



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2012, 6, 40-48
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

CHROMATOGRAFICZNE METODY IZOLACJI I IDENTYFIKACJI FENOLOKWASÓW

Piotr Mróz¹, Katarzyna Wilczek¹, Małgorzata Żak¹, Monika Zielińska-Pisklak^{2*}

¹ Koto Naukowe „Spektrum” przy Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

² Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Banacha 1, 02-097 Warszawa

* Autorka korespondująca: tel. +22 5720930, e-mail: mpisklak@wum.edu.pl

Otrzymany 13.06.2012, zaakceptowany 15.10.2012, zamieszczony 26.11.2012

STRESZCZENIE

Kwasy fenolowe stanowią grupę związków szeroko rozpowszechnionych w świecie roślin. Charakteryzują się zróżnicowaną strukturą chemiczną i właściwościami farmakologicznymi. Z uwagi na swoją aktywność prozdrowotną, związaną w głównej mierze z działaniem antyoksydacyjnym, cieszą się obecnie bardzo dużym zainteresowaniem jako bioaktywne komponenty żywności i suplementów diety. W poniższej pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa na temat izolacji fenolokwasów z materiału roślinnego oraz produktów spożywczych. Omówione zostały także chromatograficzne oraz spektroskopowe metody identyfikacji tych związków.

SŁOWA KLUCZOWE: fenolokwasy, ekstrakcja do fazy stałej (SPE), HPLC, GC

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC METHODS OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHENOLIC ACIDS

Phenolic acids are a group of compounds widely distributed in the world of plants. They are characterized by diversified chemical structure and pharmacological properties. Due to their health potency, associated mainly with antioxidative action, they are currently of interest as bioactive food components and supplements. This work provides an overview about the reported isolation procedures of phenolic acids from plant material and food products. The chromatographic and spectroscopic identification methods of these compounds are discussed.

KEYWORDS: phenolic acids, solid phase extraction (SPE), HPLC, GC

1. Budowa, występowanie i właściwości farmakologiczne fenolokwasów

Kwasy fenolowe (ang. *phenolic acids*) należą do grupy związków polifenolowych, powszechnie występujących w tkankach roślinnych. Są metabolitami wtórnymi o zróżnicowanej budowie chemicznej i właściwościach biologicznych. W roślinach występują głównie w postaci związanej, w postaci estrów lub glikozydów, jako składowe lignin i tannin hydrolizujących. Pod względem budowy chemicznej można je podzielić na: pochodne kwasu cynamonowego (Ryc. 1) i benzoowego (Ryc. 2) różniące się liczbą oraz miejscem podstawienia grup hydroksylowych i metoksylo- wych oraz fenolokwasy o nietypowej budowie (Ryc. 3). Dodatkową grupę stanowią depsydy będące połączeniem dwóch lub więcej cząsteczek fenolokwasów (Ryc. 4) [1].

Najczęściej spotykanymi pochodnymi kwasu cynamonowego są:

- kwas kawowy, występujący m. in. jabłkach, gruszkach, śliwkach, kapuście, szpinaku, sałacie, ziemniakach, kawie, liściach tytoniu, winie oraz oliwie z oliwek,
- kwas ferulowy, występujący przede wszystkim w nasionach zbóż, głównie pszenicy, owsa, żyta i jęczmienia,
- kwas p-kumarowy, którego bogatym źródłem są różne owoce i zboża (także otręby),
- kwas synapinowy, który znajduje się głównie w warzywach z rodziny *Brassicaceae*, np. brokułach, kalafiorze, brukselce czy jarmużu oraz w sokach z owoców cytrusowych [2].

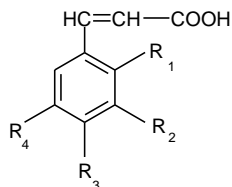
Do najbardziej znanych pochodnych kwasu benzoowego należą:

- kwas p-hydroksybenzoowy, którego źródłem są czarna porzeczka, maliny, jeżyny oraz truskawki,
- kwas salicylowy, znajdujący się w korze wierzby i wiązówce błotnej oraz w dużo mniejszych ilościach w pomidorach, rzodkiewkach, cykorii, morelach, jeżynach, jagodach, migdałach, orzechach ziemnych, a także w przyprawach, np. oregano, curry i rozmarynie,
- kwas galusowy, występujący głównie w herbacie, malinach, truskawkach oraz cebuli,
- kwas protokatechowy, znajdujący się w cebuli, rzodkiewkach [3].

Jedną z ważniejszych właściwości fenolokwasów jest działanie antyoksydacyjne, przy czym aktywność ta jest bardziej zaznaczona w przypadku pochodnych kwasu cynamonowego [4]. Właściwości przeciwutleniające fenolokwasów w istotny sposób zależą od liczby grup hydroksylowych i metoksylo- wych przyłączonych do pierścienia fenolowego. Mechanizm działania antyoksydacyjnego kwasów fenolowych w głównej mierze opiera się na: (i) hamowaniu powstawania reaktywnych form tlenu (ROS) lub azotu (RNS), (ii) neutralizacji („zmiataniu”) wolnych rodników oraz (iii) chelatowaniu jonów metali o charakterze prooksydacyjnym, np. Cu (II) lub Fe (II), a także (iv) obniżaniu aktywności enzymów katalizujących reakcje utleniania, np. oksydazy ksantynowej [5-9]. Dzięki właściwościom przeciwutleniającym fenolokwasy stanowią grupę roślinnych

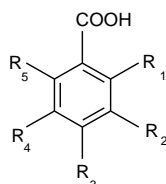
związków chemoprewencyjnych [10-12], czyli hamujących lub opóźniających wczesne etapy procesu nowotworzenia. Wśród pozostałych właściwości farmakologicznych kwasów fenolowych można wymienić m. in. działanie: (a) przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, przeciwreumatyczne (kwas salicylowy), (b) przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze (kwas galusowy, kwas gentyzynowy), (c)

przeciwróbacze (kwas wanilinowy), (d) immunostymulujące (poprzez zwiększenie produkcji przeciwciał klasy IgG - kwasy: chlorogenowy, kawowy, protokatechowy), (e) żółciopędne i żółciotwórcze oraz antyhepatotoksyczne (kwasy: chlorogenowy, ferulowy, kawowy, synapinowy, syryngowy, wanilinowy) [13-15].



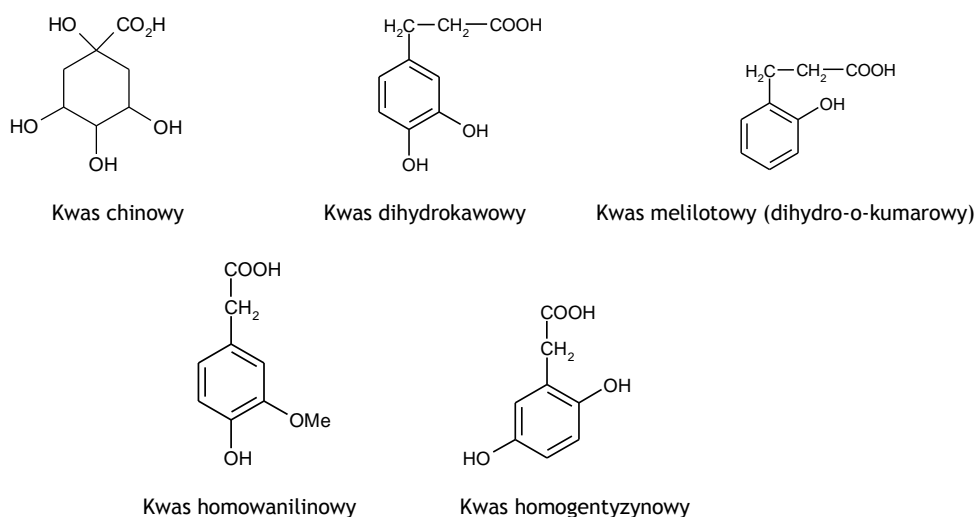
Ryc. 1. Pochodne kwasu cynamonowego. Podstawniki opisano poniżej.

Związek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Kwas cynamonowy	H	H	H	H
Kwas o-kumarowy	OH	H	H	H
Kwas m-kumarowy	H	OH	H	H
Kwas p-kumarowy	H	H	OH	H
Kwas kawowy	H	OH	OH	H
Kwas ferulowy	H	H	OH	OCH ₃
Kwas izoferulowy	H	OH	OCH ₃	H
Kwas synapinowy	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Kwas 4 - metoksycynamonowy	H	H	OCH ₃	H
Kwas 3,4 - dimetoksycynamonowy	H	OCH ₃	OCH ₃	H

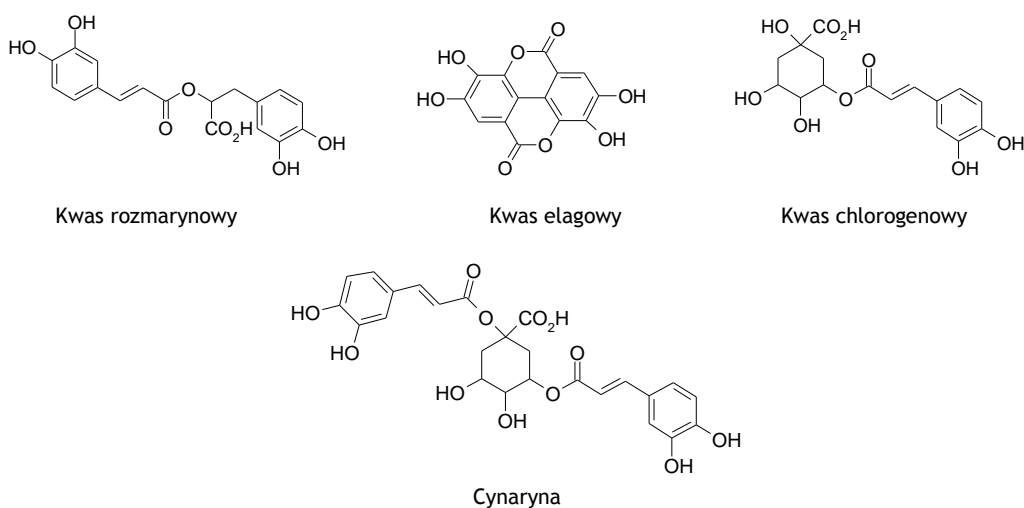


Ryc. 2. Pochodne kwasu benzoowego. Podstawniki opisano poniżej.

Związek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Kwas benzoowy	H	H	H	H	H
Kwas salicylowy	OH	H	H	H	H
Kwas m-hydroksybenzoowy	H	OH	H	H	H
Kwas p- hydroksybenzoowy	H	H	OH	H	H
Kwas α-rezorcylowy	H	OH	H	OH	H
Kwas β-rezorcylowy	OH	H	OH	H	H
Kwas γ-rezorcylowy	OH	H	H	H	OH
Kwas 2,3-dihydroksybenzoowy	OH	OH	H	H	H
Kwas gentyzynowy	OH	H	H	OH	H
Kwas protokatechowy	H	OH	OH	H	H
Kwas galusowy	H	OH	OH	OH	H
Kwas wanilinowy	H	OCH ₃	OH	H	H
Kwas syryngowy	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Kwas weratrowy	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
Kwas 2,4 - dimetoksybenzoowy	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H



Ryc. 3. Przykłady fenolokwasów o nietypowej budowie.



Ryc. 4. Depsydy

2. Metody izolacji fenolokwasów

Metodyka izolacji fenolokwasów zależy w znacznej mierze od rodzaju badanej próbki. Kwasy fenolowe izoluje się z próbek stałych, takich jak: surowce roślinne (suszone zioła, owoce, warzywa, zboża) lub stałe postaci leku ziołowego oraz z próbek ciekłych, np. soków owocowych, napojów alkoholowych (wina, piwo), oliwy z oliwek, płynnych ustrojowych lub płynnych postaci leku [16].

Izolację fenolokwasów z próbek stałych można prowadzić wieloma metodami, które przedstawiono w rozdziałach od 2.1 do 2.8.

2.1. Ekstrakcja prosta (SLE)

Jako ekstrahenty w metodzie tej wykorzystuje się przeważnie metanol, etanol, wodę, aceton, octanu etylu. Mišan i in. [17] stosowali 24-godzinną ekstrakcję mieszaniną etanolu i wody (80:20, v/v) do ekstrakcji fenolokwasów z *Petroselinia fructus*, *Frangulae cortex*, *Menthae piperitae folium*, *Carvi fructus* i *Betulae folium*, używając na jedną część surowca 10 części mieszaniny etanolowo-wodnej. W celu zwiększenia odzysku fenolokwasów z matrycy można zastosować szereg modyfikacji wspomnianej techniki.

2.2. Ekstrakcja połączona z hydrolizą

Bardzo często ekstrakcja prosta fenolokwasów jest mało wydajna. Dzieje się tak, ponieważ fenolokwasy występują w roślinach w postaci połączeń ze składnikami ścian komórkowych - np. kwas ferulowy tworzy połączenia estrowe i glikozydowe w ścianach komórkowych zbóż. W związku z tym celowe wydaje się przeprowadzenie wstępnej hydrolizy. W pracy Ross i in. [18] porównywano trzy metody hydrolizy próbek: (i) hydrolizę zasadową 10 M NaOH, a następnie hydrolizę kwaśną przy użyciu stężonego HCl, (ii) samą hydrolizę zasadową 2 M NaOH oraz (iii) samą hydrolizę kwaśną przy pomocy 12 M HCl. Każda z wymienionych metod miała dwa warianty; pierwszy z nich polegał na dodaniu 2% kwasu askorbinowego (AA) i 13,4 mM kwasu wersenowego (EDTA); w drugim wariantcie nie dodawano rozтворów wspomnianych substancji. W rezultacie największą wydajność uzyskano przy zastosowaniu hydrolizy zasadowej z dodatkiem AA i EDTA jako związków chroniących kwasy fenolowe przed rozkładem.

2.3. Ekstrakcja przy użyciu aparatu Soxhleta (SOE)

Ekstrakcja ciągła z użyciem aparatu Soxhleta jest szeroko stosowana w pracach z zakresu fitochemii, jakkolwiek w przypadku fenolokwasów technika ta nie jest metodą z wyboru. Skalicka-Woźniak i in. [19] zastosowali ekstrakcję ciągłą chlorkiem metylenu, a następnie metanolem do wyodrębnienia frakcji fenolowej z *Peucedanum cervaria* i *Peucedanum alsaticum*.

2.4. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (UAE)

Wang i in. [20] optymalizowali warunki izolacji składników fenolowych z zastosowaniem ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami. Materiałem, z którego ekstrahowano związki czynne były otręby pszenne. Porównywano wydajność ekstrakcji po zastosowaniu trzech różnych rozpuszczalników: 70% (v/v) metanolu, 70% (v/v) etanolu i 70% (v/v) acetonu. Najlepszym rozpuszczalnikiem okazał się etanol. Następnie badano wpływ stężenia etanolu (od 20 do 95%, v/v), temperatury prowadzenia ekstrakcji (w zakresie 25-75°C) oraz czasu ekstrakcji (od 10 do 50 minut). Ustalono, że optymalnymi warunkami do ekstrakcji związków fenolowych, wspomaganej ultradźwiękami są: etanol 64% (v/v) jako ekstrahent, temperatura - 60°C i czas - 25 minut; przy czym czas ekstrakcji miał największy wpływ na jej wydajność (całkowita zawartość fenolokwasów - 3,12 mg ekwiwalentów kwasu galusowego/g otrębów).

2.5. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE)

Metodę MAE zastosowali Štěrbová i in. [21] do analizy frakcji fenolokwasów otrzymanych z wielu gatunków roślin. Badano wpływ różnych warunków ekstrakcji na wydajność izolacji związków fenolowych. Do ekstrakcji użyto ekstraktora mikrofalowego ETHOS SEL. Parametry ekstrakcji (czas, temperatura, ciśnienie) były kontrolowane komputerowo. Do ekstrakcji użyto odpowiednio 10, 20, 30 ml 0,1 i 2 M wodnego roztworu HCl zawierającego 0, 10, 20 i 30 % (v/v) metanolu. Temperatura ekstrakcji była zmieniana w zakresie 40 - 90°C co 10°C, czas ekstrakcji zmieniano od 10 do 30 min. Zastosowano pulsacyjne promieniowanie mikrofalowe o mocy 500 W. Ustalono, że optymalnymi warunkami do ekstrakcji związków fenolowych, wspomaganej promieniowaniem są: 2 M roztwór HCl w temperaturze 70°C przez 20 min. Ekstrakty oczyszczano metodą SPE i oznaczono chromatograficznie 19 składników fenolowych w jednym przebiegu, z granicą detekcji (wykrywalności) bliską 0,02 ng/ μ l.

2.6. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE)

Vichapong i in. [22] zastosowali ekstrakcję 70% (v/v) etanolem pod ciśnieniem 1500 psi (funt na cal kwadratowy), czas ekstrakcji 15 min., uzyskując wyciągi z różnych odmian ryżu. W celu uwolnienia fenolokwasów związanych ze składnikami ścian komórkowych, autorzy przeprowadzili dodatkowo hydrolizę zasadową. Odzysk 12 kwasów fenolowych z próbek wyniósł od 84 do 99%. Frakcje związków fenolowych analizowano metodą HPLC w czasie 25 min. Dzięki zastosowaniu metody ASE znacznie skrócono czas ekstrakcji, co może być istotne w analizach rutynowych.

2.7. Ekstrakcja wodą w stanie nadkrytycznym (SWE)

Badania Rangsrivong i in. [23] dotyczyły porównania metod ekstrakcji kwasów fenolowych z owoców *Terminalia chebula*. Zastosowano ekstrakcję wodą w stanie nadkrytycznym w zakresie temperatur 120-220°C, przy przepływie od 2 do 4 ml/min i ciśnieniu 4 MPa. Dla porównania zastosowano ekstrakcję gorącą wodą oraz ekstrakcję etanolem w aparacie Soxhleta pod ciśnieniem normalnym. Wykazano, że ilość kwasów: elagowego i galusowego zwiększała się w ekstraktach uzyskanych metodą SWE, gdy temperatura osiągała wartość 180°C. Natomiast ilość korilaginy zwiększała się w ekstraktach, gdy temperatura osiągała wartość 120°C. Porównując metodę ekstrakcji wodą w stanie nadkrytycznym z ekstrakcją etanolem w aparacie Soxhleta, stwierdzono lepszy odzysk fenolokwasów z próbek oraz wyższą aktywność antyoksydacyjną ekstraktów uzyskanych pierwszą ze wspomnianych metod.

2.8. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD)

Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD) jest zarówno metodą izolacji, jak i oczyszczania związków z analizowanych próbek. Metoda ta jest zwykle stosowana w analizie pozostałości pestycydów w materiale roślinnym. W swojej pracy, Žiaková i in. [24] zastosowali metodę MSPD do izolacji i oczyszczania kwasów fenolowych z zieleń *Melisa officinalis*. Do ekstrakcji zastosowano różne fazy stałe, a rozpuszczalnikiem był n-heksan. Substancje interferujące odmyto z fazy stałej przy pomocy mieszaniny chlorku metylenu i n-heksanu. Związki fenolowe wyeluuowano ze złoża mieszaniną metanol-woda (80:20, v/v) o pH 2,5 i analizowano metodą HPLC. Odzysk fenolokwasów w tej metodzie wyniósł ponad 90% dla wszystkich analizowanych związków.

3. Metody oczyszczania ekstraktów

W ekstraktach zawierających fenolokwasy często występują i inne związki fenolowe np. flawonoidy. W celu ułatwienia analizy chromatograficznej, ekstrakty można poddać oczyszczaniu jedną z metod opisanych w dalszych podrozdziałach. Warto zauważyć, że metody te mogą służyć zarówno do oczyszczania ekstraktów pozyskanych z próbek stałych, jak i do zatężania próbek ciekłych.

3.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Metoda SPE jest obecnie szeroko stosowaną metodą oczyszczania i zagęszczania próbek przed ich dalszą analizą. Głowniak i in. [25] prowadzili oczyszczanie metanolo- wych ekstraktów uzyskanych z sześciorzędowej *Echinacea* stosując dwa typy kolumn SPE. Najpierw ekstrakty podano na kolumny oktadecylowe w celu usunięcia składników niepolarnych. Następnie eluaty z kolumn oktadecylowych doprowadzono do pH 7,1-7,2 przy użyciu 5% NaHCO₃ i przepuszczono przez kolumny ze złożem zawierającym czwartorzędowe grupy amoniowe. Frakcję fenolokwasów wyeluuowano z kolumn mieszaniną 0,2 M H₃PO₄ i metanolu (1:1, v/v). Oczyszczone w ten sposób próbki analizowano metodą HPLC.

Jaroszyńska [26] zastosowała metodę SPE do uzyskania oczyszczonych frakcji fenolokwasów z próbek roślinnych. W celu usunięcia składników niepolarnych z wyciągów stosowała kilkukrotną ekstrakcję n-heksanem, ekstrakcję acetonem, adsorpcję na złożu Florisil i oczyszczanie na mikroko-

lumnach ze złożem oktadecylowym. Metoda ta dała najmniejszy odzysk w przypadku kwasu ferulowego (32%), a największy w przypadku kwasu gentyzynowego (88%).

3.2. Kapilarna mikroekstrakcja do fazy ciekłej (HF-LPME)

Saraji i in. [27] zastosowali mikroekstrakcję do fazy ciekłej w celu oczyszczenia próbek soków owocowych i uzyskania frakcji do analizy kwasów fenolowych. Próbki w postaci roztworu wodnego (pH 2) przepuszczano przez cylindryczną membranę polipropylenową (hollow-fiber) impregnowaną rozpuszczalnikiem organicznym (octan hektylu). Kapilara zanurzona była w 0,02 M NaOH w celu absorpcji fenolokwasów.

3.3. Ekstrakcja przy użyciu poliwinylpirolidonu (PVP)

Magalhães i in. [28] w swoich badaniach zastosowali roztwór poliwinylpirolidonu do selektywnej adsorpcji związków fenolowych z ekstraktów *Humulus lupulus*. W tym celu do wodnego ekstraktu (o pH 4) dodawano roztwór PVP (30 mg/ml). Roztwory mieszano, sączono i poddawano liofilizacji. Liofilizat PVP z zaadsorbowanymi związkami fenolowymi reekstrahowano mieszaniną aceton/woda (70:30, v/v). Po odparowaniu acetonu i liofilizacji roztworu wodnego otrzymywano próbkę do dalszej analizy przy użyciu HPLC. Metoda ta posłużyła do analizy zarówno fenolokwasów, jak i flawonoidów obecnych w surowcu.

3.4. Preparatywna chromatografia kolumnowa

Metoda preparatywnej chromatografii kolumnowej została zastosowana przez Sampietro i in. [29] do rozdzielenia ekstraktu eterowego ze słomy *Saccharum officinarum*. W analizie użyto złoża Sephadex LH 20 i metanolu jako eluentu.

Iqbal i in. [30] użyli kolumn LC 20×600 mm wypełnionych żelalem silikonowym (C60, 70-230 mesh, Merck) do rozdzielenia związków fenolowych w ekstrakcie z korzeni *Ophiopogon japonicus*. Eluentem była mieszanina eteru dietylowego ze wzrastającą, w czasie analizy, ilością chloroformu i metanolu.

4. Rozdział i identyfikacja fenolokwasów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest szeroko stosowaną techniką analityczną służącą do oceny składu ilościowego i jakościowego różnorodnych próbek. Jest ona bardzo przydatna do analiz mieszanin związków pochodzenia naturalnego z uwagi na jej dużą czułość i możliwość stosowania do badania różnych grup metabolitów występujących w roślinach. Technika ta jest w dalszym ciągu udoskonalana dzięki czemu uzyskuje się coraz krótszy czas analiz, a także ich większą czułość. Zastosowanie HPLC sprzężonej ze spektrometrią masową (HPLC-MS/MS) lub spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) umożliwia zarówno analizę ilościową, jak i określenie struktury badanych związków. Jest to szczególnie istotne w przypadku badania ekstraktów roślinnych, które zawierają niejednokrotnie połączenia glikozydowe fenolokwasów lub depsydy.

Robbins [16] przedstawiła przegląd metodyki oznaczania fenolokwasów w żywności. Wiele publikacji poświęconych jest analizie różnych związków fenolowych metodą HPLC (głównie flawonoidów), a fenolokwasy oznaczane są

obok innych związków. Wykazano, że bardzo ważnym etapem analizy kwasów fenolowych jest rodzaj zastosowanej ekstrakcji (z ewentualną hydrolizą) oraz sposób oczyszczania ekstraktów ze związków interferujących. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie różnych warunków prowadzenia analizy fenolokwasów metodą HPLC.

4.1. Rodzaje stosowanych kolumn

Analizę fenolokwasów metodą HPLC prowadzi się głównie w odwróconym układzie faz (RP). Dlatego też podstawowym typem stosowanych kolumn są kolumny (\varnothing 2,1 do 5 mm) z grupami oktadecylowymi C₁₈ jako fazą stacjonarną. Wielkość ziaren fazy stacjonarnej waha się w granicach 3-5 μ m. W ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) wielkość ziaren fazy stacjonarnej jest odpowiednio mniejsza (ok. 1,7 μ m [36]), a stosowane kolumny mają przeważnie 100-300 mm długości. Na rynku dostępnych jest wiele typów kolumn RP-18 (Tabela 1).

4.2. Fazy ruchome

Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa [31-35], oznaczenia kwasów fenolowych metodą HPLC prowadzi się częściej w układzie izokratycznym niż gradientowym. W warunkach izokratycznych jako fazę ruchomą stosuje się mieszaninę wody i polarnych rozpuszczalników organicznych, takich jak metanol, acetonitryl, zakwaszone kwasem octowym lub fosforowym.

W układzie gradientowym przeważnie stosuje się fazę wodną (A), która również często jest zakwaszana. Czasami stosuje się dodatek kwasu trifluorooctowego (TFA) w celu zmniejszenia „ogonowania” pików [36]. W niektórych przypadkach stosuje się roztwory buforujące, np. bufor fosforanowy [37]. W skład faz organicznych (B) wchodzi metanol, acetonitryl, octan etylu, rzadziej tetrahydrofuran.

4.3. Przepływ fazy ruchomej i czas analizy

Zarówno przepływ fazy ruchomej, jak i czas analizy zależą od rodzaju zastosowanej kolumny oraz typu używanego detektora. Zazwyczaj w badaniach fenolokwasów metodą HPLC stosuje się przepływ fazy ruchomej w granicach 0,15 do 1,8 ml/min. Najczęściej prędkość przepływu wynosi 1 ml/min. Czas analiz w różnych wariantach metody waha się od 30 do 150 minut.

4.4. Temperatura kolumny

Rozdział kwasów fenolowych prowadzi się głównie w temperaturze pokojowej, jakkolwiek niektórzy badacze [38] stosowali temperaturę 10°C, dzięki czemu czasy retencji były bardziej porównywalne.

4.5. Metody detekcji stosowane w analizie fenolokwasów metodą HPLC

4.5.1. Detekcja w nadfiolecie

Najpowszechniejszą metodą detekcji jest detekcja fenolokwasów w nadfiolecie, w której stosuje się detektory z matrycą diodową (DAD). Pomiar przeprowadza się w zakresie λ = 190-380 nm. Długość fali zależy od struktury chemicznej fenolokwasów. Pochodne kwasu benzoowego mają maksima absorpcji w zakresie λ = 200-290 nm. Wyjątkiem jest kwas gentyzynowy, którego maksimum absorpcji wynosi 355 nm. Pochodne kwasu cynamonowego mają nieco wyższe wartości maksimów absorpcji (zakres λ = 270-360 nm) z uwagi na występowanie dodatkowego wią-

zania podwójnego w podstawniku przy C1 pierścienia fenolowego. W przypadku stosowania detektora monochromatycznego, rejestrującego jedną długość fali, pomiary wykonuje się zwykle przy $\lambda = 254$ nm.

4.5.2. Detekcja fluorescencyjna

Niektórzy z autorów [39] w analizie kwasów fenolowych używali detektorów fluorescencyjnych. Do wzbudzenia cząsteczek związków oznaczanych w próbkach stosowano promieniowanie UV o długości fali 278 nm i wówczas emisja następowała przy $\lambda = 360$ nm. Takie parametry stosowano przez pierwsze 17,5 min. analizy chromatograficznej. Przez następne 16,5 min długość fali wzbudzenia ustalono na 330 nm natomiast pomiaru fluorescencji dokonywano przy $\lambda = 374$ nm.

Chang i in. [40] zastosowali detekcję chemiluminescencyjną. W tym przypadku wykorzystano reakcję pomiędzy kwasami fenolowymi a odczynnikami złożonym z luminolu i nadtlenu wodoru. Obecność fenolokwasu powoduje obniżenie intensywności luminescencji odczynnika. Opisana metoda detekcji jest bardzo czuła i relatywnie tania.

4.5.3. Spektrometria mas (MS)

Połączenie HPLC ze spektrometrią mas ma pewne zastosowanie w analizie kwasów fenolowych. Boros i in. [41] zastosowali HPLC z detektorem DAD oraz detektor masowy z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym (ESI-MS) do badania składników fenolowych różnych gatunków z rodzaju *Thymus*. W powyższej pracy wykazano, że połączenie HPLC-ESI-MS nadaje się do szybkiej i czułej analizy dość skomplikowanych mieszanin związków naturalnych. W swojej pracy Neo i in. [42] zastosowali połączenie HPLC z tandemowym spektrometrem mas (HPLC-MS/MS) do badania frakcji fenolowych z *Elaeis guineensis*.

5. Zastosowanie chromatografii gazowej (GC) w analizie fenolokwasów

Chromatografia gazowa jest kolejną techniką analityczną mającą duże znaczenie w analizie jakościowej i ilościowej kwasów fenolowych w próbkach pochodzenia naturalnego. Metoda ta jest czuła i szybka. Z uwagi na dość niską lotność tej grupy związków, przed oznaczeniem należy przeprowadzić procedurę derywatyzacji. W Tabeli 2 przedstawiono przykłady warunków prowadzenia analizy kwasów fenolowych metodą GC.

5.1. Derywatyzacja

Ze względu na dość niską lotność fenolokwasów, przed oznaczeniem metodą GC należy zastosować derywatyzację. Polega ona na przeprowadzeniu trudno lotnych związków w ich lotne i zarazem trwałe pochodne. W przypadku fenolokwasów najczęściej stosuje się jodek metylu w alkalicznym DMSO (powstają estry metylowe). Czasami przeprowadza się kwasy fenolowe w pochodne trialkilosilanowe. W tym celu stosuje się głównie N,O-bis-(trimetylosililo)acetamid (BSA), N-metylo-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (MST-FA) oraz N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoro-acetamid (BST-FA). Reakcja tworzenia pochodnych trimetylosilanowych przy pomocy tych reagentów zachodzi na ogół łatwo, jeśli prowadzi się ją w rozpuszczalniku o charakterze zasadowym (np. pirydynie). Przeważnie czas prowadzenia silniczacji wynosi 20-60 min.

5.2. Stosowane kolumny i warunki prowadzenia analizy

W analizie fenolokwasów stosuje się głównie kolumny kapilarne z krzemionki topionej, o długości 25-30 m i średnicy wewnętrznej ok. 0,25 mm. Większość analiz GC kwasów fenolowych prowadzi się w warunkach programowanej temperatury. Zaleca się stosowanie temperatury początkowej od 75 do 80°C, a wzrost temperatury programuje się do wartości od 2 do 40°C/min.

5.3. Detektory

Najczęściej stosowanymi detektorami w chromatografii gazowej kwasów fenolowych są detektory płomieniowo-jonizacyjne (FID). Nie mniej jednak coraz częściej są one zastępowane detektorami masowymi (GC-MS), co umożliwia szybszą identyfikację badanych związków. Ponadto metoda GC-MS charakteryzuje się lepszą odtwarzalnością niż metoda HPLC-MS i jest korzystniejsza w przypadku dokładnych analiz ilościowych fenolokwasów [46]. Widma mas rejestruje się w zakresie m/z 39-650.

6. Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa jest techniką analityczną, którą można zastosować zarówno do analizy jakościowej, jak i ilościowej kwasów fenolowych. Badano wiele rodzajów układów do TLC [47]. Skład fazy ruchomej: eter naftowy-octan etylu-kwas mrówkowy (40:60:1, v/v/v) okazał się najlepszy do rozdzielenia mieszanin składników. Do wywoływania płytek zastosowano jod, roztwór chlorku żelaza w metanolu lub roztwór waniliny w stężonym kwasie siarkowym. Jako fazy stacjonarnej używano płytek szklanych powleczonych warstwą żelu krzemionkowego; płytki były aktywowane przez 1h w suszarce w temp. 110°C.

7. Zastosowanie innych metod

7.1. Elektroforeza kapilarna (CE)

Elektroforeza kapilarna odgrywa coraz większą rolę w analizie związków naturalnych. Scampicchio i in. [48] zastosowali metodę CE z detekcją amperometryczną do analizy składników fenolowych wina. Rozdział prowadzono w 15 mM buforze boranowym o pH 9,5 stosując do separacji napięcie 2000 V. Zastosowana metoda pozwala na szybką analizę próbek - analiza trwała mniej niż 300 s. Niewątpliwą zaletą tej metody jest prosta procedura przygotowania próbki, która nie wymaga wstępnego oczyszczania frakcji fenolokwasów i wyodrębniania jej z innych grup związków. Ponadto elektroforeza kapilarna generuje małe ilości odpadów, co jest istotne w przypadku zastosowania tej metody do analiz dużej ilości próbek.

7.2. Spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIR)

Ferrer-Gallego i in. [49] zastosowali spektroskopię NIR do badania składników fenolowych w skórce owoców winogron. Metoda ta wykorzystuje analizę pasm absorcyjnych grup hydroksylowych związków fenolowych w zakresie bliskiej podczerwieni. Jest to bardzo dobra metoda do badania próbek żywności lub też kontroli procesów przemysłowych, gdyż nie wymaga wstępnego przygotowania próbek, co w znacznym stopniu skraca czas analizy.

Tabela 1. Warunki prowadzenia analizy kwasów fenolowych metodą HPLC.

Rodzaj próbki	Warunki przygotowania próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki rozdziatu	Detektor (λ)	Ref.
Wino	Ekstrakcja octanem etylu: - przy pH 7 (usunięcie alkoholu) - przy pH 2 (ekstrakcja fenolokwasów)	MCH 10 C18 (300×4 mm; 5 μ m)	A : CH ₃ OH B: H ₂ O (zakwaszona HClO ₄ do pH 2,5	Rozdział izokratyczny	UV-Vis (280 nm)	[31]
Oliwa	Wstępna hydroliza 2,5% NaOH (v/v), ekstrakcja 80% (v/v) EtOH + 1% pirosiaroczan sodu, pH = 3	Spherisorb ODS C18 (250×4 mm; 2,5 μ m)	A: H ₂ O (zakwaszona H ₃ PO ₄ do pH 2) B: ACN	0 min. 5% ACN 20 min. 25% ACN 40 min. 50% ACN	DAD (200-380 nm)	[32]
Surowce z rodziny <i>Lamiaceae</i>	Ekstrakcja wstępna metanolem, oczyszczanie na SPE (C18), po doprowadzeniu do pH 7,0-7,2 do czyszczenie na SPE (IV rz. gr. amoniowe)	ODS-Hypersil C18 (200×4,6mm; 5 μ m)	CH ₃ OH-CH ₃ COOH-woda (25:1:75, v/v/v)	Rozdział izokratyczny	UV-Vis (254 nm)	[33]
Ziele <i>Viscum album</i>	Ekstrakcja wstępna metanolem, - hydroliza kwasowa (1M HCl) - 15 min. na wrzącej łaźni wodnej - hydroliza zasadowa (1M KOH) - 15 min. na wrzącej łaźni wodnej	LiChrospher C18 (250×4,6mm; 5 μ m)	Woda - CH ₃ CN- H ₃ PO ₄ (85:13,8:1,2, v/v/v)	Rozdział izokratyczny	UV-Vis (320 nm)	[34]
Korzeń <i>Eleuterococcus senticosus</i>	Ekstrakcja wstępna metanolem, próbki przepuszczone przez kolumnę SPE C18, eluat doprowadzono do pH 7,0-7,2 przy pomocy NaHCO ₃ i przepuszczone przez kolumnę SPE z IV rz. gr. amoniowymi, desorpcja analitu 0,2 M H ₃ PO ₄ i CH ₃ OH	1. ODS-Hypersil C18 (200×4,6 mm; 5 μ m) 2. Symmetry C ₁₈ (250×4,6 mm; 5 μ m)	1. CH ₃ OH CH ₃ COOH-woda (23:1:77, v/v/v) 2. CH ₃ OH - 0,001 M H ₃ PO ₄ (23:77, v/v)	Rozdział izokratyczny	UV 254 nm, DAD 254 nm i fluorescencyjny: $\lambda_{wzb.}$ 230nm $\lambda_{em.}$ 350nm	[35]

Tabela 2. Warunki prowadzenia analizy kwasów fenolowych metodą GC.

Rodzaj próbki	Warunki przygotowania próbki i derywatyzacja	Kolumna	Warunki oznaczenia	Detektor	Ref.
Korzeń <i>Panax ginseng</i>	- Ekstrakcja mieszaniną metanol-aceton-woda (7:7:6) w temp. pokojowej, - oczyszczanie na kolumnie SPE C18, - derywatyzacja przy pomocy BASFTA w pirydynie z dodatkiem 1% TMS, - ogrzewanie 15 min w temp. 80°C	DB-5 kolumna kapilarna z metylopolioksilanem (5% grup fenolowych) (30m × 0,25mm, 0,20 μ m) Niepolarna	Temperatura kolumny od 80°C do 260°C (4°C/min), temp. końcowa utrzymywana przez 5 min. Gaz nośny: hel Przeptyw gazu: brak danych Temp. nastrzyku: 260°C	FID	[43]
Liście i korzenie <i>Olea europea</i>	- Ekstrakcja octanem etylu materiału roślinnego uprzednio macerowanego przez 45 min. w gorącym 2 M roztworze HCl - ogrzewanie wysuszonych ekstraktów z dodatkiem BSA w temp. 70°C przez 30 min.	SPB-1 kolumna kapilarna z topioną krzemionką (30m × 0,32 mm, 0,25 μ m) Niepolarna	Temperatura kolumny: 138°C przez 38 min, następnie 1°C/min do 150°C Gaz nośny : hel Przeptyw gazu: 2,8ml/min Temp. nastrzyku: 260°C	FID	[44]
Ziele gatunków z rodzaju <i>Polygonum</i>	- Ogrzewanie przez 30 min w chloroformie, - przesączenie przez kolumnę SPE - C18, - derywatyzacja przy pomocy jodku metylu w DMSO/ KOH.	XTI-5 kolumna kapilarna z krzemionką topioną (30m×0,25mm, 0,25 μ m) Niepolarna	Temperatura kolumny - 140°C utrzymywana przez 2 min, następnie wzrost o 5°C/min do 300°C Gaz nośny: hel Przeptyw gazu: 1ml/min Temp. nastrzyku: 300°C	EI-MS dane zebrane przy m/z 50-650	[45]

7.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Spektroskopię ^1H NMR zastosowano do oznaczania całkowitej ilości składników fenolowych w ekstraktach roślinnych [50]. Badano widma wykonane w DMSO- d_6 , który jest rozpuszczalnikiem aprotycznym o silnych właściwościach wiążących protony. W zarejestrowanych widmach badano rejon 8-14 ppm. Wykazano, że jest to metoda szybka i dokładna (czas analizy ok. 10 min). Ponadto technika ta może być stosowana do analizy złożonych próbek bez ich wstępnego przygotowania.

8. Podsumowanie

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa na temat metod izolacji i identyfikacji kwasów fenolowych można stwierdzić, że kluczowym etapem analizy tej grupy związków jest odpowiednie przygotowanie próbki i wybór właściwej metody izolacji. W niniejszej pracy zaprezentowano różne warianty ekstrakcji, oczyszczania oraz zatężania analitów. Z danych literaturowych wynika, że najczęściej stosowaną do oznaczania fenolokwasów techniką analityczną jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Omówiono optymalizację warunków chromatograficznych m. in.: dobór kolumny, warunków elucji oraz odpowiedniego typu detekcji. Scharakteryzowano również inne metody separacyjne, takie jak chromatografia gazowa (GC), chromatografia cienkowarstwowa (TLC) oraz elektroforeza kapilarna (CE), wykorzystywane w analizie kwasów fenolowych. Połączenie technik chromatograficznych z metodami spektroskopowymi, np. spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopią w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) oraz spektrometrią masową (MS) umożliwia kompleksową analizę, pozwalającą na oznaczenia ilościowe oraz identyfikację badanych związków.

9. Wkaz skrótów i symboli

AA	Kwas askorbinowy (ascorbic acid)
ACN	Acetonitril (acetonitrile)
ASE	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (accelerated solvent extraction)
BSA	N,O-bis-(trimetylosililo)acetamid (N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamide)
BSTFA	N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoro-acetamid (N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
CE	Elektroforeza kapilarna (capillary electrophoresis)
DAD	Detektor z matrycą diodową (diode array detector)
EDTA	Kwas wersenowy (ethylenediaminetetraacetic acid)
EI	Jonizacja elektronami (electron ionization)
ESI	Elektrozpylanie (electrospray ionization)
FID	Detektor płomieniowo - jonizacyjny (flame ionization detector)
GC	Chromatografia gazowa (gas chromatography)
HF-LPME	Kapilarna mikroekstrakcja do fazy ciekłej (hollow fiber liquid phase microextraction)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (high-performance liquid chromatography)
LC	Chromatografia cieczowa (liquid chromatography)
MAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (microwave assisted extraction)
MS	Spektrometria mas (mass spectrometry)

MSPD	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (matrix solid phase dispersion)
MSTFA	N-metylo-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
NIR	Spektroskopia w bliskiej podczerwieni (near-infrared spectroscopy)
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance)
PVP	Poliwinylopirolidon (polyvinylpyrrolidone)
ROS	Reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species)
RNS	Reaktywne formy azotu (reactive nitrogen species)
RP	Odwrócony układ faz (reversed phase)
SLE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (solvent liquid extraction)
SOE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika prowadzona w aparacie Soxhleta (Soxhlet extraction)
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej (solid phase extraction)
SWE	Ekstrakcja wodą w stanie nadkrytycznym (supercritical water extraction)
TFA	Kwas trifluorooctowy (trifluoroacetic acid)
TLC	Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (thin layer chromatography)
TMS	Tetrametylosilan (tetramethylsilane)
UAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (ultrasound assisted extraction)
UPLC	Ultrasprawa chromatografia cieczowa (ultra performance liquid chromatography)

10. Bibliografia

- Kohlmünzer, S. *Farmakognozja*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007.
- Clifford, M.N. Chlorogenic acid and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. food Agric.*, 2000, 80, 1033 - 1042.
- King, A.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1999, 2, 213 - 218.
- Nardini, M.; d'Aquino, M.; Tomassi, G.; Gentil, V.; di felice, M.; Scaccini, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, 19, 541 - 552.
- Lodovici, M.; Guglielmi, F.; Meoni, M.; Dolara, P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem. Toxicol.*, 2001; 39, 1205 - 1210.
- Masella, R.; Vari, R.; d'Archivio, M.; di Benedetto, R.; Matarrese, P.; Malorni, W.; Scazzocchio, B.; Giovannini, C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J. Nutr.*, 2004, 134, 785 - 791.
- Masella, R.; Cantafora, A.; Modesti, D.; Cardilli, A.; Gennaro, L.; Bocca, A.; Coni, E. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep.*, 1999, 4, 113 - 121.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, 20, 933 - 956.
- Rice-Evans, C.A.; Miller N.J.; Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 1997, 2, 152 - 159.
- Lamer-Zarawska, E.; Oszmiański, J. Rola niektórych substancji roślinnych w profilaktyce przeciwnowotworowej. *Wiad. Ziel.*, 1998, 5, 1 - 4.
- Slavin, J.; Marquart, L.; Jacobs, D. Jr. Consumption of whole-grain food and decreased risk of cancer: proposed mechanisms. *Cereal Foods World*, 2000, 45, 54 - 58.

12. Sreejayan, N.; Rao, M.N.A. Nitric oxide scavening by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1997, 49, 105 - 107.
13. Fernández, M.A.; García, M.D.; Sáenz, M.T. Antibacterial activity of the phenolic acid fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J. Ethnopharm.*, 1996, 53, 11 - 14.
14. Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Watari, A.; Kobayashi, M.; Tamesada, M.; Yagi, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33, 983 - 987.
15. Yu-Shan, Y.; Chin-Lin, H., Gow-Chin Y. Anti-inflammatory effects of the roots of *Alpinia pricei* Hayata and its phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7673 - 7680.
16. Robbins, R.J. Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 2866 - 2877.
17. Mišan, A.Č.; Mimica-Dukić, N.M.; Mandić, A.I.; Sakač, M.B.; Milovanović, I.L.; Sedej, I.J. Development of rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Cent. Eur. J. Chem.*, 2011, 9, 133 - 142.
18. Ross, K.A.; Beta, T.; Arntfield, S.D. A comparative study of phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem.*, 2009, 113, 336 - 344.
19. Skalicka-Woźniak, K.; Głowniak, K. Quantitative analysis of phenolic acids in extracts obtained from the fruits of *Peucedanum alsaticum* L. and *Peucedanum cervaria* L. *Lap. Chromatographia*, 2008, 68, 85 - 90.
20. Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Li, X. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.*, 2008, 106, 804 - 810.
21. Štěrbová, D.; Matějčík, D.; Vlček, J.; Kubáň, V. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 513, 435 - 444.
22. Vichapong, J.; Sookserm, M.; Srijesdaruk, V.; Swatsitang, P.; Srijananai, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT-Food Sci. Technol.* 2010, 43, 1325 - 1330.
23. Rangsiwong, P.; Rangkadilok, N.; Satayavivad, J.; Goto, M.; Shotipruk, A. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. *Fruits. Sep. Purif. Technol.*, 2009, 66, 51 - 56.
24. Žiaková, A.; Brandštetrová, E.; Blahová, E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *J. Chromatogr. A*, 2003, 983, 271 - 275.
25. Głowniak, K.; Zagórka, G.; Kozyra, M. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *J. Chromatogr. A*, 1996, 730, 25 - 29.
26. Jaroszyńska, J. Isolation of free phenolic compounds from arboreal leaves by use of the Florosil/C18 system. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 377, 702 - 708.
27. Saraji, M.; Mousavi, F. Use of hollow fibre-based liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection for determination of phenolic acids in fruit juices. *Food Chem.*, 2010, 123, 1310 - 1317.
28. Magalhães, P.J.; Vieira, J.S.; Goncalves, L.M.; Pacheco, J.G.; Guido, L.; Barros, A.A. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 3258 - 3268.
29. Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A.; Isla, M.I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) Straw. *J. Plant Physiol.* 2006, 163, 837 - 846.
30. Iqbal Z., Hiradate S., Araya H., Fujii Y.; Plant growth inhibitory activity of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler and role of phenolic acids and their analogues: a comparative study, *Plant Growth Regul.*, 2004, 43, 245 - 250.
31. Salagoity, A.; Bertrand, M.H. Wine phenolics-analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography, *J. Sci. Food Agric.*, 1984, 35, 1242 - 1247.
32. Brenes-Balbuena, M.; Gracia, P.; Garrido-Fernandez, A. Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1192 - 1196.
33. Zgórká, G.; Głowniak, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 26, 79 - 87.
34. Łuczkiwicz, M.; Cisowski, W.; Kaiser, P.; Ochocka, R.; Piotrowski, A. Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Pol. Pharm.*, 2001, 58, 373 - 377.
35. Zgórká, G.; Dawka, S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, 24, 1065 - 1072.
36. Hung, P.V.; Hatcher, D.W.; Barker, W. Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 2011, 126, 1896 - 1901.
37. Yu, J.; Vasanthan, T.; Temelli, F. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 4352 - 4358.
38. Gioacchin, M.A.; Roda, A.; Gellati, C.G.; Bopccchini, P.; Manetta, C.A.; Baraldini, M. High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of phenolic acids and aldehydes. *J. Chromatogr. A*, 1996, 730, 31 - 37.
39. Rodriguez-Delgado, A.M.; Malovaná, S.; Pérez, P.J.; Borges, T.; Gracia-Montelogo, F.J.; Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A*, 2001, 912, 249 - 257.
40. Chang, Y-X.; Ding, X-P.; Qi, J.; Cao, J.; Kang, L-Y.; Zhu, D-N.; Zhang, B-L.; Yu, B-Y. Determination of phenolic acids in Danshen preparations by LC with chemiluminescence detection. *Chromatographia*, 2009, 69, 319 - 323.
41. Boros, B.; Jakabová, S.; Dörnei, Á.; Horváth, G.; Pluhár, Z.; Kilár, F.; Felinger, A. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 7972 - 7980.
42. Neo, Y-P.; Ariffin, A.; Tan, C-P.; Tan, Y-A. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chem.*, 2010, 122, 353 - 359.
43. Jung, M.Y.; Jeon, B.S.; Bock, J.Y. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids in white and red Korean ginsengs (*Panax ginseng* C.A.Meyer). *Food Chem.*, 2002, 79, 105 - 111.
44. Heimler, D.; Pieroni, A. Capillary gas chromatography of plant tissues and soil phenolic acids. *Chromatographia*, 1994, 38, 475 - 478.
45. Smolarz, D.H. Application of GC-MS method for analysis of phenolic acids and their esters in chloroformic extracts from some taxons of *Polygonum* L. genus. *Chem. Anal.*, 2001, 46, 439 - 444.
46. Kivilompolo, M.; Obürka, V.; Hyötyläinen, T. Comparison of GC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 881 - 887.
47. Sharma, O.P.; Bhat, T.K.; Singh, B. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid, *J. Chromatogr. A*, 1998, 822, 167 - 171.
48. Scampicchio, M.; Wang, J.; Mannio, S.; Chatrathi, M.P. Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1049, 189 - 194.
49. Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2011, 44, 847 - 853.
50. Nerantzaki, A.A.; Tsiafoulis, C.G.; Charisiadis, P.; Kontogianni, V.G.; Gerotheranassis, I.P. Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of ¹H NMR of the -OH spectral region, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 688, 54 - 60.