

УДК: 543.635:543.544.123

РАЗДЕЛЕНИЕ ХЛОРОГЕНОВЫХ КИСЛОТ И КОФЕИНА НА СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ ДИАСФЕР-110-С10CN

© 2024 г. В. И. Дейнека^{a,*}, Е. Ю. Олейниц^a, Х. М. Культид Кабрера^a, Л. А. Дейнека^a

^aБелгородский государственный национальный исследовательский университет,

Институт фармации, химии и биологии
ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия

*E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 22.05.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 17.06.2024 г.

Показано, что переход от традиционных C18 (I) стационарных фаз с неполярным эндкеппингом к фазе C10CN (II), содержащей концевую полярную группу, приводит к изменению селективности, сопоставимой с ростом активности остаточных силанольных групп в фазах I. Эффект обнаружен при разделении изомерных монокофеолхинных кислот. Предложены два варианта градиентных режимов с использованием колонки Диасфер-110-C10CN и водно-ацетонитрильных, подкисленных H_3PO_4 компонентов подвижной фазы для разделения хлорогеновых кислот и кофеина экстрактов зеленого кофе различных производителей. Показано, что предложенный хроматографический способ также может быть использован и для определения тригонелина, удерживание которого заметно увеличилось при замене фазы I на фазу II. Предложенный способ использован для дифференциации плодов двух видов кофе – арабика и робуста. Установлено, что в экстрактах кофе робуста выше содержание суммы хлорогеновых кислот и кофеина.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, C18-фаза; C10CN-фаза, селективность, хлорогеновые кислоты, кофеин, тригонеллин, кофе арабик, кофе робуста.

DOI: 10.31857/S0044450224110092, EDN: swolam

В работе [1] показано, что изменение порядка элюирования монокофеолхинных кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии определяется активностью остаточных силанольных групп. По этой причине экспериментально обнаружаются различия в селективности разделения пары 4-кофеолхинной (4CQA) и 5-кофеолхинной (5CQA) кислот: наиболее часто наблюдаемый порядок элюирования $t_R(3CQA) \ll t_R(5CQA) < t_R(4CQA)$ [2–5] через соэлюирование [6] может измениться на другой $t_R(3CQA) \ll t_R(4CQA) < t_R(5CQA)$ [7, 8] с ростом активности остаточных силанольных групп [1]. Однако в таком случае интерес представляет исследование селективности разделения хлорогеновых кислот на стационарной фазе Диасфер C10CN, гидрофильные свойства цианидной группы которой могут дополнить липофильные свойства основы из десяти метиленовых групп стационарной фазы. К настоящему времени число публикаций по изучению хроматографического поведения веществ

на стационарной фазе такого типа весьма ограничено [9–12].

Цель настоящей работы – сопоставление селективности разделения тригонеллина, кофеина и хлорогеновых кислот, к которым в широком понимании относятся три изомерные монокофеолхинные, три изомерные дикофеолхинные и 5-ферулоилхинная кислота, и использование разработанного способа для определения состава экстрактов зеленого кофе и дифференциации видов кофе арабика (*Coffea arabica*) и более дешевого вида – робуста (*Coffea canephora* var. *robusta*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения экстракции ингредиентов зеленого кофе зерна размалывали в бытовой кофемолке и отсеивали для анализа фракцию, проходившую через сито 0.125 мм. Навеску размолотого кофе массой около 0.050 г заливали 20 мл смеси этанола с водой (1 : 1, по объему) и выдерживали на перемешивающем устройстве

LSS 220 в течение 40 мин. Затем смесь центрифугировали, сливали экстракт, а твердый остаток повторно экстрагировали. Экспериментально установили, что за две последовательные экстракции извлекается более 97% активных ингредиентов.

Для градуировки отклика детектора использовали в качестве стандартов: хлорогеновую кислоту ($5\text{CQA}\cdot0.5\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich, Индия) для определения всех монокофеоилхинных, дикофеоилхинных кислот и 5-ферулоилхинной кислоты (при пересчете на моль площадь пиков дикофеоилхинных кислот делили на два) и кофеин (Китай).

Использовали хроматографическую систему Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. Для разделения компонентов экстрактов зеленого кофе применяли различные варианты подвижных фаз системы этанол–0.2 об. % ортофосфорной кислоты–вода в изократическом режиме для сопоставления селективности разделения, в градиентных режимах – для определения концентрации активных ингредиентов экстракта. При сопоставлении селективности разделения использовали колонку 150×4.0 Диасфер-110-C10CN, 5 мкм, и колонку 100×4.6 Kromasil 100-5C18. При определении активных ингредиентов использовали только первую колонку в двух вариантах градиентного элюирования с двумя компонентами подвижной фазы: А – 10 об. % этанола, 0.2 об. % ортофосфорной кислоты в воде, Б – 40 об. % этанола, 0.2 об. % ортофосфорной кислоты в воде в режимах градиента: 1) 0 мин – 0% Б; 3 мин – 0% Б; 25 мин – 100% Б; 26 мин – 0% Б; 35 мин – 0% Б; 2) 0 мин – 20% Б; 3 мин – 20% Б; 25 мин – 100% Б; 26 мин – 20% Б; 35 мин – 20% Б.

Экстракты зеленого кофе нельзя вводить в хроматограф из-за образования артефактов – уширения и искажения формы пиков монокофеоилхинных кислот вследствие превышения элюирующей способности растворителя образцов по сравнению со стартовым элюентом. Экспериментально определили, что достаточно уже двукратного разбавления дистиллированной водой для исключения их образования, хотя при определении активных ингредиентов использовали четырехкратное разбавление. После разбавления растворы проб фильтровали через нейлоновый насадочный фильтр с порами 0.45 мкм (Millipore Millex HP, Китай) без дополнительной очистки.

Скорость подачи подвижной фазы – 0.8 мл/мин при температуре термостата колонки 30°C . Для детектирования всех хлорогеновых кислот использовали длину волны 325 нм, а для определения кофеина – вторую длину волны 273 нм. Установили, что градировочные

графики для хлорогеновых кислот и кофеина линейны без статистически значимых интерсепторов (указывающих на систематические погрешности) в диапазонах концентраций от 0.01 до 0.06 мг/мл для хлорогеновой кислоты и от 0.005 до 0.06 мг/мл для кофеина в хроматографируемой пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе в качестве безвредных для человека и окружающей среды подвижных фаз использовали различные составы системы этанол–0.2 об. % H_3PO_4 –вода. Для стабилизации зарядового состояния хлорогеновых кислот в подвижные фазы вносили добавки 0.2 об. % ортофосфорной кислоты. При этом достигалось значение pH подвижной фазы немного выше 2. Это приводило, во-первых, к переводу всех кислот в почти полностью неионизированное состояние [13]. Во-вторых, такой состав подвижной фазы не выходит за пределы рекомендованного для обычных “мономерных” стационарных фаз диапазона pH 2–8 [14].

Стационарную фазу Kromasil 100-5C18 использовали в качестве фазы сравнения. Хроматографическое поведение основных компонентов зеленого кофе, включающих три изомерные монокофеоилхинные кислоты – 5-кофеоилхинную (5CQA), 4-кофеоилхинную (4CQA) и 3-кофеоилхинную (3CQA) и кофеин, представлено на карте разделения второго типа [15] (рис. 1).

Из представленных данных следует, что во всем рассмотренном диапазоне концентрации этанола в подвижной фазе (от 10 до 16 об. %) порядок элюирования на стационарной фазе марки Kromasil не изменяется:

$$t_{\text{R}}(3\text{CQA}) < t_{\text{R}}(\text{кофеин}) < t_{\text{R}}(5\text{CQA}) < t_{\text{R}}(4\text{CQA}). \quad (1)$$

На рис. 1 отсутствует тригонеллин, поскольку его удерживание (вероятно, вследствие ионной эксклюзии) оказалось меньше удерживания щавелевой кислоты, использованной в качестве метчика “мертвого” времени колонки.

Переход к стационарной фазе Диасфер C10CN привел к существенным изменениям в удерживании основных компонентов (рис. 2), что, по всей видимости, связано именно с наличием гидрофильной CN-группы на конце привитого алкильного радикала. Как и предполагалось, изменилась селективность разделения пары изомерных хлорогеновых кислот – удерживание 5CQA во всех составах подвижных фаз оказалось выше, чем 4CQA :

$$t_{\text{R}}(3\text{CQA}) < t_{\text{R}}(4\text{CQA}) < t_{\text{R}}(5\text{CQA}). \quad (2)$$

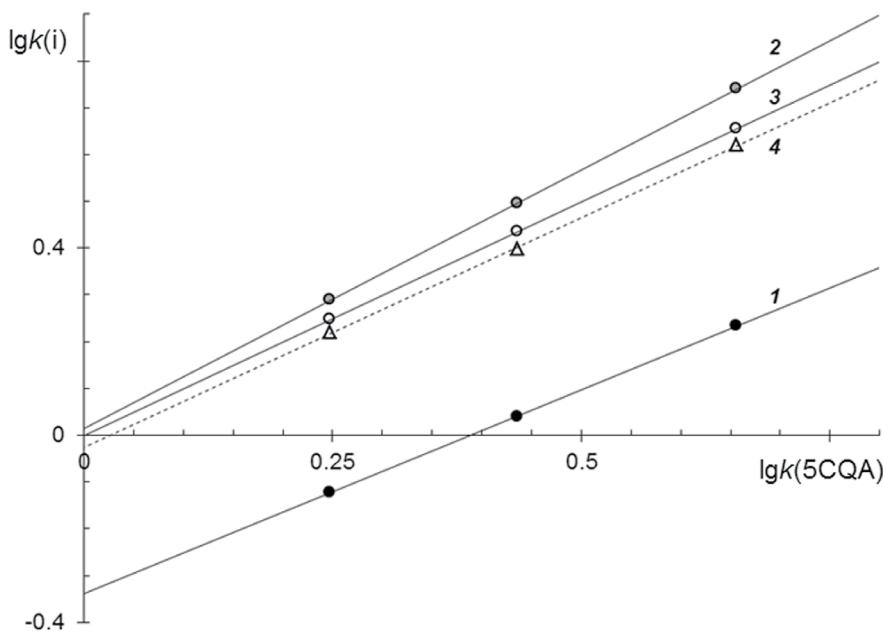


Рис. 1. Карта разделения второго типа 3CQA (1), 4CQA (2), 5CQA (3) и кофеина (4) на стационарной фазе Kromasil 100-5C18 в подвижных фазах системы этанол–0.2 об. % ортофосфорной кислоты–вода при 30°C.

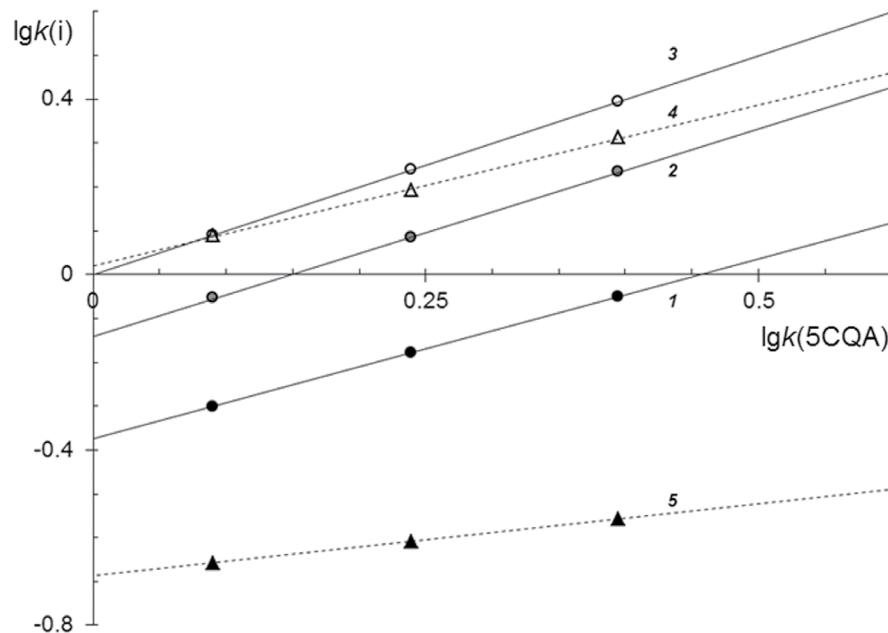


Рис. 2. Карта разделения второго типа 3CQA (1), 4CQA (2), 5CQA (3), кофеина (4) и тригонеллина (5) на стационарной фазе Диасфер 110-C10CN в подвижных фазах системы этанол–0.2 об. % ортофосфорной кислоты–вода при 30°C.

Кроме того, наклон линии тренда для кофеина был меньше такого параметра для 4CQA и 5CQA:

$$\lg k(4\text{CQA}) = 0.947 \cdot \lg k(5\text{CQA}) - 0.140, \quad (3)$$

$$\lg k(\text{кофеин}) = 0.737 \cdot \lg k(5\text{CQA}) + 0.020, \quad (4)$$

поэтому место элюирования кофеина изменяется при изменении содержания этанола в подвижной фазе от приведенного ниже порядка при содержании этанола более 16 об. %:

$$t_R(3\text{CQA}) < t_R(4\text{CQA}) < t_R(5\text{CQA}) < t_R(\text{кофеин}), \quad (5)$$

до ряда с одной инверсией при содержании этанола менее 16 об. %:

$$\begin{aligned} t_R(3CQA) &< t_R(4CQA) < \\ &< t_R(\text{кофеин}) < t_R(5CQA). \end{aligned} \quad (6)$$

Кроме того, для стационарной фазы Диасфер C10CN тригонеллин имеет время удерживания больше “мертвого” времени, определенного по удерживанию щавелевой кислоты.

Сравнение пиков на хроматограммах (рис. 3), записанных при двух длинах волн (273 и 325 нм), показывает, что колонка Kromasil 100-5C18 обладает большей эффективностью, несмотря на меньшую длину: более 47 000 т.т./м для фазы Kromasil 100-5C18 против около 28 000 т.т./м для фазы Диасфер C10CN. Несмотря на это, при использовании последней стационарной фазы достигается полное (на уровне базовой линии с $R_s > 1$) разделение пиков всех последовательно элюируемых соединений.

По данным [5] среди основных компонентов экстракта зеленого кофе должен обнаруживаться пик 5-ферулоилхинной кислоты (5FQA) и трех изомеров дикофеоилхинных кислот: 3,4-дикофеоилхинной кислоты (3,4diCQA), 3,5diCQA и 4,5diCQA [5]. Однако три изомера дикофеоилхинных кислот более липофильны по сравнению с монокофеоилхинными кислотами (рис. 4).

Вертикальный разрез *a* на рис. 4, определяющий удерживание всех веществ, показывает, что при значении фактора удерживания $5CQA < 1$ фактор удерживания 4,5diCQA равен 16: т.е. время, необходимое для записи хроматограммы, превышает 30 мин. В связи с этим для одновременного определения всех хлорогеновых (моно- и дикофеоилхинных) кислот и кофеина удобнее использовать градиентное элюирование. В настоящей работе предложено два варианта градиентных режимов с различной локализацией кофеина в ряду хлорогеновых кислот (рис. 5).

В обоих случаях, однако, добиться полного разделения 3,4diCQA и 3,5diCQA не удалось, но это непринципиально: для записи хроматограмм требуется не более 20 мин в случае первого типа градиента и 12 мин – для второго типа градиента. Это позволило определить концентрацию активных ингредиентов в первых экстрактах зеленого кофе, результаты которого для первой экстракции представлены в табл. 1.

Судя по результатам, представленным в табл. 1, во всех образцах экстрактов обнаруживается по три изомера монокофеоилхинных кислот, основным из которых является 5CQA. В образцах экстрактов кофе robusta содержание этой кислоты несколько больше, чем в сортах кофе арабика, но это различие не столь велико. Существенно более заметным различием

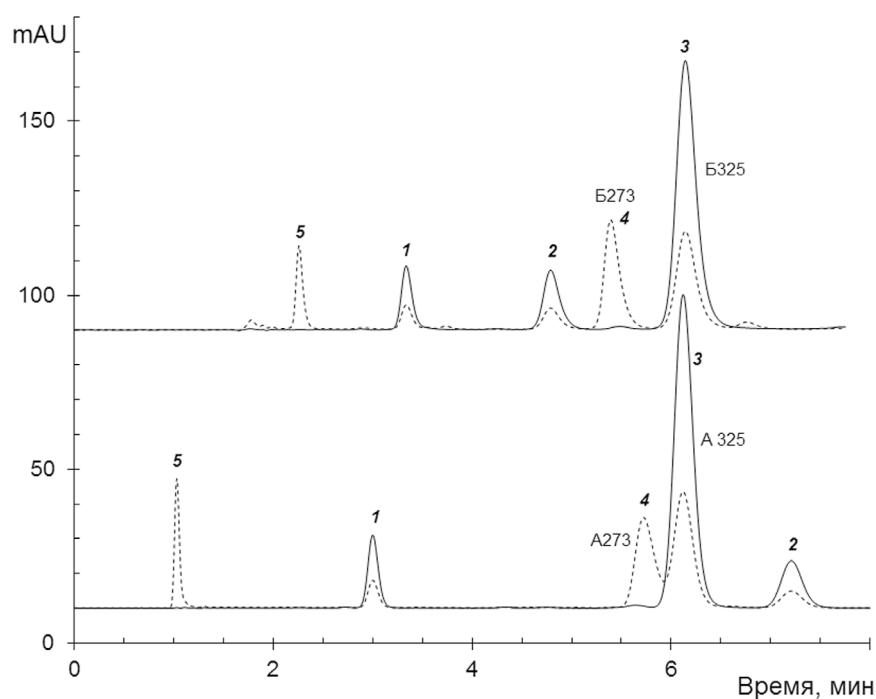


Рис. 3. Разделение 3CQA (1), 4CQA (2), 5CQA (3), кофеина (4) и тригонеллина (5) на стационарной фазе Kromasil 100-5C18: A325 и A273, записанных при длинах волн 325 нм и 273 нм соответственно, и на стационарной фазе Диасфер-110-C10CN: Б325 и Б273; подвижная фаза 10 об. % этанола и 0.2 об. % ортофосфорной кислоты в воде, 0.8 мл/мин, 30°C.

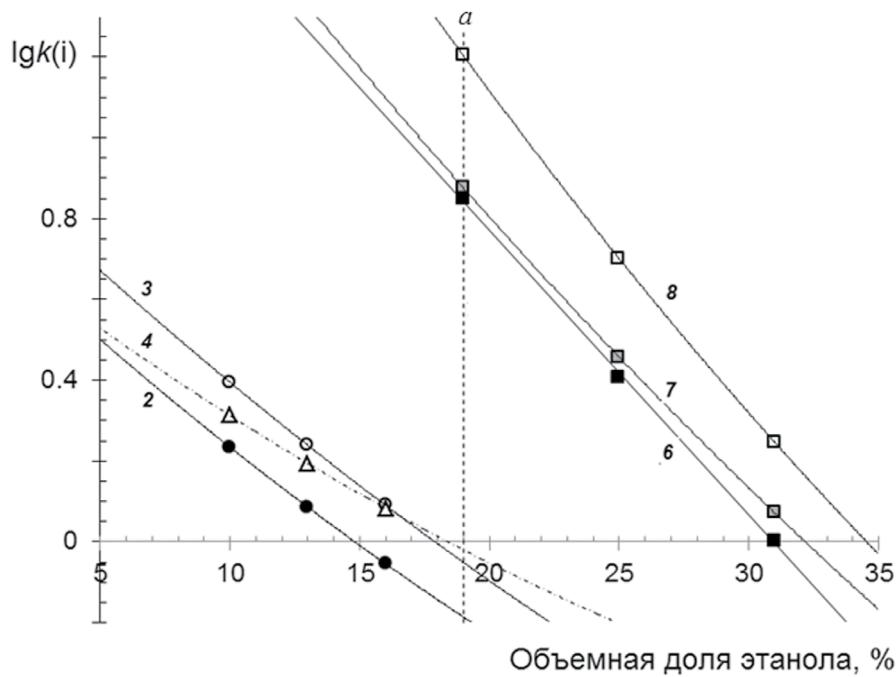


Рис. 4. Карта разделения первого типа 4CQA (2), 5CQA (3), кофеина (4), 3,4diCQA (6), 3,5diCQA (7) и 4,5diCQA (8) на стационарной фазе Диасфер 110-C10CN в подвижных фазах системы этанол–0.2 об. % ортофосфорной кислоты–вода при 30°C.

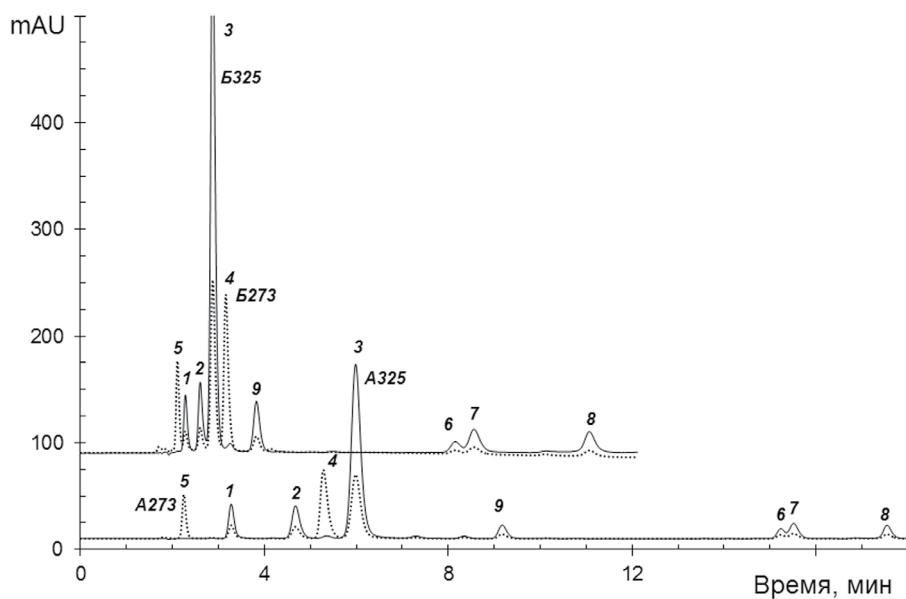


Рис. 5. Разделение основных компонентов экстракта зеленого кофе: 3CQA (1), 4CQA (2), 5CQA (3), кофеин (4), тригонеллин (5), 5FQA (9), 3,4diCQA (6), 3,5diCQA (7) и 4,5diCQA (8) на стационарной фазе Диасфер 110-C10CN при градиентном элюировании в режимах 1 (A273 и A325) и 2 (Б273 и Б325); регистрация хроматограмм при 273 и 325 nm при 30°C.

экстрактов является концентрация 5-ферулоилхинной кислоты — почти в два раза выше для кофе робуста (табл. 1, 2). Наконец, сумма концентраций всех хлорогеновых кислот для кофе

робуста оказывается заметно больше, чем для кофе арабика. Еще одним показателем отличия экстрактов двух видов кофе является более высокая концентрация кофеина в кофе робуста.

Таблица 1. Концентрация (мг/100 мл) хлорогеновых кислот в первом экстракте зеленого кофе (± 6.5 отн. %, $n = 2$)

Производитель, сорт	3CQA	4CQA	5CQA	5FQA	3,4diCQA	3,5diCQA	4,5diCQA
Бразилия, Фернандо	1.04	1.36	8.44	0.84	0.23	0.42	0.34
Колумбия	0.82	1.14	9.31	0.88	0.22	0.54	0.38
Кения	0.70	1.00	9.47	0.97	0.15	0.46	0.37
Эфиопия	0.53	0.74	8.51	0.74	0.19	0.62	0.47
Гватемала	0.56	0.78	7.03	0.75	0.01	0.03	0.02
Уганда	1.52	2.11	9.94	2.27	0.73	0.69	1.01
Перу	0.81	1.12	8.71	1.11	0.26	0.63	0.54
Эфиопия, Ранчо	0.59	0.87	11.39	0.90	0.11	0.54	0.55
Вьетнам, Копи лувак	0.95	1.41	10.09	1.03	0.36	0.58	0.63
(арабика + робуста) Verde	1.40	2.02	10.74	1.89	0.81	0.94	1.15
Робуста, Пачмент	0.97	1.43	10.32	1.85	0.72	0.85	0.98
Сальвадор, Пакамара	1.12	1.51	8.77	0.70	0.42	1.12	0.69

Таблица 2. Суммарная концентрация (мг/100 мл) монокофеоилхинных, дикофеоилхинных и ферулоилхинной кислот и кофеина в первом экстракте зеленого кофе (± 6.5 отн. %, $n = 2$)

Производитель, сорт	Сумма моно	5FQA	Сумма ди	Сумма	Кофеин
Эфиопия	9.78	0.74	1.28	11.81	2.16
Гватемала	8.37	0.75	0.06	9.18	2.41
Кения	11.17	0.97	0.98	13.12	2.54
Перу	10.64	1.11	1.43	13.17	2.55
Колумбия	11.28	0.88	1.14	13.29	2.64
Эфиопия, Ранчо	12.85	0.90	1.20	14.95	2.66
Бразилия, Фернандо	10.84	0.84	0.99	12.66	2.81
Вьетнам, Копи лувак	12.44	1.03	1.56	15.04	2.89
Сальвадор, Пакамара	11.40	0.70	2.23	14.33	3.12
(арабика + робуста) Verde	14.16	1.89	2.90	18.96	5.25
Уганда	13.57	2.27	2.43	18.28	5.25
Робуста, Пачмент	12.72	1.85	2.55	17.12	5.89

Отметим, что относительно большое расхождение между концентрациями активных компонентов между параллельными наблюдениями (более 6 отн. %) может быть следствием неравномерности степени измельчения и неоднородности растительного материала в пробах, отобранных для анализа. Но это не мешает дифференциации кофе по виду (арабика или робуста) по предложенным выше критериям.

При этом стационарная фаза Диасфер C10CN вновь показала уникальность сорбционных свойств, благодаря чему возможно изменение

селективности (по сравнению с традиционными C18-фазами) разделения веществ, чувствительных к полярным взаимодействиям.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Белгородского государственного национального исследовательского университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Блинова И.П., Дейнека Л.А. Селективность разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. С. 588. (*Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A.* Selectivity of the separation of isomeric chlorogenic acids under the conditions of reversed-phase HPLC // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. P. 778.)
2. Ncube E.N., Mhlongo M.I., Piater L.A., Steenkamp P.A., Dubery I.A., Madala N.E. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from Nicotiana tabacum tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method // *Chem. Central J.* 2014. V. 8. P. 66.
3. Zheng W., Clifford M.N. Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China // *Food Chem.* 2008. V. 106. P. 147.
4. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 2900.
5. Craig A.P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts // *Talanta*. 2016. V. 154. P. 481.
6. Bennat C., Engelhardt U.H., Kiehne A., Wirries F.-M., Maier H.G. HPLC Analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994. V. 199. P. 17.
7. Stalmach A., Mullen W., Nagai C., Crozier F. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee // *Braz. J. Plant Physiol.* 2006. V. 18. P. 253.
8. Trugo L.C., Macrae R. Chlorogenic acid composition of instant coffees // *Analyst*. 1984. V. 109. P. 263.
9. Milligan P.A. Determination of piroxicam and its major metabolites in the plasma, urine and bile of humans by high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1992. V. 516. P. 121.
10. Осипов А.С., Нечаева Е.Б. Применение капроновой и циклогексанкарбоновой для анализа бензойной и сорбиновой кислот // Хим.-фарм. журн. 2013. Т. 47. № 47. С. 51. (*Osipov A.S., Nечаева Е.Б.* Use of caproic and cyclohexanecarboxylic acids for determining benzoic and sorbic acids // *Pharm. Chem. J.* 2013. V. 47. P. 118.)
11. Ноздрин К.В., Великородный А.А., Осипов А.С., Родионова Г.М. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксианизола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии // *Фармация*. 2017. № 5. С. 7.
12. Дейнека В.И., Кульченко Я.Ю., Дейнека В.И. Хроматографическое поведение антоцианов на стационарной фазе C10CN // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. С. 1093. (*Deineka V.I., Kul'chenko Ya. Yu., Deineka L.A.* Chromatographic Behavior of Anthocyanins on a C10CN Stationary Phase // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. P. 1233.)
13. Блинова И.П., Олейниц Е.Ю., Саласина Я.Ю., Дейнека В.И., Ву Тхи Нгок Ань, Нгуен Ван Ань. Одновременное определение хлорогеновых кислот и кофеина в кофе методом обращенно-фазовой высокоеффективной жидкостной хроматографии. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2023. Т. 66. № 2. С. 45.
14. McNeff C., Zigan L., Johnson K., Carr P.W., Wang A., Weber-Main A.M. Analytical advantages of highly stable stationary phases for reversed-phase LC // *LC GC North America*. 2000. V. 18. № 5. P. 514.
15. Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Блинова И.П., Дейнека Л.А. Сопоставление двух вариантов карт разделения в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии // Журн. физ. химии. 2022. Т. 96. С. 1195. (*Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A.* Comparing two versions of a separation map in reversed phase liquid chromatography // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2022. V. 96. P. 1768.)

ISOLATION OF CHLOROGENIC ACIDS AND CAFFEINE IN THE STATIONARY PHASE OF DIASPER-110-C10CN

V. I. Deyneka^a, * E. Yu. Oleynits^a, H. M. Cultid Cabrera^a, L. A. Deyneka^a

^a Belgorod State National Research University, Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology,
Belgorod, Russia

*E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Abstract. The transition from the traditional C18(I) stationary phases with nonpolar endcapping to the C10CN(II) phase has been shown to contain the terminal polar group leading to a change in selectivity comparable to an increase in the activity of residual silanol groups in phases I. The effect was found in the separation of isomeric monocopheoylquinic acids. Two variants of gradient modes have been proposed using a column of Diaspher-110-C10CN and aqueous acetonitrile, acidified H_3PO_4 components of the mobile phase for the separation of chlorogenic acids and caffeine from green coffee extracts from various manufacturers. The proposed chromatographic method has been shown as the method that can be used to determine trigonelin, the retention of which increased markedly when phase I was replaced by phase II. The proposed method is used to differentiate the fruits of two types of coffee – Arabica and robusta. It was found that robusta coffee extracts contain a higher amount of chlorogenic acids and caffeine.

Keywords: reversed-phase HPLC, C18-phase, C10CN-phase, selectivity, chlorogenic acids, caffeine, trigonellin, Arabica coffee, robusta coffee.