



УДК 539.543.544

Метод структурной аналогии в нестандартной идентификации изомерных фенолов в экстракте эфирного масла монарды дудчатой (*Monarda Fistulosa*)

Яшкин С.Н., Агеева Ю.А.

ФГБОУ ВПО "Самарский государственный технический университет", Самара

Поступила в редакцию 6.08.2012 г.

Аннотация

В работе методом газожидкостной хроматографии на неподвижных фазах Apiezon L и Carbowax 20M выполнен качественный анализ компонентов фенольной фракции экстракта эфирного масла ботанического вида *Monarda Fistulosa L.*, представляющего большой практический интерес в качестве потенциального антибактериального препарата природного происхождения. В рамках решения общей проблемы "структура-хроматографическое удерживание" разработана методика нестандартной идентификации изомерных фенолов, основанная на использовании принципа структурной аналогии. Особое внимание в работе уделено применению топологических характеристик при прогнозировании хроматографических параметров исследованных соединений.

Ключевые слова: газовая хроматография, алкилфенолы, неподвижные жидкие фазы разной полярности, относительное удерживание, топологические индексы, соотношения "структура-удерживание", метод структурной аналогии

The qualitative analysis of components of phenolic fraction in extract of essential oil *Monarda Fistulosa L.*, which is a potential antibacterial preparation of natural origin, was performed by gas-liquid chromatography on the stationary phases Apiezon L and Carbowax 20M. The method of standardless identification of isomeric phenols is developed within the framework of solving the general problem «structure-chromatographic retention». This method is based on the principle of structural analogy. Application of the topological characteristics to predicting the chromatographic parameters for the investigated compounds was emphasized in this work.

Keywords: gas chromatography, alkylphenols, stationary liquid phases of different polarity, relative retention, topological indices, structure-retention relationship, structural analogy method

Введение

Широкое использование антибиотиков и сульфаниламидных препаратов привело к значительному повышению эффективности лечения инфекционных заболеваний. Однако с течением времени выяснилось, что антибиотики обуславливают снижение иммунитета, способствуют возникновению аллергии и т.д. [1]. В связи с этим, поиск новых видов антибактериальных препаратов превратился в настоящее время в одну из актуальных задач фармакологии и медицины [2].

Весьма перспективными с этой точки зрения могут быть биологически активные вещества растительного происхождения, например, эфирные масла некоторых ботанических видов монарды, чабреца, тимьяна и др. [3].

Для оценки чистоты выделяемых компонентов и с целью установления их количества необходимо проводить анализ на каждом этапе процесса получения лекарственных форм из растительного сырья. Эта задача может быть успешно решена с помощью метода газовой хроматографии. В то же время при проведении газохроматографического анализа зачастую возникают трудности, связанные прежде всего с отсутствием необходимых веществ сравнения на этапе качественного определения. Для решения этой проблемы перспективным является метод нестандартной идентификации, основанный на построении количественных зависимостей "структура-хроматографическое удерживание" [4-5].

Главной предпосылкой самой возможности применения корреляционных соотношений для предсказания хроматографических характеристик по структурным и физико-химическим константам органических соединений служит наличие строгих математических зависимостей между различными молекулярными дескрипторами веществ [6]. Особая роль в подобных исследованиях принадлежит химической теории графов, позволяющей переводить молекулярные параметры соединений в единые характеристические структурные дескрипторы, выраженные численными индексами. Подобная форма представления структуры соединения оказывается очень удобной для построения корреляционных зависимостей "структура - хроматографическое удерживание", что открывает широкие возможности использования математических методов для прогнозирования свойств малоизученных и гипотетических соединений.

Целью настоящей работы было определение качественного состава экстракта эфирного масла *монарды дудчатой* (*Monarda fistulosa* L.) методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) без использования стандартных веществ сравнения. Кроме того, представляло интерес исследование влияния молекулярной структуры изученных производных фенола на их хроматографические свойства.

Эксперимент

На рис. 1. приведены структурные формулы изученных соединений.

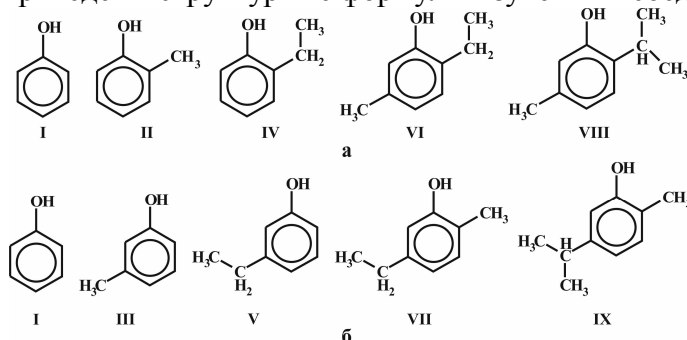


Рис.1. Ряды структурных аналогов тимола (а) и карвакрола (б)

Экспериментальная часть включала два основных этапа: стадию пробоподготовки (приготовление экстракта) и стадию хроматографического анализа.

Стадия отгонки эфирных масел из растительного сырья представляла собой перегонку с водяным паром по стандартной методике, взятой из литературы [7]. Для отгонки эфирного масла из растительного сырья монарды (РСМ) применяли аппарат

для перегонки [8], усовершенствованный в работе таким образом, чтобы при минимальной площади рабочей поверхности обеспечить высокий теплообмен и уменьшить потери эфирного масла при перегонке.

Стадия выделения эфирных масел заключалась в следующем: 2-5 г РСМ помещали в колбу емкостью 500 мл и заливали 100-150 мл дистиллированной воды. Колбу присоединяли к аппарату, в приемник которого до максимального уровня наливали воду и 0.2-0.5 мл *n*-гексана. При перегонке пары воды и эфирного масла конденсировались в холодильнике и конденсат стекал в приемник. За счет большого различия (на 4-5 порядков) в растворимости компонентов эфирного масла в воде и *n*-гексане они практически полностью поглощались фазой неполярного растворителя (*n*-гексана), а вода возвращалась в колбу с навеской РСМ. Отгонку эфирного масла проводили в течении 45 мин при 210°C в изотермическом режиме. Полученное эфирное масло непосредственно подвергалось хроматографическому анализу.

Качественное определение содержания основных компонентов фенольной фракции эфирного масла *монарды дудчатой*, ответственных за проявляемый фармакологический эффект, тимола (2-изопропил-5-метилфенол) и карвакрола (5-изопропил-2-метилфенол) [9], проводили методом ГЖХ на хроматографе "Цвет 100М" с пламенно-ионизационным детектором. Газом-носителем служил гелий при расходе 25 мл/мин. Для разделения применяли стальные насадочные колонки размером 2 м × 3 мм, заполненные Хроматоном N-AW зернением 0.125-0.160 мм, отмытым HCl и содержащем 15% неподвижных жидких фаз (НЖФ) разной полярности. В качестве неполярной НЖФ использовали Apiezon L (*Chemapol, Prague, Czech Republic*), а в качестве полярной НФ - Carbowax 20M (*Chemapol, Prague, Czech Republic*). Температура колонки составляла 200°C, испарителя - 240°C. Работа проводилась в изотермическом режиме. Объем вводимых проб равнялся 1 мкл. Хроматографирование исследованных в работе алкилфенолов - структурных аналогов тимола и карвакрола - проводили из спиртовых растворов в аналогичных условиях. Относительные времена удерживания рассчитывали по методу [10], с использованием времени удерживания фенола в качестве стандартного вещества. Основные физико-химические параметры, а также полученные в работе хроматографические характеристики исследованных в работе соединений приведены в табл. 1.

Таблица 1. Физико-химические характеристики и параметры удерживания тимола, карвакрола и их структурных аналогов на НЖФ Apiezon L (Ap-L)

Соединение	$T_{\text{кип.}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{пл.}}, ^\circ\text{C}$	V_M, A^{3a}	$r_{i/st}^b$	
				I ^b	II ^c
Фенол (I)	181.8	40.9	35.25	1.00	1.00
2-Метил- ^d (II)	191.0	30.9	40.26	1.48	1.50
3-Метил- ^e (III)	202.2	11.5	40.44	1.66	1.65
2-Этил- [*] (IV)	207.0	18.0	45.30	2.21	2.20
3-Этил- ^{**} (V)	214.0	4.0	45.54	2.48	2.50
2-Метил-5-этил- ^{**} (VI)	227.7	–	50.23	–	3.60
5-Метил-2-этил- [*] (VII)	224.2	–	50.43	–	3.20
Тимол [*] (VIII)	232.0	51.5	54.68	4.22	4.20
Карвакрол ^{**} (IX)	236.5	3.5	54.64	4.54	4.55

Примечание: ^aрассчитано по методу РМЗ с полной оптимизацией геометрии; ^bстандарт – фенол; ^cданные работы [11]; ^dданные настоящей работы; ^eсоединения, относящиеся к структурной группе тимола; ^{*}соединения, относящиеся к структурной группе карвакрола

Расчет топологических характеристик изученных соединений проводили по стандартной методике, подробно описанной в литературе [4-6]. Полученные значения топологических индексов Винера (W) и Рэндиша разных порядков (${}^n\chi_p$) приведены в табл. 2.

Таблица 2. Топологические индексы Винера (W) и Рэндиша разных порядков (${}^n\chi_p$) исследованных в работе алкилфенолов

Соединение	W	${}^n\chi_p$						
		${}^0\chi_p$	${}^1\chi_p$	${}^2\chi_p$	${}^3\chi_p$	${}^4\chi_p$	${}^5\chi_p$	${}^6\chi_p$
Фенол	58.56	3.8340	2.1343	1.3355	0.7562	0.4290	0.2421	0.0287
2-Метилфенол	84.56	4.7566	2.5510	1.7865	1.1155	0.5634	0.3167	0.0804
3-Метилфенол	85.96	4.7566	2.5450	1.8390	1.0017	0.6280	0.3059	0.0804
2-Этилфенол	122.88	5.4637	3.1116	1.9823	1.3725	0.8098	0.4133	0.1374
3-Этилфенол	125.68	5.4637	3.1056	1.9244	1.3188	0.7764	0.4504	0.1322
2-Метил-5-этилфенол	167.70	6.3864	3.5223	2.4744	1.6818	0.8749	0.6174	0.2857
5-Метил-2-этилфенол	166.30	6.3864	3.5223	2.4860	1.6217	0.9729	0.5512	0.2439
Тимол	216.48	7.2566	3.9050	3.2170	1.8079	1.1419	0.5890	0.3993
Карвакрол	219.28	7.2566	3.9050	2.9506	1.8999	0.9855	0.6663	0.3839

Обсуждение результатов

В табл. 1 приведены экспериментально определенные на НФ Apiezon L значения относительного удерживания ($r_{i/st}$). Полученные экспериментальные данные $r_{i/st}$ хорошо согласуются с приведенными в литературе [11] (табл.1). Идентификацию карвакрола в работе проводили с помощью вещества сравнения (98%, Aldrich) по совпадению в пределах погрешности газохроматографического эксперимента значений относительного удерживания. Идентификацию тимола - с помощью нестандартного метода, основанного на использовании сорбционно-структурных корреляций.

Задача идентификации полученных в работе пиков фенольной фракции эфирного масла *монарды дудчатой* в отсутствие веществ сравнения решалась путем построения корреляций "структура - удерживание". В качестве коррелируемых структурных параметров были использованы топологические индексы Винера (W) и Рэндиша (${}^n\chi_p$), различные физико-химические характеристики и относительное удерживание фенольных компонентов ($r_{i/st}$).

Среди известных методов нестандартной идентификации [4-5] широко распространенным является метод "структурной аналогии", позволяющий оценивать физико-химические свойства (в том числе и хроматографическое поведение) изучаемых соединений по соответствующим свойствам их структурных аналогов [12]. На неполярной НЖФ удается достичь удовлетворительного разделения изомерных тимола и карвакрола. Поэтому наиболее предпочтительным является построение такой выборки структурных аналогов, в рамках которой происходило бы монотонное изменение неполярного фрагмента молекулы, определяющего в данных условиях хроматографическое удерживание (в нашем случае ароматический фрагмент). В качестве опорного соединения при построении рядов структурных аналогов был использован фенол. Таким образом, проблема построения адекватной выборки структурных аналогов в рядах фенол-тимол и фенол-карвакрол

заключалась в правильном подборе недостающих молекулярных структур при переходе от опорной молекулы (фенола) к исследуемому соединению (тимолу или карвакролу).

Детальный анализ строения неполярного фрагмента в молекуле тимола указывает на то, что заместитель в 2-положении ароматического кольца (изопропильный радикал) оказывает значительно большее влияние на спектр проявляемых молекулой физико-химических характеристик, по сравнению с небольшой CH_3 -группой в 5-положении. Очевидно, что при построении ряда аналогов тимола, необходимо соблюдение двух основных требований к молекулярной структуре аналога: 1) наличие гидроксильной группы в молекуле, обуславливающей принадлежность рассматриваемого соединения к данному классу соединений (фенолы); 2) доминирование (размер и форма) алкильного заместителя в 2-положении ароматического кольца относительно заместителя в положении 5. Введение заместителей в другие положения ароматической системы представляется нецелесообразным, поскольку в исследуемой молекуле тимола эти положения не содержат заместителей. Основываясь на сформулированных выше требованиях к структурным аналогам, алгоритм "построения" молекулярной структуры тимола из структуры фенола состоит в постепенном введении в молекулу фенола CH_2 -групп, с учетом структурного "доминирования" положения 2 над положением 5 ароматического кольца. Таким образом, для молекулы тимола был составлен следующий ряд структурных аналогов: фенол – 2-метилфенол – 2-этилфенол – 5-метил-2-этилфенол – 2-изопропил-5-метилфенол (тимол). Основываясь на совершенно аналогичных рассуждениях, был составлен ряд структурных аналогов для карвакрола: фенол - 3-метилфенол - 3-этилфенол - 2-метил-5-этилфенол - 5-изопропил 2-метилфенол (карвакрол) (рис.1). Находясь в рамках отдельного ряда структурных аналогов, видно, что молекулярная структура всех его представителей "претерпевает" аналогичные изменения при усложнении строения ароматического кольца (доминирование одинаковых положений ароматического кольца (размер и форма алкильного заместителя) при сохранении функциональной принадлежности к одному классу веществ - фенолы). Очевидно, что однотипное изменение молекулярного строения соединений вызывает симбатное изменение спектра их физико-химических свойств, в частности, хроматографического удерживания. Таким образом, структурные ряды для двух изомерных соединений (тимол и карвакрол) оказываются совершенно различными, что позволяет для изучения свойств данных соединений получить независимые корреляции "структура - удерживание".

Известно, что удерживание на неполярных НФ определяется размером, поляризуемостью и формой молекулы сорбата. Среди известных физико-химических свойств, в полной мере отражающих способность молекулы вступать в неспецифические взаимодействия с НФ, следует отметить температуру кипения, поляризуемость, молекулярный объём, а также некоторые топологические характеристики [13]. На рис .2 приведены графики полученных в работе корреляционных зависимостей, связывающих значения относительного удерживания с физико-химическими свойствами и топологическими параметрами для рассмотренных выше рядов структурных аналогов. Из представленных графиков зависимостей видно, что достаточно характеристичными являются зависимость $r_{i/st}$

от молекулярного объема (V_M) и топологических индексов ($W, \sum_{i=1}^6 \chi_p$ - суммарный топологический индекс 0–6-порядков). Если в случае коррелируемого параметра

рассматривать температуру кипения ($T_{\text{кип}}$) и обычные индексы Рэндиша, то зависимости $r_{i/st}=a \cdot X + b$ (где X – свойство, a, b – константы) для рассмотренных рядов структурных аналогов оказываются практически идентичными и ценности для прогноза величин $r_{i/st}$ не представляют. На преимущество использования составных индексов Рэндиша (в частности, $\sum_{i=1}^6 \chi_p$) при построении сорбционно-структурных корреляций уже указывалось нами ранее при исследовании хроматографических свойств близких по строению и свойствам производных адамантана [14].

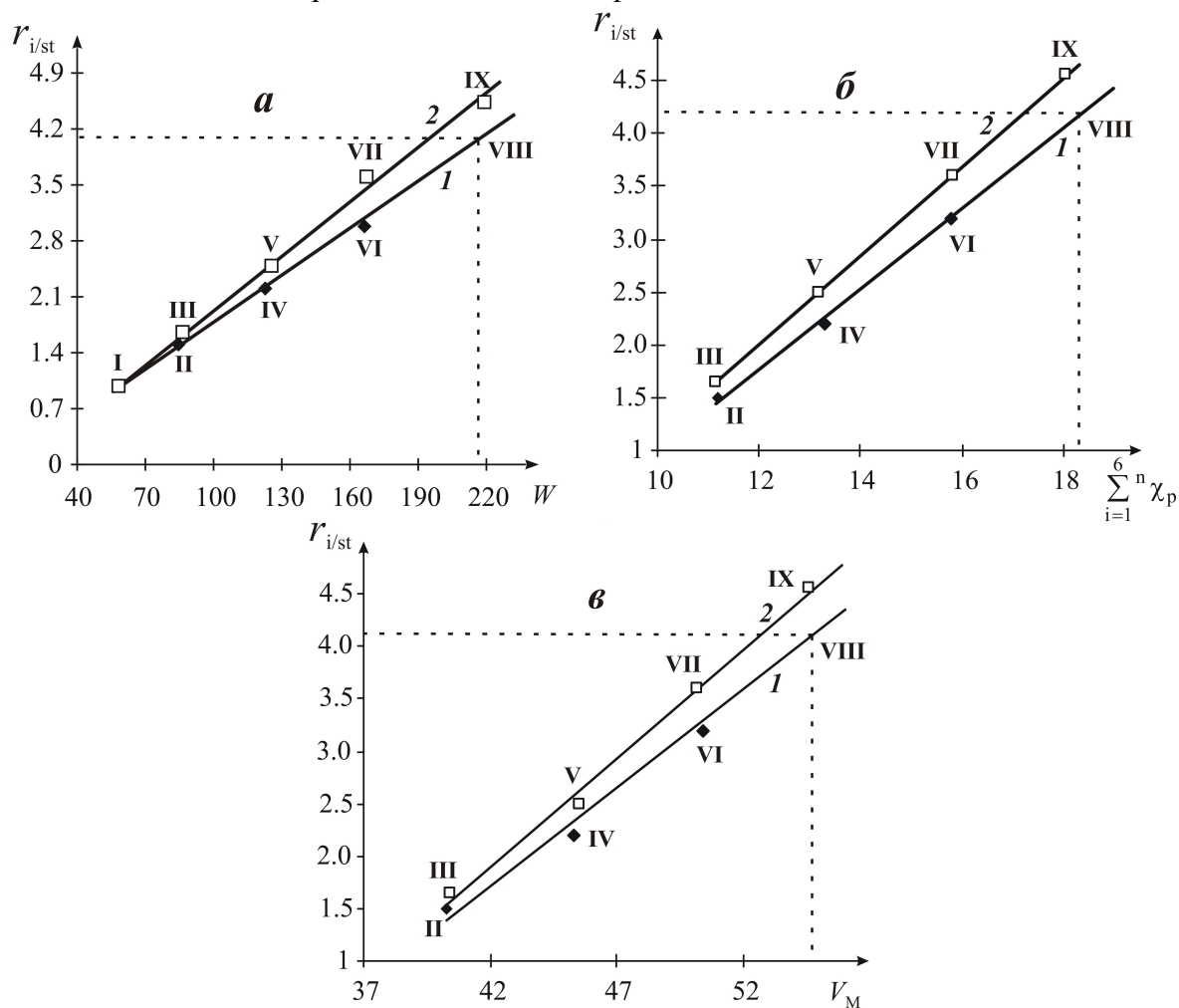


Рис. 2. Зависимости величин относительного удерживания ($r_{i/st}$) от значений W (а), $\sum_{i=1}^6 \chi_p$ (б) и V_M (в) в соответствующих рядах структурных аналогов тимола (1) и карвакрола (2)

В табл. 3 приведены параметры некоторых корреляционных соотношений, использованных для прогнозирования величины $r_{i/st}$ для молекул тимола и карвакрола на НЖФ Ariezon L, а также экспериментальные и теоретически рассчитанные значения $r_{i/st}$ для молекул тимола и карвакрола.

Из полученных данных можно сделать однозначный вывод о том, что тимол на НЖФ Ariezon L элюируется раньше карвакрола.

Хроматографическое поведение карвакрола и тимола на неподвижных фазах различной полярности в значительной степени определяется наличием в их

молекулах двух основных фрагментов: полярной ОН-группы и слабополярного ароматического кольца. В зависимости от природы НФ основной вклад в удерживание сорбатов будет вносить та или другая часть молекулярной структуры.

Таблица 3. Параметры корреляционных зависимостей $r_{i/st}=a \cdot X + b$ (где X – свойство), а также экспериментальные и теоретически рассчитанные значения $r_{i/st}$ для молекул тимолола и карвакрола

Параметр	a	b	R ²	r _{i/st} (теор.)	r _{i/st} (эксп.)
структурные аналоги тимолола					
W	-0.2844	0.0207	0.999	4.20	4.20±0.10
$\sum_{i=1}^6 \chi_p$	-2.8006	0.3808	0.999	4.17	
V _M	-6.1554	0.1873	0.988	4.09	
структурные аналоги карвакрола					
W	-0.2328	0.0221	0.995	4.61	4.55±0.10
$\sum_{i=1}^6 \chi_p$	-3.0333	0.4197	0.999	4.54	
V _M	-6.7935	0.2068	0.995	4.51	

На неполярной НЖФ (Apiezon L) характер межмолекулярного взаимодействия в системе "сорбат - сорбент" будет определять ароматический углеводородный фрагмент. Несмотря на близкие физико-химические, структурные и топологические характеристики изомерных карвакрола и тимолола, на использованной насадочной колонке удаётся достичь их полное разделение. Порядок элюирования фенольных компонентов на неполярной НФ объясняется соотношением температур кипения (233.5°C - для тимолола и 238°C - для карвакрола) и молекулярных поляризуемостей (18.77 Å³ и 18.98 Å³, соответственно) этих веществ. Таким образом, менее поляризуемый и нижекипящий тимол элюируется раньше, чем более поляризуемый и высококипящий карвакрол. Подобный порядок выхода из колонки является обычным при использовании неполярных НФ для разделения структурных изомеров [15].

На полярной НЖФ (Carbowax 20M) основной вклад в хроматографическое удерживание изомеров будет вносить гидроксильная группа, функция же ароматического фрагмента молекулы, вероятно, заключается в стерическом экранировании гидроксильной группы сорбата при его взаимодействии с полярными участками НЖФ. При этом введение в положение 2 ароматического кольца изопропильного радикала, значительно превышающего по размеру метильную группу, приводит к более значительным пространственным затруднениям при взаимодействии ОН-группы с НЖФ. В литературе [16-17] имеются также сведения о возможном внутримолекулярном взаимодействии между атомами кислорода в ОН-группе и атомами водорода изопропильного радикала, находящегося в *орто*-положении (*орто*-эффект). Все перечисленные выше факторы должны, очевидно, приводить к ослаблению специфического взаимодействия ОН-группы тимолола с полярной НЖФ по сравнению с аналогичным взаимодействием у карвакрола. Следствием возникающих взаимодействий является то, что на полярной НЖФ тимол элюируется раньше, чем карвакрол. Необходимо отметить, что на полярной НЖФ степень разделения изомерных тимолола и карвакрола значительно ниже, чем на

неполярной НФ, в результате чего более предпочтительной для осуществления хроматографического анализа является НЖФ Ariezon L. Подтверждением сделанному выводу являются приведенные на рис. 3 хроматограммы разделения тимола и карвакрола.

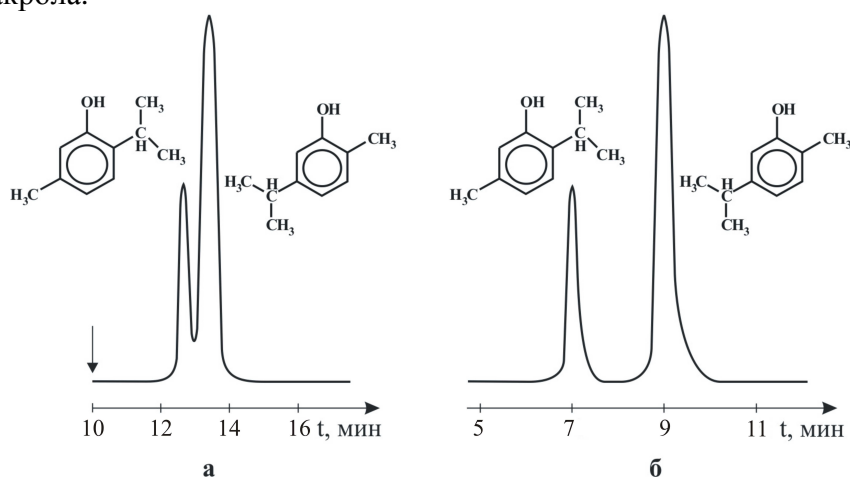


Рис. 3. Хроматограммы разделения фенольной фракции монарды дудчатой (*Monarda Fistulosa L.*) на различных по полярности НЖФ ($T=200^{\circ}\text{C}$; а – НЖФ Carbowax 20M, б – НЖФ Ariezon L)

Заключение

В работе методом ГЖХ на НЖФ различной полярности с применением метода структурной аналогии и химической теории графов по величинам удерживания изоструктурных соединений идентифицированы компоненты фенольной фракции монарды дудчатой (*Monarda Fistulosa L.*) – изомерные тимол и карвакрол. Установлено влияние тонкой молекулярной структуры указанных соединений на проявляемые ими хроматографические свойства.

*Авторы выражают искреннюю признательность д.ф.н., профессору В.А. Куркину (СамГМУ, Самара) и Н. Тимуюссе (Марокко) за любезно предоставленные образцы растительного сырья монарды дудчатой (*Monarda Fistulosa L.*).*

Список литературы

1. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках, М.: Наука, 2004, 528 с.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия, Самара: ООО "Офорт" СамГТУ, 2004, 1180 с.
3. Кузнецова М.А., Рыбачук И.З. Фармакогнозия, М.: Медицина, 1993, 448 с.
4. Набивач В.М., Дмитриков В.П. Использование корреляционных уравнений для предсказания величин удерживания в газожидкостной хроматографии // Успехи химии, 1993, Т.62, №1, С.27-38.
5. Король А.Н. Возможности предсказания величин удерживания в газожидкостной хроматографии // Успехи химии, 1982, Т.51, №7, С.1225-1255.
6. Станкевич М.И., Станкевич И.В., Зефирова Н.С. Топологические индексы в органической химии // Успехи химии, 1988, Т.58, №3, С.343-344.
7. Сур С.В. Методы выделения, идентификации и определения терпеновых соединений (обзор) // Хим.-фарм. журн., 1990, №5, С.42-47.
8. Органикум / Пер. с нем. под ред. В.М. Потапова, М.: Мир, 1992, Т.1, 487 с.

9. Замуреенко В.А., Ключев Н.А., Бочаров Б.В., Кабанов В.С. Исследование компонентного состава *Monarda fistulosa* // Химия природных соединений, 1989, №5, С. 646–649.
10. Крейчи М., Паюрек Я., Комерс Р. и др. Вычисления и величины в сорбционной колоночной хроматографии, М.: Мир, 1993, 208 с.
11. Богословский Ю.Н., Анваер Б.И., Вигдергауз М.С. Хроматографические постоянные в газовой хроматографии. Углеводороды и кислородсодержащие соединения. Справочник, М.: Изд-во стандартов, 1978, 192 с.
12. Скворцова М.И., Станкевич И.В., Палюлин В.А., Зефиоров Н.С. Концепция молекулярного подобия и её использование для прогнозирования свойств химических соединений // Успехи химии, 2006, Т.75, №11, С.1074-1093.
13. Киселев А.В., Иогансен А.В., Сакодынский К.И., Сахаров В.М. и др. Физико-химическое применение газовой хроматографии, М.: Химия, 1973, 256 с.
14. Яшкин С.Н., Светлов Д.А., Новоселова О.В., Яшкина Е.А. Экспериментальное и молекулярно-статистическое исследование адсорбции алкиладамантанов на графитированной термической саже // Известия Академии наук, Серия химическая, 2008, Т.57, №12, С.2340-2351.
15. Опарин Р.В., Покровский Л.М., Высочина Г.И., Ткачев А.В. Исследование химического состава эфирного масла *Monarda fistulosa* L. и *Monarda didyma* L., культивируемых в условиях Западной Сибири // Химия растительного сырья, 2000, № 3, С. 19-24.
16. Харлампович Г.Д., Чуркин Ю.В. Фенолы, М.: Химия, 1974, 376 с.
17. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы, М.: Химия, 1972, 352 с.

Яшкин Сергей Николаевич – к.х.н., доцент кафедры «Аналитическая и физическая химия» ФГБОУ ВПО «Самарский государственный технический университет», Самара

Агеева Юлия Александровна – аспирант кафедры «Аналитическая и физическая химия», ФГБОУ ВПО «Самарский государственный технический университет», Самара

Yashkin Sergey N., – Ph. Dr. in physical chemistry, the lecturer of Department of Analytical and Physical Chemistry, Samara State Technical University, Samara, e-mail : physchem@samgtu.ru

Ageeva Yuliya A. – post-graduate student of Department of Analytical and Physical Chemistry, Samara State Technical University, Samara