

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2022-88-11-14-21>

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОКОФЕОИЛХИННЫХ КИСЛОТ И КОФЕИНА МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ЭЛЮЕНТАМИ НА ОСНОВЕ ПРОПАНОЛА-2 И ЭТИЛАЦЕТАТА

© Виктор Иванович Дейнека*, Елена Юрьевна Олейниц,
Людмила Александровна Дейнека

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85; *e-mail: deineka@bsu.edu.ru

*Статья поступила 25 июля 2022 г. Поступила после доработки 21 сентября 2022 г.
Принята к публикации 28 сентября 2022 г.*

Для определения кофеина и трех изомерных монокофеоилхинных (хлорогеновых) кислот (3CQA, 4CQA и 5CQA) в кофе (напитке) при совместном присутствии использовали метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с заменой дорогостоящего и экологически неблагоприятного ацетонитрила на этилацетат в качестве органического модификатора подвижных фаз. Предложен подход, позволяющий сопоставлять эффективность и селективность разделения веществ в широком диапазоне концентраций органических модификаторов выбранных элюентных систем. Установлено, что замена ацетонитрила на пропанол-2 или этилацетат лишь в небольшой степени изменяет селективность разделения трех изомерных хлорогеновых кислот, но существенно уменьшает относительное удерживание кофеина вследствие его лучшей сольватации органическим модификатором. Это позволяет целенаправленно изменять положение элюирования кофеина относительно хлорогеновых кислот для исключения его соэлюирования с другими экстрактивными веществами за счет изменения концентрации и типа органического модификатора подвижной фазы. Элюенты на основе этилацетата удобны для одновременного определения кофеина и монокофеоилхинных кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ и позволяют при пробоподготовке рекстрагировать с концентрирующих патронов (ДИАПАК С18) в основном кофеин и монокофеоилхинные кислоты. Более липофильные экстрактивные вещества при этом остаются на концентрирующем патроне, что обеспечивает возможность применения простого изократического режима с сокращением времени анализа и расхода органического модификатора подвижной фазы.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ; одновременное определение; кофеин; монокофеоилхинные кислоты; селективность разделения; «зеленая» хроматография.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MONOCAFFEYOYLQUINIC ACIDS AND CAFFEINE BY REVERSE-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELUENTS BASED ON PROPANOL-2 AND ETHYL ACETATE (REJECTION OF ACETONITRILE)

© Viktor I. Deineka*, Elena Yu. Oleinits, Lyudmila A. Deineka

Belgorod State National Research University, 85, Pobedy ul., Belgorod, 308015, Russia; *e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Received July 25, 2022. Revised September 21, 2022. Accepted September 28, 2022.

The purpose of the study is development of conditions for the simultaneous determination of caffeine and three isomers of monocaffeoylquinic acids (esters of caffeic and quinic acids: 3CQA, 4CQA and 5CQA) in coffee using “green” reverse-phase HPLC, in which an expensive and environmentally unfavorable acetonitrile is replaced with ethyl acetate as an organic modifier of mobile phases. An approach which provides comparing the efficiency and selectivity of the substance separation in a wide range of concentrations of organic modifiers of selected eluent systems is proposed. It is shown that the replacement of acetonitrile with propanol-2 or ethyl acetate slightly changes the selectivity of the separation of three isomeric chlorogenic acids, but significantly reduces the relative retention of caffeine due to better solvation of caffeine with an organic modifier. This makes it possible to change the position of caffeine elution relative to chlorogenic acids in a targeted way to avoid coelution of caffeine with other extractive substances by changing the concentration and type of the organic modifier of the mobile phase. Ethyl acetate-based eluents are shown to be convenient for simultaneous determination of caffeine and monocaffeoylquinic

acids in conditions of reverse-phase HPLC. The replacement of acetonitrile with ethyl acetate makes it possible to re-extract mainly caffeine and monocaffeoylquinic acids from concentrating cartridges (DIAPAK C18) during sample preparation. More lipophilic extractive substances still remain on the concentrating cartridge, which provides the possibility of using a simple isocratic mode thus reducing the duration of analysis and consumption of the organic modifier of the mobile phase.

Keywords: reverse-phase HPLC; simultaneous determination; caffeine; monocaffeoylquinic (chlorogenic) acids; separation selectivity; “green” chromatography.

Введение

По экономическим обзорам объем продаж кофе уступает только сырой нефти (более 100 миллиардов долларов в год¹), поэтому определение качества кофе является важной задачей. Для его оценки необходимо определять хлорогеновые кислоты (основные антиоксиданты) [1] и кофеин — единственный легальный психостимулятор [2], который накапливается одновременно с хлорогеновыми кислотами в зернах кофе [3].

Монокофеоилхинные (хлорогеновые) кислоты являются вторичными метаболитами растений [1]. Под «хлорогеновыми» кислотами в широком смысле подразумевают эфиры хинной кислоты и замещенных коричневых кислот [4]. Поскольку в хинной кислоте четыре ОН-группы, возможно образование четырех изомерных монокофеоилхинных (CQA) кислот. В экстрактах растений чаще всего встречаются три из них, различающихся по номеру атома углерода, гидроксильная группа которого вступила в образование сложноэфирной связи: 3CQA, 4CQA и 5CQA [5]. Отметим, что рекомендации ИЮПАК по порядку нумерации атомов углерода в циклогексановом кольце хинной кислоты [6] не всегда соблюдаются: нумерация в противоположном направлении встречается не реже рекомендованной, что необходимо учитывать при анализе опубликованных работ (рис. 1).

Кроме монокофеоилхинных кислот и кофеина, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) в кофе определяют также производные феруловой кислоты и дикофеоилхинные (3,4diCQA, 3,5diCQA и 4,5diCQA) кислоты [7], тригонелин, никотиновую кислоту и теофиллин [8]. Но при этом во многих работах есть свои особенности. Так, например, в работе [7] не приведена хроматограмма, использованная для определения кофеина, а это важно, поскольку для контроля содержания кофеоилхинных кислот в элюате используют детектирование на длине волны около 325 нм, что соответствует положению максимумов на полосах поглощения всех производных кофейной кислоты. При этом кофеин не мешает определению, поскольку максимум его полосы поглощения находится в более коротковолновой области (273 нм). Однако по-

глощение хлорогеновых кислот на длине волны 273 нм остается достаточно высоким. Поэтому для надежного определения четырех соединений при их совместном присутствии необходимо разделение уже всех четырех веществ. В работе [8] определяли только 5CQA (часто называемую просто хлорогеновой), хотя затем упомянуто присутствие еще двух изомеров с явной путаницей в отнесении пиков. В работе [9] определяли кофеин и монокофеоилхинные кислоты в напитках, приготовленных из двух наиболее распространенных видов кофе — *Coffea arabica* и *Coffea canephora* var. *robusta*, но не приведены хроматограммы, как и в работе [10] при определении кофеина и всех хлорогеновых кислот. Работы, в которых полностью приведены все необходимые условия, весьма немногочисленны [11–13]. В РФ введены два ГОСТ^{2,3}, содержащие методики спектрофотометрического определения кофеина после сложной и длительной пробоподготовки. При этом условия одновременного определения кофеина и трех монокофеоилхинных кислот были опубликованы в 2012 г. [14].

Монокофеоилхинные и дикофеоилхинные кислоты имеют существенно различающуюся липофильность, поэтому для их одновременного определения необходимо использование градиентного элюирования. Однако содержание дикофеоилхинных кислот в мольном соотношении не превышает 5–7 % от суммы хлорогеновых кислот [9], поэтому для оценки качества кофе можно

² ГОСТ ISO 4052–2013. Межгосударственный стандарт. Кофе. Определение содержания кофеина.

³ ГОСТ 29148–97. Межгосударственный стандарт. Кофе натуральный растворимый.

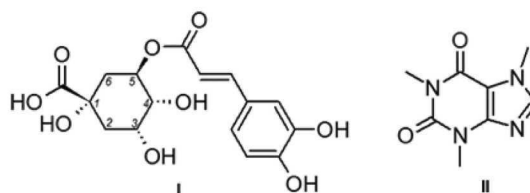


Рис. 1. Нумерация атомов углерода хинной кислоты (I) по рекомендациям ИЮПАК и структура кофеина (II)

Fig. 1. Numbering of carbon atoms of quinic acid (I) according to the IUPAC recommendations and the structure of caffeine (II)

¹ <http://www.cafebarbera.com/coffee-industry>

ограничиться совместным определением кофеина и трех изомерных монокофеоилхиновых кислот. Наконец, в плане «зеленой» (или более «зеленой») хроматографии желательна замена дорогостоящего и экологически неблагоприятного ацетонитрила на более экологически приемлемые компоненты подвижных фаз [15]. Поэтому цель настоящей работы — разработка условий определения кофеина и трех изомерных хлорогеновых кислот в экстрактах напитков при совместном присутствии с отказом от ацетонитрила.

Экспериментальная часть

Материалы. Исследованные в работе образцы чая мате и кофе были приобретены в розничной торговле. В качестве стандартных веществ использовали гемигидрат хлорогеновой кислоты (Aldrich) и кофеин (Китай). Для приготовления подвижных фаз и буферных растворов использовали ацетонитрил (gradient grade for liquid chromatography, Lichrosolv, Германия), пропанол-2 (Реахим, РФ), этилацетат (Компонент-Реактив, РФ), ортофосфорную кислоту (Реахим, РФ) и гидроксид натрия (Реахим, РФ).

Экстракция. 1 г растительного материала заливали 100 мл кипящей воды и настаивали в течение 30 мин. Фильтрат отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр.

Пробоподготовку к определению методом ОФ ВЭЖХ проводили методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, РФ). Патроны активировали пропусканием 5 мл ацетона и кондиционировали пропусканием 15 мл раствора 0,1 М HCl, затем пропускали через патрон 50 мл экстракта. Соединения десорбировали с патрона, пропуская 3 мл реэкстрагента — смеси ацетонитрил – муравьиная кислота – вода в объемном отношении 30:30:40 (а) с последующим разбавлением элюата в 4 раза дистиллированной водой или смеси этилацетат — муравьиная кислота — вода (5:3:92) (б) с десорбцией (в) оставшихся на патроне веществ экстрагентом (а).

Хроматографическое определение проводили с использованием хроматографа Agilent 1200 Infinity, оснащенного дегазатором, градиентным насосом, автодозатором, термостатом колонок и диодно-матричным детектором, и двух хроматографических колонок 150 × 4.6 mm Symmetry C18, 3,5 мкм (Waters, США), различающихся сроками использования в лаборатории.

Запись, хранение и обработку хроматограмм, а также определение времен удерживания и ширины пиков на половине высоты (мин) осуществляли с помощью программы Agilent ChemStation. В качестве метчика «мертвого» времени ис-

пользовали щавелевую кислоту (детектирование на длине волны 240 нм).

Расчет липофильности ($C \log P$) соединений выполняли с помощью программы Chem3D пакета программ Chem Office (PerkinElmer).

Обсуждение результатов

Влияние различных факторов на разделение хлорогеновых кислот и кофеина. Обращенно-фазовая ВЭЖХ с традиционными «мономерными» обращенными фазами (полученными силированием силикагеля алкилдиметилхлорсилами) не относится к числу методов, удобных для разделения изомеров при распределительном механизме сорбции. Такая стационарная фаза рассматривается как аморфная жидкая среда, и разделение сорбатов подчиняется закономерностям распределения между двумя несмешивающимися фазами [16], которые обычно сопоставляют с коэффициентами распределения в системе масло – вода. Значения логарифма коэффициента распределения веществ между октанолом-1 и водой, $C \log P$, рассчитанные с помощью программы Chem3D, оказались одинаковыми для двух изомеров хлорогеновых кислот — 3CQA и 5CQA (–1,879), отличаясь от значения, полученного для 4CQA (–1,400), тогда как кофеин обладал существенно большей липофильностью (–0,040). Однако экспериментально найденный для трех различных типов подвижных фаз (для одной и той же стационарной фазы) порядок элюирования четырех соединений не согласуется с предсказаниями по $C \log P$ (рис. 2).

С другой стороны, в случае «поплавочного» механизма [17] удерживание может быть чувствительным к положению кофеоильных групп в «поплавке». В случае хлорогеновых кислот в качестве «поплавка» выступает самая гидрофильная часть — радикал хиновой кислоты, проникновение которого в привитой C18-слой маловероятно. «Поплавочный» механизм отвечает за различие удерживания изомерных хлорогеновых кислот. При этом наиболее часто в известных публикациях приводится следующий порядок элюирования изомеров монокофеоилхиновых кислот: $t_R(3CQA) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA)$, который по результатам наших исследований [18] может частично измениться за счет инверсии времен удерживания двух последних изомеров.

Обоснование подхода. Известно, что фактор удерживания сорбатов в условиях обращенно-фазовой хроматографии зависит от концентрации органического модификатора (ОМ) выбранной элюентной системы. Но при изменении концентрации ОМ может измениться не только удерживание, но и порядок элюирования компонентов сложных смесей. Это делает сравнение удержи-

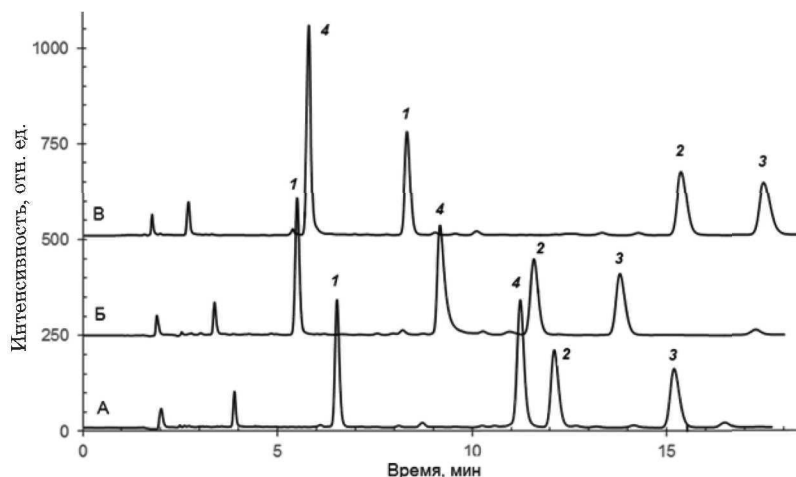


Рис. 2. Разделение трех кофейнолхиновых кислот (1 — 3CQA; 2 — 5CQA; 3 — 4CQA) и кофеина (4) в трех различных подвижных фазах: А — ацетонитрил — H_3PO_4 — вода (9:0,3:90,7 по объему); Б — пропанол-2 — H_3PO_4 — вода (4,5:0,3:95,2); В — этилацетат — H_3PO_4 — вода (2,75:0,3:96,95) (стационарная фаза — Symmetry® C18 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм, 30 °С, $\lambda = 273 \text{ nm}$)

Fig. 2. Separation of three caffeoylquinic acids (1 — 3CQA; 2 — 5CQA; 3 — 4CQA) and caffeine (4) in three different mobile phases: A) acetonitrile — H_3PO_4 — water (9:0.3:90.7 by volume); B) propanol-2 — H_3PO_4 — water (4.5:0.3:95.2); C) ethyl acetate — H_3PO_4 — water (2.75:0.3:96.95) (stationary phase — Symmetry® C18 150 × 4.6 mm, 3.5 μm , 30 °C, $\lambda = 273 \text{ nm}$)

вания веществ в подвижных фазах случайно выбранного состава также случайной характеристикой. Поэтому единственным эффективным методом контроля селективности разделения целевых соединений является анализ карт разделения, построенных для широкого диапазона (а при надежной аппроксимации за пределы использованного состава — на весь диапазон) состава подвижных фаз выбранной элюентной системы. Рассмотрим подход, основанный на анализе относительного удерживания.

По вытеснительной модели удерживания [19] при сорбции 1 моль исследуемого вещества в подвижную фазу высвобождается $n(i)$ моль органического модификатора подвижной фазы:

$$\lg k(i) = a_i - n(i) \lg c(\text{OM}), \quad (1)$$

где $k(i)$ — фактор удерживания сорбата i ; a_i — интерсепт линейной зависимости; $c(\text{OM})$ — молярная концентрация ОМ в подвижной фазе.

Аналогичное уравнение справедливо для вещества, принимаемого в качестве вещества сравнения, R :

$$\lg k(R) = a_R - n(R) \lg c(\text{OM}), \quad (2)$$

где $k(R)$ — фактор удерживания сорбата сравнения.

Исключая концентрацию ОМ из уравнений (1) и (2), получаем уравнение относительного удерживания:

$$\lg k(i) = \frac{n(i)}{n(R)} \lg k(R) + a_i - \frac{n(i)}{n(R)} a_R,$$

$$\lg k(i) = a \lg k(R) + b. \quad (3)$$

И хотя как $n(i)$, так и $n(R)$ могут не оставаться постоянными в широком диапазоне состава подвижных фаз, их соотношение, как показывает эксперимент (рис. 3), оказывается постоянным в широком диапазоне. При этом параметр a соответствует отношению числа моль ОМ, высвобождаемых при сорбции аналита, относительно такого же параметра для вещества сравнения, поэтому параметр a характеризует особенности сольватации аналита молекулами ОМ.

Подвижные фазы системы $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$. Параметры уравнений относительного удерживания для всех исследованных в работе систем подвижных фаз, в которых в качестве вещества сравнения использован изомер 5CQA, представлены в табл. 1. Выбор 5CQA был обоснован тем, что его время удерживания близко к t_R кофеина.

Преимуществом таких карт разделения является то, что благодаря линейности трендов [20] они позволяют прогнозировать порядок элюирования соединений даже при использовании результатов, полученных для двух подвижных фаз различного состава.

Порядок элюирования удобнее исследовать на карте разделения, которая для ацетонитрила имеет вид, представленный на рис. 3. При построении карты разделения использовали данные для подвижных фаз, содержащих 0,3 % об. фосфорной кислоты и 12,0, 10,5, 9,0, 7,5, 6,0 % об. ацетонитрила (слева направо) в воде.

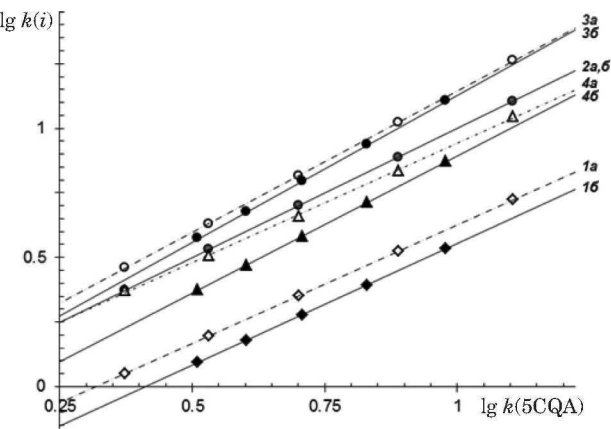


Рис. 3. Карта разделения монокофеоилхиновых кислот и кофеина в системе пропанол-2 – H₃PO₄ (0,3 % об.) – вода (б) на фоне карты для системы ацетонитрил – H₃PO₄ (0,3 % об.) – вода (а) при температуре 30 °С (нумерация пиков соответствует рис. 2)

Fig. 3. The map of the separation of monocaffeoylquinic acids and caffeine in the system propanol-2 – 0.3 vol. H₃PO₄ – water (b) against the background of the map for the system acetonitrile – 0.3 vol. % H₃PO₄ – water (a) at a temperature of 30 °C (for the numbering of peaks, see Fig. 1)

По представленным данным удерживание пары 5CQA – кофеин ухудшается с ростом концентрации ацетонитрила с последующим обращением порядка элюирования. При хорошем разделении всех четырех соединений, показанном на рис. 3, эти условия не подходят для их определения, поскольку на хроматограммах перед 5CQA может появляться пик 3-пара-кумароилхиновой и/или 3-ферулоилхиновой кислот [13].

Среди растворителей, смешиваемых с водой и доступных в высокочистом состоянии, рекомен-

дуется (для более «зеленой» хроматографии) замена ацетонитрила на пропанол-2 и этилацетат [20]. Выбор ортофосфорной кислоты вместо традиционно используемых уксусной, муравьиной и трифторуксусной обусловлен необходимостью исключения этерификации спирта этими кислотами, что приводит к нестабильности времен удерживания [21].

Подвижные фазы системы пропанол-2 – H₃PO₄ – H₂O (б). Замена ацетонитрила на пропанол-2 приводит к меньшему относительному удерживанию 3CQA и 4CQA за счет большего различия параметров *a* линий трендов для обоих изомеров (см. табл. 1 и рис. 3). Для построения карты разделения использовали подвижные фазы, содержащие 0,3 % об. фосфорной кислоты и 5,8, 5,1, 4,4, 3,7, 3,0 % об. пропанола-2 (слева направо) в воде. При этом такая замена наиболее заметно сказалась на относительном удерживании кофеина: параметр *a* существенно возрос, указывая на лучшую сольватацию кофеина изопропиловым спиртом по сравнению с ацетонитрилом.

Благодаря лучшей сольватации пропанолом-2 пики кофеина хорошо отделяются от пиков сильнее удерживаемой 5CQA во всех приемлемых (т.е. с *k* от 2 до 10) подвижных фазах, впрочем, в подвижных фазах с высокой элюирующей силой возможны проблемы в разделении 5CQA и 4CQA.

Таким образом, изопропиловый спирт является хорошей альтернативой ацетонитрилу, причем важно также и то, что объемная доля этого органического растворителя (от 3 до 5 %) заметно меньше объемной доли ацетонитрила (5 – 12 %),

Таблица 1. Параметры уравнений относительного удерживания трех монокофеоилхиновых кислот и кофеина в трех различных элюентных системах ОМ – H₃PO₄ (0,3 % об.) – H₂O при температуре термостата колонок 30 °С

Table 1. Parameters of the equations of relative retention of three monocaffeoylquinic acids and caffeine in three different eluent systems ОМ – H₃PO₄ (0.3 %vol.) – H₂O, at a temperature of the column thermostat of 30 °C

Органический модификатор	Аналит	Параметры уравнения (4)		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> ²
CH ₃ CN (6 – 12 % об.)	3CQA	0,920	–0,292	0,99999
	5CQA	1	0	1
	4CQA	1,096	0,050	0,99998
	Кофеин	0,923	0,021	0,9995
Пропанол-2 (3 – 6 % об.)	3CQA	0,942	–0,387	0,99999
	5CQA	1	0	1
	4CQA	1,138	–0,008	0,99999
	Кофеин	1,063	–0,168	0,99999
Этилацетат (1,5 – 4 % об.)	3CQA	0,891	–0,222	0,99995
	5CQA	1	0	1
	4CQA	1,205	–0,119	0,99996
	Кофеин	1,164	–0,653	0,996

требуемой для достижения близких времен удерживания кофеилхиновых кислот.

Подвижные фазы системы этилацетат – $H_3PO_4 - H_2O$ (а). Замена ацетонитрила на этилацетат приводит к еще большему значению параметра α для линии тренда относительного удерживания 4CQA. Поэтому при высокой концентрации этого растворителя в подвижной фазе была бы возможна инверсия удерживания 4CQA и 5CQA (рис. 4), но этого не происходит из-за низкой растворимости этилацетата в воде. Важно также, что при этом относительное удерживание 3CQA возрастает, приводя к более «компактному» элюированию трех изомеров. Удерживание кофеина уменьшается значительно — его пики появляются до пиков 3CQA, что также важно при создании условий для отделения кофеина от сопутствующих примесей. Отметим, что расход этилацетата (от 1,5 до 4 % об.) еще меньше, чем пропанола-2, что предпочтительно с экологической точки зрения. Для построения карты разделения использовали подвижные фазы, содержащие 0,3 % об. фосфорной кислоты и 4,0, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 % об. этилацетата (слева направо) в воде для колонки, бывшей длительное время в употреблении, и 0,3 % об. фосфорной кислоты и 4,0, 3,4, 2,8, 2,1, 1,5 % об. этилацетата (слева направо) в воде для новой колонки.

Еще одно важное свойство элюентной системы на основе этилацетата может быть использовано при пробоподготовке. Дело в том, что после сорбции веществ из экстрактов и кофе, и мате на концентрирующих патронах десорбции раствором этилацетат – $HCOOH - H_2O$ (5:3:92 по объему) позволяет десорбировать только кофеин и монокофеилхиновые кислоты, оставляя на патроне более липофильные соединения, включая окрашенные в коричневый цвет продукты полимеризации. При этом можно отказаться от градиентного режима элюирования для очистки колонки от сопутствующих экстрактивных веществ, что существенно уменьшает время единичного определения и расход подвижной фазы.

Кроме того, на рис. 4 сопоставлено относительное удерживание всех четырех аналитов на новой и старой колонках: последнюю длительное время использовали при разделении антоцианов

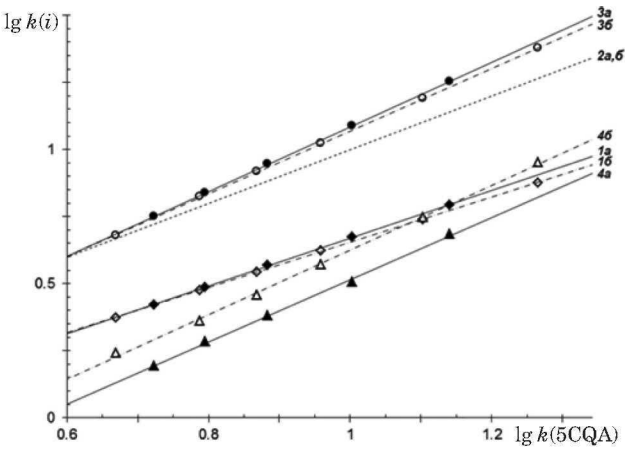


Рис. 4. Карта разделения монокофеилхиновых кислот и кофеина в системе этилацетат – H_3PO_4 (0,3 % об.) – вода на новой колонке Symmetry C18 (а) и на длительно используемой ранее колонке (б) при температуре 30 °С (нумерация пиков соответствует рис. 2)

Fig. 4. The map of the separation of monocaffeoylquinic acids and caffeine in the system ethyl acetate – 0.3 %vol. H_3PO_4 – water on a new column Symmetry® C18 (a) and on a long-used column (b) at a temperature of 30 °C (for the numbering of peaks, see Fig. 2)

в сильноокислых растворах с pH 1,5, выходящих за рамки устойчивости фазы Symmetry C18. Такое удерживание неизбежно приводит к частичному удалению привитых групп, освобождая доступ к остаточным силанольным группам. Это подтверждается сближением линии трендов на рис. 4 для 4CQA и 5CQA, но особенно сильно возрастает удерживание кофеина как слабого основания, обладающего склонностью к образованию водородных связей с остаточными силанольными группами.

Определение монокофеилхиновых кислот и кофеина в кофе и в чае мате. Для одновременного определения кофеина и монокофеилхиновых кислот в напитках, полученных из молотого кофе, растворимого кофе и измельченных листьев падука парагвайского (чай мате), содержащего, как и кофе, одновременно кофеин и три такие же изомерные монокофеилхиновые кислоты, была использована подвижная фаза на основе этилацетата как более «зеленого» заменителя ацетонитрила (см. рис. 2).

Таблица 2. Содержание трех монокофеилхиновых кислот и кофеина (мг/100 мл) в трех различных напитках, полученных из размолотых листьев мате, растворимого (Jardin café éclair) и молотого (Tchibo) кофе ($n = 5$; $P = 0,95$)

Table 2. The content of three monocaffeoylquinic acids and caffeine (mg/100 ml) in three different drinks obtained from ground mate leaves, instant coffee (Jardin café éclair) and ground coffee (Tchibo) ($n = 5$; $P = 0.95$)

Объект анализа	3CQA	5CQA	4CQA	Сумма CQA	Кофеин
Мате	64 ± 3	31 ± 2	20 ± 1	115 ± 5	9,3 ± 0,3
Jardin café éclair	24 ± 2	45 ± 3	25 ± 2	94 ± 5	22,9 ± 0,7
Tchibo (молотый)	20 ± 2	34,6 ± 3	23 ± 2	78 ± 6	41,4 ± 0,3

В результате было установлено (табл. 2), что напиток, полученный из размолотого кофе Tchibo, содержал самую высокую концентрацию кофеина, а концентрация хлорогеновых кислот была максимальной в чае мате, причем в этом случае основная хлорогеновая кислота — 3CQA, а не 5CQA, как в кофейных напитках.

Использованный метод «зеленой» хроматографии характеризуется малым временем, необходимым для элюирования всех четырех компонентов в изократическом режиме, отсутствием необходимости длительной очистки от более липофильных соединений и вывода в режим. Положение элюирования кофеина не накладывается на положения элюирования других экстрактивных веществ как в случае кофе, так и в случае мате. Отсутствие проскока контролировали, используя два последовательно соединенных патрона. Полноту десорбции веществ с концентрирующего патрона контролировали, анализируя реэкстракт (в) (см. раздел «Пробоподготовка»). При этом было найдено, что степень извлечения кофеина и изомерных хлорогеновых кислот на втором этапе была не ниже 99 %.

Заключение

В работе впервые показано, что замена ацетонитрила на такие более экологически благоприятные (и более дешевые) растворители, как пропанол-2 или этилацетат, при подкислении подвижной фазы ортофосфорной кислотой для разделения монокофеоилхинных кислот и кофеина в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ не только возможна, но и желательна. Установлено, что такая замена особенно сильно влияет на удерживание кофеина, меняя даже порядок элюирования четырех рассматриваемых соединений. Это позволяет выбрать условия, при которых кофеин отделялся бы не только от монокофеоилхинных кислот, но и от других сопутствующих экстрактивных соединений, например, изомерных *пара*-кумароил- и ферулоилхинных кислот реальных растительных объектов. При твердофазной экстракции использование экстрагентов на основе этилацетата дает возможность отделить монокофеоилхинные кислоты (и кофеин) от существенно более липофильных изомерных дикофеоилхинных кислот и окрашенных продуктов конденсации хлорогеновых кислот. Это позволяет использовать изократический режим хроматографирования при разделении монокофеоилхинных кислот и кофеина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Naveed M., Hejazi V., Abbas M., et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research / Biomed. Pharmacotherapy. 2018. Vol. 97. P. 67 – 74. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.064

2. Lopez-Sanchez R. C., Lara-Diaz V. J., Aranda-Gutierrez A., et al. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure / J. Anal. Methods Chem. 2018. Vol. 2018. 2085059. DOI: 10.1155/2018/2085059
3. Cornelis M. C. The Impact of Caffeine and Coffee on Human Health / Nutrients. 2019. Vol. 11. P. 416. DOI: 10.3390/nu11020416
4. Clifford M. N., Jaganath I. B., Ludwig I. A., Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity / Nat. Prod. Rep. 2017. Vol. 34. P. 1391 – 1421. DOI: 10.1039/C7NP00030H
5. Köseoğlu Yılmaz P., Kolak U. SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee / J. Chromatogr. Sci. 2017. Vol. 55. P. 712 – 718. DOI: 10.1093/chromsci/bmx025
6. Kremr D., Bajer T., Bajerova P., et al. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review / Quim. Nova. 2016. Vol. 39. P. 530 – 533. DOI: 10.5935/0100-4042.20160063
7. Fujioka K., Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees / Food Chem. 2008. Vol. 106. P. 217 – 221. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.05.091
8. Arai K., Terashima H., Aizawa S., et al. Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate / Anal. Sci. 2015. Vol. 31. P. 831 – 835. DOI: 10.2116/analsci.31.831
9. Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., De Peca M. P. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation / Eur. Food Res. Technol. 2016. Vol. 242. P. 1403 – 1409. DOI: 10.1007/s00217-016-2643-y
10. Campa C., Doubeau S., Dussert S., et al. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species / Food Chem. 2005. Vol. 93. P. 135 – 139. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.015
11. Jeon J.-S., Kim H.-T., Jeong I.-H., et al. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions / J. Chromatogr. B. 2017. Vol. 1064. P. 115 – 123. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.08.041
12. Rodrigues N. P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC – DAD – MSn / J. Food Comp. Anal. 2013. Vol. 32. P. 105 – 115. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.09.002
13. Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts / Med. Food. 2019. Vol. 22. P. 314 – 320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039
14. Сычев К., Стыскин И. Анализ полифенольных соединений кофе и чая в условиях гидрофильного режима ВЭЖХ / Аналитика. 2012. Т. 5. № 4. С. 56 – 61.
15. Yabré M., Ferey L., Touridomon Somé I., Gaudin K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis / Molecules. 2018. Vol. 23. 1065. DOI: 10.3390/molecules23051065
16. Dorsey J. G., Dill K. A. The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography / Chem. Rev. 1989. Vol. 89. P. 331 – 346. DOI: 10.1021/cr00092a005
17. Дейнека В. И., Дейнека Л. А., Саенко И. И., Чулков А. Н. «Поплавочный» механизм удерживания в обращенно-фазовой хроматографии / Журн. физ. химии. 2015. Т. 89. № 7. С. 1172 – 1177. DOI: 10.7868/S0044453715070079
18. Дейнека В. И., Олейник Е. Ю., Блинова И. П., Дейнека Л. А. Селективность разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ / Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 8. С. 588 – 594. DOI: 10.1134/S004445021908005X
19. Murakami F. Retention behavior of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns / J. Chromatogr. 1979. Vol. 178. N 2. P. 393 – 399. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)92497-X
20. Дейнека В. И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анали-

за удерживания в ВЭЖХ / Журн. физ. химии. 2006. Т. 80. № 3. С. 511 – 516.

REFERENCES

1. Naveed M., Hejazi V., Abbas M., et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research / Biomed. Pharmacotherapy. 2018. Vol. 97. P. 67 – 74. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.064
2. Lopez-Sanchez R. C., Lara-Diaz V. J., Aranda-Gutierrez A., et al. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure / J. Anal. Methods Chem. 2018. Vol. 2018. 2085059. DOI: 10.1155/2018/2085059
3. Cornelis M. C. The Impact of Caffeine and Coffee on Human Health / Nutrients. 2019. Vol. 11. P. 416. DOI: 10.3390/nu11020416
4. Clifford M. N., Jaganath I. B., Ludwig I. A., Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity / Nat. Prod. Rep. 2017. Vol. 34. P. 1391 – 1421. DOI: 10.1039/C7NP00030H
5. Köseoglu Yılmaz P., Kolak U. SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee / J. Chromatogr. Sci. 2017. Vol. 55. P. 712 – 718. DOI: 10.1093/chromsci/bmx025
6. Kremr D., Bajer T., Bajerova P., et al. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review / Quim. Nova. 2016. Vol. 39. P. 530 – 533. DOI: 10.5935/0100-4042.20160063
7. Fujioka K., Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees / Food Chem. 2008. Vol. 106. P. 217 – 221. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.05.091
8. Arai K., Terashima H., Aizawa S., et al. Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate / Anal. Sci. 2015. Vol. 31. P. 831 – 835. DOI: 10.2116/analsci.31.831
9. Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., De Peca M. P. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation / Eur. Food Res. Technol. 2016. Vol. 242. P. 1403 – 1409. DOI: 10.1007/s00217-016-2643-y
10. Campa C., Doubeau S., Dussert S., et al. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species / Food Chem. 2005. Vol. 93. P. 135 – 139. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.015
11. Jeon J.-S., Kim H.-T., Jeong I.-H., et al. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions / J. Chromatogr. B. 2017. Vol. 1064. P. 115 – 123. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.08.041
12. Rodrigues N. P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC – DAD – MSn / J. Food Comp. Anal. 2013. Vol. 32. P. 105 – 115. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.09.002
13. Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts / Med. Food. 2019. Vol. 22. P. 314 – 320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039
14. Sychev K., Styskin I. HPLC Separation of Tea and Coffee Compounds in HILIC mode of the VEZHKH regime / Analitika. 2012. Vol. 5. N 4. P. 56 – 61 [in Russian].
15. Yabré M., Ferey L., Touridomon Somé I., Gaudin K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis / Molecules. 2018. Vol. 23. 1065. DOI: 10.3390/molecules23051065
16. Dorsey J. G., Dill K. A. The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography / Chem. Rev. 1989. Vol. 89. P. 331 – 346. DOI: 10.1021/cr00092a005
17. Deineka V. I., Deineka L. A., Saenko I. I., Chulkov A. N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography / Russ. J. Phys. Chem. A. 2015. Vol. 89. P. 1300 – 1304. DOI: 10.1134/S0036024415070079
18. Deineka V. I., Oleinits E. Y., 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. Vol. 74. P. 778 – 783. DOI: 10.1134/S1061934819080057
19. Murakami F. Retention behavior of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns / J. Chromatogr. 1979. Vol. 178. N 2. P. 393 – 399. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)92497-X
20. Deineka V. I. Chromatographic separation map and incremental relationships in the method of relative analysis of retention under HPLC conditions / Russ. J. Phys. Chem. 2006. Vol. 80. P. 429 – 434. DOI: 10.1134/S0036024406030204