



УДК 543.054

Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции

Дейнека В.И.¹, Михеев А.Ю.², Олейниц Е.Ю.¹, Дейнека Л.А.¹

¹ ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород

² ФГБНУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»,
Пушино-на-Оке, Московская область

Поступила в редакцию 18.04.2018 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/556>

Исследована возможность использования насадочных картриджей ДИАПАК С18 для очистки хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции. Показано, что особое внимание следует уделить сорбции 3-кофеоилхиновой кислоты (3CQA), обладающей наименьшим удерживанием в условиях обращенно-фазовой хроматографии, а сорбцию необходимо проводить из подкисленных до pH 1 экстрактов. С учетом объема элюата, получаемого при десорбции, и последующего разбавления степень концентрирования 3CQA составит около 2.5, а для 5-кофеоилхиновой и 4-кофеоилхиновой кислот этот параметр может быть удвоен. Показано, что использование при пробоподготовке высоких концентраций метанола или ацетонитрила в качестве растворителей пробы может быть недопустимым из-за «выноса» части аналитов раньше основного пика.

Ключевые слова: твердофазная экстракция, хлорогеновые кислоты, обращенно-фазовая ВЭЖХ, растворитель пробы, артефакты в хроматографии.

Purification of chlorogenic acids by solid phase extraction

Deineka V.I.¹, Mikheev A.Yu.², Oleinits E.Yu.¹, Deineka L.A.¹

¹ Belgorod National Research University, Belgorod,

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino-on-Oka

Solid phase extraction (SPE) with usage of syringe cartridges DIAPAK C18 for purification and concentration of chlorogenic acids from green coffee beans or infusions was worked up. The problem is a consequence of low lipophilicity of chlorogenic acids that is resulted in low retention of the solutes at reversed-phase conditions. The method was adopted for the HPLC determination of the acids by reversed-phase special gradient mode with spectrophotometric detection (325 nm). In the mode the three chlorogenic acid isomers were eluted by isocratic mode for correct solutes quantification without regard to solvatochromic effects and a gradient elution for desorption of highly retained concomitant solutes. The acidification of the mobile phase was shown to be necessary to achieve the best reversed-phase sorption at SPE as well as for subsequent chromatographic performance. Utilization of two cartridges connected in series was proposed to control the breakthrough of the least retainable 3-caffeoylquinic (neochlorogenic) acid (3CQA) during SPE, while acidification of water extracts to pH 1 – 0 is highly desirable to achieve 2.5-fold concentration after solute reextraction by a proper solvent (30 vol. % of CH₃CN and 3 vol. % of HCOOH in water) with subsequent dilution (1 : 1) with water. For plant sources without 3CQA extracts may be purified and other chlorogenic acids may be concentrated up to 5-fold due to better sorbtivities of 5-caffeoylquinic (chlorogenic) and 4-caffeoylquinic (cryptochlorogenic) acids compared to 3CQA. The attention was paid to influence of sample solvent composition and injected sample volume upon chromatographic performance to escape appearance of

chromatographic artefacts leading to chromatographic peak distortion and splitting. Methanol excess in sample solution had a higher impact upon peak distortion compared to acetonitrile.

Keywords: solid-phase extraction, chlorogenic acids, reverse-phase HPLC, sample solvent, chromatographic artifacts.

Введение

Хлорогеновые кислоты, - 3-кофеолихинная, 4-кофеолихинная и 5-кофеолихинная кислоты (ХК, 3СQA, 4СQA, 5СQA, рис.1), - относятся к важнейшим природным фенольным соединениям, обладающим высокой биологической активностью [1]. Они синтезируются во многих растениях, которые используются (или могут быть использованы) в качестве источников этих важнейших биологически активных веществ [2]. По этой причине экстракция, очистка и концентрирование ХК являются важными технологическими операциями в производственных схемах и при их определении в исходном растительном материале.

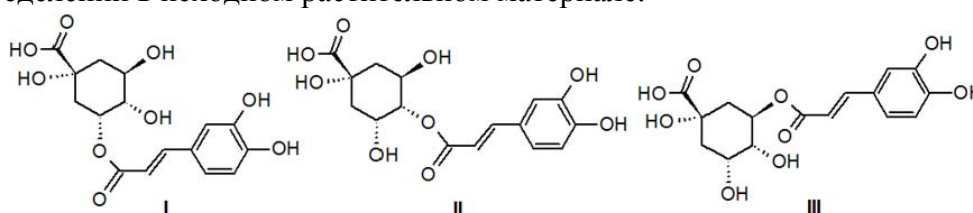


Рис. 1. Структура 3-кофеоилхинной (I), 4-кофеоилхинной (II) и 5-кофеоилхинной (III) кислот

Экстракция хлорогеновых кислот проблем не вызывает, поскольку они легко растворимы в воде, поэтому основная проблема – очистка ХК от сопутствующих экстрактивных веществ. В работе [3] были сопоставлены пять способов очистки и концентрирования ХК из кофе, включавшие, в том числе, и твердофазную экстракцию (ТФЭ) на C18 Sep-Pak картриджах 51910 (Millipore Waters). При этом было установлено, что лучший результат достигается при экстракции ХК метанолом (метод M+) с последующим отделением от коллоидных частиц добавлением специального реагента (Cagez reagent), содержащего ацетат цинка, ледяную уксусную кислоту и раствор гексацианоферрата (II) калия. Согласно представленным данным по методу M+ массовая доля хлорогеновых кислот в исходном материале оказалась более чем в три раза выше, чем по методу ТФЭ. К сожалению, в работе не исследовали все необходимые параметры для определения причин неэффективности метода ТФЭ. В работе [4] сообщали о хорошей сорбируемости ХК на полиамидном сорбенте с последующей реэкстракцией методом флэш-хроматографии. Известно использование C18 картриджа [5] для удаления сопутствующих липофильных веществ из экстракта ХК в 80%-ном метаноле. В работе [6] для выделения фенольных соединений из яблочного сока использовали два C18 картриджа: первый из них, кондиционированный при pH = 7.0, затем сорбировали фенольные вещества не кислотного типа, а из элюата после подкисления сорбировали ХК на втором картридже, кондиционированном при pH = 1. В работе [7] сопоставлена эффективность нескольких различных сорбентов в ТФЭ: а) OASIS HLB - гидрофильно-гидрофобно сбалансированного сополимера N-винилпирролидона и дивинилбензола, б) «обычного» обращенно-фазового химически модифицированного силикагеля, Sep-Pak C18, в) сильного катионообменника, AccBond SAX; г) и аминофазы, AccBond Amino. В результате авторы пришли к выводу о том, что картриджи C18 и OASIS не только ускоряют, но и упрощают очистку экстрактов с полифенольными соединениями. Активированный уголь был успешно использован для сорбции ХК при pH = 3 при 60°C с последующей экстракцией ХК

98%-ным этанолом [8]. В работе [9] для твердофазной экстракции использовали насадочные картриджи (концентрирующие патроны) ДИАПАК С 18 и ДИАПАК С (заполнен сверхсшитым полистиролом) и при этом было показано, что проскок галловой и кофейной кислот наблюдается довольно быстро.

Настоящая работа посвящена исследованию возможности очистки и концентрирования экстрактов, содержащих ХК, методом ТФЭ на картриджах С18 сорбции для последующего определения в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Эксперимент

Зерна зеленого кофе измельчали на бытовой кофемолке, затем навеску массой 1.010 ± 0.010 г заливали 100 см^3 кипящей воды и настаивали в течение 10 мин при периодическом перемешивании. После охлаждения до комнатной температуры настой отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Полученный экстракт смешивали с 0.1 М водным раствором HCl в соотношении 3:7 (по объему) для спектрофотометрического анализа.

Концентрирование хлорогеновых кислот осуществляли методом твердофазной экстракции на насадочных картриджах (на концентрирующих патронах) ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва, РФ). Для этого патрон активировали, пропуская $5-7 \text{ см}^3$ ацетона со скоростью 2-3 капли в секунду, затем кондиционировали, пропуская $15-20 \text{ см}^3$ 0.1 М водного раствора HCl. Сорбцию осуществляли на первом этапе, пропуская экстракт порциями по 2 см^3 со скоростью 2-3 капли в секунду, собирая элюат в отдельные емкости для последующего исследования элюата спектрофотометрическим и хроматографическим методами. Для десорбции в меньшем объеме готовили экстрагенты на основе ацетонитрила и муравьиной кислоты, содержащие втрое большую концентрацию ацетонитрила по сравнению с элюентом, используемым при последующем определении кислот методом ВЭЖХ, но перед ВЭЖХ для исключения артефактов элюаты разбавляли в три раза водой.

Для записи хроматограмм использовали хроматографическую систему Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хлорогеновые кислоты разделяли на хроматографической колонке 100×4.6 мм Kromasil 100-5C18 с предколонкой 10×4.0 мм, заполненной таким же сорбентом. Подвижные фазы на основе ацетонитрила: А - 8 об.% CH_3CN и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде, Б - 32 об. % CH_3CN и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде. Режим градиента: 0 мин – 0% Б, 12 мин – 0% Б, 20 мин – 100% Б, 21 мин – 0 % Б, 33 мин – 0 % Б.: на основе метанола: А - 16 об. % CH_3OH и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде, Б - 40 об. % CH_3OH и 1 об.% HCOOH в дистиллированной воде. Режим градиента: 0 мин – 0 % Б, 20 мин – 0 % Б, 30 мин – 100% Б, 31 мин – 0 % Б, 40 мин – 0 % Б. Скорость подачи подвижной фазы во всех случаях составляла $0.8 \text{ см}^3/\text{мин}$. Хроматограммы записывали при 325 нм.

Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали в программном продукте ChemStation 32. Дополнительно программы и весь набор данных обрабатывали в MSExcel. Для идентификации кислот использовали стандартный образец 5-кофеоилхинной кислоты (Aldrich) и 3-кофеоилхинная и 4-кофеоилхинная кислоты были идентифицированы по совпадению спектров поглощения и порядка элюирования по данным работы [10].

Обсуждение результатов

В обращенно-фазовой хроматографии сорбция веществ усиливается при росте их липофильности. Однако, наиболее часто используемое в качестве параметра ли-

пофильности расчетное значение коэффициента распределения веществ в системе октанол-1 – вода, CLogP [11], для хлорогеновых кислот практически бесполезно, поскольку удерживание изомерных хлорогеновых кислот в широком диапазоне pH растет в ряду 3CQA < 5CQA < 4CQA, рис.2, что никак не коррелирует с CLogP, рассчитанным, например, по программе Molinspiration (-0.45, -0.45 и -0.67, соответственно).

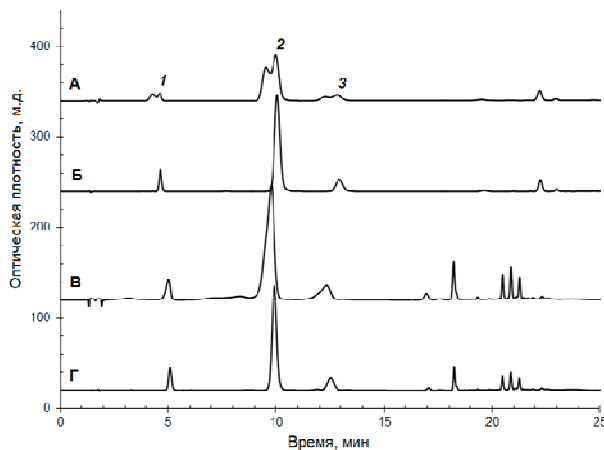


Рис. 2. Контроль влияния растворителя пробы на эффективность разделения хлорогеновых кислот

Кислоты: 1 – 3-кофеоилхинная (неохлорогеновая), 2 – 5-кофеоилхинная; 3 – 4-кофеоилхинная (криптохлорогеновая). Колонка: 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5C18 и предколонка 10 × 4.0 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата 30°C. Градиентное элюирование (см. текст) с использованием в качестве органического модификатора метанола (А и Б) и ацетонитрила (В и Г). Объем водимых проб 5 мкл (А, Б и Г) и 10 мкл (В). Детектор: 325 нм. Растворитель проб: А – 60 об.% метанола и 1 об.% муравьиной кислоты в воде; Б – 1 об.% муравьиной кислоты в воде, В – 80 об.% ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в воде; Г – 1 об.% муравьиной кислоты в воде.

При этом, несомненно, то, что липофильность ХК возрастает при подавлении диссоциации карбоксильной группы. Расчет по программе MarvinSketch (ChemAxon) молекул изомерных ХК приводит к оценке рК карбоксильной группы на уровне 3.33 – 3.39. Корректность расчетного показателя в целом подтверждена экспериментально - по наиболее быстрому изменению удерживания изомерных хлорогеновых кислот в диапазоне pH от 3 до 4. Распределение различно заряженных частиц хлорогеновых кислот, рассчитанное той же программой MarvinSketch, указывает на существование незаряженной частицы (с полностью подавленной диссоциацией карбоксильной группы), по крайней мере, до pH=0 (при pH=2 доля ионизированной ХК меньше 5%). Следовательно, для сорбции при твердофазной экстракции лучше использовать низкие pH (0-1), а при ВЭЖХ воспользоваться возможно более кислыми элюентами в пределах диапазона стабильности стационарной фазы (например, с pH около 2.5, при которой доля анионной формы находится в пределах 10%).

По полученным результатам можно утверждать, что константа Генри (для сорбции при малой степени заполнения поверхности сорбента, характерной для ВЭЖХ разбавленных растворов аналитов) при pH=2 для сорбции 5-кофеоилхинной (5CQA) кислоты немногим меньше (в 1.2 раза), чем для 4-кофеоилхинной кислоты (5CQA), но более, чем в 2 раза (в 2.1 раза) больше, чем для 3-кофеоилхинной кислоты (3CQA). Следовательно, особые проблемы могут возникнуть при сорбции 3CQA. Увеличение pH от 2 до 5 уменьшает константу Генри для сорбции 5CQA более чем в 4 раза (4.25 раза), поэтому сорбцию следует проводить из сильнокислых растворов, подкисляя при необходимости экстракт минеральной кислотой перед ТФЭ.

Сорбцию хлорогеновых кислот исследовали на примере экстракта зеленого кофе с относительно высоким содержанием 3CQA и 4CQA. Экстракт (0.225 г/дм³ суммы всех хлорогеновых кислот) вручную пропускали через подготовленный картридж, собирая для анализа элюат порциями по 2 см³. Результаты спектрофотометрического анализа порций элюата представлены на рис.3. Проскок хлорогеновых кислот начинается уже после сорбции 10 мл экстракта (т.е. после сорбции 2.25 мг суммы ХК). Следовательно, для получения репрезентативных результатов последующего определения суммы ХК можно сорбировать не более 10 мл экстракта с указанной выше концентрацией. При ВЭЖХ определении ХК в тех же порциях элюата было установлено, что, начиная с 10 см³, наблюдается проскок 3CQA, в то время как для 5CQA и 4CQA до проскока этих соединений можно произвести сорбцию из примерно в два с половиной раза большего объема экстракта.

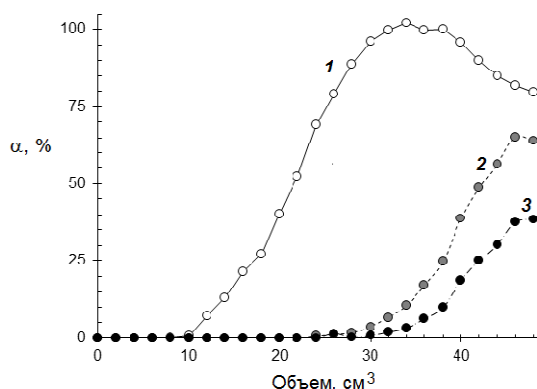


Рис. 3. Концентрация элюата (в % от исходной) при твердофазной экстракции раствора смеси хлорогеновых кислот на насадочных картриджах ДИАПАК С18. Соединения: 1 – 3CQA; 2 – 5CQA и 3 – 4CQA.

Однако результат может сильно зависеть не только от концентрации суммы ХК, но и от присутствия в экстракте других соединений, способных вытеснять ХК из сорбционного слоя. Нами для контроля эффективности сорбции компонентов экстракта предложен вариант ТФЭ, при котором экстракт пропускается через два последовательно соединенных патрона. В таком случае элюат из первого патрона можно использовать для количественного определения соотношения между количествами компонентов экстракта, если они не обнаруживаются в элюате со второго патрона. Отметим, что процесс сорбции в таком случае реализуется без лишних усилий.

Для реэкстракции нами разработана процедура, по которой ХК с картриджа элюируют раствором, содержащим 30 об. % ацетонитрила и 3 об. % муравьиной кислоты в воде. Спектрофотометрический контроль элюатов порциями по 0.5 см³ показывает, что для практически полной десорбции ХК необходимо удалить в слив первые 0.5 см³ реэкстракта, собирая отдельно следующие 2 см³, что обеспечивает реэкстракцию около 98,5 % исходных хлорогеновых кислот. Затем полученный экстракт необходимо разбавить в два раза дистиллированной водой. В итоге предложенный вариант обеспечивает повышение концентрации ХК в пробе в 2.5 раза по сравнению с исходным экстрактом.

Указанное выше разбавление необходимо для исключения появления артефактных пиков [12]. В этом отношении можно остановиться на выводах работы [3] о том, что метанольный экстракт кофе может быть напрямую введен в хроматографическую систему при определении хлорогеновых кислот. Это, по меньшей мере, странно, если учесть, что используется растворитель пробы, обладающий значительно большей элюирующей силой по сравнению с подвижной фазой. Для контроля

влияния растворителя пробы на характер получаемых хроматограмм был выполнен эксперимент, в котором одинаковое количество экстракта разбавляли растворами 1 об.% HCOOH в воде и 1 об.% HCOOH в метаноле или ацетонитриле, записывая затем хроматограммы с разным объемом введенной пробы (от 5 до 15 мкл).

При вводе образца экстракта, содержавшего даже не 100, а лишь 60 об.% метанола «вынос» веществ оказался более чем заметен, - наблюдается характерное для такого случая раздвоение пиков, рис.2, тогда как для образца, растворенного в 1 об.% растворе HCOOH в воде, были получены нормальные пики. При увеличении объема вводимой пробы раздвоение превращается в сложную сумму уширенных пиков с уменьшенными временами удерживания, из чего следует, что не только чисто метанольный экстракт вводить в хроматографическую систему не следует, но и серьезного превышения концентрации метанола в растворителе пробы по сравнению с подвижной фазой следует избегать.

Результаты исследования образцов проб, полученных с использованием ацетонитрила оказались похожими на приведенные выше, но им было уделено более пристальное внимание из-за более частого использования именно ацетонитрила в качестве компонента подвижной фазы, по крайней мере в нашей лаборатории (НИУ БелГУ). Для пиков 5CQA, записанных для двух растворов, один из которых не содержал ацетонитрила вообще (случай I), а во втором (случай II) объемная доля ацетонитрила составила 80%. В случае I при увеличении объема пробы в ряду 5 – 10 – 15 мкл высота пика увеличивалась практически точно в соответствующее число раз, а высота на половине ширины практически не изменялась, что говорит о приемлемости такого варианта введения пробы. В случае II вынос вещества (рис.2) был заметен – и по непропорциональному росту площадей пика 5CQA, и по существенному уширению пика, хотя при введении пробы объемом 5 мкл наблюдалось лишь незначительное уширение пика. Возможно, найденные различия для двух элюентных систем связаны с особенностями сольватации стационарной фазы и аналитов метанолом или ацетонитрилом, но выяснение причин такого эффекта требует дополнительных исследований.

Заключение

Таким образом, в работе предложен способ очистки и концентрирования ХК в 2.5 раза при помощи твердофазной экстракции на насадочных картриджах ДИАПАК С18. В способе наименьшим удерживанием характеризуется 3-кофеоилхинная (неохлорогеновая) кислота, и сорбцию следует проводить из сильноокислых экстрактов (рН до 1). Предложен простой вариант экстракции с контролем проскока с использованием двух последовательно соединенных картриджей. При этом показано, что разбавление реэкстракта необходимо для исключения появления артефактных пиков на хроматограмме.

Список литературы

- 1 Upadhyay R., Rao L.J.M. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. Vol. 53. pp. 968-984.
2. Gil M., Wianowska D. // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin – Polonia.* 2017. Vol. 72. S. AA. pp. 61-104.
3. Ky C.-L., Noirot M., Hamon S. / *J. Agric. Food Chem.* 1997. Vol. 45. pp. 786-790.
4. Zhao W., Chen Y., Li S., Dai K. et al. // *African J. Biotechnol.* 2015. Vol. 14. pp. 1731-1736.
5. Li Z., Wang L., Yang G., Shi H. et al. // *J. Chromat. Sci.* 2003. Vol. 41. pp. 36-40.
6. Suárez B., Picinelli A., Mangas J.J. // *J. Chromat. A.* 1996. Vol. 727. pp. 203-209.

7. Zhang X., Liu W., Xu Y., Yang L. et al. // *Chem. Res. Chinese Universities*. 2011. Vol. 27, pp. 550-556.

8. Suárez-Quiroz M.L., Campos A.A., Alfaro G.V., González-Ríos O. et al. // *J. Food Compos. Anal.* 2014. Vol. 33. pp. 55-58.

9. Темердашев З.А., Милевская В.В., Киселева Н.В., Верниковская Н.А. и др. // *Аналитика и контроль*. 2013. Т. 17. С. 211-218.

References

1 Upadhyay R., Rao L.J.M., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2013, Vol. 53, pp. 968-984.

2. Gil M., Wianowska D., *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin – Polonia*. 2017, Vol. 72. S. AA, pp. 61-104.

3. Ky C.-L., Noirot M., Hamon S., *J. Agric. Food Chem.*, 1997, Vol. 45, pp. 786-790.

4. Zhao W., Chen Y., Li S., Dai K. et al. *African J. Biotechnol.*, 2015, Vol. 14, pp. 1731-1736.

5. Li Z., Wang L., Yang G., Shi H. et al., *J. Chromat. Sci.*, 2003, Vol. 41, pp. 36-40.

6. Suárez B., Picinelli A., Mangas J.J., *J. Chromat. A*, 1996, Vol. 727, pp. 203-209.

7. Zhang X., Liu W., Xu Y., Yang L. et al., *Chem. Res. Chinese Universities*, 2011, Vol. 27, pp. 550-556.

Дейнека Виктор Иванович – профессор кафедры общей химии, д.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Михеев Андрей Юрьевич – научный сотрудник, к.ф.-м.н., Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино-на-Оке, Московская область

Олейниц Елена Юрьевна – магистрант кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Дейнека Людмила Александровна – доцент кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

10. Shan Y., Jin X., Cheng Y., Yan W. // *Internat. J. Food Prop.* 2017. Vol. 20. pp. 2028-2040.

11. Hanai T., Tran C., Hubert J. // *J. Sep. Sci.* 1981. Vol. 4. pp 454-460.

12. Дейнека В.И., Сидоров А.Н., Дейнека Л.А., Тыняная И.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2016. Т. 16. № 3. С. 384-389.

8. Suárez-Quiroz M.L., Campos A.A., Alfaro G.V., González-Ríos O. et al., *J. Food Compos. Anal.*, 2014, Vol. 33, pp. 55-58.

9. Temerdashev Z.A., Milevskaya V.V., Kiseleva N.V., Vernikovskaya N.A. et al., *Analitika i kontrol, Analytics and Control*, 2013, Vol. 17, pp. 211-218.

10. Shan Y., Jin X., Cheng Y., Yan W., *Internat. J. Food Prop.* 2017, Vol. 20, pp. 2028-2040.

11. Hanai T., Tran C., Hubert J., *J. Sep. Sci.*, 1981, Vol. 4, pp 454-460.

12. Deineka V.I., Sidorov A.N., Deineka L.A., Tynyanaya I.I., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2016, Vol. 16, pp. 384-389.

Deineka Victor I. - professor of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod State National Research University. Dr. Sci. (Chemistry), Belgorod, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Mikheev Andrey Y., researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Science, Ph.D. (Physics), Pushchino-on-Oka, e-mail: 2miheev@gmail.com

Oleinits Elena Y. – master programm student of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod State National Research University., Belgorod, e-mail: 812887@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. - professor assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod State National Research University. Ph.D. (Chemistry), Belgorod, e-mail: deyneka@bsu.edu.ru