

УДК 547.563.1:547.814.5:543.5 44.52:543.51

## О МОДЕЛИРОВАНИИ МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ ДИМЕРНЫХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ

© *И.Г. Зенкевич\**, *Т.И. Пушкарева*

*Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии,  
Университетский пр., 26, Санкт-Петербург, 198504 (Россия),  
e-mail: izenkevich@yandex.ru*

Для объяснения образования димерных продуктов, часто обнаруживаемых при окислении природных флавоноидов (в том числе наиболее распространенного из них – кверцетина) даже в разбавленных водных растворах, рассмотрено свободнорадикальное и электрохимическое окисление более простого субстрата – 4-изопропилфенола. Показано, что продукты этих процессов согласуются с промежуточным образованием хинонметидного интермедиата. Образование аналогичных интермедиатов возможно и при окислении флавоноидов. Основным химическим свойством хинонметидов является сопряженное присоединение различных нуклеофильных реагентов, в том числе воды и исходных фенольных соединений, что и объясняет образование димерных продуктов окисления как 4-изопропилфенола, так и флавоноидов.

Для идентификации продуктов окисления 4-изопропилфенола использован метод ВЭЖХ-МС-МС (массовые числа основных сигналов масс-спектров) в сочетании с оценкой факторов гидрофобности и оценкой энергий основных состояний предполагаемых продуктов реакции.

*Ключевые слова:* 4-Изопропилфенол, окисление, димерные продукты, хинонметидные интермедиаты, нуклеофильное присоединение, флавоноиды, кверцетин.

### *Введение*

Одним из основных химических свойств природных флавоноидов является их способность к легкому окислению в водных растворах различными реагентами и в том числе – растворенным кислородом воздуха, что объясняет их высокую антиоксидантную активность [1–3]. К наиболее распространенным и подробно изученным соединениям этого класса относится 3',4',5,7-тетрагидроксифлавонол (кверцетин, **Q**).

Окисление органических соединений молекулярным кислородом (основное состояние – триплет  $^3S_g^-$ ) подчиняется закономерностям свободнорадикальных реакций, первой стадией которых является элиминирование наиболее реакционноспособных атомов водорода (преимущественно при третичных атомах углерода и в  $\alpha$ -положениях к ароматическим системам или гетероатомам) с образованием пероксидных радикалов  $RO_2^\bullet$  [4, 5]:

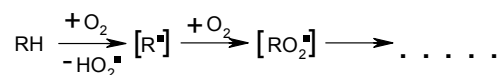


Схема 1.

---

*Зенкевич Игорь Георгиевич* – доктор химических наук, профессор кафедры органической химии, e-mail: izenkevich@yandex.ru  
*Пушкарева Татьяна Ивановна* – аспирант, e-mail: tatyana\_pushkareva93@mail.ru

Известные схемы окисления кверцетина [3, 4] предполагают подобный процесс с участием атома водорода во 2-м положении пиранового фрагмента его таутомерной формы (**Q\***) (отмечен на схеме 2 стрелкой):

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

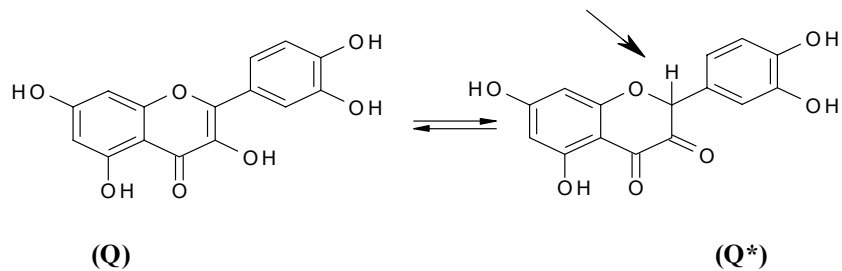
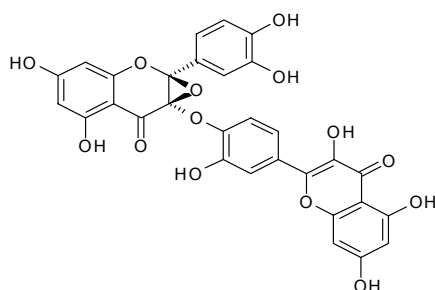


Схема 2.

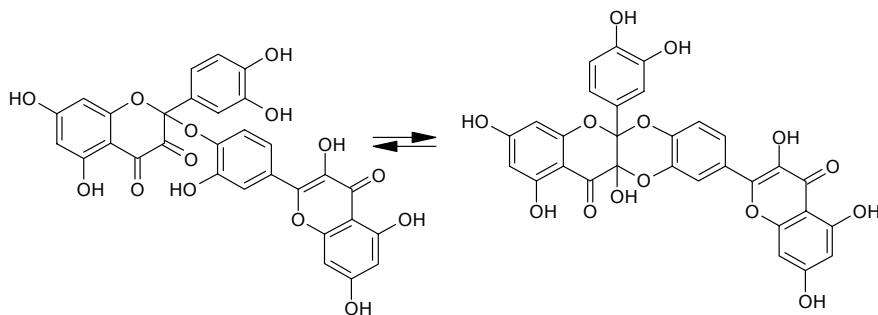
Дальнейшие превращения образующихся промежуточных продуктов окисления **Q** весьма сложны. Систематизация ранее обнаруженных соединений с целью соотнесения их структур с экспериментально регистрируемыми 57 хроматографическими пиками компонентов смеси продуктов окисления **Q** [3] показала, что около половины из них (28) остаются неидентифицированными, а однозначно опознать удается только восемь. Среди продуктов окисления **Q** присутствуют или предполагались нестабильные пероксиды и гидропероксиды, полукетали, гидратные и енольные формы карбонильных соединений, препаративное выделение которых из водных растворов невозможно. Присутствие таких компонентов объясняет высокую лабильность реакционных смесей во времени и несоответствие результатов различных работ между собой. Одной из наиболее интересных особенностей продуктов окисления флавоноидов в водных растворах даже при низких концентрациях оказывается образование димеров с молекулярными массами ( $2M - 2$ ), где  $M$  – молекулярная масса исходного флавоноида (для кверцетина  $2 \times 302 - 2 = 602$  Да), тримеров и более сложных олигомеров [3]. Однако структуры многих из них, и особенно механизмы образования, остаются дискуссионными до настоящего времени.

Строение отдельных димерных продуктов окисления **Q** считают известным. Часто встречающемуся димеру с  $M = 602$  приписывают структуру с 3,4'-сочленением мономерных фрагментов через атом кислорода (**3,4'-O-димер, I**) [6–10]. Ниже изображена структура с (2*S*,3*S*)-конфигурацией хиральных центров, но присутствует и второй энантиомер:



(I)

Димер альтернативного строения получается в результате 2,4'-сочленения мономерных фрагментов через атом кислорода (**2,4'-O-димер, II**). В результате прототропной таутомерии он способен к дальнейшей циклизации с образованием циклического продукта (**II**) (**2,4'-O:3,3'-O-циклодимер**) [9, 11–16]:



(II)

Образование димеров **I** и **II** отмечено в результате как химического (свободнорадикального), так и электрохимического, а также ферментативного (энзиматического) окисления **Q**. Однако известны упоминания димерных продуктов, в молекулах которых сочленение мономерных фрагментов осуществляется за счет образования связей С-С (С-димеры) [10, 13, 17]. Так, их образование предполагали в условиях восстановления флавонов цинком в кислой среде [18]. Несмотря на препаративное выделение димеров и использование спектроскопии ЯМР для установления их строения отмечено, что надежно отличить О-димеры от С-димеров часто оказывается невозможным [10]. Несколько димеров и тримеров обнаружено в составе продуктов окисления **Q** кислородом воздуха в водном растворе (0.1 мг/мл  $\approx$  0.3 мМ/л) при рН = 8 [3]. Изменение состава продуктов такого окисления при варьировании рН водной фазы, отмеченное в работе [19], можно объяснить уменьшением вклада свободнорадикальных процессов (схема 1) при уменьшении рН до  $\sim$ 7, когда образование димерных продуктов **Q** начинает преобладать среди нескольких параллельных процессов.

Цель настоящей работы состоит в попытке объяснения образования димерных продуктов окисления флавоноидов путем моделирования процесса окисления **Q** на примере более простого соединения (4-изопропилфенол).

### Экспериментальная часть

*Приготовление растворов и окисление 4-изопропилфенола (4-IPP) растворенным кислородом воздуха.* Для моделирования окисления 4-изопропилфенола [Sigma-Aldrich, CAS № 99-89-8,  $T_{\text{пл}}$  60–61 °С (лит. 59–61 °С),  $pK_a$  10.25] готовили его растворы с концентрациями 0.77–1.0 мг/мл в смеси водного раствора  $NH_4HCO_3$  (25 мМ, рН $\approx$ 8.5) и ацетонитрила (80 : 20 по объему). После барботирования воздуха через 100 мл раствора со скоростью  $\sim$ 2 л/мин в течение четырех часов при рассеянном люминесцентном освещении и последующего контакта с воздухом в течение суток без перемешивания продуктов окисления **4-IPP** в нем обнаружено не было. Для активизации процесса окисления добавляли водный раствор аммиака (10%) до рН  $\sim$ 10 и дополнительно барботировали воздух в течение часа. Перед анализом образцы раствора подкисляли муравьиной кислотой (приблизительно 0.1%) до рН  $\sim$ 3. Для выявления и исключения сигналов мешающих веществ и обнаружения минорных или нестабильных компонентов варьировали концентрацию 4-изопропилфенола в растворах.

Приготовление образцов и условия окисления кверцетина в водных растворах приведены в работе [3]. Раствор кверцетина в ходе окисления при рН  $\sim$ 10 приобретал красную окраску, которая исчезала с течением времени (более 3 ч), что сопровождалось выпадением осадка.

*Электрохимическое окисление 4-изопропилфенола* проводили в его растворе (50–100 мкг/мл) в смеси водного раствора ацетата аммония (рН $\sim$ 7.4) и ацетонитрила (3 : 1 по объему,) в электрохимической ячейке ROXY (Antec, Лейден, Нидерланды) с допированным бором электродом Magic Diamond при температуре 37 °С и скорости потока 10 мкл/мин. Потенциал электрода варьировали от 2.5 до 3.5 В, контролируя процесс окисления по величине тока. Раствор продуктов окисления перед анализом подкисляли  $HCO_2H$  до ее концентрации в пробе  $\sim$ 0.1%.

Электрохимическое окисление с *on-line* масс-спектрометрическим детектированием продуктов окисления **4-IPP** проводили в режиме сканирующей вольтамперометрии в диапазоне вариаций потенциала  $U$  со скоростью 2 мВ/с а) от 0 до 1.5 В и б) от 1.0 до 4.4 В.

*Хроматографический анализ водных растворов* выполнен на хроматографе Agilent 1290 Infinity с масс-спектрометрическим детектором. *Режим разделения I:* на колонке Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 $\times$ 2.1 мм, размер частиц сорбента 3.5 мкм), с предколонкой, заполненной таким же сорбентом, в режиме градиентного элюирования подвижными фазами А [вода – ацетонитрил – муравьиная кислота, 99 : 1 : 0.1] и Б [вода – ацетонитрил – муравьиная кислота, 10 : 90 : 0.1]. Содержание фазы Б в элюенте линейно увеличивали с 5 до 80% за 20 мин, выдерживали постоянным в течение 2 мин, затем уменьшали до 5% за 1 мин и кондиционировали колонку в течение 2 мин. Расход элюента (рН  $\sim$ 2–3) 0.2 мл/мин. Объем дозируемых проб 10 мкл. Температура термостата колонки 30 °С. *Режим разделения II:* на колонке Acquity UPLC HSS T3 (100 $\times$ 2.1 мм, размер частиц сорбента 1.8 мкм), с предколонкой, заполненной таким же сорбентом, в режиме градиентного элюирования подвижными фазами А [вода – ацетонитрил – муравьиная кислота, 99 : 1 : 0.1] и Б [вода – ацетонитрил – муравьиная кислота, 10 : 90 : 0.1]. Содержание фазы Б в элюенте ли-

нейно увеличивали с 20 до 90% за 20 мин, выдерживали постоянным в течение 4 мин, затем уменьшали до 20% за 1 мин и кондиционировали колонку в течение 2 мин. Расход элюента (pH ~2–3) 0.2 мл/мин. Объем дозируемых проб – 10 мкл. Температура термостата колонки – 30 °С.

*Условия масс-спектрометрического детектирования.* Масс-спектрометрическое определение продуктов окисления кверцетина проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой Bruker amaZON ETD (Германия) с ионизацией электрораспылением в режимах детектирования как положительных, так и отрицательных ионов. Напряжение на капилляре -4.8 кВ, газ-осушитель азот, температура 250 °С, расход 9 л/мин. Диапазон сканируемых масс 70–1000 Да. Детектирование проводили в автоматическом режиме по общему ионному току (AutoMS). Ионы, соответствующие сигналам с относительными интенсивностями более 5%, изолировали для последующей фрагментации, индуцированной соударениями с атомами гелия (энергия соударений 1 эВ) (режим AutoMS/MS). Каждый спектр получен в результате усреднения пяти последовательных сканов.

*Обработка результатов.* Для вычисления линейно-логарифмических индексов удерживания продуктов окисления 4-изопропилфенола в режимах **I** и **II** использованы времена удерживания реперных компонентов: ацетофенона [ $t_R$  = 13.0 мин (**I**), 8.4 мин (**II**)], пропиофенона [15.7 мин (**I**), 11.4 мин (**II**)], бутирофенона [17.9 мин (**I**), 13.7 мин (**II**)]. Для оценки времени удерживания несорбируемого компонента [ $t_0$  = 2.1 мин (**I**), 1.5 мин (**II**)] использовали водный раствор тиомочевины. Вычисление индексов удерживания проводили по программе QBasic.

Значения факторов гидрофобности ( $\log P$ ) для оценки порядка элюирования компонентов вычисляли с использованием программного обеспечения ACD (версия 1994–1996 гг.). Вычисления энергий образования методами ММ+ и АМ-1 выполнены с использованием программного обеспечения HyperChem Pro (версия 6.0).

### Результаты и их обсуждение

Одним из направлений превращений радикальных интермедиатов окисления **Q**, образующихся из его таутомерной формы **Q\*** (Схема 2), считают образование *o*-хинона (***o*-QQ**, схема 3):

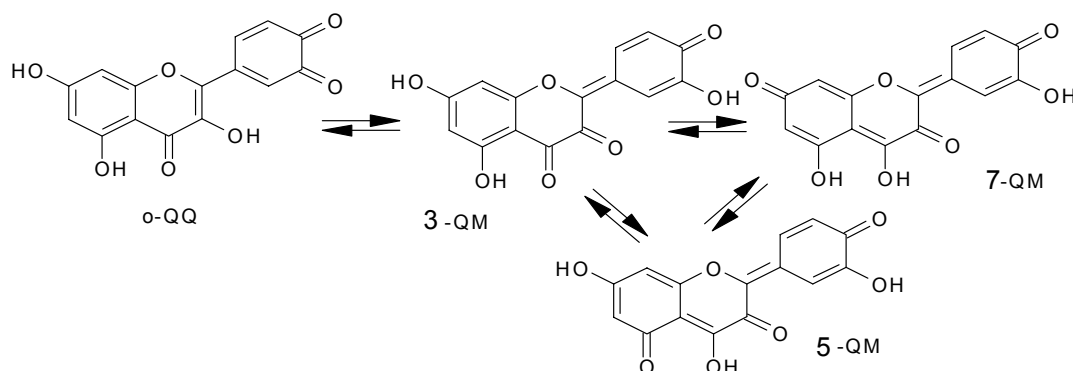


Схема 3.

Образование такого хинона согласуется с появлением интенсивной красной окраски раствора смеси продуктов окисления **Q**, исчезающей с течением времени [3, 4, 7]. В работе [3] отмечено, что УФ-спектр раствора смеси продуктов окисления **Q** соответствует УФ-спектрам хинонов. Такой хинон (***o*-QQ**) может находиться в прототропном равновесии как минимум с тремя таутомерами, имеющими структуры так называемых хинонметидов кверцетина **3** – (**3-QM**), **5** – (**5-QM**) и **7** – (**7-QM**) (Схема 3). Сравнение оценок энергий основных состояний этих хинонметидов методами молекулярной механики (ММ+) и полуэмпирическим методом (АМ-1), приведенное в таблице 1, показывает, что предпочтительной структурой является *o*-хиноновая (***o*-QQ**). Вклады хинонметидных структур несколько меньше, причем среди них преобладает структура 3-хинонметида кверцетина (**3-QM**), энергия которой всего на ~5(АМ-1) – 10(ММ+) кДж/моль превышает значение для *o*-хинона.

Таблица 1. Оценки энергий основных состояний *орто*-хинона (**o-QQ**) и таутомерных хинонметидов (**3-QM**, **5-QM** и **7-QM**) с использованием метода молекулярной механики (ММ+) и полуэмпирического метода (АМ-1)

Структура	Энергия основного состояния, кДж/моль	
	ММ+	АМ-1
<b>o-QQ</b>	<b>25.5</b>	<b>-3568.0</b>
<b>3-QM</b>	<b>35.9</b>	<b>-3562.9</b>
<b>5-QM</b>	41.6	-3547.8
<b>7-QM</b>	39.8	-3543.8

Примечание: жирным шрифтом выделены минимальные значения.

Хинонметидные интермедиаты разнообразнее всего представлены в химии лигнина [20]; их наиболее характерным химическим свойством, так же как их структурных аналогов – хинонов [21, 22], является легкое присоединение нуклеофильных реагентов (так называемое сопряженное нуклеофильное присоединение). Иногда хинонметиды «позиционируют» именно как сшивающие (cross-linking) агенты [23].

Для формирования более наглядных представлений о роли хинонметидов в процессах окисления флавоноидов представляется целесообразным выбрать более простое соединение, способное к образованию хинонметидного интермедиата при окислении кислородом воздуха в водных растворах при pH ~10, а именно 4-изопропилфенол (**4-IPP**,  $M = 136$ ,  $pK_a = 10.25$ ):

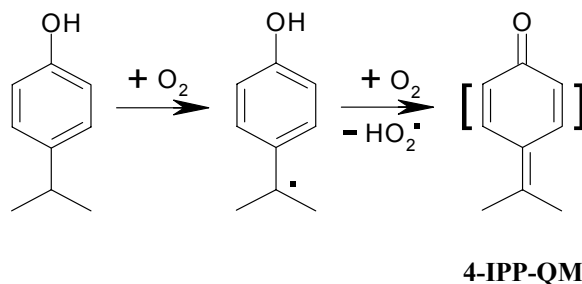


Схема 4.

Сопряженное присоединение нуклеофильных реагентов (NuH) к хинонметидам может протекать в положения 2-, 3- и 5- относительно карбонильной группы, что в случае **4-IPP** должно приводить к следующим продуктам:

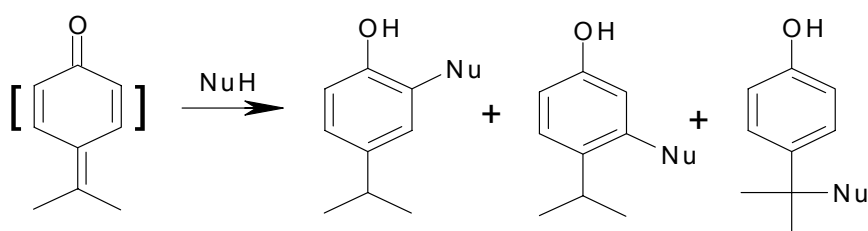


Схема 5.

Водные растворы **4-IPP** содержат два нуклеофильных реагента: воду и исходный 4-изопропилфенол. Присоединение воды к хинонметиду (**4-IPP-QM**) может приводить к изомерным дигидроксиизопропилбензолам и 4-(1-гидрокси-1-метилэтил)фенолу с  $M = 152$  (продукты с такими массами зафиксированы только в условиях электрохимического окисления). Их последующее окисление объясняет появление компонентов с  $M = 150$ . Если же нуклеофильным реагентом является исходный **4-IPP**, то это должно приводить к образованию изомерных 4-изопропил-3-(**4-IPP-A1**), 4-изопропил-2-(4-изопропилфенокси)фенолов (**4-IPP-A2**), а также 4-[1-метил-1-(4-изопропилфенокси)этил]фенола (**4-IPP-A3**) с  $M = 270$ :

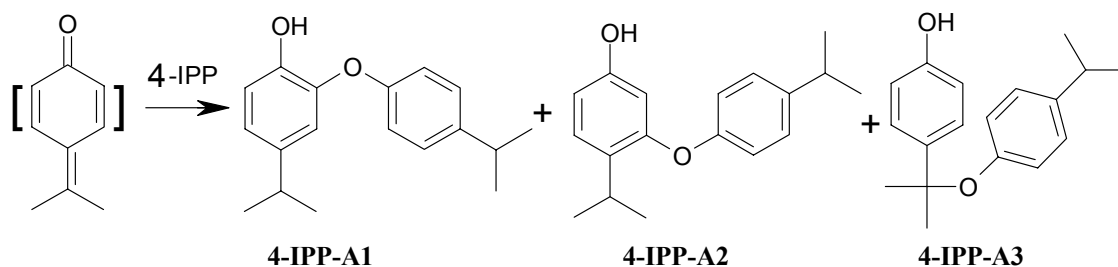


Схема 6.

**Окисление 4-изопропилфенола кислородом воздуха в щелочной среде.** Для обнаружения продуктов окисления **4-IPP** при ионизации электрораспылением использовали режимы детектирования как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. В таблице 2 приложения приведены времена удерживания ( $t_R$ ) основных продуктов окисления **4-IPP** в режимах разделения (**I** и **II**), значения линейно-логарифмических индексов удерживания (**RI**) в режиме (**II**), а также массовые числа ионов  $[M + H]^+$  в режиме регистрации положительных (символ «+») и отрицательных ионов  $[M - H]^-$  (символ «-»). Если в масс-спектрах присутствуют интенсивные сигналы осколочных ионов, их массовые числа указаны дополнительно.

Таблица 2. Компоненты, обнаруживаемые в результате окисления 4-изопропилфенола кислородом воздуха в водном растворе при pH ~10

$t_R$ , мин ( <b>I</b> )	$t_R$ , мин ( <b>II</b> )	RI ( <b>II</b> )	$m/z$ $[M + H]^+$ или $[M - H]^-$ ( $m/z$ фрагментных ионов)	Соединение
1.5	–		(+) 151 (110 $[M + H - C_3H_5]$ , 82)	$C_9H_{12}O - 2H + [O]$
1.7	–		(+) 151 (110 $[M + H - C_3H_5]$ , 82)	$C_9H_{12}O - 2H + [O]$
<b>16.6</b>	<b>12.1</b>	929	(-) 135 (+) 137 (95 $[M + H - C_3H_6]$ , 77)	4-Изопропилфенол ( <i>исходный</i> )
<b>22.7</b>	<b>18.9</b>	1266	(-) 269 (251 $[M - H - H_2O]$ , 225 $[M - H - C_3H_8]$ )	4-Изопропил-3-(4-изопропилфенокси)фенол

Примечание: жирным шрифтом набраны времена удерживания основных компонентов реакционных смесей.

Два гидрофильных компонента со временами удерживания 1.5 и 1.7 мин (режим **I**) с  $M = 150$  принадлежат изомерным продуктам двухстадийного окисления **4-IPP**:  $136(C_9H_{12}O) - 2(2H) + 16([O]) = 150(C_9H_{10}O_2)$  или  $136(C_9H_{12}O) - 2(2H) + 18(H_2O) - 2(2H) = 150(C_9H_{10}O_2)$ . Теоретически для таких продуктов можно предположить три вероятных структуры: *o*-хиноновую и две хинонметидных. Исходный **4-IPP** обнаруживается в обоих режимах хроматографического разделения при регистрации как положительных ( $[M + H]^+$ ), так и отрицательных ( $[M - H]^-$ ) ионов. Появление продуктов окисления отмечено только после барботирования воздуха через растворы с pH ~10. Таким образом, окисление **4-IPP** кислородом воздуха наблюдается лишь при приближении pH раствора к значению  $pK_a$  фенола.

Единственным продуктом окисления **4-IPP** в мягких условиях оказывается гидрофобное соединение с  $t_R$  22.7 (режим **I**) и 18.9 мин (режим **II**), соответствующее димеру с молекулярной массой 270 Да  $[2 \times 136(C_9H_{12}O) - 2]$ , регистрирующееся только при детектировании отрицательно заряженных ионов). Появление такого продукта согласуется со свойствами промежуточного хинонметидна (схема 4), а именно его последующим взаимодействием с исходным фенолом (схема 6). Поскольку в составе продуктов окисления присутствует лишь один из возможных изомеров (схема 5), то уточнение его структуры средствами только хромато-масс-спектрометрического анализа невозможно. Если бы удалось зарегистрировать все изомеры, то их идентификация была бы возможна на основании либо порядка хроматографического элюирования (по увеличению гидрофобности), либо их относительной стабильности (оценки энергий основных состояний), либо обоих критериев в совокупности.

**Электрохимическое окисление 4-изопропилфенола в водных растворах.** Для подробно изученного кверцетина известно, что составы продуктов его свободнорадикального (растворенным кислородом воздуха), ферментативного и электрохимического окисления во многом сходны [4], что предопределяет как возможность их сравнения, так и моделирования процессов окисления. По этой причине в качестве дополнения к свободнорадикальному представляется целесообразным рассмотреть электрохимическое окисление **4-IPP**. Если первичным интермедиатом и в этом случае является соответствующий хинонметид, то схема процесса может быть записана следующим образом:

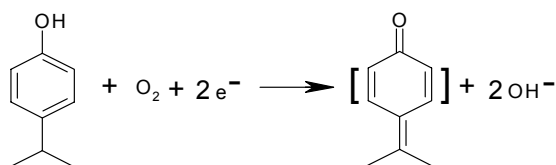


Схема 7.

Фенолы (и, следовательно, природные флавоноиды) относятся к электрохимически активным компонентам, что позволяет применять для их детектирования в ВЭЖХ электрохимические детекторы [24, 25]. При этом, в отличие от химических процессов, степень конверсии анализов можно регулировать, изменяя потенциалы на электродах электрохимической ячейки. Мы использовали ячейку ROXY, специально предназначенную для включения в системы ВЭЖХ-МС, что позволяет детектировать и идентифицировать продукты окисления фактически одновременно с их генерированием [26–29]. Установлено, что потенциалы до 1.5 В не обеспечивают приемлемую степень конверсии **4-IPP**, а их увеличение до 3.0 В позволило зарегистрировать более десятка продуктов окисления.

В таблице 3 приведены времена удерживания продуктов электрохимического окисления **4-IPP** (режим разделения **II**), их индексы удерживания в диапазоне 820–1340, массовые числа ионов  $[M - H]^-$  и других интенсивных сигналов масс-спектров, варианты идентификации и расчетные значения факторов гидрофобности  $\log P$  (программное обеспечение ACD), используемые для контроля последовательности хроматографического элюирования. Для исходного **4-IPP** указано экспериментальное значение  $\log P$ , изомеры охарактеризованы диапазонами вариаций этого параметра.

Невысокая информативность масс-спектров, записанных в условиях электрораспыления с регистрацией отрицательно заряженных ионов, проявляется в том, что наиболее обоснованные предположения о структуре, приближающиеся к их однозначной идентификации, удалось сформулировать для всего четырех соединений. В их числе исходный 4-изопропилфенол ( $t_R$  12.1 мин), продукт присоединения воды к хинонметиду **4-IPP-QM**, которому можно приписать структуру 4-изопропилпирокатехина или 4-изопропилрезорцина ( $M = 152$ ,  $t_R$  9.2 мин)\*, минорный продукт присоединения 4-IPP к хинонметиду – 4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-метилэтил]фенол ( $M = 270$ ,  $t_R$  15.7 мин) и соответствующий главный продукт такого присоединения – 4-изопропил-3-(4-изопропилфенокси)фенол ( $M = 270$ ,  $t_R$  18.9 мин). Все остальные продукты соответствуют более «грубым» уровням групповой идентификации [30] «с точностью» до изомеров с одинаковыми молекулярными массами, в том числе дигидрокси-(4-изопропилфенокси)-изопропилбензолы ( $M=286$ , 3 изомера), дигидрокси-*бис*-(4-изопропилфенокси)изопропилбензолы ( $M = 420$ , 7 изомеров) и другие.

В смеси продуктов электрохимического окисления 4-IPP обнаружены всего два из трех возможных димерных компонентов с  $M = 270$ . Это объясняется либо тем, что третий изомер не образуется, либо тем, что два из них обладают одинаковыми параметрами удерживания в выбранном режиме разделения. Для их идентификации энергии основных состояний изомеров **4-IPP-A1**, **4-IPP-A2** и **4-IPP-A3** (схема 6) были оценены методами MM+ и AM-1 (программное обеспечение HyperChem), а значения их факторов гидрофобности  $\log P$  – с использованием программного обеспечения ACD (табл. 4).

На основании полученных данных можно предположить, что минорный изомер **A3**, как наиболее гидрофильный ( $\log P = 5.1$ ), должен быть первым по порядку элюирования ( $t_R$  15.7 мин, RI = 1097), а наиболее гидрофобный изомер **A1** ( $\log P = 6.3$ ) – последним ( $t_R$  18.9 мин, RI = 1266). Меньшее значение  $E(\text{AM-1})$  этого изомера соответствует его преобладанию в смеси продуктов окисления. Относительно же изомера **A2** можно заметить, что совпадение его параметров удерживания с параметрами удерживания изомера **A1** маловероятно из-за *орто*-эффекта заместителей в положении 2. Например, индекс удерживания (ВЭЖХ) 2-изопропилфенола равен 929 (справочные литературные данные), а 4-изопропилфенола – 978 (настоящая работа). Следовательно, остается признать, что изомер **4-IPP-A2** либо не образуется в сопоставимых с другими изомерами количествах при присоединении исходного фенола к хинонметиду **4-IPP-QM**, либо по сравнению с ними намного быстрее вступает в последующие реакции.

Смесь продуктов электрохимического окисления **4-IPP** (табл. 4) содержит три изомерных дигидрокси-(4-изопропилфенокси)изопропилбензола с  $M = 286$ . Теоретическое число таких изомеров равно шести; регистрация меньшего их числа, как и выше, объясняется либо неодинаковыми вероятностями их образо-

\* Структура 4-изопропилпирокатехина представляется более вероятной, так как обнаружены продукты его дальнейшего окисления и их взаимодействия с исходным 4-IPP.

вания, либо совпадением параметров удерживания. Они могут образовываться в результате присоединения воды к продуктам последующего окисления димеров **A1** и **A2** (но не **A3**, так как этот продукт не содержит атома водорода в заместителе в  $\alpha$ -положении к ароматической системе) и характеризуются значениями  $\log P$  в диапазоне 5.0–5.8. И, наконец, в составе продуктов зафиксированы семь соединений с  $M = 420$ , представляющие собой изомерные дигидрокси-*бис*-(4-изопропилфенокси)изопропилбензолы, образующиеся в результате нескольких циклов «окисление – присоединение нуклеофильных реагентов». Последний зарегистрированный компонент с  $M = 404$  соответствует одному из изомерных 4-изопропил-*бис*-(4-изопропилфенокси)фенолов.

Таблица 3. Аналитическая информация для компонентов, обнаруживаемых в результате электрохимического окисления 4-изопропилфенола в водном растворе при pH ~7.4 (режим разделения II): времена удерживания, индексы удерживания, массовые числа сигналов [M – H] и (в скобках) главных фрагментных ионов в режиме AutoMS/MS (выборочно с интерпретацией), значения  $\log P$

$t_R$ , мин	RI	$m/z$ [M – H] <sup>+</sup> , ( $m/z$ фрагментных ионов)	Соединение	$\log P$
9.2*	822	151 (110 [M – H – C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ], 82)	4-изопропилпирокатехин или 4-изопропил-резорцин**	2.22
12.1	929	135	4-изопропилфенол ( <i>исходный</i> )**	2.90
12.3	937	285 (267 [M – H – H <sub>2</sub> O])	изомер дигидрокси-(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	5.01–5.78
12.8	959	419 (391 [M – H – H <sub>2</sub> O], 373, 347, 305, 221, 203, 187, 139)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
13.4	986	285 (242 [M – H – C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ])	изомер дигидрокси-(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	5.01–5.78
15.7	1097	269 (226 [M – H – C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ])	4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-метилэтил]фенол**	5.09
17.0	1164	285 (267 [M – H – H <sub>2</sub> O], 257, 242, 221)	изомер дигидрокси-(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	5.01–5.78
17.5	1191	419 (401 [M – H – H <sub>2</sub> O], 383, 343)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
18.0	1217	419 (401 [M – H – H <sub>2</sub> O], 383, 203)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
18.9	1266	269 (251 [M – H – H <sub>2</sub> O], 225 [M – H – C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> ])	4-изопропил-3-(4-изопропилфенокси)фенол**	6.33
19.4	1294	419 (401 [M – H – H <sub>2</sub> O], 376, 283)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
20.0	1327	419 (401 [M – H – H <sub>2</sub> O], 376, 283, 265)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
20.2	1339	419 (401 [M – H – H <sub>2</sub> O], 383, 267, 133)	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
21.9	–***	419	изомер дигидрокси- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)изопропилбензола	8.04–8.93
23.6	–***	403 (385 [M – H – H <sub>2</sub> O])	изомер 4-изопропил- <i>бис</i> -(4-изопропил-фенокси)фенола	

Примечания: \*) Курсивом набраны времена удерживания минорных, жирным шрифтом – главных компонентов реакционных смесей; \*\*) Соединения, характеристики которых использованы для вычисления параметров регрессионного уравнения  $RI = a \log P + b$ ; \*\*\*) Времена удерживания двух элюируемых последними компонентами выходят за пределы области линейного градиента (20 мин); изменение режима элюирования делает невозможным вычисление их индексов удерживания.

Таблица 4. Оценки энергий основных состояний продуктов присоединения 4-изопропилфенола к хинонметиду 4-IPP-QM с использованием метода молекулярной механики (ММ+) и полуэмпирического метода (АМ-1) и их факторов гидрофобности ( $\log P$ )

Изомер	4-IPP-A1	4-IPP-A2	4-IPP-A3
$E(\text{ММ}+)$ , кДж/моль	24.6	24.2	4.9
$E(\text{АМ-1})$ , кДж/моль	-4396.1	-4397.6	-4392.7
$\log P$	6.3±0.3	5.9±0.3	5.1±0.2



На рисунке 1 приведена типичная хроматограмма по полному ионному току продуктов электрохимического окисления 4-изопропилфенола, а на рисунке 2(а–д) масс-спектры (ВЭЖХ-МС, электрораспылительная ионизация, режим детектирования отрицательно заряженных ионов) четырех идентифицированных компонентов. Сравнение масс-спектров разных компонентов небезынтересно в отношении степени их искажения фоном прибора и хроматографической колонки. Сигнал исходного 4-изопропилфенола (масс-спектр 2б) соответствует шкале его регистрации  $4 \times 10^5$  усл. ед., при которой количество и интенсивности фоновых сигналов в области  $m/z$  150–500 и более достаточно высоки. Масс-спектр же основного продукта окисления – 4-изопропил-3-(4-изопропилфенокси)фенола (2д) записан на более «грубой» шкале  $2 \times 10^7$  усл. ед., и, в результате, он практически не искажен фоновыми сигналами.

Рис. 1. Типичная хроматограмма по полному ионному току продуктов электрохимического окисления 4-изопропилфенола. Времена удерживания соответствуют данным, представленным в таблице 3. Звездочкой обозначен пик исходного 4-ИРР

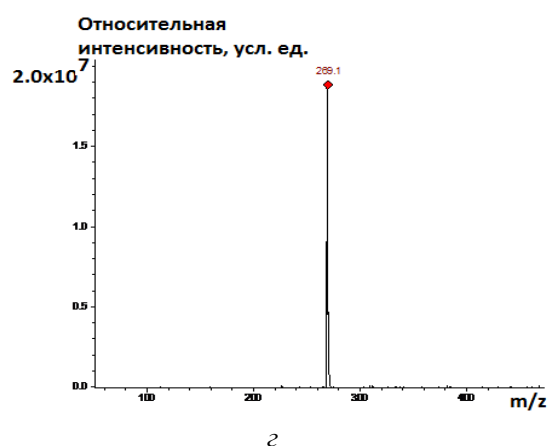
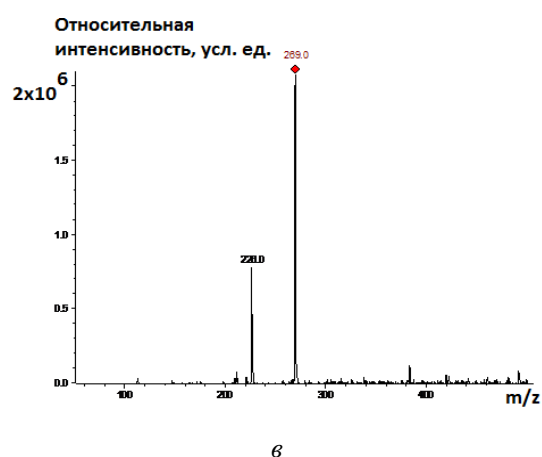
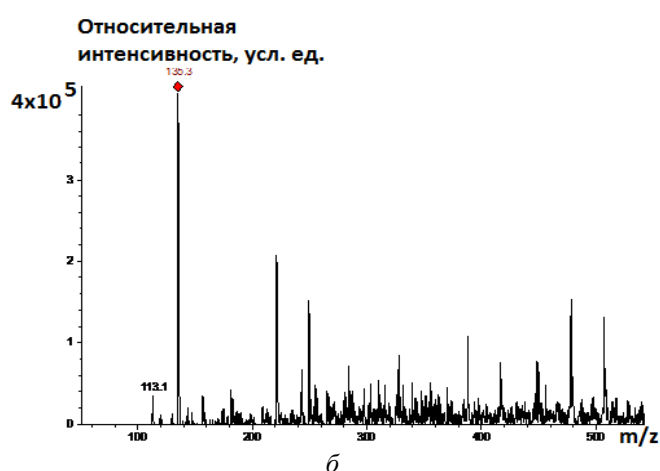
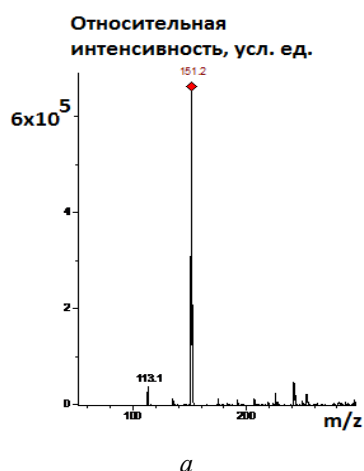
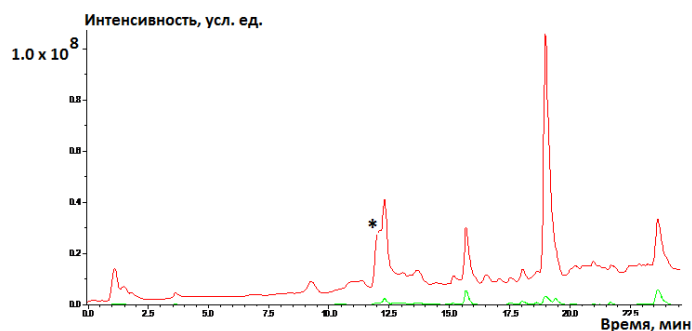


Рис. 2. Масс-спектры в режиме AutoMS/MS основных идентифицированных продуктов электрохимического окисления 4-изопропилфенола: а) 4-изопропилпирокатехин ( $M = 152$ ,  $t_R$  9.2 мин), б) исходного 4-ИРР ( $M = 136$ ,  $t_R$  12.1 мин), в) 4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-метилэтил]фенола ( $M = 270$ ,  $t_R$  15.7 мин) и г) 4-изопропил-3-(4-изопропилфенокси)фенола ( $M = 270$ ,  $t_R$  18.9 мин). Красными ромбиками отмечены сигналы ионов, подвергаемых последующей фрагментации за счет соударений с атомами гелия

Окисление **4-IPP** в режиме сканирующей вольтамперометрии позволяет установить минимальные значения потенциала, при которых наблюдается образование тех или иных продуктов. Это дает возможность оценить последовательность их образования (выявить первичные и вторичные компоненты). Так, образование компонента с  $M = 270$  фиксируется при минимальном значении потенциала  $U = 0.7$  В, вторичных продуктов окисления с  $M = 286$  и  $420$  – начиная с  $U = 0.95$  В, а с  $M = 152$  – при  $U = 1.4$  В. Максимальные количества всех продуктов регистрируются в диапазоне значений потенциала  $U$  от 1.5 до 3.0 В.

Для *проверки* правильности идентификации продуктов окисления целесообразно использовать дополнительные (независимые) критерии, простейшим из которых представляется корреляция экспериментально определенных индексов удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ с параметрами гидрофобности аналитов,  $\log P$ . Поскольку (табл. 3) таких соединений всего четыре [4-изопропилпирокатехин ( $RI = 822$ ,  $\log P = 2.22$ ), исходный 4-изопропилфенол ( $RI = 929$ ,  $\log P = 2.90$ ), 4-изопропил-3-(4-изопропилфеноксифенол) ( $RI = 1266$ ,  $\log P = 6.33$ )] и 4-[1-метил-1-(4-изопропилфеноксифенол)этил]фенол ( $RI = 1097$ ,  $\log P = 5.09$ ], то параметры соответствующего уравнения линейной регрессии вычисляют по четырем точкам. Близкая к линейной зависимость  $RI = a \log P + b$ , (рис. 3) подтверждает правильность идентификации этих соединений. Параметры уравнения линейной регрессии:  $a = 101 \pm 9$ ,  $b = 610 \pm 41$ ,  $r = 0.991$ ,  $S_0 = 30$ .

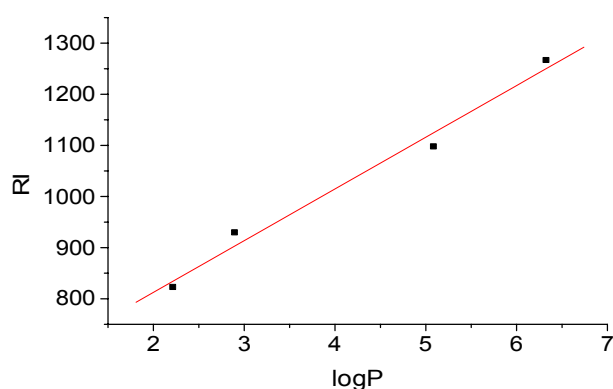


Рис. 3. Зависимость  $RI = a \log P + b$  индексов удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ ( $RI$ ) от параметров гидрофобности ( $\log P$ ) для 4-изопропилфенола и трех идентифицированных продуктов его окисления. Параметры уравнения линейной регрессии:  $a = 101 \pm 9$ ,  $b = 610 \pm 41$ ,  $r = 0.991$ ,  $S_0 = 30$ .

## Выводы

Таким образом, показано, что как свободнорадикальное окисление 4-изопропилфенола в водных растворах растворенным кислородом воздуха, так же как и его электрохимическое окисление в аналогичных условиях приводит к образованию димерных и, в общем случае, олигомерных продуктов, что объясняется промежуточным образованием хинонметидных интермедиатов. Этот же механизм позволяет объяснить образование димеров с массами ( $2M-2$ ) и олигомеров при окислении флавоноидов в водных растворах. Так, образование димера (**II**) может быть представлено следующей схемой, включающей присоединение 4'-гидроксильной группы кверцетина в положение 5 хинонметидного таутомера его окисленной формы (**3-QM**) (схема 8):

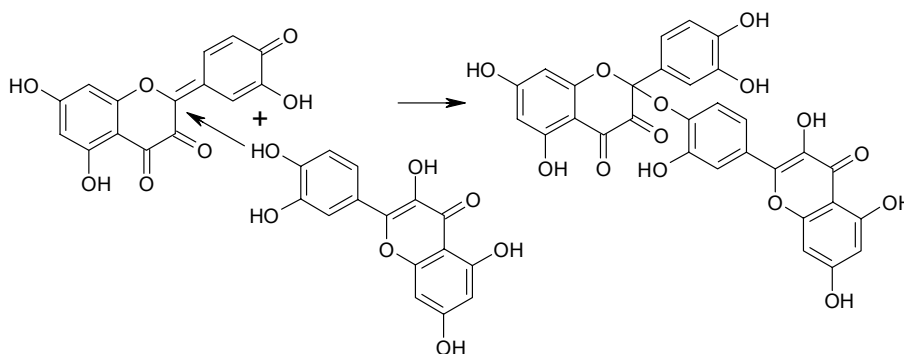


Схема 8.

Авторы благодарят руководство ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России (Санкт-Петербург) за предоставленную возможность использования оборудования для выполнения настоящей работы.

## Список литературы

1. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, 1970. 354 p.
2. Zenkevich I.G., Eschenko A.Yu., Makarova S.V., Vitenberg A.G., Dobryakov Yu.G., Utsal V.A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature // *Molecules*. 2007. Vol. 12. N3. Pp. 654–572.
3. Zenkevich I.G., Пушкарева Т.И. Систематизация результатов хромато-масс-спектрометрической идентификации продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах // *Журнал аналитической химии*. 2017. Т. 72. №10. С. 890–903.
4. Zenkevich I.G., Ищенко Е.В., Макаров В.Г., Макарова М.Н., Селезнева А.И. Новые примеры участия кислорода воздуха в химических реакциях в растворе // *Журнал общей химии*. 2008. Т. 78. №9. С. 1449–1456.
5. Zenkevich I.G., Ищенко Е.В., Макаров А.А., Сончик О.Е. Окисление органических соединений кислородом воздуха в водных растворах. Экохимические и экологические аспекты // *Экологическая химия*. 2010. Т. 19. №1. С. 1–13.
6. Schreier P., Miller E. Studies on flavonol degradation by peroxidase (donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 2 – quercetin // *Food Chem*. 1985. Vol. 18. Pp. 301–317.
7. Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide – glutathione adducts // *Arch. Biochem. Biophys*. 2000. Vol. 378. N2. Pp. 224–233.
8. Chervakovskiy E.M., Bolibrukh D.A., Baranovsky A.V., Vlasova T.M., Kurchenko V.P., Gilep A.A., Usanov S.A. Oxidative modification of quercetin by heme proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. Vol. 342. Pp. 459–464.
9. Osman A., Makris D.P., Kefalas P. Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: an insight into quercetin oxidation mechanism // *Process Biochem*. 2008. Vol. 43. Pp. 861–867.
10. Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.-H. Mechanistic study in the enzymatic oxidation of flavonoids // *Tetrahed. Lett*. 2008. Vol. 49. Pp. 619–623.
11. Krishnamachari V., Levine L.H., Zhou C., Pare P.W. In vitro flavon-3-ol oxidation mediated by a B ring hydroxylation pattern // *Chem. Res. Toxicol*. 2004. Vol. 17. Pp. 795–804.
12. Zhou A., Kikandi S., Sadik O.A. Electrochemical degradation of quercetin: isolation and structural elucidation of the degradation products // *Electrochem. Commun*. 2007. Vol. 9. Pp. 2246–2255.
13. Gazak R., Sedmera P., Marzorati M., Riva S., Kren V. Laccase-mediated dimerization of the flavonolignan silybin // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 2008. Vol. 50. Pp. 87–92.
14. Gulsen A., Makris D.P., Kefalas P. Biomimetic oxidation of quercetin: isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties // *Food Res. Int*. 2007. Vol. 40. Pp. 7–14.
15. Zhou A., Sadik O.A. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study // *J. Agric. Food Chem*. 2008. Vol. 56. Pp. 12081–12091.
16. Pham A., Bortolazzo A., White J.B. Rapid dimerization of quercetin through an oxidative mechanism in the presence of serum albumin decreases its ability to induce cytotoxicity in MDA-MB-231 cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012. Vol. 427. Pp. 415–420.
17. Ramos F.A., Takaishi Y., Shrotori M., Kawaguchi Y., Tsuchiya K., Shibata H., Higuti T., Tadokoro T., Takeuchi M. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin // *J. Agric. Food Chem*. 2006. Vol. 54. Pp. 3551–3557.
18. Bergot B.J., Jurd L.J. Anthocyanins and related compounds – V. Formation of bisflavenylidenes from flavones by reductive dimerization // *Tetraherdon*. 1965. Vol. 21. Pp. 657–661.
19. Гущина С.В., Косман В.М., Zenkevich I.G. Некоторые закономерности окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах // *Вестник СПбГУ. Сер. физ.-хим.* 2009. Вып. 1. С. 96–103.
20. Shevchenko S.M., Apushkinskii A.G. Quinone methides in the chemistry of wood // *Rus. Chem. Rev*. 1992. Vol. 61. N2. Pp. 105–131.
21. Katritzky A.R., Fedoseenko D., Mohapatra P.P., Steel P.J. Reactions of p-benzoquinone with sulfur nucleophiles // *Syntheses*. 2008. N5. Pp. 777–787; Katritzky A.R., Fedoseenko D., Mohapatra P.P., Steel P.J. Reactions of p-benzoquinone with sulfur nucleophiles // *Syntheses*. 2012. Vol. 44. N21. P. 3400.
22. Gulaborski R., Bogeski I., Mirceski V., Saul S., Pasička B., Haeri H.H., Stefova M., Stanoeva J.P., Mitrev S., Hoth M., Kappl R. Hydroxylated derivatives of dimethoxy-1,4-benzoquinone as redox switchable earth-alkaline metal ligands and radical scavengers // *Sci. Rep*. 2013. Vol. 3. Art No. 1865. DOI: 10.1038/srep01865.
23. Freccero M. Quinone methides as alkylating and cross-linking agents // *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2004. Vol. 1. N4. Pp. 403–415.
24. Рубан В.Ф., Похощев Ю.В. Определение изомеров крезоло в водных растворах с использованием микро-ВЭЖХ и двухдетекторной регистрации сигнала // *Журнал аналитической химии*. 2007. Т. 62. №5. С. 515–517.
25. Kochetova M.S., Semenistaya E.N., Larionov O.G., Revina A.A. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques // *Rus. Chem. Rev*. 2007. Vol. 76. N1. Pp. 79–90.
26. Karst U., Lohmann W., Baumann A. Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies and trends // *LC-GC Europe*. 2010. Vol. 23. N1. Pp. 8–16.
27. Faber H., Melles D., Brauckmann C., Wehe C.A., Wentker K., Karst U. Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography)/mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem*. 2011. Vol. 3. N12. Pp. 1291–1296.

28. Faber H., Vogel M., Karst U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies – a review // *Anal. Chim. Acta*. 2014. Vol. 834. Pp. 9–21.
29. Oberacher H., Pitterl F., Erb R., Plattner S. Mass spectrometric methods for monitoring redox processes in electrochemical cells // *Mass Spectrom. Rev.* 2015. Vol. 34. N1. Pp. 64–92.
30. Зенкевич И.Г. Особенности использования дифференциальных характеристик органических соединений для их групповой идентификации // *Журнал общей химии*. 2017. Т. 87, вып. 4. С. 665–676.

*Поступило в редакцию 22 декабря 2017 г.*

*После переработки 12 января 2018 г.*

**Для цитирования:** Зенкевич И.Г., Пушкарева Т.И. О моделировании механизма образования димерных продуктов окисления флавоноидов // *Химия растительного сырья*. 2018. №3. С. 185–197. DOI: 10.14258/jcrpm.2018033589.

*Zenkevich I.G.\**, *Pushkareva T.I.* ON THE MODELING THE FORMATION OF FLAVONOID OXIDATION DIMERIC PRODUCTS

*St. Petersburg State University, Institute for Chemistry, Universitetskii prospect, 26, St. Petersburg, 198504 (Russia), e-mail: izenkevich@yandex.ru*

Dimeric products of the oxidation of flavonoids (including most abundant of them – quercetin) are observed rather often even in the dilute aqueous solutions. For explaining the formation of such products the free-radical and electrochemical oxidation of simpler substrate – 4-isopropyl phenol – is considered. It is shown that the products of these processes correspond with the formation of quinone methide intermediate. The formation of similar intermediates seems to be possible at the oxidation of natural flavonoids. The principal chemical property of quinone methides is conjugated addition of various nucleophilic reagents, including water, as well as the initial phenolic compounds. Just this reaction allows explaining the formation of dimeric oxidation products of both 4-isopropyl phenol and flavonoids.

For identification of 4-isopropyl phenol oxidation products the technique of HPLC-MS-MS (mass numbers of most abundant signals of mass spectra) combined with evaluations of hydrophobicity factors and ground state energies of supposed reaction products were used.

*Keywords:* 4-Isopropyl phenol, oxidation, dimeric products, quinon methide intermediate, nucleophilic addition, flavonoids, quercetin.

---

\* Corresponding author.

## References

1. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York, 1970, 354 p.
2. Zenkevich I.G., Eschenko A.Yu., Makarova S.V., Vitenberg A.G., Dobryakov Yu.G., Utsal V.A. *Molecules*, 2007, vol. 12, no. 3, pp. 654–572.
3. Zenkevich I.G., Pushkareva T.I. *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 2017, vol. 72, no. 10, pp. 890–903. (in Russ.).
4. Zenkevich I.G., Ishchenko E.V., Makarov V.G., Makarova M.N., Selezneva A.I. *Zhurnal obshchei khimii*, 2008, vol. 78, no. 9, pp. 1449–1456. (in Russ.).
5. Zenkevich I.G., Ishchenko E.V., Makarov A.A., Sonchik O.E. *Ekologicheskaiia khimiia*, 2010, vol. 19, no. 1, pp. 1–13. (in Russ.).
6. Schreier P., Miller E. *Food Chem.*, 1985, vol. 18, pp. 301–317.
7. Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, vol. 378, no. 2, pp. 224–233.
8. Cherviakovskiy E.M., Bolibrukh D.A., Baranovsky A.V., Vlasova T.M., Kurchenko V.P., Gilep A.A., Usanov S.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, vol. 342, pp. 459–464.
9. Osman A., Makris D.P., Kefalas P. *Process Biochem.*, 2008, vol. 43, pp. 861–867.
10. Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.-H. *Tetrahedr. Lett.*, 2008, vol. 49, pp. 619–623.
11. Krishnamachari V., Levine L.H., Zhou C., Pare P.W. *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, vol. 17, pp. 795–804.
12. Zhou A., Kikandi S., Sadik O.A. *Electrochem. Commun.*, 2007, vol. 9, pp. 2246–2255.
13. Gazak R., Sedmera P., Marzorati M., Riva S., Kren V. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.*, 2008, vol. 50, pp. 87–92.
14. Gulsen A., Makris D.P., Kefalas P. *Food Res. Int.*, 2007, vol. 40, pp. 7–14.
15. Zhou A., Sadik O.A. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 12081–12091.
16. Pham A., Bortolazzo A., White J.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, vol. 427, pp. 415–420.
17. Ramos F.A., Takaishi Y., Shrotori M., Kawaguchi Y., Tsuchiya K., Shibata H., Higuti T., Tadokoro T., Takeuchi M. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, vol. 54, pp. 3551–3557.
18. Bergot B.J., Jurd L.J. *Tetraherdon*, 1965, vol. 21, pp. 657–661.
19. Gushchina S.V., Kosman V.M., Zenkevich I.G. *Vestnik SPbGU. Ser. fiz.-khim.* 2009, no. 1, pp. 96–103. (in Russ.).
20. Shevchenko S.M., Apushkinskii A.G. *Rus. Chem. Rev.*, 1992, vol. 61, no. 2, pp. 105–131.
21. Katritzky A.R., Fedoseenko D., Mohapatra P.P., Steel P.J. *Syntheses*, 2008, no. 5, pp. 777–787; Katritzky A.R., Fedoseenko D., Mohapatra P.P., Steel P.J. *Syntheses*, 2012, vol. 44, no. 21, p. 3400.
22. Gulaborski R., Bogeski I., Mirceski V., Saul S., Pasička B., Haeri H.H., Stefova M., Stanoeva J.P., Mitrev S., Hoth M., Kappl R. *Sci. Rep.*, 2013, vol. 3, art. no. 1865. DOI: 10.1038/srep01865.
23. Freccero M. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2004, vol. 1, no. 4, pp. 403–415.
24. Ruban V.F., Pokhvoshchev Iu.V. *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 2007, vol. 62, no. 5, pp. 515–517. (in Russ.).
25. Kochetova M.S., Semenistaya E.N., Larionov O.G., Revina A.A. *Rus. Chem. Rev.*, 2007, vol. 76, no. 1, pp. 79–90.
26. Karst U., Lohmann W., Baumann A. *LC-GC Europe*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 8–16.
27. Faber H., Melles D., Brauckmann C., Wehe C.A., Wentker K., Karst U. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, vol. 3, no. 12, pp. 1291–1296.
28. Faber H., Vogel M., Karst U. *Anal. Chim. Acta.*, 2014, vol. 834, pp. 9–21.
29. Oberacher H., Pitterl F., Erb R., Plattner S. *Mass Spectrom. Rev.*, 2015, vol. 34, no. 1, pp. 64–92.
30. Zenkevich I.G. *Zhurnal obshchei khimii*, 2017, vol. 87, no. 4, pp. 665–676. (in Russ.).

Received December 22, 2017

Revised January 12, 2018

**For citing:** Zenkevich I.G., Pushkareva T.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 185–197. (in Russ.).  
DOI: 10.14258/jcprm.2018033589.

