866-2887.
9. Brandsteterova E., Ziakova-Caniova A. Phenolic acids in Natural plants: analysis by HPLC // *Encyclopedia of chromatography.* Marcel Dekker 2002. P. 1-9.
10. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Федина П.А., Черноусова Н.И. Определение природных антиоксидантов в пищевых злаках и бобовых культурах // *Аналитика.* 2012. Т.1. С.32-36.

11. Dobes J., Zitka O., Sochor J. et.al. Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants. A review // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013. V.8. P. 4520-4542.
12. Whittle N., Eldridge H., Bartley J., Organ G. Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection // *Journal of the Institute of Brewing* 1999. V.105. P.89-99.
13. Cortina-Puig M., Gallart-Ayala H., Lacorte S. Liquid Chromatography Coupled to Electrochemical Detection and Mass Spectrometry for the Determination of Phenolic Compounds in Food and Beverages // *Curr. Anal. Chem.* 2012. V.8. P.436.
14. Merken H. M., Beecher G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: □ A Review // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V.48. P.577.
15. Cao W., Suo Z. R., Song J. R., Zheng J. B. Analyses of Seven Kinds of Phenolic Acids in Wine by HPLC with Electrochemical Detection // *Chem. J. Chin. Univ.-Chin.* 2005. V.26. P.1424.
16. Zitka, J. Sochor, O. Rop, S. Skalickova, P. Sobrova, J. Zehnalek, M. Beklova, B. Krska, V. Adam, R. Kizek Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits // *Molecules.* 2011. V.16. P. 2914.
17. Sochor J., Babula P., Krska B., Horna A., Provaznik I., Hubalek J., Kizek R., in J. Jan, R. Jirik, R. Kolar, J. Kolarova, J. Kozumplik, I. Provaznik (Editors), *Analysis of Biomedical Signals and Images*, Brno Univ Technology Vut Press, Brno, 2010, p. 209.
18. Sochor J., Skutkova H., Babula P., Zitka O., Cernei N., Rop O., Krska B., Adam V., Provaznik I., Kizek R. Mathematical Evaluation of the Amino Acid and Polyphenol Content and Antioxidant Activities of Fruits from Different Apricot Cultivars // *Molecules.* 2011. V.16. P. 7428.
19. Yoshida A., Sonoda K., Nogata Y., Nagamine T., Sato M., Oki T., Hashimoto S., Ohta H. Determination of Free and Bound Phenolic Acids, and Evaluation of Antioxidant Activities and Total Polyphenolic Contents in Selected Pearled Barley // *Food Sci. Technol. Res.* 2010. V.16. P. 215.
20. Liang Y., Cao W., Chen W.J., Xiao X.H., Zheng J.B. Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection // *Food Chem.* 2009. V.114. P.1537.
21. Joerg E., Sontag G. Multichannel coulometric detection coupled with liquid chromatography for determination of phenolic esters in honey // *J.Chromatogr. A* 1993. V.635. P. 137.
22. Joerg E., Sontag G. Determination of phenolic acids in honey by HPLC using coulometric dual electrode detection // *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 1992. V.88. P. 179.
23. Gazdik Z., Reznicek V., Adam V., Zitka O., Jurikova T., Krska B., Matuskovic J., Plsek J., Saloun J., Horna A., Kizek R. Use of Liquid Chromatography with Electrochemical Detection for the Determination of Antioxidants in Less Common Fruits // *Molecules.* 2008. V.13. P.2823.
24. Jurikova T., Sochor J., Rop O., Mlcek J., Balla S., Szekeres L., Zitny R., Zitka O., Adam V., Kizek R. Evaluation of Polyphenolic Profile and Nutritional Value of Non-Traditional Fruit Species in the Czech Republic — A Comparative Study // *Molecules.* 2012. V.17. P. 8968.
25. Vanbeneden N., Delvaux F., Delvaux F. R. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection // *J. Chromatogr. A.* 2006. V.1136. P. 237.

-
26. Aaby K., Skrede G., Wrolstad R. E. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*) // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53. P. 4032.
27. Kahoun D., Rezkova S., Veskrnova K., Kralovsky J., Holcapek M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1202. P.19.
28. Milbury P. E., Chen C. Y., Dolnikowski G. G., Blumberg J. B. Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds // J. Agric. Food Chem. 2006. Vol. 54. P. 5027.
29. Kermasha S., Goetghebeur M., Dumont J. Determination of Phenolic Compound Profiles in Maple Products by High-Performance Liquid Chromatography // J. Agric. Food Chem. 1995. Vol. 43. P. 708.
30. Luo W. H., Ang C. Y. W., Gehring T. A., Heinze T. M., Lin L. J., Mattia A. Determination of Phenolic Compounds in Dietary Supplements and Tea Blends Containing *Echinacea* by Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection // J. AOAC Int. 2003. Vol. 86. P. 202.
31. Katalinic V. High-performance liquid chromatographic determination of flavan fingerprints in plant extracts // J.Chromatogr. A. 1997. Vol. 775. P. 359-367.
32. Qian Y., Heitz R.E.A., Krempin D.W. Antioxidant activity profile assay. Patent No: US 6.429021 B1. Date of Patent: Aug 6, 2002.
33. Яшин Я.И., Левин Д.А., Яшин А.Я., Миронов С.А., Осина О.С. Кофе: подробно и со вкусом. Химический состав кофе и его влияние на здоровье человека. ТрансЛит. Москва. 2011. С. 106-141.
-

Яшин Александр Яковлевич – к.х.н.,
зам.руководителя отдела исследований и
разработок компании «Интерлаб», Москва

Yashin Alexander Ya. – Dr.Sci. (chemistry),
company “Interlab”. Research and Development
group vice manager, Moscow