



УДК 544

Влияние структуры молекул полифенолов - антиоксидантов на чувствительность амперометрического детектирования в ВЭЖХ и инъекционно-проточных системах

Яшин А.Я.

ООО «Интерлаб», Москва

Поступила в редакцию 2.07.2014 г.

Аннотация

В настоящей статье определено влияние структуры молекул полифенолов на чувствительность амперометрического детектирования на примере производных фенола, нафталина, фенольных кислот и флавоноидов (40 соединений). Установлено, что чувствительность амперометрического детектора зависит от числа гидроксильных групп в бензольном кольце, их положения, степени экранирования, а также от природы других заместителей, влияющих на электронную плотность бензольного кольца.

Ключевые слова: ВЭЖХ, структура полифенолов, амперометрический детектор, инъекционно-проточные системы (ИПС)

In present article influence molecules structure of polyphenols on sensitivity is defined at amperometric detection on an example derivatives of phenols, naphthalenes, phenolic acids and flavonoids (40 compounds). It is established, that sensitivity of a amperometric detector it is depend from a number of hydroxyl groups in a benzene ring, their positions, shielding degree, also by nature other substituents influencing electronic density of a benzene ring.

Keywords: HPLC, structure of polyphenols, amperometric detection, flow injection analysis (FIA)

Введение

Полифенолы (в основном, флавоноиды и фенольные кислоты) обладают сильной антиоксидантной активностью [1-3]. Их изучают во многих странах, всего идентифицировано в растениях более 8000 полифенолов [2]. Опубликованы сотни обзоров и книг, более 150 тысяч оригинальных статей, ежегодно проходят в разных странах международные конференции и симпозиумы по полифенолам. Некоторые полифенолы имеют сложное строение, их свойства определяются не только составом, но и структурой. Влияние их структуры на свойства изучены недостаточно.

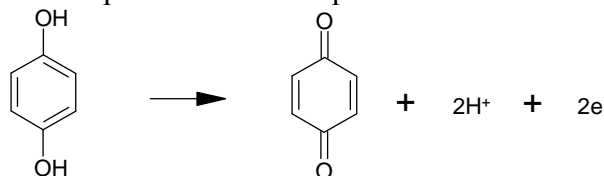
В основном опубликованы исследования по связи структуры полифенолов с их антиоксидантной активностью [4-13]. В частности, ряд работ было опубликовано по связи структуры флавоноидов с их антиоксидантной активностью [4, 5, 7-13], только в единичных работах эти связи были количественными. Согласно этим исследованиям антиоксидантная активность зависела, от числа и положения

гидроксильных групп в молекулах флавоноидов, наличие двух гидроксильных групп в положении орто в бензольном кольце. В молекулы флавоноида, присутствие ненасыщенных связей и наличие оксо-группы в положении 4 кольца С [4].

В работе [7] предложен параметр для оценки антиоксидантной активности, основанный на числе гидроксильных групп и их положении в молекуле флавоноидов. В работе [6] сделана попытка построения количественной модели описания и предсказания антиоксидантной активности молекул флавоноидов и систематизации флавоноидов по их биологической активности. Были получены данные для 36 флавоноидов разных видов (флавононы, флавоны, флаваноны, изофлавоны и др.).

Наиболее фундаментальное исследование проведено в работе [11], в которой методом ТЕАС определена антиоксидантная активность (АА) флавоноидов (более 30) разного строения.

Природные полифенолы-соединения растительного происхождения, они определяются в основном методами хроматографии (ВЭЖХ, ТСХ, ГХ), чаще всего методом ВЭЖХ с УФ, МС и амперометрическим детекторами. Амперометрический детектор наиболее интересен, т. к. он селективен к полифенолам и обладает большой чувствительностью к ним (на уровне $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-12}$ г) [14]. Полифенолы, имеющие гидроксильную группу в бензольном кольце, легко окисляются на рабочем электроде (чаще всего стеклоуглеродном), при этом, как видно из уравнения реакции возрастает электрический ток при постоянном приложенном потенциале:



Используется также и импульсный режим амперометрического детектирования. Рабочий электрод обычно имеет тщательно отполированную поверхность, окисление лучше происходит при более близкой ориентации гидроксильной группы молекул полифенолов к поверхности рабочего электрода. Если гидроксильные группы экранированы или пространственно затруднены контактам объемными заместителями, в основном в орто-положении, то сигналы к ним сильно уменьшаются. Цель настоящей работы - изучение влияния структуры полифенолов на чувствительность амперометрического детектирования на примере большого числа производных фенола, флавоноидов, фенольных кислот и фенольных соединений других классов.

Эксперимент

Измерения проводились на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза» с амперометрическим детектором в обращенно-фазовом варианте с колонками, наполненными сорбентом С18, размер зерен 5 мкм. Определение чувствительности (площади пиков) и построение вольтамперограмм проводилось с помощью инъекционно-проточной системы (ИПС) также с амперометрическим детектором. В этом детекторе в качестве рабочего электрода применялся стеклоуглерод, а в качестве вспомогательного электрода использовался корпус ячейки из нержавеющей стали. Электрод сравнения не использовался. Нами было показано, что такая система работает стабильно без электрода сравнения. Применение электродов сравнения в амперометрическом детекторе для ВЭЖХ создает дополнительные

проблемы (периодическое загрязнение, смещение потенциала при изменении pH и др.). Электрод сравнения (Ag/AgCl или палладиевый) необходимы, чтобы сохранялся установленный потенциал. Это совершенно необходимо для точных электрохимических исследований. При применении амперометрического детектора в ВЭЖХ или в инъекционно-проточных системах важна стабильность показаний во времени, даже если потенциал несколько смещен (обычно на 0,2В). В ВЭЖХ и ИПС перед анализом производится градуировка.

Обсуждение результатов

Несмотря на большой интерес к полифенолам-антиоксидантам, мало публикаций по влиянию структуры их молекул на чувствительность или пределы детектирования. Хотя эти исследования вообще представляют интерес по многим причинам:

- для корреляции связи структуры с биологической активностью полифенолов;
- для исследования и предсказания связи структуры молекул полифенолов с их химической активностью;
- для предсказания связи структуры молекул полифенолов с их антиоксидантной активностью;

Для проведения исследований связи структуры молекул полифенолов на их чувствительность при амперометрическом детектировании были подобраны стандарты фенольных кислот как в чистом виде, так и в виде смесей:

- диокси-и триоксифенолов;
- производных фенола (фтор-, хлор-, бром-, иод-, нитро-, метил- и др.);
- фенольные кислоты(производные бензойной и коричной кислот);
- производные дифенила и нафталина;
- флаванойды (флаванолы и флавонолы)

Оксифенолы. Для исследования были взяты орто- и пара-изомеры диоксибензолов (пирокатехин и гидрохинон), а также триоксифенолы (флороглюцин и пирогаллол). В таблице 1 приведены значения площадей пиков (при одинаковой дозе и концентрации) и относительные сигналы (относительно стандарта кверцетина). Из этой таблицы видно, что площади пиков (чувствительность) сильно зависят от числа гидроксильных групп в бензольном кольце и их расположении. Известно, что гидроксильные группы, находящиеся в орто положении, вступают во внутримолекулярную связь, поэтому их чувствительность уменьшается по сравнению с изомерами, в которых гидроксильные группы находятся в мета- или пара – положении. Пирокатехин (орто-изомер) имеет чувствительность ниже, чем у гидрохинона(пара-изомера). По тем же причинам флороглюцин имеет большую чувствительность, чем пирогаллол.

Производные фенола. Среди этих производных интересно проследить, как влияют разные заместители бензольного кольца на чувствительность.

В амперометрическом детекторе окисляется гидроксильная группа, то есть происходит отрыв атома водорода с освобождением лишнего электрона. На процесс этого окисления влияет электронная плотность бензольного кольца. Разные заместители влияют на электронную плотность по разному: заместители – CH_3 -, C_2H_5 -, $i\text{-C}_3\text{H}_7$ -, C_4H_9 -, NH_2 -, хлор, бром, CH_3O - увеличивают электронную плотность кольца и уменьшают кислотность гидроксильной группы, а заместители – CN -, NO_2 -, CH_2Cl -, OH -, COCH_3 -, COOCH_3 - и др. уменьшают электронную плотность

бензольного кольца и увеличивают кислотность гидроксильной группы.

Таблица 1. Чувствительность (площадь пика) амперометрического детектирования к оксифенолам

№		Структурная формула	Сигнал АД (площадь пика)
1.	Пирокатехин		3260
2.	Гидрохинон		3436
3.	Пирогаллол		4541
4.	Флороглюцин		6339

Это отражается на значениях рКа. Например: рКа динитрофенола равно 3,41. По существу эта кислота, сильнее уксусной кислоты. Поэтому это соединение в растворе будет в диссоциированном состоянии и чувствительность амперометрического детектора будет к нему ниже (рис.1).

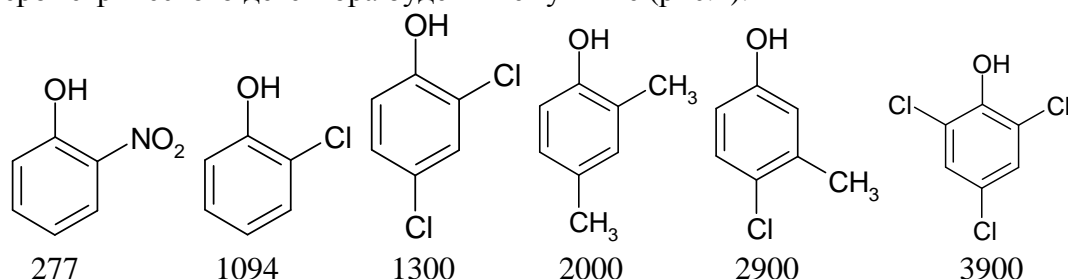


Рис.1 Структурные формулы производных фенола и чувствительность к ним амперометрического детектора (цифры под формулами – площади пиков)

На рис.2 приведены вольтамперограммы некоторых фенольных соединений, т.е. зависимости площади пика при разных приложенных потенциалах. Из этого рисунка видно, что соотношение сигналов при разных прилагаемых потенциалах различные, например, при 0,8; 0,9; 1,0; 1,2 В. Эти соотношения можно использовать для идентификации.

В таблице 2 приведены относительные чувствительности производных фенола. В ряду: 2,4,6-трифторфенол, 2,4,6-трибромфенол, 2,4,6-трийодфенол относительная чувствительность, по-видимому, уменьшается в большей степени за счет возрастания степени экранировки гидроксильной группы (размеры экранирующих заместителей возрастают). Сильное различие чувствительности пентафторфенола и пентабромфенола можно объяснить как экранирующим эффектом, так и влиянием заместителей на электронную плотность бензольного кольца. Очень низкая чувствительность нитропроизводных, как ранее уже сказано, можно объяснить большой диссоциацией гидроксильных групп.

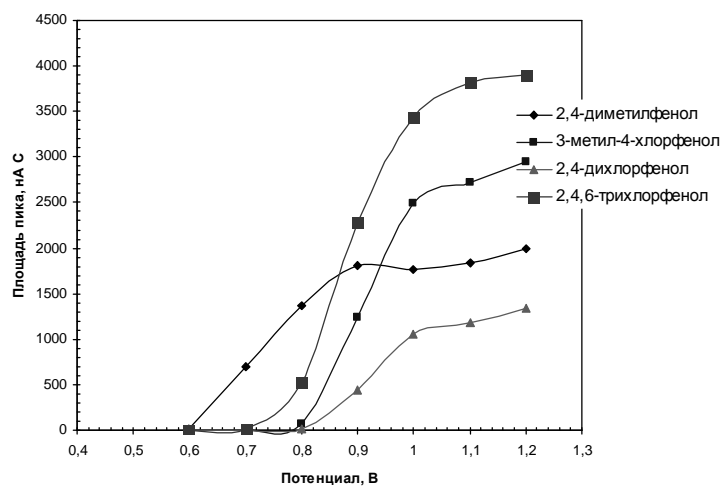


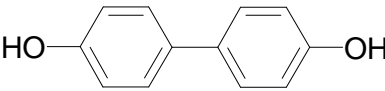
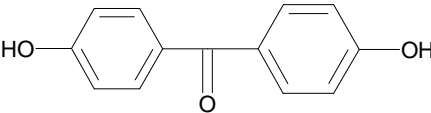
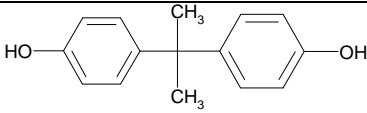
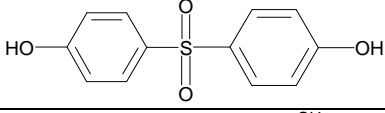
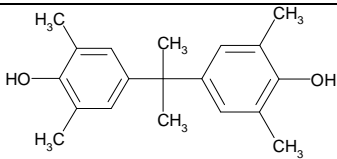
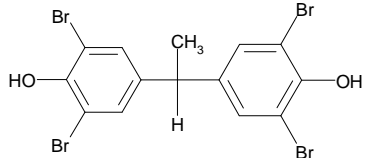
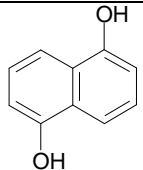
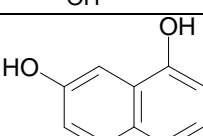
Рис. 2. Вольтамперограммы производных фенола

Таблица 2. Относительная чувствительность производных фенола

	Название	Структурная формула	Относительная чувствительность
1	2,4,6-трифторфенол		389
2	2,4,6-трибромфенол		198
3	2,4,6-трийодфенол		82
4	Пентафторфенол		220
5	Пентабромфенол		6
6	1,3-диокси-2,4,6-нитрофенол (стифниновая кислота)		8
7	2,4,6-тринитрофенол		3

Производные бисфенола и нафталина. Бисфенол (4,4-дигидрокси-2,2-дифенилпропан), дифенилпропан широко используется в качестве отвердителя при производстве пластмасс (эпоксидные смолы, поликарбонатный пластик). Он как сильный антиоксидант применяется в некоторых пластификаторах. Дифенилпропан признан вредным, поэтому его примеси определяют в воде, пищевых продуктах и напитках методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. Уменьшение чувствительности бромпроизводных можно объяснить экранировкой гидроксильных групп. 1,7-Дигидроксиафталин имеет чувствительность почти в 2 раза больше, т.к. гидроксильные группы находятся с одной стороны молекулы и могут обе окисляться (таблица 3).

Таблица 3. Относительная чувствительность производных бисфенола и нафталинов

	Название	Структурная формула	Относительная чувствительность
1	1,4-бисфенол		466
2	4,4'-дигидроксибензофенон		489
3	Дифенилпропан		866
4	Дигидроксифенилсульфон		44
5	4,4'-изопропилиден-бис-(2,6-диметилфенол)		447
6	4,4'-изопропилиден-бис-(2,6-дибромфенол)		67
7	1,5-дигидроксиафталин		866
8	1,7-дигидроксиафталин		1924

Фенольные кислоты. В качестве фенольных кислот-антиоксидантов чаще всего рассматривают производные бензойной и коричной кислот. Они присутствуют во многих пищевых продуктах, в основном, в виде гликозидов. В свободном виде (в виде агликонов) в небольших количествах присутствуют в зерновых и бобовых культурах [15]. Антиоксидантная активность кофе в основном определяется

содержанием хлорогеновых кислот [16]. Нами в работе [17] определено суммарное содержание антиоксидантов в зерновых и бобовых культурах, параметры удерживания и разделение фенольных кислот методом ВЭЖХ приведены в другой работе [18].

На рис. 3 и 4 около структурных формул кислот приведены их относительные чувствительности. Чувствительность зависит как от числа, так и расположения гидроксильных групп. Экранировка гидроксильной группы уменьшает чувствительность. Эти закономерности наблюдаются как для производных бензойных, так и коричневых кислот.

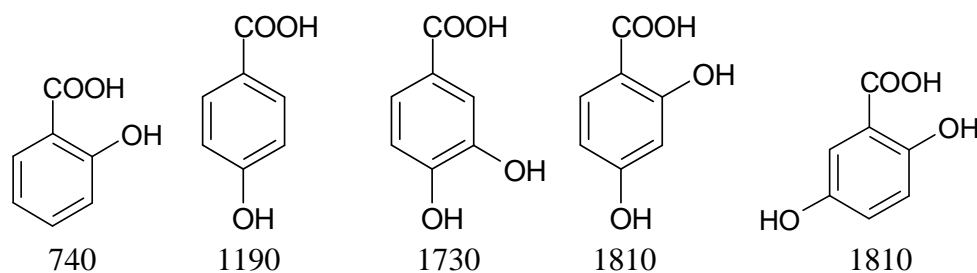


Рис. 3. Структурные формулы бензойных оксикислот и чувствительность к ним амперометрического детектора (цифры под формулами – площади пиков)

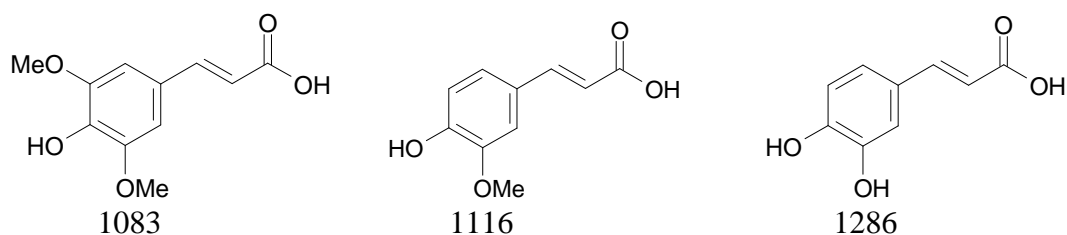


Рис. 4. Структурные формулы коричневых кислот и чувствительность к ним амперометрического детектора (цифры под формулами – площади пиков)

Флавоноиды. Флавоноиды – основная группа природных полифенолов, находящихся в растениях. Растения синтезируют флавоноиды для защиты от вредных воздействий окружающей среды: УФ-облучения, радиации, кислорода, температуры, болезней, инфекций, бактерий.

Флавоноиды, содержащиеся в ягодах, фруктах, овощах, способны защитить человека от свободных радикалов и других реакционных кислородных и азотных соединений. Кроме антиоксидантной активности, флавоноиды обладают и другой биологической активностью: антиканцерогенной, антисклеротической, противовоспалительной, антиаллергической, антигипертонической. К флавоноидам относятся несколько классов: флавононы, флавонолы, флаванолы, флаваноны, антоцианидины и др. Флавоноиды в растениях содержатся в основном в гликолизированной форме, реже в виде агликонов (без сахарных групп). Флавоноиды различаются числом гидроксильных групп и их расположением.

Нами для исследования были взяты самые распространенные флавоноиды: кверцетин (содержится в луке, яблоках, в вине, чае и других продуктах), дигидрокверцетин (содержится в коре лиственницы).

На рис. 5 приведены вольтамперограммы этих флавоноидов. При максимальном потенциале 1,4 В площадь пика (сигнал) наибольшая для кверцетина (8400) и дигидрокверцетина (5000). Эта последовательность объясняется тем, что у дигидрокверцетина в положении 2, 3 отсутствует двойная связь, что делает

гидроксильную группу в положении 3 менее активной.

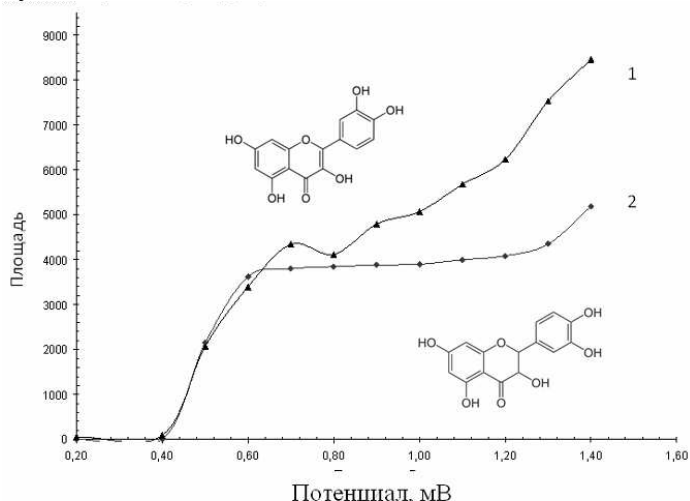
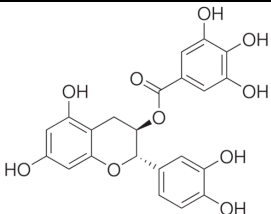
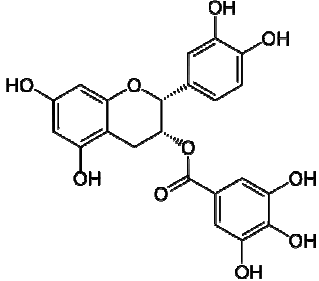
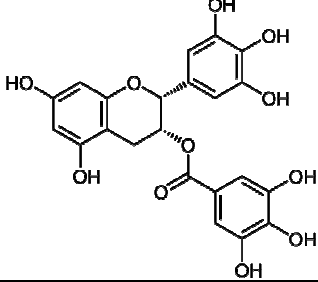


Рис. 5. Вольтамперограммы кверцетина и дигидрокверцетина:
1 – кверцетин, 2 - дигидрокверцетин

Катехины. Катехины - основные полифенолы-антиоксиданты зеленого чая (до 8-12 типов). Некоторые катехины содержатся в красном вине, в какао. Катехины относятся к классу флаванолов. Катехины различаются числом гидроксильных групп в кольце В. В положении 3 гидроксильная группа может быть связана с галловой кислотой (в случае катехингаллата, эпикатехингаллата и эпигаллокатехингаллата). Очевидно, что чувствительность (площадь пика) катехина и эпикатехина ниже, чем у катехинов с присоединенной в положении 3 галловой кислоты, за счет меньшего числа гидроксильных групп (на три группы). Гидроксильная группа в положении 3 кольца С в молекулах катехина и эпикатехина не активна, она не окисляется при используемых потенциалах, т. к. кольцо С не ароматическое (таблица 4).

Таблица 4. Чувствительность (площадь пика) амперометрического детектора к катехинам

1	2	3	4	5
1	(+) Катехин		4	590
2	(-) Эпикатехин		4	560

1	2	3	4	5
3	(-) Катехингаллат		7	710
4	(-) Эпикатехингаллат		7	720
5	(-) Эпигаллокатехингаллат		8	720

Заклучение

Исследования связи чувствительности амперометрического детектирования (АД) со структурой молекулы подтвердили зависимости, установленные ранее с использованием других методов, в частности:

- от числа гидроксильных групп в бензольном кольце;
- от степени экранирования гидроксильных групп другими неактивными функциональными группами в бензольном кольце;
- проявляется так называемый «орто-эффект» двух и более гидроксильных групп или гидроксильной и карбоксильной группами, когда они вступают во внутримолекулярную водородную связь;
- чувствительность АД зависит от природы других заместителей в бензольном кольце, которые могут увеличивать или уменьшать электронную плотность бензольного кольца, в результате чего изменяется окисляемость гидроксильной группы и тем самым влиять на чувствительность определения.

Полученные экспериментальные данные позволяют ориентировочно предсказывать различие чувствительности к полифенольным соединениям разной структуры.

Список литературы

1. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Молекулярная биология флавоноидов. Руководство для врачей. СПб, 2010. 428 с.
2. Andersen O.M., Markham K.R. (editors). Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. – London; New York, 2006. 1212 p.

- 3.Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н., Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино. 2013. 310 с.
- 4.Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Rad. Biol. Med.* 1996. Vol. 20. P. 933-956.
- 5.Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. // *J. Nutr. Biochem.* 2002. Vol. 13. P. 572-584.
- 6.Lien E.J., Ren S.J., Bui H.Y.H., Wang R.B. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. // *Free Rad. Biol. Med.* 1999. Vol. 26. P. 285-297.
- 7.Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Trinajstic N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. // *Croat. Chem. Act.* 2003. Vol. 76. P. 55-61.
- 8.Burda S., Oleszok W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49. P. 2774-2779.
- 9.Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. // *Phytochem.* 2000. Vol. 55. P. 481-504.
10. Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from their Oxidation Potentials. // *Analytical Sciences* 2001. Vol. 17. P. 599-604.
11. Farkas O., Jakus J., Heberger K. Quantitative structure – antioxidant activity relationships of flavonoids compounds // *Molecules.* 2004. Vol. 9. P.1079-1088.
12. Yang J.-G., Liu B.-G., Liang G.-Zh., Ning Zh.-X. Structure – Activity relationship of flavonoids active against hard oil oxidation based on quantum chemical analysis // *Molecules.* 2009. Vol.14. P.46-52.
13. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids // *Phytochemistry.* 2006. Vol.67. P.2058-2070.
14. Яшин А.Я. Применение ВЭЖХ с амперометрическим детектированием в жизненно-важных областях: медицина, анализ пищевых продуктов, экология. // В книге «Хроматография на благо России». Под ред. А.А. Курганова. «Граница». Москва. 2007. с. 390-420.
15. Dykes I., Rooney L.W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits // *Cereal Foods World.* 2007. Vol. 32. P.105-111.
16. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Федина П.А., Черноусова Н.И. Определение природных антиоксидантов в пищевых злаках и бобовых культурах // *Аналитика.* 2012. Т.1. С.32-36.
17. Яшин Я.И., Левин Д.А., Яшин А.Я., Миронов С.А., Осина О.С.. Кофе: подробно и со вкусом. Химический состав кофе и его влияние на здоровье человека. Транслит. Москва. 2011. 232 с.
18. Яшин А.Я. ВЭЖХ фенольных кислот – антиоксидантов с амперометрическим детектированием // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2014. Т. 14. Вып. 3. С.232-240.

Яшин Александр Яковлевич – к.х.н.,
зам.руководителя отдела исследований и
разработок компании «Интерлаб», Москва

Yashin Alexander Ya. – Dr.Sci. (chemistry),
company “Interlab”. Research and Development
group vice manager, Moscow