

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹Д. В. Овчинников, ¹Д. С. Косяков*, ¹Н. В. Ульяновский,
^{1,2}К. Г. Боголицын, ¹Д. И. Фалёв, ³О. И. Покровский

¹Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,
Архангельск, Россия

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН, Архангельск, Россия

³Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

* d.kosyakov@narfu.ru

Поступила в редакцию 3.03.2015 г.

Производные бензойной и коричной кислот — вторичные метаболиты растений, широко распространенные в природе и обладающие биологической активностью. Показано, что сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) обеспечивает высокоэффективное разделение девяти важнейших представителей данного класса соединений с селективностью, радикально отличающейся от обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведено сравнение параметров удерживания и хроматографического разделения аналитов на четырех неподвижных фазах различной природы, изучено влияние на хроматографическое разделение параметров сверхкритического флюида, а также состава подвижной фазы. Установлено, что оптимальное разделение достигается с использованием сорбента на основе силикагеля с привитыми 2-этилпиридиновыми группировками. Предложен подход для определения выбранных соединений, основанный на сочетании хроматографического разделения с многоволновым спектрофотометрическим детектированием и позволяющий обеспечить пределы обнаружения в диапазоне 13,0—51,3 мкг/л при продолжительности анализа 2,5 мин. Разработанные подходы успешно апробированы на реальных объектах — различных сортах вин.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сверхкритическая флюидная хроматография, СФХ, природные ароматические кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Производные бензойной и коричной кислот — вторичные метаболиты растений, широко распространенные в природе. Они встречаются во многих фруктах, овощах, ягодах, в значительных количествах содержатся в кофе, чае, соках, винах и других пищевых продуктах. В растительных тканях ароматические кислоты находятся как в свободном, так и связанном состоянии, в том числе в виде компонентов таких сложных структур, как лигнин или гидролизуемые танины. Они обладают разнообразными видами биологической активности, например, противоязвенной, противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой. Фенольные кислоты, содержащие также одну или несколько фенольных гидроксильных групп, известны своей антиоксидантной активностью [1—4].

В связи с этим несомненную актуальность приобретают работы по созданию методов определения природных ароматических кислот в биомассе растений и продуктах ее переработки, отличающихся, помимо высокой чувствительности, экспрессностью и селективностью, что открывает возможность исследования исключительно сложных по составу биообъектов.

В настоящее время наиболее распространенным методом анализа ароматических кислот является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области спектра. В качестве неподвижных фаз используются, как правило, неполярные сорбенты на основе силикагеля с привитыми октильными или октадецильными группировками, в некоторых случаях содержащие внедренные полярные группы (гидроксильные, амидные и пр.) для повышения селективности и расширения диапазона полярности удерживаемых аналитов. В качестве подвижной фазы применяются водно-метанольные или водно-ацетонитрильные смеси. Существенной проблемой хроматографического определения природных ароматических кислот является необходимость разделения большого количества весьма близких по структуре и полярности соединений, требующего использования высокоэффективных сорбентов и значительного времени анализа. Так, в работе [5] предложен метод разделения 9 соединений за 50 мин с использованием октадецильной неподвижной фазы и градиентного элюирования смесью вода — метанол. Авторами работы [6] показана возможность одновременного определения свыше 20 природных ароматических соединений во фруктах с использованием октадецильной неподвижной фазы Aqua C₁₈ и градиентного элюирования смесью вода — ацетонитрил; длительность анализа составляет 60 мин. В статье [7] предложен метод одновременного определения 48 фенольных соединений (включая 11 фенолокислот) в винограде и винах за 86 мин с пределами обнаружения для галловой, протокатеховой, кофейной, кумаровой и феруловой кислот в диапазоне 0,10—0,71 мг/л. Разделение осуществлялось с использованием сорбента Ace C₁₈ и градиентного элюирования смесью вода — ацетонитрил. Сопоставимая продолжительность анализа (40 мин) пищевых продуктов на содержание 13 фенольных кислот продемонстрирована и в работе [8]. При этом, несмотря на использование неподвижной фазы C₁₈ с размером частиц 3 мкм и градиентного элюирования, разделение феруловой и синаповой кислот, различающихся наличием метоксильной группы, оказалось невозможным. Аналогичная проблема с разделением 4-гидроксибензойной и 2,3-дигидроксибензойной кислот возникла в исследовании экстрактов водорослей при попытке сократить время анализа до 10 мин [9].

Повышение производительности анализа при одновременном увеличении разрешения достигается применением ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ), использующей высокие давления и сорбенты с зернением 1,7—3,0 мкм. Публикаций в данной области применительно к определению природных ароматических кислот сравнительно немного. Среди них можно выделить недавнюю работу [10], в которой продемонстрированы преимущества УЭЖХ при разделении 16 фенольных соединений (включая 9 кислот), позволяющие сократить время анализа с 75 до 12 мин без потери разрешения. Похожие результаты получены авторами [11], предложившими метод определения 8 фенольных соединений в томатах в режиме сверхбыстрой жидкостной хроматографии на октадецильном сорбенте с размером частиц 1,7 мкм в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Достигнутые пределы обнаружения не превысили 0,25 мг/л, а время анализа составило 13 мин. Нами ранее [12] был предложен метод разделе-

ния 12 родственных лигнину ароматических соединений в изократическом режиме с использованием бифункциональной обращенной неподвижной фазы. Время анализа при этом не превышало 10 мин, однако отказ от градиентного элюирования не позволил полностью разделить ванилиновую и сиреневую кислоты.

Очевидной альтернативой ВЭЖХ при анализе сложных смесей природных соединений является сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ), обладающая рядом важных преимуществ [13, 14]. В качестве подвижной фазы в данном методе, как правило, используется сверхкритический диоксид углерода (СК-СО₂), имеющий низкую вязкость и обеспечивающий более высокие коэффициенты диффузии аналитов и компонентов элюента по сравнению с традиционными для жидкостной хроматографии растворителями. Это позволяет использовать существенно более высокие скорости потока подвижной фазы и достигать быстрого уравнивания системы при смене состава элюента или градиентном элюировании. С другой стороны, в силу тех же причин СФХ позволяет легко реализовать разделения в нормально-фазовом режиме на полярных неподвижных фазах, демонстрируя совершенно иную селективность в сравнении с ОФ ВЭЖХ (принято говорить об ортогональности двух хроматографических методов [14]).

К настоящему моменту имеются лишь единичные исследования, посвященные определению природных ароматических соединений методом СФХ. Авторами ранней работы [15] представлены исследования по разделению 8 фенольных соединений, включая 4 фенольные кислоты, на различных полярных неподвижных фазах: немодифицированном силикагеле, а также силикагелях с привитыми диольными и цианопропиловыми группировками. Изучено влияние на разделение температуры и обратного давления, при этом показано, что варьирование этих параметров в диапазонах соответственно 40—80 °С и 9,0—12,5 МПа не оказывает существенного влияния на эффективность и селективность анализа. Показано, что добавление кислоты в подвижную фазу существенно уменьшает размывание пиков. Оптимального разделения удалось добиться, используя две последовательно соединенные колонки (250×4,6 мм), сорбент с привитыми диольными группировками (размер частиц 5,0 мкм) и метанол с добавкой лимонной кислоты в качестве модификатора подвижной фазы. Тем не менее, время анализа составило 25 мин при неудовлетворительном разделении протокатеховой и кофейной кислот.

Существенный прогресс в области техники сверхкритической флюидной хроматографии и изготовления специализированных ультраэффективных сорбентов для СФХ, достигнутый в последние годы [13, 14], открывает новые перспективы для применения метода в различных областях, в том числе химии природных соединений.

В связи с этим целью настоящей работы является изучение хроматографического разделения важнейших представителей природных ароматических кислот в режиме сверхкритической флюидной хроматографии, разработка на этой основе подхода для экспрессного высокочувствительного определения указанных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования выбраны коммерчески доступные препараты бензойной (I) и коричной (VI) кислот, а также семи их производных с гидроксильными и метоксильными заместителями в ароматическом ядре, широко распространенные в растительных тканях и экстрактах: 4-гидроксибензойная (II), ванилиновая (III), сиреневая (IV), вератровая (V), кумаровая

(VII), феруловая (VIII) и синаповая (IX) кислоты. Все соединения с содержанием основного вещества более 98 % приобретены у компаний «Sigma-Aldrich» (Германия) и «Fluka» (Швейцария). Структурные формулы анализов представлены на рис. 1.

В качестве реальных объектов, содержащих свободные ароматические кислоты, для демонстрации применимости разрабатываемых подходов выбраны различные сорта виноградного и плодового вина, приобретенные в торговой розничной сети: красное полусладкое (ВК), плодвое крепленое (ВП) и розовое полусухое (ВР). Идентификацию компонентного состава вин проводили на основе двух критериев — совпадения времени удерживания и УФ-спектра обнаруживаемого соединения с аналогичными характеристиками соответствующих стандартных образцов природных ароматических кислот.

Оборудование и условия анализа. Хроматографическое разделение осуществляли с использованием СФХ-системы Acquity UPC² («Waters», США), включающей

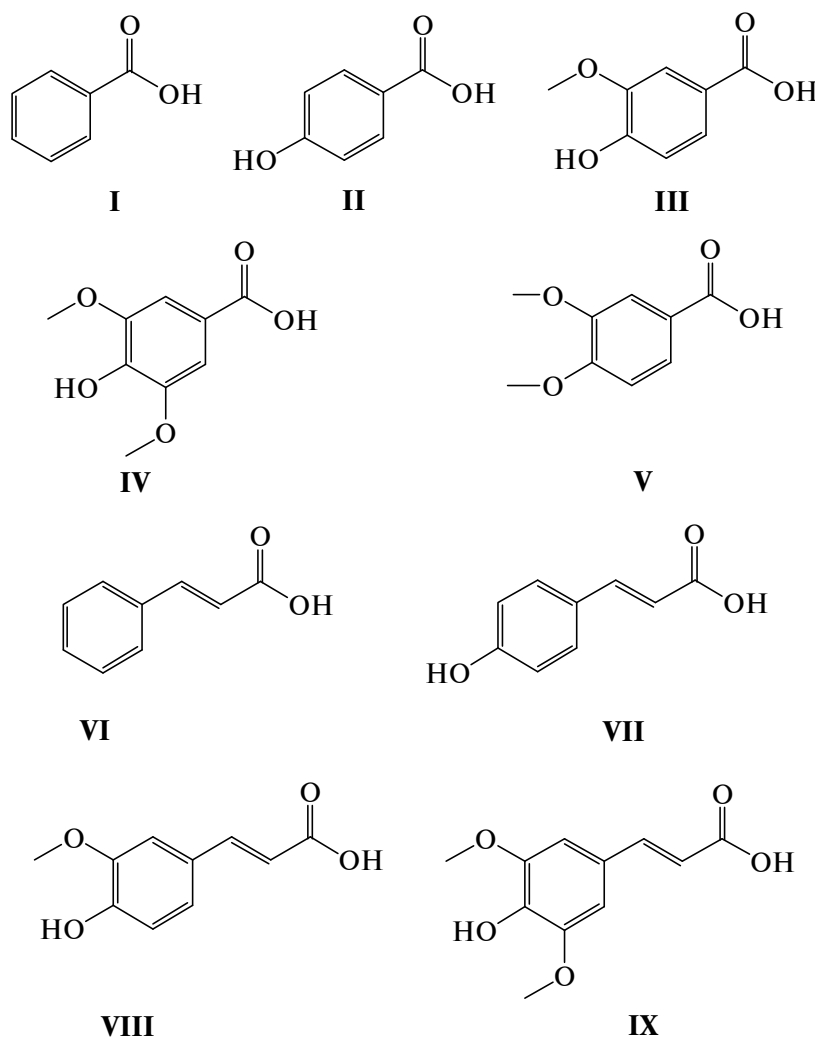


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений

насосы для подачи диоксида углерода и соразтворителя, автосамплер, термостат колонок, регулятор обратного давления и диодноматричный спектрофотометрический детектор. Управление прибором, сбор и обработку хроматографических данных осуществляли с помощью программного пакета Empower 3.0 («Waters», США).

Для разделения аналитов использовали следующие хроматографические колонки: UPC² ВЕН, UPC² ВЕН 2-EP, UPC² CSH Fluoro-Phenyl («Waters», США), 150×3,0 мм, размер частиц сорбента 1,7 мкм, а также Nucleodur HILIC («Macherey-Nagel», Германия), 150×2,0 мм, размер частиц 1,8 мкм.

В качестве подвижной фазы (А) использовали диоксид углерода (ос.ч.) с добавками различных модификаторов (Б) — метанола (LiChrosolv HPLC grade, «Merck», Германия), 2-пропанола (для ВЭЖХ, «Компонент-Реактив»), ацетонитрила (0 сорт, НПК «Криохром»). Скорость потока элюента составляла 2 мл/мин (в случае диоксида углерода, скорость относится к жидкому СО₂, подаваемому в насос при температуре +2 °С). Для подавления искажений формы хроматографических пиков использовали трифторуксусную кислоту (HPLC grade, «Sigma-Aldrich»), добавляемую в органический соразтворитель. Детектирование осуществляли в диапазоне длин волн 200—400 нм со спектральным разрешением 4,8 нм и частотой сбора данных 80 Гц. Объем вводимой пробы во всех экспериментах составлял 5,0 мкл. Мертвый объем хроматографической системы для расчета величин коэффициентов емкости (k') определяли по времени выхода неудерживаемого компонента (толуол).

Для определения коэффициентов емкости октадецильной неподвижной фазы по отношению к исследуемым соединениям в режиме ОФ ВЭЖХ использовали хроматографическую систему LC-30 Nexera («Shimadzu», Япония), состоящую из двух насосов LC-30 AD, вакуумного дегазатора DGU-5A, автосамплера SIL-30A, термостата колонок STO-20A и диодноматричного спектрофотометрического детектора SPD-M20A. Разделение проводили при температуре 40 °С на колонке с октадецильной неподвижной фазой Nucleodur C₁₈ Isis («Macherey-Nagel», Германия), 150×2,0 мм, с размером частиц 1,8 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь воды с метанолом в объемном соотношении 70:30 с добавкой муравьиной кислоты (0,1 % об.). В качестве маркера мертвого объема применяли ацетон.

Приготовление градуировочных растворов. Из точных навесок готовили исходные растворы индивидуальных компонентов в ацетонитриле концентрацией 1000 мг/л и сохраняли в холодильнике при температуре 4 °С не более семи дней. Для градуировки хроматографической системы непосредственно перед проведением эксперимента из исходных растворов путем последовательных разбавлений готовили градуировочные растворы, содержащие смесь определяемых соединений в диапазоне концентраций каждого компонента 0,2—20,0 мг/л.

Экстракционное извлечение аналитов. При исследовании образцов вин для предварительного извлечения и концентрирования свободных ароматических кислот использовали метод жидкостно-жидкостной экстракции этилацетатом [6, 16, 17]. В стеклянную виалу объемом 4 мл помещали 3 мл исследуемого вина, 150 мкл муравьиной кислоты (ACS reagent, >96 %, производство «Sigma-Aldrich») и 1 мл этилацетата (для хроматографии, производство «Компонент-Реактив»). Экстракцию проводили в течение 10 мин при постоянном энергичном перемешивании при помощи вортекса. После разделения слоев отделяли фракцию экстрагента, фильтровали через мембранный нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм и вводили в хроматографическую систему.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографическое разделение. Ключевым фактором, определяющим эффективность хроматографического разделения в СФХ, является выбор неподвижной фазы. Учитывая многообразие существующих сорбентов, пригодных для использования во флюидной хроматографии, при разработке метода разделения выбранных соединений использовался подход, основанный на тестировании набора неподвижных фаз, относящихся к разным группам по полярности и способности к специфическим взаимодействиям с аналитами [18]. Исходя из этого, нами выбраны полярные фазы на основе этоксилированного силикагеля (ВЕН) и силикагеля с привитыми 2-этилпиридиновыми группировками (ВЕН 2-EP), обладающими выраженной способностью образовывать сильные водородные связи с аналитами. Кроме того, использовался пентафторфенильный сорбент средней полярности (CSH Fluoro-Phenyl), хорошо зарекомендовавший себя при разделении широкого круга органических соединений [14]. неполярные стационарные фазы, требующие применения обращенно-фазового режима разделения, были исключены из рассмотрения как вследствие схожести механизма разделения с ОФ ВЭЖХ, так и в связи с необходимостью использования высоких концентраций органического соразтворителя в элюенте, что привело бы к частичной утрате преимуществ СФХ. В дополнение к указанным стационарным фазам нами впервые использовался новый для СФХ цвиттерионный сорбент Nucleodur HILIC на основе силикагеля, содержащий в привитой бетаиновой фазе комбинацию внутреннего катиона триалкиламмония и наружной отрицательно заряженной сульфогруппы, разделенных тремя метиленовыми группировками.

Предварительные эксперименты показали, что элюирующая сила чистого диоксида углерода по отношению к ароматическим кислотам крайне мала; приемлемых величин времени удерживания не удалось достичь ни с одной из перечисленных выше неподвижных фаз. В связи с этим использовано модифицирование СК-СО₂ органическими соразтворителями (модификаторами) — метанолом, 2-пропанолом и ацетонитрилом. Полученные результаты, представленные на рис. 2 на примере неподвижной фазы ВЕН 2-EP, демонстрируют явное преимущество спиртов по сравнению с апротонным растворителем. Применение ацетонитрила не позволяет привести значения k' 4-гидроксибензойной и кумаровой кислот, содержащих свободную (не вовлеченную во внутримолекулярную водородную связь) фенольную гидроксильную группу, в оптимальный диапазон (1—10). Поэтому дальнейшие работы проводились с применением в качестве модификатора метанола, обладающего — при сопоставимой с изопропанолом элюирующей силой — существенно меньшей вязкостью [19]. Ввиду избыточной сорбции кислотных соединений на полярных сорбентах в условиях СФХ, приводящей к значительному размыванию хроматографических пиков, необходимым является введение кислотного динамического модификатора. Наилучшие результаты достигнуты при введении в соразтворитель 0,1 % трифторуксусной кислоты, тогда как более слабая муравьиная кислота не подавляет нежелательные взаимодействия в хроматографической системе в полной мере.

Конструктивные особенности СФХ системы, свойства используемых сорбентов и необходимость поддержания сверхкритического состояния диоксида углерода ограничивают доступный диапазон параметров сверхкритического флюида. Установлено, что времена удерживания ароматических кислот практически линейно возрастают с ростом температуры, противоположный эффект наблюдается

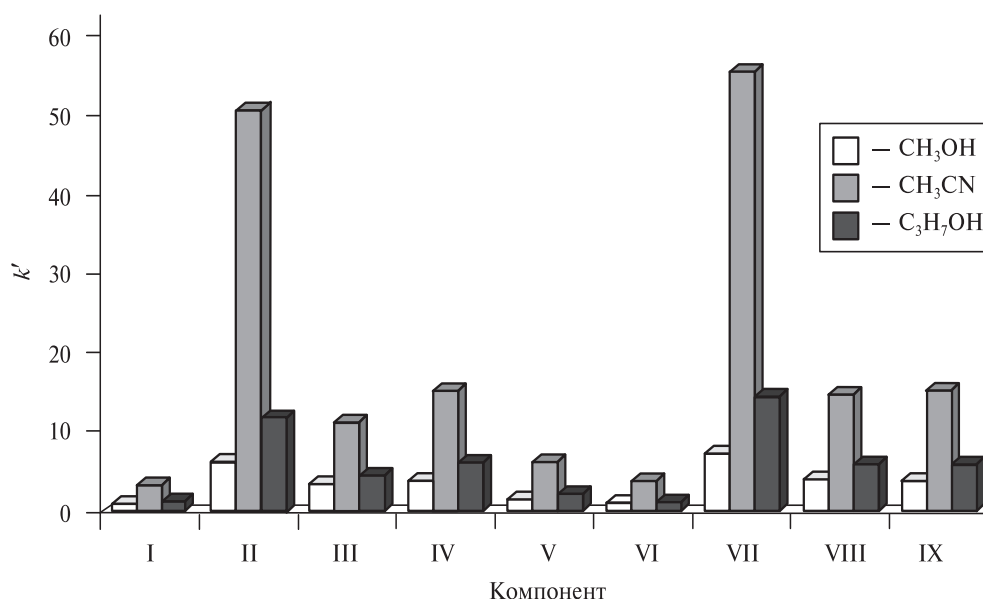


Рис. 2. Зависимость коэффициентов емкости аналитов от модификатора подвижной фазы для неподвижной фазы VEN 2-EP (55 °С; 13,0 МПа; скорость потока 2,0 мл/мин; содержание модификатора 10 %)

для влияния величины обратного давления в системе. Это хорошо согласуется с данными, представленными в литературе [15]. Варьирование данных параметров в пределах 35–60 °С и 10,0–15,0 МПа не оказывает существенного влияния на хроматографическое разделение, сопоставимого с введением модификатора подвижной фазы. Из этих соображений температура и обратное давление в дальнейших экспериментах были зафиксированы на уровне 55 °С и 13,0 МПа соответственно.

Применение изократического режима элюирования не обеспечивает полное разделение всех компонентов ни на одной из протестированных хроматографических колонок, что связано как с совпадением времен удерживания аналитов, так и с размыванием хроматографических пиков некоторых соединений. В связи с этим для каждого сорбента оптимизирована программа градиентного элюирования, позволяющая добиться наилучшего разделения в целевом диапазоне значений коэффициентов емкости. Профили градиента, а также полученные в оптимальных условиях значения параметров хроматографического разделения (время удерживания t_R , ширина пика на полувысоте $W_{1/2}$, коэффициент емкости k' , разрешение R , селективность α и число теоретических тарелок N) представлены в таблице 1.

Обращает на себя внимание существенное различие между использованными сорбентами не только во временах удерживания аналитов и характеристиках хроматографических пиков, но и в порядке элюирования исследуемых кислот. Так, если для VEN 2-EP и цвиттерионной неподвижной фазы он остается неизменным, то при переходе к CSH Fluoro-Phenyl местами меняются сиреневая и феруловая кислоты; коэффициент емкости по отношению к синаповой кислоте резко возрастает, и она элюируется последней. По-видимому, это объясняется существенно большим вкладом в механизм удерживания на умеренно полярном сорбенте гидрофобных и π – π взаимодействий, что важно для соединения со значительно сопряженной π -электронной системой и экранированной за счет орто-эффекта фенольной гидроксильной группой. Различия между пентафтор-

Таблица 1

Параметры хроматографического разделения аналитов в режиме СФХ

Неподвижная фаза, профиль градиента	Компонент	t_R , мин	$W_{1/2}$, с	k'	R	α	N , м ⁻¹
ВЕН 0 мин — 1 % CH ₃ OH 1,5—3,0 мин — 10 % CH ₃ OH 3,5 мин — 1 % CH ₃ OH	I	1,53	0,90	1,92	—	—	384254
	VI	1,69	1,08	2,21	5,31	1,15	325572
	V	2,07	1,20	2,94	11,6	1,33	395639
	III	2,39	1,38	3,55	8,50	1,21	398803
	VIII	2,66	1,62	4,06	6,24	1,14	358471
	IV	2,71	1,56	4,17	1,17	1,03	401246
	II	2,96	1,92	4,63	4,96	1,11	316011
	IX	3,05	1,92	4,80	1,61	1,04	335520
	VII	3,20	2,28	5,09	2,49	1,06	261910
CSH Fluoro-Phenyl 0 мин — 2,8 % CH ₃ OH 1,0—3,0 мин — 7 % CH ₃ OH 3,5 мин — 2,8 % CH ₃ OH	I	1,10	1,50	1,27	—	—	71503
	VI	1,31	1,56	1,70	4,82	1,33	93759
	V	1,69	1,50	2,50	8,95	1,47	168776
	III	1,80	1,86	2,72	2,22	1,09	124520
	VIII	2,11	2,10	3,37	5,58	1,24	134229
	IV	2,22	2,22	3,59	1,76	1,07	132960
	II	2,31	2,34	4,78	1,46	1,05	129573
	VII	2,59	2,70	4,34	3,88	1,15	122347
	IX	2,68	3,24	4,54	1,13	1,05	90970
ВЕН 2-EP 0 мин — 5 % CH ₃ OH 1,0—3,0 мин — 15 % CH ₃ OH 3,5 мин — 5 % CH ₃ OH	I	0,98	0,78	1,67	—	—	209886
	VI	1,06	0,84	1,90	3,47	1,13	211726
	V	1,27	0,78	2,46	8,70	1,29	352484
	III	1,78	0,96	3,82	19,7	1,56	457108
	IV	1,86	1,08	4,08	3,09	1,07	394366
	VIII	1,91	1,02	4,22	1,60	1,03	466216
	IX	2,04	1,32	4,57	3,75	1,08	317566
	II	2,26	1,14	5,16	5,97	1,13	522550
	VII	2,40	1,26	5,56	4,13	1,08	482395
Nucleodur HILIC 0 мин — 5 % CH ₃ OH 1,0—3,0 мин — 10 % CH ₃ OH 3,5 мин — 5 % CH ₃ OH	I	0,99	1,20	2,67	—	—	90496
	VI	1,10	1,20	3,07	2,93	1,15	111723
	V	1,35	1,14	4,01	7,21	1,31	186457
	III	2,35	1,68	7,69	24,3	1,92	260159
	IV	2,47	1,86	8,16	2,50	1,06	234471
	VIII	2,67	2,04	8,90	3,58	1,09	227763
	IX	3,03	2,52	10,2	5,33	1,15	192223
	II	3,24	2,28	11,0	3,17	1,08	268498
	VII	3,49	2,64	11,9	3,54	1,08	232361

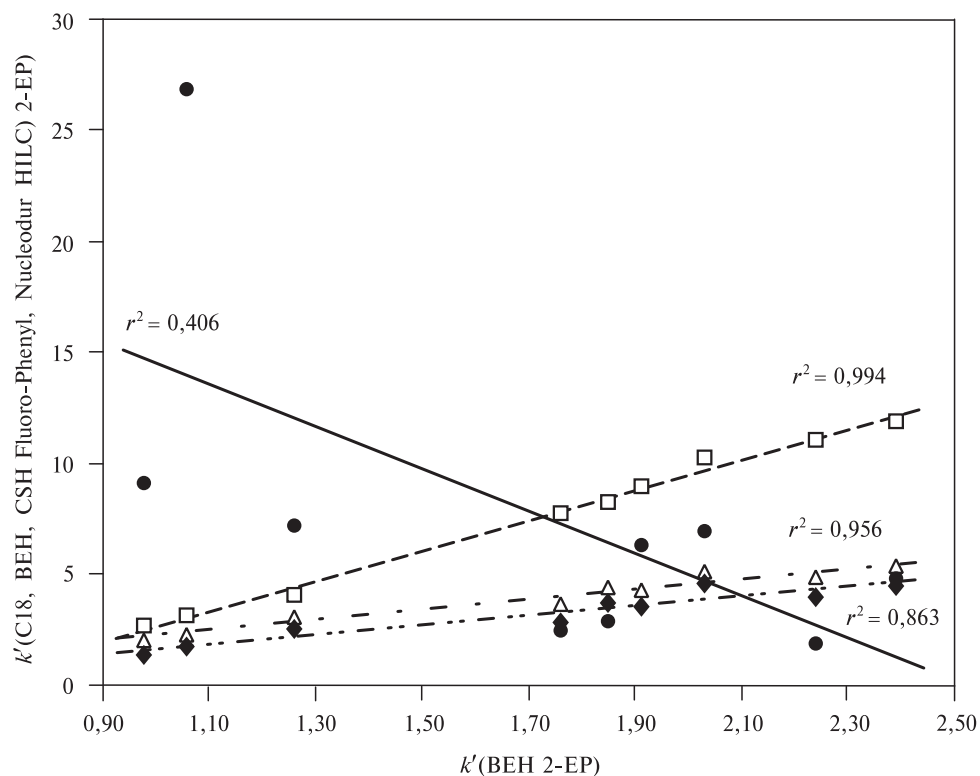


Рис. 3. Взаимосвязь коэффициентов емкости неподвижных фаз C_{18} в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ (●, —), VEN (Δ , - - -), CSH Fluoro Phenyl (\blacklozenge , - · - ·) и Nucleodur HILIC (\square , - -) по отношению к исследуемым анализам с коэффициентами емкости для сорбента VEN 2-EP

фенильной фазой и силикагелем VEN существенно меньше и сводятся к перестановке местами кумаровой и синаповой кислот.

В целом коэффициенты емкости всех исследованных неподвижных фаз по отношению к бензойным и коричным кислотам неплохо коррелируют между собой (рис. 3). При этом коэффициент корреляции (r^2) для сорбентов VEN 2-EP и Nucleodur HILIC превышает 0,99, что можно рассматривать как свидетельство схожести механизмов удерживания кислот на данных неподвижных фазах, определяющий вклад в которые вносят донорно-акцепторные взаимодействия. Напротив, практически отсутствует корреляция ($r^2 = 0,406$) между параметрами удерживания в СФХ и ОФ ВЭЖХ, что еще раз иллюстрирует ортогональность данных методов.

Наилучшие результаты по хроматографическому разделению компонентов демонстрирует 2-этилпиридиновая неподвижная фаза, дающая максимальное разрешение между соседними хроматографическими пиками и проявляющая максимально высокую эффективность (более 130 тыс. Т.Т./м для 4-гидроксibenзойной и сиреневой кислот). Величины коэффициентов емкости для нее также лежат в оптимальном диапазоне, позволяющем обеспечить исключительную экспрессность хроматографического анализа (рис. 4). Его продолжительность составляет 2,5 мин, что на 1-2 порядка ниже по сравнению с имеющимися литературными данными, основанными на применении ОФ ВЭЖХ.

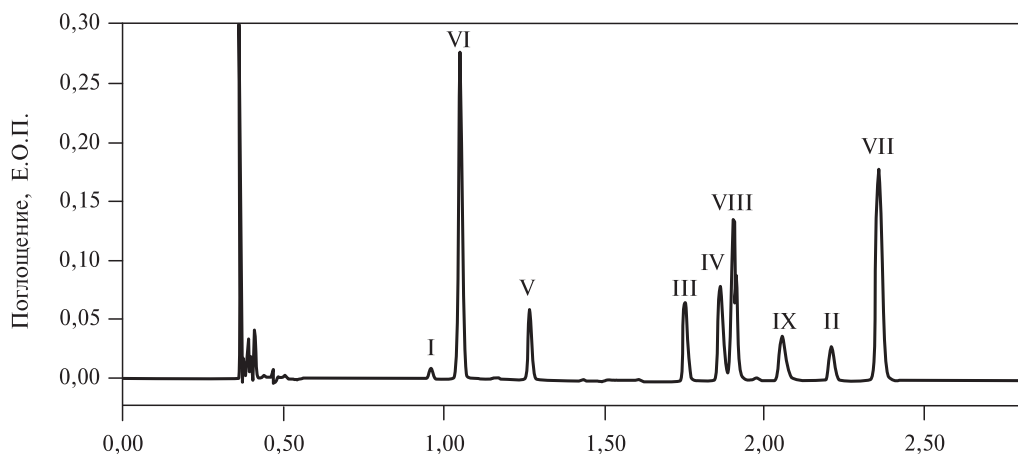


Рис. 4. Хроматограмма стандартной смеси ароматических кислот, полученная с использованием неподвижной фазы VEN 2-EP в оптимальных условиях (детектирование при длине волны 280 нм; Е.О.П. — единицы оптической плотности)

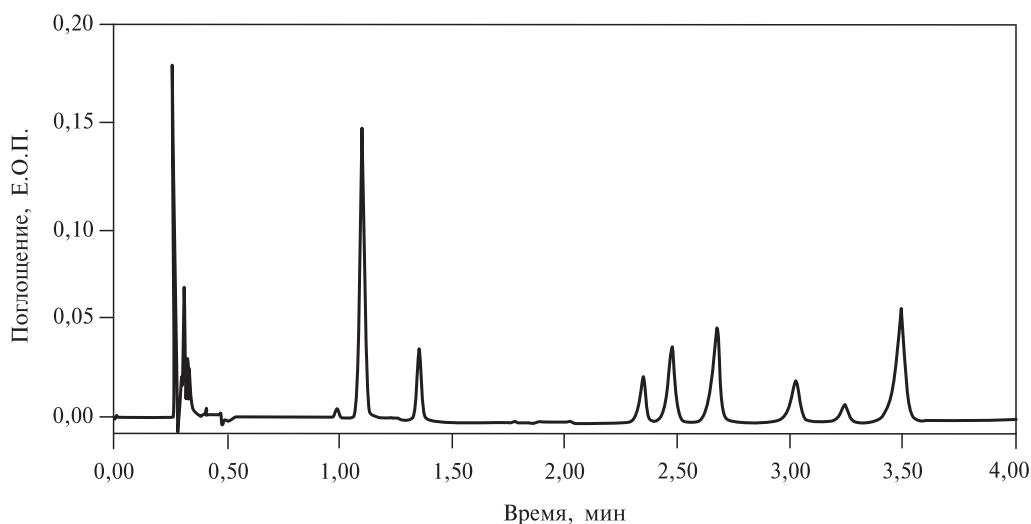


Рис. 5. Хроматограмма стандартной смеси ароматических кислот, полученная с использованием неподвижной фазы Nucleodur HILIC в оптимальных условиях (детектирование при длине волны 280 нм)

Неподвижные фазы VEN и CSH Fluoro-Phenyl не позволили достичь целевых значений разрешения ($R > 1,5$) для некоторых пар компонентов, что обусловлено, наряду с близкими временами удерживания, уширением хроматографических пиков и искажением их формы. Особенно данный эффект проявляется для пентафторфенильной неподвижной фазы.

Интересно, что использование цвиттерионного сорбента Nucleodur HILIC также позволяет добиться хорошего разделения всех исследуемых соединений (рис. 5). При этом весьма примечательными являются упомянутая выше идентичность порядка элюирования кислот и сходная селективность этилпиридинового и цвитте-

**Определение природных ароматических кислот
методом сверхкритической флюидной хроматографии**

рионного сорбентов. При разделении кислот на этилпиридиновом сорбенте определяющая роль водородной связи, в которой атом азота пиридина выступает в качестве донора неподеленной электронной пары, широко известна. В связи с этим возникает предположение о главенствующей роли аналогичных взаимодействий и на цвиттерионном сорбенте. Можно представить, что в качестве донора электронной пары в этом случае выступает сульфогруппа, входящая в состав привитой фазы. Это явление требует более детального экспериментального изучения, однако уже сейчас можно сказать, что цвиттерионный сорбент потенциально представляет особый интерес для СФХ. Наличие двух разноименно заряженных пространственно разделенных ионов на поверхности неподвижной фазы создает возможность высокоселективных СФХ-разделений как кислотных, так и основных соединений. В то же время эффективность такой неподвижной фазы в наших экспериментах оказалась существенно более низкой (от 90 до 268 тыс. Т.Т./м), а высокое разрешение обеспечивается высокими значениями коэффициентов емкости хроматографической колонки. Это ведет к существенному проигрышу во времени анализа (в 1,5 раза) по сравнению с фазой ВЕН 2-EP, а также снижению чувствительности детектирования за счет размывания пиков. Недостатком Nucleodur HPLC является также искажение формы хроматографических пиков с уширением переднего фронта (фронтинг), устранение которого, возможно, требует введения дополнительных модификаторов в подвижную фазу.

На основании вышесказанного, для целей количественного хроматографического анализа нами выбрана неподвижная фаза ВЕН 2-EP и оптимальные условия хроматографирования, представленные для нее в таблице 1.

Количественный анализ. Поскольку выбранные аналиты характеризуются сильно различающимися спектрами поглощения в УФ-области, для достижения максимальной чувствительности анализа использовалось многоволновое детектирование, при этом аналитические длины волн (λ) выбирались максимально близко к положению максимума поглощения (λ_{\max}) исследуемых соединений (таблица 2). Изучение градуировочных растворов с концентрациями 0,2—20,0 мг/л показало соблюдение линейности градуировочных зависимостей площади пика от концентрации, описываемых уравнением вида $y = ax$ с коэффициентом корреляции (r^2)

Таблица 2

**Длины волн спектрофотометрического детектирования
и метрологические характеристики определения аналитов методом СФХ**

Соединение	λ_{\max} , нм	λ , нм	ПО, мкг/л	ПКО, мкг/л	a	r^2
I	223,1	225	21,6	72,1	11953	0,9968
II	251,4	255	20,9	69,6	15100	0,9958
III	256,1	255	34,7	115,6	9098	0,9986
IV	270,3	270	51,3	170,8	7334	0,9989
V	256,1	255	27,6	91,9	9575	0,9992
VI	265,6	265	13,0	43,3	20372	0,9995
VII	303,5	305	23,0	76,5	18435	0,9956
VIII	313,1	315	28,2	94,1	12453	0,9978
IX	317,8	315	40,9	136,2	11245	0,9987

более 0,995 для всех компонентов. Оценка уровня шумов базовой линии (средне-квадратичное отклонение) позволила на основе критерия 3σ (соотношение сигнал/шум равно 3) рассчитать пределы обнаружения (ПО) аналитов. Пределы количественного определения (ПКО) определялись, соответственно, с использованием критерия 10σ (таблица 2). Полученные значения ПО для исследуемых соединений лежат в диапазоне 13,0—51,3 мкг/л, что на порядок лучше, чем при использовании спектрофотометрического детектирования в работах [7, 20]. Существенное повышение чувствительности анализа достигнуто, в первую очередь, за счет реализации сверхбыстрого хроматографического разделения и использования сорбента с ультрамалым размером частиц, что обеспечивает минимальное размывание хроматографических зон.

Для апробации разработанного подхода на реальных объектах были проанализированы различные сорта вин, содержащих по литературным данным [21, 22] значительные количества свободных природных ароматических кислот. Полученные хроматограммы (рис. 6) показывают отсутствие существенных интерференций со стороны матрицы даже при минимальной пробоподготовке, а также достаточную чувствительность метода. Поскольку некоторые сопутствующие компоненты экстракта элюируются после определяемых соединений, анализ может быть продлен до 4 мин, либо — при необходимости обеспечения максимальной экспрессности — требуется промывка хроматографической колонки сильным растворителем (метанолом). Такой подход требует минимального времени благодаря быстрому уравниванию системы в среде сверхкритического флюида.

В исследованных образцах были обнаружены 4-гидроксibenзойная, кумаровая, сиреневая и феруловая кислоты в концентрациях на уровне от 0,2 до 5 мг/л (таблица 3). Статистическая обработка результатов параллельных определений показала хорошую воспроизводимость предложенного метода — стандартное отклонение несколько превышает 10 % лишь для наиболее низких концентраций, что связано с погрешностями экстракционного извлечения.

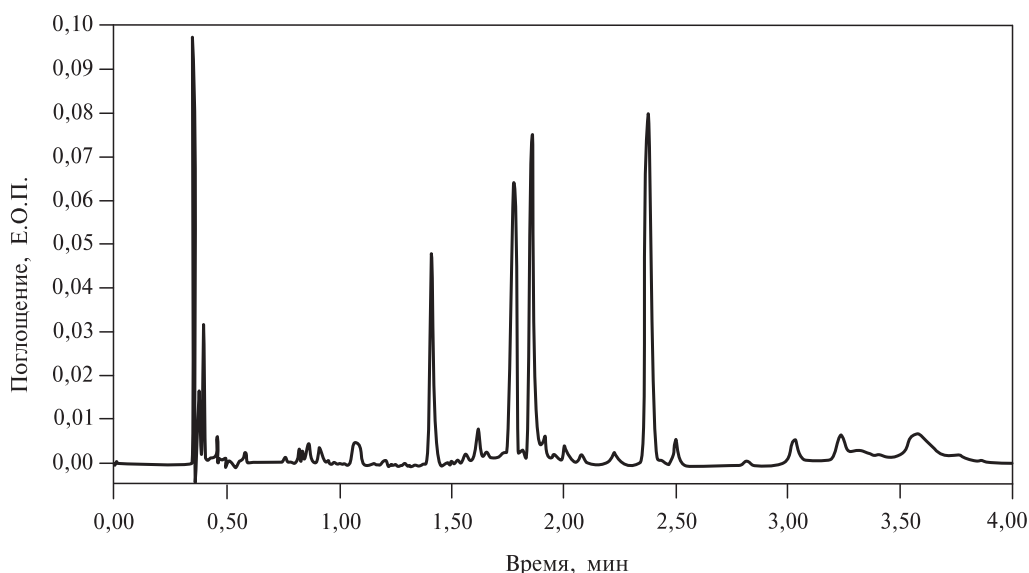


Рис. 6. Хроматограмма образца ВК, полученная с использованием неподвижной фазы ВЕН 2-EP (детектирование при длине волны 280 нм)

Таблица 3

Результаты определения бензойных и коричневых кислот в винах

Образец	Соединение	Концентрация, мг/л	Стандартное отклонение, мг/л
ВК	II	0,87	0,07
	IV	4,9	0,2
	VII	3,2	0,1
ВП	II	0,36	0,05
	VII	1,0	0,1
	VIII	0,45	0,05
ВР	II	0,23	0,03
	IV	1,3	0,1
	VII	1,9	0,1
	VIII	0,36	0,04

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сверхкритическая флюидная хроматография является высокоэффективным и экспрессным методом определения природных ароматических кислот в растительном сырье и продуктах его переработки. Наилучшие результаты достигаются при использовании в качестве неподвижной фазы силикагеля с привитыми 2-этилпиридиновыми группировками, а в качестве элюента — диоксида углерода с добавками метанола. Разделение бензойной и коричневых кислот, а также семи их производных может быть осуществлено в течение 2,5 минут, что на порядок превосходит по скорости известные в литературе подходы, основанные на применении ОФ ВЭЖХ. Использование многоволнового спектрофотометрического детектирования позволяет обеспечить низкие пределы обнаружения аналитов, лежащие в интервале 13,0—51,3 мкг/л. Применимость разработанного подхода продемонстрирована на примере анализа различных образцов вин. Показана возможность использования цвиттерионного сорбента в качестве неподвижной фазы для СФХ, коэффициенты емкости которой по отношению к ароматическим кислотам линейно коррелируют с удерживанием на этилпиридиновой неподвижной фазе.

Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 14.594.21.0004, уникальный идентификатор работ RFMEFI59414X0004) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-03-12238 офи_м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saxena M., Saxena J., Pradhan A.* International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2012. Vol. 16. No. 2. P. 130.
2. *Dillard C.J., German J.B.* J. of the Science of Food and Agriculture. 2000. Vol. 80. P. 1744.
3. *Biskup I., Golonka I., Gamian A., Sroka Z.* Postepy Hig Med Dosw (online). 2013. Vol. 67. P. 958.
4. *Prousek J.* Pure and Applied Chemistry. 2007. Vol. 79. No. 12. P. 2325.
5. *Haminiuk C.W.I., Plata-Oviedo M.S.V., Mattos G., Carpes S.T., Branco I.G.* J. of Food Science and Technology. 2012. Vol. 51. No. 10. P. 2862.
6. *Schieber A., Keller P., Carle R.* J. of Chromatography A. 2001. Vol. 910. No. 2. P. 265.

7. Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermosin-Gutierrez I. J. of Food Composition and Analysis. 2007. Vol. 20. No. 7. P. 618.
8. Onofrejova L., Vasickova J., Klejdus B., Stratil P., Misurcova L., Kracmar S., Kopecky J., Vacek J. J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010. Vol. 51. No. 2. P. 464.
9. Mattila P., Kumpulainen J. J. of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 50. No. 13. P. 3660.
10. Kukula-Koch W., Aligiannis N., Halabalaki M., Skaltsounis A., Glowniak K., Kalpoutzakis E. Food Chemistry. 2013. Vol. 138. No. 1. P. 406.
11. Li H., Deng Z., Liu R., Young J.C., Zhu H., Loewen S., Tsao R. J. of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. No. 21. P. 11803.
12. Овчинников Д.В., Косяков Д.С., Ульяновский Н.В. Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 3. С. 302.
13. Самохин А.С., Ревельский И.А., Чепелянский Д.А., Паренаго О.О., Покровский О.И., Лепешкин Ф.Д., Устинович К.Б., Ревельский А.И. СКФ-ТП. 2011. Т. 6. № 4. С. 21.
14. Supercritical fluid chromatography: advances and applications in pharmaceutical sciences / Ed. by G.K. Webster. Boca Raton: CRC Press, 2014. 394 p.
15. Karnangerpour A., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T., McNair H.M., Chorida L. Chromatographia. 2002. Vol. 55. No. 7/8. P. 417.
16. Tumbas V.T., Mandic A.I., Cetkovic G.S., Dilas S.M., Canadanovic-Brunet J.M. Acta periodica technologica. 2004. Vol. 35. P. 265.
17. Zahradnikova L., Schmidt S., Sekelyova Z., Sekretar S. Czech Journal of Food Sciences. 2008. Vol. 26. No. 1. P. 58.
18. West C., Lesellier E. J. of Chromatography A. 2008. Vol. 1203. P. 105.
19. Bernal J.L., Martin M.T., Toribio L. J. of Chromatography A. 2013. Vol. 13. P. 24.
20. Tarola A.M., Van de Velde F., Salvagni L., Preti R. Food Analytical Methods. 2013. Vol. 6. No. 1. P. 227.
21. Gris E.F., Mattivi F., Ferreira E.A., Vrhovsek U., Filho D.W., Pedrosa R.C., Bordignon-Luiz M.T. J. of Food Composition and Analysis. 2013. Vol. 31. No. 1. P. 31.
22. Van Leeuw R., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., Dommes J. J. of Food Composition and Analysis. 2014. Vol. 36. No. 1—2. P. 40.

DETERMINATION OF NATURAL AROMATIC ACIDS USING SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY

¹D.V. Ovchinnikov, ¹D.S. Kosyakov, ¹N.V. Ul'yanovskii, ^{1, 2}K.G. Bogolitsyn,
¹D.I. Falev, ³O.I. Pokrovskiy

¹Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia

²Institute of Ecological Problems in the North RAS, Arkhangelsk, Russia

³Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Derivatives of benzoic and cinnamic acids are secondary metabolites of plants, widely spread in nature and possessing biological activity. It is shown that supercritical fluid chromatography (SFC) provides a high performance separation of nine most important representatives of this class of compounds with selectivity, which is dramatically different from the reversed-phase high-performance liquid chromatography. The retention and separation parameters of analytes for four chromatographic stationary phases of different nature are compared and the effect of supercritical fluid parameters and the composition of the mobile phase onto the chromatographic separation are analyzed. The optimum separation can be achieved using a silica-based sorbent with 2-ethylpyridinium linked groups. The proposed approach to determine the above mentioned compounds is based on the combination of chromatographic separation with multiwavelength spectrophotometric detection. It provides the detection limits in the range of 13.0—51.3 mg/L and the duration of analysis about 2.5 min. The developed approach is successfully tested on the analysis of real objects — three different kinds of wine.

Key words: supercritical fluid chromatography, SFC, natural aromatic acids.