### Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет"

На правах рукописи

### ПУШКАРЕВА

Татьяна Ивановна

### АНАЛИТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ КИСЛОРОДОМ ВОЗДУХА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., проф. И.Г. Зенкевич

Санкт-Петербург, 2019 г.

1. E	ЗВЕДЕНИЕ6
2.1.	Общие закономерности окислительной деструкции экотоксикантов 13
2.2. кисло особе	Свободнорадикальный механизм окисления органических соединений ородом воздуха в водных растворах. Характер продуктов окисления и онности их хроматографического разделения
2.3. идент	Моделирование окислительных процессов в водных средах с целью гификации продуктов окисления органических соединений17
2.3.1. услов	Моделирование процессов окисления органических соединений в иях реакции Фентона
2.3.2.	Взаимодействие алкилфенолов с хлоридом железа (III) 19
2.3.3. облуч	Окисление органических соединений, инициированное УФ- иением
2.3.4. орган	Электрохимическое моделирование свободнорадикального окисления ических соединений кислородом воздуха в водных растворах
2.4. воднь	Идентификация продуктов окисления соединений разных классов в ых растворах
2.4.1. возду	Идентификация продуктов окисления алкилфенолов кислородом ха в водных растворах
2.4.2.	Определение органических пероксидных соединений
2.4.3.	Проблемы идентификации продуктов окисления флавоноидов 37
2.4.3.	1. Структура флавоноидов и классификация
2.4.3.2 окисл	2. Структурные особенности флавоноидов, объясняющие легкость их нения в водных растворах
2.4.3 окисл	<ol> <li>Проблемы идентификации димерных и олигомерных продуктов нения флавоноидов</li></ol>
2.4.3.4	4. Методы идентификации продуктов окисления кверцетина
2.4.4.	Идентификация продуктов окисления синтетических пестицидов 45
3. 3	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1.	Реактивы
3.2.	Вспомогательное оборудование и операции 47
3.2.1.	Вспомогательное оборудование47
3.2.2.	Вспомогательные операции
3.2.2.1.	Подготовка воды
3.3.	Условия окисления различных органических соединений
3.3.1. раствор	Окисление растворенным кислородом атмосферного воздуха в водных рах
3.3.1.1.	Окисление 4-изопропилфенола кислородом атмосферного воздуха 48
3.3.1.2.	Окисление кверцетина кислородом атмосферного воздуха 49
3.3.1.3. воздуха	Окисление диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов кислородом 4 49
3.3.2.	Окисление при действии различных реагентов 50
3.3.2.1.	Окисление кверцетина в условиях реакции Фентона 50
3.3.2.2.	Окисление фенолов хлоридом железа (III) 50
3.3.3.	Электрохимическое окисление 50
3.3.3.1.	Электрохимическое окисление 4-изопропилфенола 50
3.3.3.2.	Электрохимические свойства крезоксим-метила
3.3.3.3.	Электрохимические свойства дифеноконазола 52
3.4.	Дополнительные эксперименты 52
3.4.1. окислет	Идентификация продукта хиноидной структуры, образующегося при нии кверцетина
3.5.	Условия хроматографического анализа кверцетина 53
3.6.	Условия хроматомасс-спектрометрического анализа 53
3.6.1. изопро	Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов окисления 4- пилфенола

3.6.2. алкилфен	Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов окисления полов хлоридом железа (III)
3.6.3.	Хроматомасс-спектрометрическое определение продуктов окисления
кверцети	на
3.6.4.	Определение продуктов димеризации кверцетина методом MALDI . 56
3.6.5.	Условия хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов
электрох	имической трансформации дифеноконазола
3.6.6.	Условия хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов
электрох	имической трансформации крезоксим-метила
3.6.7.	Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов взаимодействия
1-бутано.	па и 1-гептанола с трихлоридом фосфора
3.7. O	бработка экспериментальных данных 58
4. ОБС	УЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 60
4.1. Хр	роматомасс-спектрометрическая идентификация необычных
продукто	в окисления 4-изопропилфенола кислородом воздуха в водных
раствораз	к
4.2. В	ЭЖХ-МС разделение и детектирование продуктов окисления
диалкилф	росфонатов и триалкилфосфитов в реакционных смесях 1-алканолов с
трихлори	дом фосфора
4.3. X <sub>1</sub> алкилфен	роматомасс-спектрометрическое определение продуктов окисления полов хлоридом железа (III)
4.4. Хр	роматомасс-спектрометрическая идентификация необычных
продукто	в электрохимического окисления 4-изопропилфенола в водных
раствора:	к
4.5. Х <sub>ј</sub> кверцети	роматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов окисления на кислородом воздуха в водных растворах 101
4.5.1.	Хроматомасс-спектрометрическая идентификация
низкомол	екулярных продуктов окисления кверцетина101

2. Моделирование механизма образования димерных и олигомерных
дуктов окисления флавоноидов с использованием результатов окисления 4-
пропилфенола в водных растворах109
3. Свойства кверцетина и их влияние на его аналитические
актеристики
Изучение электрохимического поведения пестицидов и фунгицидов с
ью установления основных продуктов их окисления кислородом воздуха в
ных средах115
1. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов
строхимического окисления дифеноконазола в растворах
2. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов
строхимических превращений крезоксим-метила в растворах 125
РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ137
ЛИТЕРАТУРА139
ПРИЛОЖЕНИЕ

#### 1. ВВЕДЕНИЕ

<u>Актуальность темы.</u> Определение следов техногенных органических соединений (экотоксикантов) в различных объектах окружающей среды (атмосферный воздух, водные среды, почвы и другие) – одна их важнейших задач современной аналитической химии. Однако во всех средах первичные загрязнители подвергаются различным химическим трансформациям, что приводит к образованию вторичных метаболитов, многие из которых оказываются не менее опасными (токсичными), чем исходные поллютанты и также требуют аналитического контроля. Поскольку практически все объекты окружающей среды находятся в контакте с атмосферой, основным типом превращений экотоксикантов являются реакции окисления с участием кислорода атмосферного воздуха.

Окислительно-восстановительные реакции, наряду с гидролизом и кислотно-основными превращениями, составляют большую группу химических реакций, происходящих В окружающей среде. Механизмы окисления органических соединений очень разнообразны. В реакциях окисления может участвовать как молекулярный кислород, так и его более реакционноспособные (гидропероксиды, пероксиды); процессы часто ускоряются при формы воздействии света, температуры или ионов переходных металлов. Биогенное окисление представляет собой ферментативные процессы, протекающие, в основном, под воздействием ферментов группы оксидаз [1, 2].

Атмосфера Земли обладает огромным окислительным потенциалом (обобщенная характеристика ее способности окислять поступающие из других геосфер органические и неорганические соединения), определяющим скорости окисления не только циркулирующих в естественных биогеохимических циклах восстановленных соединений, но и антропогенных примесей. При этом ключевая роль в окислительных процессах принадлежит не молекулярному

кислороду, а различного рода активированным кислородсодержащим частицам, присутствующим в ней в относительно небольших количествах. Такие частицы образуются в реакциях, инициируемых солнечной радиацией, и называются фотооксидантами [3].

Окисление органических соединений может происходить и в почве. Механизм распада органических веществ в почве может быть как абиотическим так и биотическим. Биотическое окисление в почвах происходит при участии микроорганизмов [4]. Различные виды микроорганизмов используют различные окислительные реакции и подразделяются на O<sub>2</sub>-аэробов, SO<sub>2</sub>-анаэробов и NOанаэробов [5]. Деструкция органических веществ в почве под влиянием микроорганизмов зачастую приводит к образованию простых минеральных соединений: углекислого газа, воды, аммиака и др.

Окисление природных и техногенных органических соединений в водных средах растворенным кислородом воздуха представляет собой один из основных процессов их трансформации. Следовательно, выявление закономерностей таких процессов актуально для характеристики деструкции экотоксикантов в различных объектах окружающей среды.

Окисление органических соединений В водных средах изучено недостаточно из-за необходимости определения гидрофильных соединений (продукты окисления органических соединений) в гидрофильной матрице (вода). Извлечение гидрофильных соединений из водных растворов на стадии подготовки проб отличается трудоемкостью, нередко требует применения коэффициентами уникальных реагентов И характеризуется низкими Применение высокоэффективной жидкостной концентрирования. хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (BЭЖX-MC) позволяет проводить прямое определение аналитов в водных растворах без ВЭЖХ-МС Олнако с ионизацией сталии экстракции. метол

электрораспылением характеризуется относительно невысокой структурной информативностью, что заставляет рассмотреть новые подходы к интерпретации данных.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состоит в идентификации продуктов окисления некоторых органических соединений различной химической природы (алкилфенолы, пестициды, природный флавоноид кверцетин, алкилфосфиты, алкилфосфонаты и алкилфосфаты) кислородом воздуха в водных растворах в условиях, близких к нормальным, что является основанием для установления закономерностей процессов окисления.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Идентификация продуктов свободнорадикального окисления органических соединений (4-изопропилфенол, кверцетин) в водных растворах;

2. Выявление аналогий в окислении органических соединений кислородом воздуха в водных растворах и при действии некоторых химических окислителей [хлорид железа (III), реактив Фентона];

3. Идентификация продуктов электрохимического окисления органических соединений (4-изопропилфенол, крезоксим-метил, дифеноконазол) как способ моделирования их свободнорадикального окисления кислородом воздуха;

4. Хроматомасс-спектрометрический анализ смесей продуктов окисления органических соединений (*о*-, *м*-, п-крезолы, 4-изопропилфенол, кверцетин крезоксим-метил, дифеноконазол) в режиме ВЭЖХ-МС с целью идентификации продуктов.

<u>Научная новизна.</u> На основании результатов идентификации установлено, что как свободнорадикальное (кислородом воздуха в водных растворах), так и электрохимическое окисление 4-изопропилфенола приводит к образованию димерных и, в общем случае, олигомерных продуктов, что объяснено, промежуточным образованием хинонметидных интермедиатов и их взаимодействием с исходными фенолами.

Детальная идентификация продуктов окисления алкилфенолов в водных растворах позволила впервые переосмыслить особенности протекания известной в аналитической химии цветной реакции фенолов с хлоридом железа (III). Входящие в состав первоначально образующихся окрашенных комплексов молекулы фенолов через некоторое время окисляются с образованием хинонметидных интермедиатов, дальнейшие превращения которых приводят к образованию набора плохо растворимых в воде олигомерных продуктов.

Аналогия процессов окисления алкилфенолов и окислительной димеризации природных флавоноидов (на примере кверцетина) позволила впервые предложить механизм образования их димеров и олигомеров, часто обнаруживаемых во многих природных объектах.

Впервые охарактеризованы продукты электрохимических превращений двух пестицидов: дифеноконазола и крезоксим-метила, рассмотренных как способ моделирования свободнорадикальных процессов. В случае дифеноконазола преобладают процессы окисления, связанные с деструкцией 1,3-диоксоланового фрагмента молекулы, среди продуктов но электрохимических превращений крезоксим-метила преобладают продукты его гидролиза и восстановления.

**Практическая значимость.** Идентификация продуктов окисления 4замещенных алкилфенолов важна для объяснения превращений некоторых алкилфенолов (например, 4-октил- и 4-нонил-), являющихся продуктами трансформации неионогенных поверхностно-активных веществ, часто

попадающих в сточные и природные воды и обладающих эндокринной токсичностью.

Установление закономерностей превращений кверцетина в условиях свободнорадикального окисления кислородом воздуха в водных растворах, позволяет объяснить детали его антиоксидантной активности.

Идентификация продуктов электролиза пестицидов дифеноконазола и крезоксим-метила позволяет предположить пути и продукты их деградации в водных объектах окружающей среды, и, следовательно, прогнозировать их влияние на окружающую среду.

#### На защиту выносятся следующие положения:

Результаты идентификации и установленное на этом основании сходство наборов продуктов свободнорадикального и электрохимического окисления некоторых органических соединений (алкилфенолы, природный флавоноид кверцетин).

1. Результаты хроматомасс-спектрометрической идентификации продуктов окисления алкилфенолов, позволяющие установить механизм их свободнорадикального окисления кислородом воздуха в водных растворах, который предполагает образование хинонметидов в качестве промежуточных интермедиатов и последующее образование димеров и олигомеров.

2. Аналогия состава продуктов окисления алкилфенолов и природных флавоноидов кислородом воздуха в водных растворах позволяет предположить аналогию механизмов их окисления с промежуточным образованием хинонметидных интермедиатов.

3. В результате хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов электролиза дифеноконазола и крезоксим-метила было установлено, что в случае дифеноконазола преобладают процессы, связанные с окислением 1,3диоксоланового фрагмента молекулы, а среди продуктов электрохимических

превращений крезоксим-метила преобладают продукты его гидролиза и восстановления.

4. В результате ВЭЖХ-МС анализа показано, что хранение при доступе воздуха реакционных смесей, содержащих диалкилфосфонаты и триалкилфосфиты приводит к почти полному окислению этих производных фосфора (III) с образованием соответствующих производных фосфора (V) – дии триалкилфосфатов.

### 2. ОКИСЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ КИСЛОРОДОМ ВОЗДУХА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ. АНАЛИТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Одним из важнейших свойств органических соединений является их способность к окислению кислородом воздуха. Окислительные процессы протекают во всех объектах окружающей среды: в водных средах, в атмосфере почве. Часто такие процессы подчиняются И В закономерностям свободнорадикальных реакций происходящих по цепному механизму. Так как значительная часть процессов окисления протекает в водных растворах, основным аналитическим методом идентификации продуктов окисления ВЭЖХ органических соединений является в сочетании с массспектрометрическим детектированием.

В обзоре литературы рассмотрены: методы идентификации и определения продуктов окисления органических веществ; методы моделирования мягкого окисления органических соединений; закономерности окисления замещенных фенолов, флавоноидов и пестицидов.

Идентификация продуктов окисления алкилфенолов кислородом воздуха в водных растворах важна для характеристики процессов окисления не только различных замещенных фенолов в водных растворах, но и фенольных соединений растительного происхождения, в том числе природных флавоноидов, например, кверцетина.

Легкое окисление некоторых флавоноидов в водных растворах приводит к образованию широкого спектра продуктов. Флавоноиды обладают свойствами антиоксидантов, поэтому изучение состава продуктов окисления флавоноидов – важная аналитическая задача.

Окисление пестицидов – один из путей их деградации в окружающей среде. При этом может происходить как уменьшение, так и увеличение

отрицательного воздействия пестицидов на живые организмы. Выяснение состава продуктов окисления пестицидов позволяет прогнозировать их влияние на окружающую среду.

Для установления состава продуктов окисления органических соединений, из-за сложности изучения реальных объектов, используют способы различные моделирования процессов окисления. Существует несколько способов моделирования окисления органических веществ: окисление, инициированное УФ-облучением, микробиологическое окисление, реакция Фентона (проведение окисления при добавлении перекиси водорода и соли железа (II)), окисление алкилфенолов FeCl<sub>3</sub> и электрохимическое окисление.

### 2.1. Общие закономерности окислительной деструкции экотоксикантов

Окисление природных и техногенных органических соединений в водных средах растворенным кислородом воздуха представляет собой один из основных процессов их трансформации в водных объектах окружающей среды. Зачастую эти процессы приводят к образованию соединений, более полярных, чем исходные, что увеличивает вероятность попадания продуктов окисления в водные объекты окружающей среды. Многие органические соединения, попадающие в окружающую среду, относят к экотоксикантам [1, 2].

Окисление органических соединений в водных средах чаще всего происходит растворенным в воде кислородом воздуха. Водные системы разделяют на олиготрофные и эвтрофные. Олиготрофные водоемы содержат малые концентрации питательных веществ, азота и фосфора. Напротив, в эвтрофные воды поступает много питательных веществ, такие водоемы

содержат высокие концентрации азота и фосфора и, соответственно, большие концентрации планктона, благодаря высокой биологической продуктивности водоема. Воды таких систем, как правило, мутные, и истощены кислородом на глубине. В эвтрофных озерах, в летнее время, концентрация молекулярного кислорода может снижаться до одного миллиграмма на литр - порог для возможности протекания многих биологических и химических процессов. Эвтрофикация может быть естественной или искусственной. Эвтрофикация, вызванная вмешательством человека, происходит при искусственном обогащении избытком питательных и органических веществ из сточных вод, сельского хозяйства и промышленности [6].

# 2.2. Свободнорадикальный механизм окисления органических соединений кислородом воздуха в водных растворах. Характер продуктов окисления и особенности их хроматографического разделения

Молекулярный кислород может существовать в разных электронных состояниях. В основном состоянии ( ${}^{3}\Sigma_{g}$  - триплетное) молекула кислорода содержит два неспаренных электрона с параллельными спинами на вырожденных  $\pi$ -орбиталях, а в возбужденном ( ${}^{1}\Delta_{g}$  - синглетном) состоянии оба валентных электрона с противоположными спинами размещаются на одной  $\pi$ -орбитали [7]. Первый вариант энергетически более выгоден, поскольку между двумя электронами, находящимися на одной и той же орбитали, существует межэлектронное отталкивание; расположенные на разных орбиталях электроны находятся дальше друг от друга, и их взаимное отталкивание меньше [8]. Синглетное состояние молекулы кислорода лежит выше основного состояния на 22,5 ккал/моль [9]. Эти спиновые состояния кислорода различны как по химическим, так и по физическим свойствам. Так, кислород, триплетный в

основном состоянии, является стабильным бирадикалом и может быть условно изображен как 'О–О'. Тем не менее, энергия связи О-О в таком триплете близка к энергии двойной связи. Для него характерны свободнорадикальные реакции, которые обычно происходят по цепному механизму. В то время как структура синглетного кислорода может быть представлена в виде О=О и имеет структурное сходство с этиленом. Есть экспериментальные доказательства этой структуры, которые подтверждают, что синглетный кислород – диенофил, способный к присоединению к сопряженным 1,3-диенам и к антраценам, без каких либо катализаторов или воздействия УФ-излучения [7].

За небольшими исключениями автоокисление протекает при участии триплетного кислорода, возможно, из-за большего количества молекул кислорода находящихся в триплетном состоянии, чем в синглетном [10].

Автоокисление большинства органических веществ в гомогенных растворах происходит по свободнорадикальному цепному механизму [11]. Как показано на схемах реакций (1), в отсутствие инициаторов, свободные радикалы формируются в процессе взаимодействия кислорода с органическими соединениями, содержащими слабые С-Н связи или О-Н связи (1).

$$R-H + O_2 \rightarrow R + HO_2$$

$$R-H + HO_2 \rightarrow R + H_2O_2 \qquad (1)$$

$$PhOH + O_2 \rightarrow PhO + HO_2$$

$$PhOH + HO_2 \rightarrow PhO + H_2O_2$$

Перекись водорода, которая образуется в ходе реакций (1) далее разлагается с образованием гидроксильных радикалов (2).

$$H_2O_2 \rightarrow 2HO$$
 (2)

Окисление органических соединений гидроксильными радикалами происходит с отщеплением водорода (3). Органический радикал далее

реагирует с кислородом с образованием органического пероксида (4). Органический пероксидный радикал отнимает атом водорода от органического соединения с образованием органического гидропероксида (ROOH) и другого органического радикала (5).

$$R - H + OH' \rightarrow R' + H_2O \qquad (3)$$
  
$$R' + O_2 \rightarrow ROO' \qquad (4)$$

 $ROO' + R - H \rightarrow ROOH + R'$  (5)

Поскольку образовавшиеся гидропероксиды часто нестабильны, разложение таких промежуточных продуктов приводит к образованию интермедиатов с меньшим числом атомов углерода. Последующие реакции могут приводить к образованию углекислого газа и воды [12].

Определение кислородсодержащих продуктов указанных выше реакций необходимо для изучения реакционной способности и механизмов окисления органических веществ. Оптимальными методами для этого являются газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Возникающие при этом экспериментальные затруднения обусловлены как лабильностью некоторых продуктов, главным образом пероксидных, так и способностью пероксидных соединений окислять другие компоненты реакционной среды, например, карбонилсодержащие. Существенно, что такие вторичные реакции могут приводить к изменению состава анализируемых образцов. Нежелательные изменения в составе анализируемых смесей продуктов окисления органических веществ в той или иной степени происходят во время хранения проб, при получении производных для анализа И В ходе аналитического определения. Важно отметить необходимость понимания реакций распада основных типов лабильных соединений для прогнозирования изменения состава анализируемого образца [13].

Растворимость кислорода воздуха в воде при 25°С и нормальном давлении составляет 8 мг/л воды, а при 20°С – 9.2 мг/мл. Растворимость кислорода сильно зависит от температуры и уменьшается при увеличении температуры. Растворимость кислорода в воде имеет обратную зависимость от количества растворенных в воде солей. Следовательно, растворимость кислорода в пресной воде выше растворимости в морской воде на 1-3 мг/л, в зависимости от температуры [14].

Растворенный в воде кислород является важным фактором выживания водных организмов. Критическая концентрация кислорода для существования рыб равна 4 мг/л воды. Тепловое загрязнение, которое является следствием сброса теплой воды промышленными предприятиями, приводит к уменьшению концентрации кислорода в воде [14].

### 2.3. Моделирование окислительных процессов в водных средах с целью идентификации продуктов окисления органических соединений

### 2.3.1. Моделирование процессов окисления органических соединений в условиях реакции Фентона

Реактив Фентона был предложен в 1890-х годах Генри Джоном Хорстманом Фентоном. Для окисления органического соединения к нему добавляют растворы перекиси водорода и соли железа (II) [15].

При действии реактива Фентона на органические соединения происходит окисление железа (II) перекисью водорода до железа (III), при этом образуется гидроксильный (6). Затем (III) радикал И гидроксид-ион железо восстанавливается перекисью водорода железа (II), образуя до гидропероксильный радикал и катион водорода (7). Фактически при этом происходит диспропорционирование перекиси водорода с образованием двух кислородсодержащих радикалов и воды (H<sup>+</sup> + OH<sup>-</sup>) в качестве побочного продукта [16].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO + OH \quad (6)$$
  
$$Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + HOO + H^+ \quad (7)$$

Образующиеся в результате этого процесса свободные радикалы, являясь сильными неселективными окислителями, вступают во вторичные реакции. Окисление органических соединений реактивом Фентона происходит быстро, с выделением тепла, зачастую, до диоксида углерода и воды [17].

Реагент Фентона чаще всего используют для удаления органических соединения устойчивых к другим методам очистки сточных вод, таким как биологическая очистка или адсорбция углеродом. Самым распространенным применением является очистка сточных вод от органических растворителей, устойчивых к биологическому окислению, таких как: фенолы, формальдегид, метиленхлорид и др. Ингибиторами реакции Фентона являются ловушки свободных радикалов и хелатирующие агенты, такие как: фосфаты, ЭДТА, лимонная и щавелевая кислоты [18].

Механизм деградации органических соединений в условиях реакции Фентона изучают главным образом для оптимизации процесса деструкции. Например, авторы статьи [19] описывают процесс деструкции лигнина в условиях реакции Фентона при воздействии УФ-излучения. Понимание происходящих процессов необходимо для выявления оптимальных условий, необходимых для удаления лигнина из сточных вод целлюлозно-бумажного производства.

Реактив Фентона изначально был предложен в качестве аналитического реагента для определения винной кислоты, но в настоящее время реакция

Фентона в аналитических целях используется только для характеристики антиоксидантной способности различных соединений [15].

#### 2.3.2. Взаимодействие алкилфенолов с хлоридом железа (III)

Взаимодействие фенолов (ArOH) с хлоридом железа (III) относят к известным в аналитической химии качественным реакциям на соединения этого класса. Так, при действии такого реагента, водный раствор фенола приобретает интенсивную красно-фиолетовую окраску ( $A_{\text{макс}}$  558 нм), исчезающую в кислой среде. Для замещенных фенолов возможны вариации окраски: красная, пурпурная, голубая или зеленая. По современным представлениям появление окраски связывают с образованием комплексных ионов вида [Fe(OAr)<sub>6</sub>]. Из соединений иных классов этому цветному тесту удовлетворяют оксимы, гидроксамовые кислоты, енолы и некоторые другие [20].

### 2.3.3. Окисление органических соединений, инициированное УФоблучением

Фотоокисление органических соединений в окружающей среде происходит при совместном действии кислорода и солнечного света. Многие органические вещества подвержены фотодеградации. Фотодеградация пестицидов представляет большой интерес из-за интенсивного использования этих химических веществ в сельском хозяйстве и их неизбежного попадания в окружающую среду [21].

Фотодеградация фармацевтических препаратов представляет некоторый интерес, поскольку они обнаруживаются во многих источниках воды, где и

претерпевают фотоокисление. Они и их метаболиты оказывают вредное воздействие на водные организмы, включая токсичность, эндокринные нарушения и генетические заболевания [22].

Для моделирования фотодеградации органических соединений, помимо УФ-излучения, распространено использование фотокатализаторов (например, диоксида титана) и реагентов, таких как перекись водорода, служащих для образования гидроксильных радикалов, которые далее воздействуют на изучаемые органические вещества [21].

## 2.3.4. Электрохимическое моделирование свободнорадикального окисления органических соединений кислородом воздуха в водных растворах.

Окисление органических веществ кислородом воздуха в водных растворах можно моделировать электрохимически [23].

Электрохимические методы могут быть применены для получения продуктов окисления, а также для генерирования реакционноспособных интермедиатов, которые могут вступать в реакции с различными реагентами. Окисление в электрохимической ячейке – инструментальный метод проведения окисления. Состав продуктов И скорость окисления зависят OT электрохимического потенциала, материала электрода, рН раствора И концентрации реагентов. Этот метод является быстрым и легко может быть автоматизирован. Электрохимическое окисление может приводить К образованию сложных смесей продуктов, поэтому для характеристики полученных реакционных смесей необходимо применять такие аналитические методы, как хроматомасс-спектрометрию [24].

Используемые электрохимические ячейки обычно состоят из трех электродов: рабочего, электрода сравнения и вспомогательного. Наиболее распространенный материал рабочего электрода - стеклоуглерод. Основным недостатком стеклоуглеродного электрода является адсорбция аналитов на поэтому обычно используют растворители, поверхности электрода, содержащие органические вещества. Другая проблема электрохимических ячеек - ограниченные надежность и воспроизводимость. Предыстория и возраст электрохимической ячейки могут оказывать влияние на наблюдаемые реакции окисления. Для проточной тонкослойной ячейки адсорбция на рабочем электроде является менее распространенной проблемой, чем для ячеек других типов. Другим преимуществом этого типа ячеек является возможность использовать различные виды материалов электродов. Помимо стеклоуглерода и платины можно использовать легированный бором алмазный электрод. Для получения высоких коэффициентов конверсии, проточные тонкослойные ячейки обычно используют при очень низких потоках электролита через ячейку (<10 мкл/мин) [24].

### 2.4. Идентификация продуктов окисления соединений разных классов в водных растворах

### 2.4.1. Идентификация продуктов окисления алкилфенолов кислородом воздуха в водных растворах

Необходимость характеристики процессов окисления алкилфенолов обусловлена их попаданием в окружающую среду в результате деятельности человека. Одними из самых распространенных экотоксикантов среди алкилфенолов являются нонилфенол *1* и октилфенол *2*. Нонилфенол (коммерческое название сложной смеси фенолов, в которой преобладают *пара*изомеры с разветвленными углеводородными заместителями, содержащими

девять атомов углерода) и октилфенол (коммерческое название сложной смеси преобладают разветвленными фенолов, В которой пара-изомеры с углеводородными заместителями, содержащими восемь атомов углерода) ИХ образуются В результате гидролиза этоксильных производных оксиэтилированного нонилфенола и оксиэтилированного октилфенола, которые используют в качестве неионогенных ПАВ. Алкилфенолы часто сохраняются после очистки сточных вод в водоемах, а анаэробные условия обычно приводят к их накоплению. Например, в некоторых реках Швейцарии общее содержание алкилфенолов достигает 43 мкг/л. Нонилфенолы токсичны для живых организмов. Пара-нонилфенол обладает свойствами эстрогенов, имитирует природный гормон 17 β-эстрадиол, из-за их структурного сходства, и нарушает гормональную систему животных [25].



Закономерности окисления простейших алкилфенолов позволяют установить закономерности окисления более сложных фенольных соединений.

При каталитическом окислении алкилфенолов происходит образование гидропероксидов алкилфенолов *3*. Наличие гидропероксидов свидетельствует об окислении боковой цепи, при котором происходит отщепление атома водорода от атома углерода, находящегося в α-положении к бензольному кольцу. Аналогично происходит окисление кумола *4*, в ходе которого образуется гидропероксид кумола *5*, что указывает на радикальный характер процесса [26]. В молекуле кумола окислению могут подвергаться как атомы углерода бензольного кольца, так и атом углерода находящийся в α-положении

к бензольному кольцу. При окислении атома углерода, находящегося в αположении к бензольному кольцу, происходит отщепление водорода и образуется радикал, который стабилизируется сопряжением с ароматической системой и двумя способными к гиперконъюгации метильными группами. При окислении *н*-пропилбензола, стабилизация промежуточно образующегося радикала менее эффективна, потому что линейная углеводородная цепь снижает устойчивость радикала [26, 27].



Авторы статьи [26] отмечают, что фенолят-ионы обладают более высокой реакционной способностью В реакциях окисления, чем фенолы В протонированной форме. При значениях pH < 10 алкилфенолы будут существовать в основном в Н-форме, так как рКа алкилфенолов ~ 10-11, поэтому их автоокисление интенсивнее происходит в щелочной среде. Авторы статьи [26], рассматривая окисление нонилфенола и октилфенола диоксидом марганца, предполагают радикальный механизм реакции. Однако, они предполагают образование радикального центра не у α-углеродного атома, а говорят об образовании феноксильных радикалов, существующих в трех резонансных формах (6,7,8).



Отмечено образование четырёх димеров 4-*н*-нонилфенола в результате его окисления [26]. Образование димеров может происходить в результате рекомбинации радикалов. Более вероятный процесс – взаимодействие радикалов с нейтральными молекулами, - авторами работы [26] не обсуждался. Продукт рекомбинации радикалов 6 представляет собой пероксид 9, который нестабилен из-за высокой реакционной способности. При взаимодействии радикалов 6 и 7 получается соединение 10. Образующийся из радикалов 6 и 8 димер 11 претерпевает диенон-фенольную перегруппировку и получается соединение 12, аналогично из радикалов 7 и 8 образуется соединение 13, а из двух радикалов 8 - 14. При рекомбинации радикалов 7 образуется соединение 15 [26].







Однако, в большинстве публикаций, образование димеров при окислении алкилфенолов объясняют образованием хинон-метидов в качестве интермедиатов [28 - 30]. Это тоже радикальный процесс, но, в отличие от описанного выше, при его протекании, отщепление подвижного атома водорода и образование радикального центра происходит при α-углеродном атоме алкильного заместителя.

Авторы статьи [28] изучали закономерности электрохимического окисления 2,6-ди-трет-бутил-4-изопропилфенола 16 и других алкилфенолов, содержащих алкильные заместители в пара-положении, с активным атомом водорода при α-углеродном атоме. Авторы статьи [28] предполагают, что из фенолят-иона 17, при окислении происходит образование феноксильных радикалов 18. Феноксильные радикалы 18 могут диспропорционировать с образованием исходного фенола 16 и хинон-метида 19. Однако хинон-метид 19 обнаружен не был из-за его высокой реакционной способности, были обнаружены только продукты присоединения нуклеофильных реагентов к хинон-метиду 19. Из 18 может образовываться димер 20. Хинон-метид 19 *21*. 21. В таутомерном равновесии с Лалее ИЗ существует при депротонировании, может образовываться фенолят-ион 22, который далее может окисляться и димеризоваться с образованием бис-хинон-метида 23.



Основными продуктами окисления 2,6-ди-*трет*-бутил-4изопропилфенола *16* и других алкилфенолов являются промежуточное соединение 19 и димер 23. В результате реакции 19 с водой образуются соединения 24 и 25. Может происходить дальнейшее окисление гидроксидиенона 24 до хинона 26 [28].



Авторы статьи [30] полагают, что при окислении алкилфенолов образуются относительно стабильные радикалы аналогичные 18, которые далее диспропорционируют на аналогичный 19, хинон-метид и исходный фенол. Далее хинон-метид димери76зуется с образованием бифенилэтана 27 и стильбенхинона 28.



Скорость образования хинон-метида из *n*-крезола ниже, чем скорость образования хинон-метида из 4-изопропилфенола. Этот факт подтверждает стабилизацию промежуточно образующегося радикала двумя способными к гиперконъюгации метильными группами [28, 30].

Было обнаружено, что в щелочной среде гидроксидиенон 29 образует ендион 30, возможно, при протекании гидроксидиеноновой перегруппировки [28].



Таким образом, авторы многих публикаций утверждают [28 - 30], что при окислении алкилфенолов происходит образование хинон-метидов в качестве промежуточных интермедиатов, поэтому следует рассмотреть реакционную способность хинон-метидов для характеристики дальнейших превращений алкилфенолов.

Хинон-метиды - это класс реакционноспособных, электрофильных соединений. Зачастую их формирование происходит при биотрансформации различных ксенобиотиков и обусловливает их токсический эффект. Окисление эндогенных алкилфенолов с промежуточным образованием хинон-метидов наблюдается в таких процессах как меланизация, склеротизация (процесс сшивания белковых молекул) и образование лигнина.

Хинон-метиды и их аналоги хиноны и хинон-имины имеют схожую реакционную способность. Наиболее важные общие реакции соединений этих классов - это их реакции как электрофилов и окисление. Из-за их электрофильной природы, хинон-метиды вступают в реакции почти исключительно как алкилирующие агенты, с небольшой окислительной активностью. В отличие от хинонов и хинон-иминов, которые реагируют и как окислители, и как электрофилы [29].

Важное различие соединений этих трех классов – это соединения, образующиеся в результате присоединения нуклеофилов. Реакции присоединения к хинонам и к хинон-иминам происходят в кольцо, и не затрагивают атом углерода в α-положении к бензольному ядру, поэтому сохраняется возможность для дальнейшего окисления продуктов. Это приводит

к присоединению нескольких нуклеофилов к промежуточно образующемуся при дальнейшем окислении хинону или хинон-имину или к сшиванию макромолекул. В то время как присоединение к хинон-метиду, по мнению авторов работы [29], исключает возможность формирования нового хинонметида.

Хинон-метиды, как электрофильные соединения, могут участвовать в двух типах реакций: нуклеофильное присоединение, или, в отсутствие подходящего нуклеофила, полимеризации.

Большинство хинон-метидов - высоко реакционноспособные соединения, полимеризуются при проведении концентрирования и очистки, поэтому их нельзя выделить из раствора, что затрудняет их идентификацию и изучение как интермедиатов в биохимических реакциях. При этом в разбавленных растворах они достаточно стабильны [29]. Хинон-метид 31 стабилен несколько дней при комнатной температуре, в инертном растворителе, в сильно разбавленном растворе  $(10^{-5} \text{ M})$ , но очень быстро димеризуется при увеличении концентрации. Стабильность его ди-*трет*-бутил аналога 32 в растворе выше, но 32 также не может быть выделен из раствора в виде чистого вещества. В обоих случаях продукты реакции в основном димерные 33. Димеры образуются в результате атаки метиленовой группы *n*-хинон-метида молекулой фенола с образованием соответствующего бензильного производного 33 [30].



Стерические факторы определяют стабильность хинон-метидов к димеризации. Хинон-метиды, не содержащие заместителей в метиленовой группе, не могут быть выделены в чистом виде [30].

В случае *n*-хинон-метидов возможна димеризация хвост к хвосту с образованием *34* [30].



В случае *о*-хинон-метидов *35* получаются димеры *36* и тримеры *37*, имеющие структуру циклических эфиров, образующихся по типу реакции Дильса-Альдера [30]. В работе [30], к сожалению, выходы таких интересных продуктов не указаны.



В реакциях нуклеофильного присоединения нуклеофил присоединяется к электрофильному метиленовому атому углерода хинон-метида **38**, при этом хиноновый атом кислорода становится фенольным **39**. Многие существующие в окружающей среде и в живых организмах нуклеофилы такие как: спирты, тиолы, белки, вода, нуклеиновые кислоты могут реагировать с хинон-метидами. Протонирование карбоксильного атома кислорода может происходить как до присоединения нуклеофила, так и после. Это говорит о нуклеофильной природе карбонильного кислорода в дополнение к электрофильной природе метиленового углерода [29].



На реакционную способность хинон-метидов могут влиять электронные эффекты заместителей. Например, присутствие алкильного радикала в *орто*положении к карбонильному кислороду стабилизирует *n*-хинон-метиды и снижает их реакционную способность по отношению к нуклеофилам. Наличие заместителей у метиленового атома углерода также уменьшает реакционную способность хинон-метидов по отношению к нуклеофилам из-за стерических факторов, но в меньшей степени, чем *орто*-алкильные группы [29]. В исследовании [31] было показано, что замена водорода в метиленовой группе хинон-метида на метильную уменьшает скорость реакции с водой в 6 раз [31].

Авторы статьи [31] изучали окисление *п*-алкилфенолов ДО соответствующих хинон-метидов катализируемое Р450 и присоединение нуклеофильных реагентов к образующимся хинон-метидам. В эксперименте использовали 2-метокси-4-алкилфенолы, а в качестве нуклеофила - глутатион (GSH) 40. Был обнаружен один продукт взаимодействия хинон-метида с одинаковыми заместителями в седьмом положении 41 с нуклеофилом 40, имеющий структуру 42. Для хинон-метидов с различными заместителями 43 были обнаружены два диастереомера 44, 45 в результате реакции с глутатионом. При проведении реакции глутатиона с хинон-метидом эвгенола 46 происходит образование 3 продуктов: два диастереомера 47, 48 при 1,6-

присоединении глутатиона в бензильное положение и один продукт 1,8присоединения 49, аналогичные данные получили авторы в статье [29].



Взаимодействие хинон-метидов с бромоводородом и спиртами происходит как 1,6-присоединение с образованием, фенолов *50* [30].



#### 2.4.2. Определение органических пероксидных соединений

Первичными продуктами окисления алкилфенолов и более сложных полифенольных соединений в водных растворах являются гидропероксиды. Соединения этого класса, представляют наибольшую сложность для аналитического определения среди продуктов окисления органических соединений из-за их неустойчивости [32].

Одним из путей направленного превращения гидропероксидов 51 и  $\alpha$ гидроксигидропероксиды 52 является их восстановление в относительно устойчивые продукты – спирты 53 и кетоны 54 соответственно. Для этой цели чаще других используется трифенилфосфин (ТФФ). Он хорошо растворим в органических средах, способен быстро и селективно восстанавливать гидропероксиды без нагревания [29]. ТФФ используют для восстановления гидропероксида 4-изопропилфенола 3 с образованием соответствующего спирта 55 [26, 27]. После обработки ТФФ проводят количественное определение образовавшегося спирта или избытка ТФФ.



Для определения содержания пероксидных соединений используют и другие восстановители: йодид-ион, ионы железа (II). При проведении дифенилсульфидом и дифенилсульфоксидом восстановления пероксидов содержание пероксида оценивают хроматографически, по образующимся, соответственно, сульфоксиду и сульфону. В качестве восстановителей также применяют боргидрид натрия (NaBH<sub>4</sub>) и алюмогидрид лития (LiAlH<sub>4</sub>). ТФФ достаточно селективно восстанавливает пероксидные группы, a NaBH<sub>4</sub> и LiAlH<sub>4</sub> способны восстанавливать В спирты И другие кислородсодержащие функциональные группы; первый – карбонильные, а второй – карбонильные, карбоксильные и сложноэфирные. Эти различия в восстанавливающей способности  $T\Phi\Phi$ , NaBH<sub>4</sub> и LiAlH<sub>4</sub> могут быть использованы ДЛЯ идентификации и количественного определения компонентов сложных смесей кислородсодержащих продуктов окисления, например, продуктов окисления нгексадекана [32].

Результаты определения гидроксисоединений в восстановленных ТФФ пробах включают содержание суммарное структурных аналогов с гидроксильными и гидропероксидными группами. Аналогичным образом карбонильные соединения определяются вместе с соответствующими αгидроксигидропероксидами. Такие данные оказываются полезными при способности изучении реакционной И направленности окислительных процессов [32].

Превращения пероксидов оказывают мешающее влияние на результаты количественного определения спиртов. Поэтому количественное определение пероксидных соединений необходимо не только для оценки направленности и механизмов окислительных превращений органических соединений, но и для расчета концентрации спиртов [32].

Для определения индивидуальных пероксидных соединений в составе продуктов окисления органических веществ наиболее пригодны хроматографические методы (ВЭЖХ, ГЖХ) [32].

В ВЭЖХ разделение чаще всего осуществляют при комнатной температуре, что, в сочетании с использованием каталитически инертных сорбентов и материалов аппаратуры, позволяет проводить разделение лабильных высокомолекулярных пероксидов. Послеколоночной обработкой элюента специфичными реагентами (дериватизацией) можно существенно повысить чувствительность, точность И селективность определения пероксидных соединений В смесях с другими кислородсодержащими продуктами. Прослеживается устойчивая тенденция к увеличению доли ВЭЖХ в непосредственном определении пероксидных соединений в продуктах окисления органических соединений [32].

Преимущества ГЖХ, как метода определения органических пероксидных соединений, связаны с высокой скоростью разделения и с наличием высокочувствительных детекторов, а недостатки - с возможностью разложения пероксидных соединений В процессе определения вследствие ИХ осложняющейся воздействиями, термодеструкции, каталитическими оказываемыми стенками испарителя и хроматографических колонок, а также носителем и неподвижной фазой. Замена металлических колонок стеклянными или тефлоновыми, применение инертных или дезактивированных специальной обработкой носителей и каталитически неактивных неподвижных фаз, а также переход от насадочных к капиллярным колонкам позволяет в ряде случаев решить проблему количественного определения для относительно термоустойчивых и летучих пероксидных соединений. При этом число типов пероксидных соединений, определяемых методом ГЖХ без предварительного восстановления, продолжает увеличиваться [32].
### 2.4.3. Проблемы идентификации продуктов окисления флавоноидов

### 2.4.3.1. Структура флавоноидов и классификация

Флавоноиды – это полифенольные соединения, производные 2-фенилбензо-γ-пирона (флавона) 56. Флавоноиды содержат два ароматических цикла (А и В) связанных гетероциклом С, нумерация атомов показана на примере природного флавоноида кверцетина 57. Флавоноиды классифицируют в соответствии со степенью окисления С-кольца, и включают: катехины (эпикатехин 58), флавононы (нарингенин 59), флавонолы (кверцетин 57), изофлавоны (генистеин 60), флавоны (апигенин 61) и антоцианы (цианидин 62). Флавоноиды могут подвергаться следующим модификациям: гидроксилирование, метилирование, гликозилирование и ацилирование, что обусловливает ещё большее разнообразие соединений этого класса [33, 34].



# 2.4.3.2. Структурные особенности флавоноидов, объясняющие легкость их окисления в водных растворах

Флавоноиды обладают свойствами антиоксидантов, легко подвергаются окислению в различных условиях [33 - 36].

Флавоноиды различных классов обладают разной способностью к окислению. Антиоксидантная активность флавоноидов зависит от структуры и заместителей С-кольца и В-кольца [35]. Заместители В-кольца должны обладать электронодонорными свойствами, в то время как заместители Акольца практически не влияют на способность флавоноидов к окислению [36].

Основными структурными особенностями флавоноидов, окисляющихся по свободнорадикальному механизму, являются:

- *Орто*-дигидрокси структура В-кольца, хорошие электронодонорные свойства которой, обусловливают более высокую устойчивость образующегося радикала из-за делокализации электронной плотности.
- 2,3-двойная связь сопряженная с карбонильной группой в четвертом положении кольца С обеспечивает делокализацию электронной плотности В-кольца.
- Гидроксильные группы в положениях 3 и 5, при наличии карбонильной группы в четвертом положении, также увеличивают антиоксидантную способность флавоноида. Наибольшая способность флавоноидов к свободно-радикальному окислению наблюдается при наличии 3-ОНгруппы при 2,3-двойной связи сопряженной с карбонильной группой в четвертом положении кольца С. Авторы статьи [35] полагают, что 3-ОНгруппа связана с протонами при атомах углерода 2' или 6' кольца В водородной связью, что обеспечивает конформацию молекулы при которой В-кольцо находится в плоскости колец А и С, что способствует

сопряжению колец В и С. Это, по мнению авторов статьи [35], может объяснять отличные антиоксидантные способности таких флавонолов. В то время как, в структуре флавонов кольцо В слегка (± 20 градусов) повернуто по отношению к плоскости колец А и С [35]. Гликозилирование положения 3 (рутин) в значительной степени уменьшает способность к свободнорадикальному окислению.

Третья гидроксильная группа в кольце В усиливает антиоксидантную активность, примером таких флавоноидов служит мирицетин (3, 5, 7, 3', 4', 5'гексагидроксифлавон). Дополнительные гидроксильные группы в положениях 5 и 7 кольца А практически не влияют на антиоксидантную активность флавоноидов, однако их вклад возрастает, когда в кольце В нет, или присутствует только одна гидроксильная группа. Наличие только одной гидроксильной группы у четвертого атома углерода кольца В снижает антиоксидантную активность флавоноида даже в сочетании с сопряженной системой двойной связи и 3-гидроксильной группой. Видимо, наличие только 2,3-двойной связи не достаточно для того, чтобы соединение обладало способностью быть донором водорода в отсутствие орто-дигидрокси структуры В-кольца (нарингенин (5, 7, 4'-тригидроксифлаванон) и апигенин (5, 7, 4'-тригидроксифлавон) [36].

# 2.4.3.3. Проблемы идентификации димерных и олигомерных продуктов окисления флавоноидов

Давно известно, что общий путь окисления флавоноидов предполагает образование олигомерных продуктов, но механизм их образования не выяснен. Ферментативное окисление флавоноидов имеет большое значение в биохимии, поскольку последующие реакции приводят к образованию лигнина, танина и меланина [37]. Сложность идентификации олигомерных продуктов окисления флавоноидов обусловлена их способностью к дальнейшему окислению и последующим реакциям с нуклеофильными реагентами, в том числе с исходными флавоноидами, что приводит к значительному усложнению состава смеси.

Конденсация флаван-3-олов приводит к образованию проантоцианидинов (ΠA), также называемых конденсированными Это танинами. краснокоричневые пигменты, которые присутствуют в некоторых растительных тканях, в том числе в плодах кукурузы. Проантоцианидины - это плохо полимеры, возможно, образующиеся при неферментативном изученные флаван-4-олов [33]. бесцветных Продукты окислении конденсации флавоноидов определяют такие органолептические характеристики, как терпкость, мутность и цвет фруктовых соков [37].

флавоноидов в растениях, наблюдают появление При окислении коричневой окраски. Флавоноиды, особенно орто-дифенолы, могут окисляться до соответствующих семихинонов и хинонов оксидазами, такими как полифенольные оксидазы и пероксидазы. Семихиноны и хиноны являются реакционноспособными соединениями, высоко которые способны К дальнейшим неферментативным реакциям. Они могут реагировать с фенолами, аминокислотами или белками, с образованием сложной смеси окрашенных продуктов [33].

Неферментативное окисление флавоноидов, например, автоокисление, также может приводить к образованию хиноидных соединений. В результате нескольких реакций окисления, хиноны могут окислять другие полифенолы, которые не могут быть непосредственно окислены ферментами, в результате образуются вторичные хиноны, которые, в свою очередь, способствуют формированию окрашенных гетерогенных полимеров [33].

Ферментативное окисление полифенолов, в частности флавоноидов, происходит, в частности, во время пищевой обработки и хранения растений, когда оболочка клеток нарушается. Это является одной из основных причин качества продуктов, выражающейся В Для потери ИХ потемнении. ингибирования процессов окисления существует несколько методов, включающие: физические методы (температурный режим, модифицированная атмосфера) и химические ингибиторы (аскорбиновая кислота, ионы галогенов, карбоновые кислоты), которые могут влиять либо на активность ферментов, на субстрат или продукт [33].

Авторы [38] изучали полимеры кверцетина, которые образуются при У воздействии ферментов. полученных была полимеров отмечена [38]. Максимальная антиоксидантная активность молекулярная масса Антиоксидантные составляла 6200 Дa. свойства полимеров агрегатов кверцетина оказались ниже, чем у исходного кверцетина [38].

В отсутствие ферментов кемпферол при окислении образует агрегаты, причем их молекулярная масса увеличивается во времени. Эти агрегаты проявляют большую антоксидантную активность чем исходные мономеры [38].

Добавление ферментов лактазы и тирозиназы к растворам кверцетина и кемпферола улучшало их свойства как антиоксидантов [38].

Авторы статьи [38] утверждают, что образование полимеров происходит результате сопряженного присоединения различных нуклеофильных В реагентов образующемуся окислении флавоноида К при хинону. Нуклеофильным реагентом быть может другая молекула флавоноида, образующийся в результате такого присоединения аддукт может подвергаться последующему окислению с образованием нового хиноидного соединения, которое способно к дальнейшему присоединению нуклеофилов, что приводит к новым полифенолам [38].

Состав полимерных продуктов окисления флавоноидов чрезвычайно сложно охарактеризовать [33]. В статье [38] авторам удалось определить молекулярные массы полученных полимеров методом электрофореза в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия и размер агрегатов по динамическому светорассеянию. Наличие хиноидной структуры продуктов окисления было выявлено с помощью ИК спектроскопии с преобразованием Фурье [38]. Все образующиеся в результате окисления полимеры не растворимы в воде, некоторые растворимы в метаноле и этаноле [38]. Из-за сложности состава смесей продуктов окисления флавоноидов, их анализ зачастую проводят с использованием препаративной хроматографии, для выделения индивидуальных компонентов [37].

Авторы статьи [37] проводили ферментативное окисление катехина в водной среде при pH 3 и 6. Смесь продуктов окисления катехина разделяли с использованием полупрепаративной и препаративной ВЭЖХ. С использованием УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии было показано, что выделенные вещества являются димерами катехина. Авторам статьи [37] удалось предложить структуры некоторых из полученных в результате окисления димеров по результатам анализа одномерных и двумерных спектров ПМР. Однако структуры нескольких димеров остались невыясненными из-за невозможности их препаративного разделения [37].

#### 2.4.3.4. Методы идентификации продуктов окисления кверцетина

При окислении флавоноида кверцетина образуется большое число продуктов, состав которых меняется в зависимости от условий окисления и остается до настоящего времени до конца не выясненным. Известно, что в число продуктов окисления кверцетина могут входить: 3,4дигидроксибензойная кислота 63, 2,4,6-тригидроксибензойная кислота 64 и 2(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидроксибензофуран-3-он **65**. Оценка их антиоксидантной способности указывает на то, что они могут являться основными факторами, обусловливающими антиоксидантные свойства кверцетина [39]. Возможная антиоксидантная способность других продуктов окисления кверцетина обусловливает необходимость их идентификации в смеси продуктов окисления кверцетина.



В составе продуктов окисления органических веществ, таких как кверцетин, молекулярным кислородом воздуха, могут присутствовать кислородсодержащие продукты: спирты, гидропероксиды (методы определения гидропероксидов были рассмотрены выше), кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты, эпоксиды и другие [40].

Соединения, содержащие гидроксильные группы можно анализировать методами ВЭЖХ и ГЖХ непосредственно, или переводя их в менее полярные производные – ацетаты, трифторацетаты, триметилсилильные эфиры (только в ГЖХ) и другие [40].

Мешающее влияние присутствующих в анализируемых образцах пероксидных соединений проявляется в результате их распада с образованием дополнительного количества спиртов в ходе аналитического определения. Такие погрешности более значимы для метода ГЖХ, в котором процесс разделения осуществляется при более высоких температурах, чем в ВЭЖХ [40].

Существуют два способа устранения влияния пероксидных соединений на результаты определения гидроксисоединений методом ГЖХ. Первый –

проводить определение в условиях, когда пероксиды устойчивы, а второй – целенаправленно переводить пероксидные соединения в устойчивые продукты. Несмотря на то, что первый способ более привлекателен, и спирты могут быть определены методом ГЖХ в условиях, используемых для анализа их гидропероксидных аналогов, по рассмотренным выше причинам, он не всегда При реализации второго способа гидропероксиды осуществим. перед определением методом ГЖХ обрабатывают подходящими восстановителями. Поскольку продуктами восстановления гидропероксидов являются спирты, то для расчета содержания гидроксисоединений в пробах необходимо знать их образующееся количество, при восстановлении, т. e. концентрацию соответствующих гидропероксидов [40].

При определении карбонильных соединений, разделению хроматографическими методами подвергают не только свободные карбонильные соединения, но и их стабильные производные, например продукты взаимодействия карбонильных соединений и 2,4-динитрофенилгидразина *66*. Имеются сведения о ГЖХ определении производных карбонильных соединений – оксимах *67*, полученных при обработке окисленных продуктов О-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламином *68* [40].



### 2.4.4. Идентификация продуктов окисления синтетических пестицидов

Хотя токсичность продуктов окисления пестицидов обычно снижается, по сравнению с исходным соединением, известны и устойчивые токсичные метаболиты пестицидов [41]. При некоторых превращениях пестицидов активная часть молекулы сохраняется, так происходит при окислении тиоэфиров в сульфоны и сульфоксиды. Смесь исходного соединения и продуктов его окисления может обладать аддитивным токсическим эффектом. Фенольные соединения таких классов, как пиретроиды И арилоксифеноксипропионовые гербициды могут воздействовать на рецепторы эстрогена. Продукты окисления зачастую более полярны, чем исходные соединения, это увеличивает возможность их попадания в ресурсы питьевой воды, такие как подземные и поверхностные воды, где полярные продукты довольно заметных концентрациях. В воде может обнаруживаются в образование канцерогеного N-нитрозо-диметиламина происходить ИЗ метаболита толилфлуанида и дихлофлуанида, диметилсульфамида, при окислении [42].

Возможная токсичность продуктов окисления пестицидов обусловливает необходимость идентификации продуктов окисления пестицидов в окружающей среде [43].

Для извлечения продуктов окисления пестицидов из объектов окружающей среды применяют следующие методы: жидкостно-жидкостная экстракция, твердофазная экстракция и твердофазная микроэкстракция. Твердофазная микроэкстракция считается наиболее подходящим методом концентрирования, из-за селективности, быстроты и низкой трудоемкости процесса [44].

Многие из продуктов окисления органических веществ являются лабильными соединениями и могут претерпевать химические превращения в ходе анализа и, зачастую, стабильны только в растворах, что обусловливает сложность их идентификации. Поэтому ВЭЖХ-МС или ГЖХ-МС анализ смесей продуктов окисления органических соединений не всегда обеспечивает истинную информацию о составе продуктов окисления. Понимание механизмов окисления органических соединений необходимо для того, чтобы исключить ошибки идентификации продуктов окисления из-за реакций, протекающих в ходе анализа. Механизмы окисления целесообразно выяснять для более простых модельных веществ. Необходимость выяснения механизмов и продуктов окисления более простых веществ обусловливает несомненную актуальность и практическую значимость работ в этом направлении.

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 3.1. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: кверцетина дигидрат 52, дифеноконазол 69, крезоксим-метил 70 - все не менее 96%, Sigma-Aldrich, 4изопропилфенол (98 %, Sigma-Aldrich); фенол, *орто*-крезол, *мета*-крезол, ацетофенон, пропиофенон, бутирофенон, пара-крезол, гидрохлорид гидроксиламина - все квалификации «х. ч.»; тиомочевина и гидрокарбонат аммония - более 99 %, Sigma-Aldrich; хлороформ (х. ч., Вектон); α-циано-4гидроксикоричная кислота (более 98 %, Sigma-Aldrich); ацетат аммония, формиат аммония, этилацетат - все не менее 99 %, Fluka Analytical; FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>0 (ч.); FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (II) и гидроксид натрия - х. ч., Нева Реактив; этанол медицинский (95 %, Росбио); метанол (более 99 %, Merck); перекись водорода медицинская (6 %); ацетонитрил (ос. ч., Криохром); муравьиная кислота (~98 %, Fluka Analytical); аммиак водный (25%, ос. ч., Сигма Тек).



Препараты пестицидов предоставлены химиком-аналитиком ФГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» к.х.н. О.К. Остроуховой.

### 3.2. Вспомогательное оборудование и операции

### 3.2.1. Вспомогательное оборудование

В работе было использовано следующее оборудование: мембранный

вакуумный насос N 86 KT.18 (KNF labport, Франция) с максимальной производительностью 6 л/мин; pH-метр PT-10P (Sartorius, Германия) со стандартным хлорсеребряным электродом; магнитная мешалка (IKA, Германия); УФ-спектрометр Epoch (BioTek Instruments, CША); твердотельный термостат Thermostat plus (Eppendorf, Германия); центробежный вакуумный концентратор Concentrator plus (Eppendorf, Германия); электрохимическая ячейка ROXY (Antec, Нидерланды) с допированным бором электродом Magic Diamond; вольтамперометрический анализатор 797 VA Computrace, (Metrohm, Швейцария).

### 3.2.2. Вспомогательные операции

### 3.2.2.1. Подготовка воды

Очистку воды проводили с использованием системы Direct Q-3UV (Merck Millipore, Франция).

### 3.3. Условия окисления различных органических соединений

# 3.3.1. Окисление растворенным кислородом атмосферного воздуха в водных растворах

#### 3.3.1.1. Окисление 4-изопропилфенола кислородом атмосферного воздуха

Для проведения окисления 4-изопропилфенола (р*K*а 10.25) готовили его растворы с концентрациями 0.1–1.0 мг/мл в смеси водного раствора NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (25 мМ, pH  $\approx$  8.5) и ацетонитрила (80:20 по объему). После барботирования воздуха через 100 мл раствора со скоростью ~2 л/мин в течение 4 ч при рассеянном люминесцентном освещении и последующего контакта с воздухом в течение 1 суток без перемешивания продуктов окисления 4-изопропилфенола в нем обнаружено не было. Для ускорения процесса окисления добавили водный раствор аммиака (10%) до pH ~10 и дополнительно барботировали

воздух в течение 1 ч. Перед анализом образцы раствора подкисляли муравьиной кислотой (приблизительно 0.1%) до рН ~3. Для выявления и исключения сигналов мешающих веществ и обнаружения минорных или нестабильных компонентов варьировали концентрацию 4-изопропилфенола в растворах (0.1 -1 мг/мл).

### 3.3.1.2. Окисление кверцетина кислородом атмосферного воздуха

Готовили раствор кверцетина в 95% этаноле или метаноле (для установления влияния присутствующего в реакционной смеси этанола на состав продуктов окисления кверцетина) с концентрацией кверцетина 10 мг/мл, который далее разбавляли в 100 раз до концентрации 100 мкг/мл водным раствором гидрокарбоната аммония с концентрацией 25мM, pH ~ 8–9 или раствором этанол/водный раствор NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (C = 25мM) = 30/70. Окисление проводили при пропускании воздуха в течение трех часов через раствор объемом 100 мл с примерной скоростью 2 л/мин. Перед хроматографическим анализом полученные реакционные смеси подкисляли муравьиной кислотой до ее концентрации в пробах 0.1 %.

### 3.3.1.3. Окисление диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов кислородом воздуха

Условия реакции 1-алканолов ROH с трихлоридом фосфора PCl<sub>3</sub> соответствовали охарактеризованным в публикациях [45-47]. Реакционные смеси получены студенткой магистратуры Института химии СПбГУ В.Э. Носовой. Продукты окисления диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов были зарегистрированы после хранения реакционных смесей в течение двух недель в растворе хлороформа.

### 3.3.2. Окисление при действии различных реагентов

#### 3.3.2.1. Окисление кверцетина в условиях реакции Фентона

Для окисления кверцетина в условиях реакции Фентона смешивали 1 мл водного раствора  $H_2O_2$  (3%), 1 мл водного раствора FeSO<sub>4</sub> с концентрацией 10 мг/мл и 1 мл раствора кверцетина в этаноле с концентрацией 10 мг/мл, а также готовили смесь этих компонентов в таких же соотношениях, но с уменьшенными в 10 раз концентрациями. Пробы реакционных смесей отбирали через 15 минут, один час и два часа после начала реакции.

### 3.3.2.2. Окисление фенолов хлоридом железа (III)

Готовили водные растворы фенола (50 мкг/мл), *орто-*, *мета-* и *пара*крезолов (20 мкг/мл), 4-изопропилфенола (1 мг/мл) и хлорида железа (III) (60 мг/мл). К 2 мл каждого из растворов прибавляли раствор FeCl<sub>3</sub> х 6H<sub>2</sub>0 (к раствору фенола - 1.6 мл, крезолов - по 334 мкл, 4-изопропилфенола - 20 мкл). Каждый из растворов приобретал характерную яркую окраску: фенола и *м*крезола - фиолетовую, *о*-крезола - зеленую, а *n*-крезола и 4-изопропилфенола синюю. После приблизительно двух суток выдерживания растворов при комнатной температуре их окраска исчезала, выпавшие осадки отделяли декантацией или фильтрованием, перерастворяли их в 1 мл хлороформа, разбавляли в 100 раз смесью вода - ацетонитрил - муравьиная кислота (50:50:0.1 по объему) и анализировали.

### 3.3.3. Электрохимическое окисление

### 3.3.3.1. Электрохимическое окисление 4-изопропилфенола

Электрохимическое окисление 4-изопропилфенола в растворе с концентрацией 100 мкг/мл проводили в смеси водного раствора формиата аммония (10 мМ, рН 7.4) и ацетонитрила (3 : 1 по объему), использовали

потенциостат ROXY с трехэлектродной электрохимической ячейкой, объемом 0.7 мкл, со слоем электролита 50 мкм. Проточная электрохимическая ячейка включает допированный бором алмазный электрод Magic Diamond в качестве рабочего, электрод HyREF в качестве электрода сравнения и платиновый электрод в качестве вспомогательного. Электролиз проводили при 37 °C и скорости потока раствора 4-изопропилфенола через электрохимическую ячейку 5 мкл/мин. Потенциал электрода варьировали от 2.5 до 3.5 В, контролируя процесс окисления по величине тока. Раствор продуктов окисления перед хроматомасс-спектрометрическим анализом подкисляли муравьиной кислотой до ее концентрации в пробе ~0.1%.

Электрохимическое окисление с on-line масс-спектрометрическим детектированием продуктов окисления 4-изопропилфенола проводили в режиме сканирующей вольтамперометрии в диапазоне вариаций потенциала U со скоростью 2 мB/с от 0 до 1.5 и 1.0 до 4.4 В.

### 3.3.3.2. Электрохимические свойства крезоксим-метила

Электрохимическое окисление и восстановление крезоксим-метила в концентрацией 100 мкг/мл проводили растворе c аналогично электрохимическому окислению 4-изопропилфенола. Для выявления всех трансформации продуктов крезоксим-метила, возможных электролиз проводили при различных потенциалах в диапазоне от 1 до 3 В с шагом 0.2 В. Для электрохимического восстановления устанавливали потенциал -2.8 В. Полученные в результате электролиза растворы собирали в пробирки типа Эппендорф для их последующего хроматомасс-спектрометрического анализа. Для вольтамперометрических измерений использовали 797 VA вольтамперометрический Computrace, анализатор (Metrohm, Швейцария), с трехэлектродной электрохимической ячейкой объемом 10 мл. Электрохимическая ячейка включает электроды: рабочий – стеклоуглеродный, вспомогательный – платиновый и хлорсеребряный электрод сравнения. Данные

полученные на вольтамперометрическом анализаторе не включены в диссертацию, так как в диапазоне потенциалов работы стеклоуглеродного электрода никаких электрохимических превращений этого вещества не происходило.

### 3.3.3.3. Электрохимические свойства дифеноконазола

Электрохимическое окисление дифеноконазола растворе В с 100 мкг/мл проводили аналогично электрохимическому концентрацией окислению 4-изопропилфенола. Для выявления всех возможных продуктов трансформации дифеноконазола, электролиз проводили при различных потенциалах в диапазоне от 1.5 до 3.5 В с шагом 0.5 В. Полученные в результате электролиза растворы собирали в пробирки типа Эппендорф, для их последующего хроматомасс-спектрометрического анализа. Для обнаружения минорных компонентов смеси проводили электролиз раствора дифеноконазола с концентрацией 50 мкг/мл, при потенциале 3,0 В. Из 0,8 мл полученного при электролизе раствора продукты окисления дифеноконазола экстрагировали тремя порциями этилацетата (по 200 мкл). Объединенный экстракт сушили при 60 °C в центробежном вакуумном концентраторе и перерастворяли в 50 мкл смеси вода-ацетонитрил-муравьиная кислота, 40:60:0.1 по объему.

#### 3.4. Дополнительные эксперименты

# 3.4.1. Идентификация продукта хиноидной структуры, образующегося при окислении кверцетина

Для подтверждения хиноидного строения продукта реакции окисления кверцетина со временем удерживания  $t_{\rm R} = 9.6$  мин и M = 332 окисление кверцетина проводили в течение шести часов при барботировании воздуха через раствор и шести суток в условиях контакта с воздухом без барботирования и перемешивания, после чего реакционная смесь была

обработана гидроксиламином. К 2 мл реакционной смеси добавили 0.02 г гидрохлорида гидроксиламина. Реакцию проводили при 70 °C в течение суток. В качестве образца сравнения использовали раствор гидрокарбоната аммония. Спектр получен на спектрометре Epoch (BioTek Instruments, U.S.A).

### 3.5. Условия хроматографического анализа кверцетина

Хроматографический анализ раствора, содержащего кверцетин И ацетофенон в концентрации 10 мкг/мл в ацетонитриле, проводили на жидкостном хроматографе с УФ-детектором с диодной матрицей LC-20 prominence (Shimadzu, Япония). Детектирование проводили по длинам волн: 370 нм (кверцетин), 230 нм (ацетофенон). Для проведения разделения использовали колонку (150×2.1 мм) Zorbax Eclipse XDB-C8 (размер частиц сорбента 3.5 мкм), предколонку, заполненную таким же сорбентом. Разделение в режиме изократического элюирования проводили ДВУМЯ составами подвижных фаз: 1 (вода-ацетонитрил-муравьиная кислота, 80:20:0.1) и 2 (водаацетонитрил-муравьиная кислота, 50:50:0.1). Расход элюента (рН ~ 2-3) - 0.2 мл/мин, объем дозируемых проб – 10 мкл, температура термостата колонки – 30 °C.

### 3.6. Условия хроматомасс-спектрометрического анализа

### 3.6.1. Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов окисления 4изопропилфенола

Хроматографический анализ водных растворов выполнен на хроматографе Agilent 1290 Infinity с масс-спектрометрическим детектором. Режим разделения I: колонка (150×2.1 мм) Zorbax Eclipse XDB-C8 (размер частиц сорбента 3.5 мкм), предколонка, заполненная таким же сорбентом, режим градиентного элюирования подвижными фазами A (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 (pH ~ 2–3) – 0.2 мл/мин, объем дозируемых проб – 10 мкл, температура термостата колонки – 30 °C. Режим разделения II: колонка (100×2.1 мм) Асquity UPLC HSS T3 (размер частиц сорбента 1.8 мкм), предколонка, заполненная таким же сорбентом, режим градиентного элюирования подвижными фазами A (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 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.

Масс-спектрометрическое определение продуктов окисления 4изопропилфенола проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой Bruker amaZON ETD (Германия) с ионизацией электрораспылением в режимах детектирования положительных и отрицательных ионов. Напряжение на капилляре 4.5 кВ, газ-осушитель азот, температура 250 °C, расход 9 л/мин, диапазон сканируемых масс 70–1000 Да. Каждый спектр получен в результате усреднения пяти последовательных сканов. Детектирование проводили как по общему ионному току (режим AutoMS), так и в результате изолирования и последующей фрагментации ионов с выбранными массами (режим MRM – мониторинга заданных реакций).

# 3.6.2. Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов окисления алкилфенолов хлоридом железа (III)

Хроматографический анализ приготовленных образцов продуктов окисления алкилфенолов FeCl<sub>3</sub> проводили аналогично анализу продуктов окисления 4-изопропилфенола. Разделение проводили на колонке (150×2.1 мм)

Zorbax Eclipse XDB-C8 (размер частиц сорбента 3.5 мкм), в трех режимах градиентного элюирования:

### Таблица 3.1

Время,	Содержание фазы Б в	Время,	Содержание фазы Б в		
МИН	элюенте, объемн. %	МИН	элюенте, объемн. %		
	Градиент III		Градиент IV	Градиент V	
0	5	0	20	50	
20	80	20	90	100	
22	80	24	90	100	
23	5	25	20	50	
25	5	27	20	50	

### Режимы градиентного элюирования

Масс-спектрометрическое определение продуктов окисления алкилфенолов хлоридом железа (III) проводили аналогично определению продуктов окисления 4-изопропилфенола. Детектирование проводили по общему ионному току (режим AutoMS).

# 3.6.3. Хроматомасс-спектрометрическое определение продуктов окисления кверцетина

ВЭЖХ анализ продуктов окисления кверцетина проводили аналогично анализу продуктов окисления 4-изопропилфенола. Разделение проводили на колонке (150×2.1 мм) Zorbax Eclipse XDB-C8 (размер частиц сорбента 3.5 мкм), в режиме градиентного элюирования VI: линейное увеличение содержания фазы В в элюенте с 2% до 80% за 35 минут, далее уменьшение до 2% фазы В за одну минуту, ещё две минуты – режим установления равновесия.

Масс-спектрометрическую детектирование продуктов окисления кверцетина проводили аналогично детектированию продуктов окисления 4изопропилфенола. Детектирование проводили в режиме регистрации отрицательных ионов. Хроматограммы регистрировали как по общему ионному току, так и в результате изолирования и последующей фрагментации заданных ионов (режим MRM).

### 3.6.4. Определение продуктов димеризации кверцетина методом MALDI

При хранении реакционной смеси, получение которой описано в пункте 3.3.1.2., при доступе кислорода в течение 4 дней выпал осадок коричневого цвета. Далее смесь хранили при температуре -20 °C в течение года, после чего осадок отфильтровали, ресуспердировали с  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислотой (C = 5 мг/мл) в растворе ацетонитрил-вода-трифторуксусная кислота (60:40:0.1, по объему) и нанесли на мишень MALDI. Анализ состава осадка проводили на масс-спектрометре типа ионно-циклотронного резонанса Bruker Solarix (Германия), оснащенном магнитом 7 Тл, метод ионизации - MALDI, в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов, ионы детектировали в диапазоне *m/z* 600-2500.

### 3.6.5. Условия хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов электрохимической трансформации дифеноконазола

Определение электрохимической продуктов трансформации дифеноконазола проводили аналогично определению продуктов окисления 4изопропилфенола. Колонка: Acquity UPLC HSS T3 2.1×100 мм с диаметром частиц сорбента 1.8 мкм, с предколонкой, заполненной таким же сорбентом. Использовали режим градиентного элюирования VII. Содержание фазы Б в элюенте линейно увеличивали с 5 % до 90 % за 20 минут, выдерживали постоянным в течение 2 минут, затем уменьшали до 5 % за 30 с и кондиционировали колонку в течение еще 3 минут. Скорость потока фазы 0.3 мл/мин. Объём дозируемых проб 5 мкл. Также использовали режим градиентного элюирования VIII: содержание фазы Б в элюенте линейно увеличивали с 50% до 55% за 15 минут, увеличивали содержание фазы Б в элюенте до 80% за 30 секунд, выдерживали постоянным в течение 1.5 минут, затем уменьшали до 50% за 30 секунд и кондиционировали колонку в течение

еще 1.5 минут. Скорость потока фазы 0.3 мл/мин. Объём дозируемых проб 5 мкл. Масс-спектрометрическое определение продуктов окисления дифеноконазола проводили аналогично определению продуктов окисления 4-изопропилфенола в режиме детектирования положительных ионов. Диапазон сканируемых масс 70–1200 Да. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме AutoMS/MS.

# **3.6.6.** Условия хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов электрохимической трансформации крезоксим-метила

Хроматографический анализ продуктов электрохимической трансформации крезоксим-метила проводили аналогично анализу продуктов окисления 4-изопропилфенола. Разделение проводили на колонке Acquity UPLC HSS T3 2.1×100 мм с диаметром частиц сорбента 1.8 мкм, с предколонкой, заполненной таким же сорбентом. Использовали режим градиентного элюирования VII.

Масс-спектрометрическое определение продуктов трансформации крезоксим-метила проводили аналогично определению продуктов окисления 4-изопропилфенола в режимах детектирования положительных и отрицательных ионов. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме AutoMS/MS. При таком методе детектирования образующиеся ионы фрагментируют в результате столкновений с атомами гелия (энергия соударений 1 В).

Для определения точных молекулярных масс отдельных компонентов смеси использовали масс-спектрометр LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией. Напряжение на капилляре 3.5 кВ, газосушитель – азот, температура 300 °C. Детектирование положительно заряженных ионов проводили в режиме сканирования по полному ионному току (режим SCAN) в диапазоне *m/z* от 50 до 500 в течение всего анализа.

### 3.6.7. Хроматомасс-спектрометрический анализ продуктов взаимодействия 1-бутанола и 1-гептанола с трихлоридом фосфора

Хроматографический анализ продуктов взаимодействия 1-бутанола и 1гептанола с PCl<sub>3</sub> проводили аналогично анализу продуктов окисления 4изопропилфенола. Колонка: Acquity UPLC HSS T3  $2.1 \times 10$  мм с предколонкой, заполненной таким же сорбентом. Размер частиц сорбента 1.8 мкм. Использовали режим градиентного элюирования IX. Содержание фазы Б в элюенте линейно увеличивали с 40 до 100% за 20 мин, выдерживали постоянным в течение 2 мин, затем уменьшали до 40% за 0.5 мин и кондиционировали колонку в течение 1.5 мин. Расход элюента 0.3 мл/мин. Объём проб 5 мкл.

Масс-спектрометрическое определение продуктов взаимодействия 1бутанола и 1-гептанола с PCl<sub>3</sub> проводили аналогично определению продуктов окисления 4-изопропилфенола. Детектирование проводили как в режиме AutoMS/MS, диапазон сканируемых значений m/z = 125-500 Да, так и в режиме активации соударениями, когда образующиеся ионы (ускоряющий потенциал 1 В) дополнительно фрагментируют в результате столкновений с атомами гелия.

### 3.7. Обработка экспериментальных данных

Для определения индексов удерживания продуктов окисления в идентичных условиях выполнены анализы смеси трех реперных налкилфенилкетонов  $C_6H_5COC_nH_{2n+1}$  (n = 1-3), времена удерживания приведены ниже. В качестве времени удерживания несорбируемого компонента ( $t_0$ ) принимали время удерживания тиомочевины. Для вычисления индексов удерживания использовали программу QBasic и программное обеспечение Microsoft Excel (версия 2007 г.).

### Времена удерживания реперных н-алкилфенилкетонов и несорбируемого компонента

	<i>t</i> <sub><i>R</i></sub> , МИН							
Градиент	Ι	II	III	IV	V	VI	VII	IX
Тиомочевина	2.1	1.5	2.0	1.9	1.8	1.6	1.1	0.8
Ацетофенон	13.0	8.4	13.0	9.1	4.2	18.8	9.1	3.2
Пропиофенон	15.7	11.4	15.7	12.1	5.8	23.5	11.7	4.8
Бутирофенон	17.9	13.7	17.9	14.5	7.5	27.3	13.7	6.8

гидрофобности Значения факторов  $(\log P)$ для оценки порядка компонентов вычисляли с использованием элюирования программного ACD/ChemSketch и ChemDraw обеспечения 12.0. Вычисления энергий AM-1 образования методами MM+И выполнены использованием с программного обеспечения HyperChem Pro (версия 6.0) (при исследовании состава продуктов окисления 4-изопропилфенола).

В значениях индексов удерживания, превышающих индекс удерживания последнего из использованных реперных компонентов (бутирофенон с *RI* = 1000) более чем на 200 ед. инд., проявляются прогрессивные ошибки экстраполяции, вследствие чего их рассматривали как ориентировочные.

### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Закономерности окисления многих природных соединений в водных растворах до настоящего времени остаются до конца не выясненными из-за сложностей установления или систематизации структур многочисленных, зачастую мало стабильных, продуктов, получающихся в ходе таких процессов. Причиной сложностей установления состава продуктов окисления органических соединений является невысокая структурная информативность точнее – его ключевой стадии – ВЭЖХ-МС a анализа, ионизации электрораспылением. Во многих случаях это определяет целесообразность характеристики процессов окисления относительно простых модельных соединений в аналогичных условиях. Так, для моделирования процессов окисления органических соединений кислородом воздуха в водных средах нами в качестве такого объекта выбран 4-изопропилфенол 71. На многих примерах продукты ранее было показано, что электрохимического окисления органических соединений и их свободнорадикального окисления (кислородом воздуха) часто идентичны. Поэтому в дополнение к окислению растворенным кислородом воздуха рассмотрено электрохимическое окисление этого же алкилфенола 71.

Уточнение состава продуктов окисления органических соединений на примерах *о-*, *м-*, *n-*крезолов и 4-изопропилфенола при их взаимодействии с хлоридом железа (III), представляющее интерес для объяснения образования димерных продуктов окисления природных флавоноидов в водных растворах растворенным кислородом воздуха, а также необычных электрохимических реакций фенолов, также входило в число задач настоящей работы.

Часть работы посвящена изучению свободнорадикального окисления кверцетина 57 кислородом воздуха в водных растворах, что является

логическим следствием характеристики продуктов окисления 4изопропилфенола и *о*-, *м*-, *n*-крезолов.

Информация 0 природе и механизмах образования продуктов электрохимических превращений пестицидов необходима, так как позволяет охарактеризовать механизмы их распада в почве, водных средах и растениях. Электрохимическое моделирование окисления органических соединений позволяет ускорять наблюдаемые процессы и, тем самым, увеличивать количество регистрируемых продуктов. В настоящей работе рассмотрена совокупность электрохимических процессов с участием пестицидов дифеноконазола и крезоксим-метила.

# 4.1. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация необычных продуктов окисления 4-изопропилфенола кислородом воздуха в водных растворах

Как правило, органических соединений растворенным окисление кислородом (основное состояние – триплет <sup>3</sup>S<sub>g</sub><sup>-</sup>) подчиняется закономерностям свободнорадикальных реакций, первой сталией которых является элиминирование наиболее реакционноспособных атомов водорода (преимущественно при третичных атомах углерода, в бензильных или в αположениях к гетероатомам) с образованием пероксидных радикалов RO<sub>2</sub>. (схема 4.1).

### Схема 4.1

$$RH \xrightarrow{+O_2}_{-HO_2} [R'] \xrightarrow{+O_2} [RO_2'] \longrightarrow ...$$

Известные схемы окисления наиболее распространенного природного флавоноида кверцетина 57 [48, 49] в качестве первой стадии предполагают

подобный процесс с участием атома водорода в положении 2 пиранового фрагмента его таутомерной формы 57\* (схема 4.2).



Систематизация (рассматриваемая в качестве самостоятельной, но ранее не классифицируемой операции идентификации) ранее известных продуктов окисления кверцетина целью соотнесения с ИХ структур С хроматографическими пиками [49] показала, что из 57 обнаруженных компонентов половина (28) осталась неидентифицированной, а однозначно опознать удалось только восемь. Среди выявленных продуктов окисления выявлены малостабильные пероксиды и гидропероксиды, нестабильные полукетали, гидратные и енольные формы, препаративное выделение которых из водных растворов практически невозможно. Кроме того, в смесях продуктов окисления флавоноидов даже при их крайне малых концентрациях в водных растворах часто присутствуют димеры и тримеры [49], механизмы образования определяет целесообразность которых остаются дискуссионными. Это характеристики процессов окисления более простых модельных соединений в аналогичных условиях.

Выбираемые объекты должны содержать атомы водорода при третичных атомах углерода. Простейшее соединение, соответствующее этому условию, – изопропилбензол (растворимость в воде, *S* (моль/л) при 20 °C, p*S* =  $-\log S = 3.39 \pm 0.01$ , т. е. около 0.1 г/л). Однако этот гидрофобный углеводород (log*P* 3.66 ±

0.20 [50]) обладает заметной летучестью (давление паров при 20°С равно 3.3 мм рт. ст.), что приводит к его значительным потерям при контакте водных растворов с воздухом, особенно при барботировании воздуха. Второй проблемой оказывается детектирование образующихся продуктов (в их числе обнаружены фенол, диметилфенилкарбинол, бензойная кислота И гидропероксид кумола [51]), для которых предпочтительнее использовать УФ детектор, поскольку масс-спектрометрическая (ВЭЖХ-МС) регистрация сигналов как положительных, так и отрицательных ионов соединений, не фенольных содержащих гидроксильных групп, В режиме электрораспылительной ионизации малоэффективна.

По указанным причинам в качестве модельного соединения для характеристики процессов свободнорадикального окисления кислородом растворах предпочтительным представляется воздуха В водных более гидрофильный по сравнению с кумолом и менее летучий 4-изопропилфенол (logP 2.90±0.02, S ~ 1.1 г/л). Помимо изложенного выше, такое соединение представляет самостоятельный интерес, поскольку моделирует поведение 4замещенных алкилфенолов (4-октил-И 4-нонил-), относящихся к экотоксикантам [52]. Далее будет изложено обсуждение результатов хроматомасс-спектрометрической (ВЭЖХ-ЭР-МС) идентификации продуктов окисления 71, рассматриваемого в качестве модельного объекта для объяснения процессов окисления более сложных соединений кислородом воздуха в водных растворах.

Поскольку природа и свойства продуктов окисления 71 кислородом воздуха в водных растворах в щелочной среде (pH ~10) до их идентификации *априори* были не очевидны, для уменьшения вероятности их «пропусков» в режиме электрораспыления использовали режимы детектирования как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. В первом из них на хроматограммах регистрируется значительное число пиков, большая часть

которых относится к фоновым сигналам примесей, которые могут быть выявлены и исключены из рассмотрения в результате параллельного анализа проб, не содержащих характеризуемого компонента или при варьировании его содержания в растворах. В результате для последующего рассмотрения остается незначительное число продуктов окисления, существенно меньшее, чем в случае кверцетина [49], что соответствует большей селективности окисления 4-изопропилфенола.

В таблице 4.1 приведены времена удерживания ( $t_R$ ) основных продуктов окисления 4-изопропилфенола в двух режимах разделения (I и II), значения линейно-логарифмических индексов удерживания в режиме II (реперные соединения – *н*-алкилфенилкетоны), а также массовые числа ионов [M+H]<sup>+</sup> в режиме регистрации положительно (обозначены символом «+») и отрицательно заряженных ионов [M–H]<sup>-</sup> (символ «–»). Если в масс-спектрах присутствуют интенсивные сигналы осколочных ионов, их массовые числа указаны и интерпретированы дополнительно.

### Таблица 4.1

<i>t</i> <sub>R</sub> , мин (I)	<i>t</i> <sub>R</sub> , мин (II)	RI (II)	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup> или [M–H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> фрагментных ионов)	Соединение
1.5	-		(+) 151 (110 [M + H - C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ])	$C_9H_{12}O - 2H + [O]$
				(структура не установлена)
1.7	-		(+) 151 (110 [M + H - C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ])	$C_9H_{12}O - 2H + [O]$
				(структура не установлена)
16.6 <sup>a</sup>	12.1	929	(-) 135	4-Изопропилфенол
			(+) 137 (95 [M + H – C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ])	(исходный)

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

17.6	-	-	(+) 222 (177, 149)	Диэтилфталат
22.7	18.9	1266	$(-) 269 (225 [M - H - C_3H_8])$	4-Изопропил-3-(4-
				изопропилфенокси)фенол
24.1	-	-	(+) 279 (205, 149)	Дибутилфталат

Примечание: a) Времена удерживания главных компонентов реакционных смесей указаны *курсивом*.

Даже небольшое число перечисленных компонентов наглядно иллюстрирует существенные различия в информативности регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов. Так, соединения с временами удерживания 17.6 и 24.1 мин (режим I) представляют собой диэтил- и дибутилфталаты – широко применяемые пластификаторы [53], попадающие в образцы чаще всего из хранящейся в пластиковой таре дистиллированной воды. Однако эти компоненты, не содержащие функциональных групп с активными атомами водорода, регистрируются при детектировании только положительных ионов.

Два гидрофильных компонента со временами удерживания 1.5 и 1.7 мин (режим I) с M = 150 принадлежат изомерным продуктам двухстадийного окисления 71: 136(C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O) – 2(2H) + 16(O) = 150(C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>) или 136(C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O) – 2(2H) + 18(H<sub>2</sub>O) – 2(2H) = 150(C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>). Теоретически для таких продуктов можно предположить три вероятных структуры: *о*-хиноновую и две хинонметидных. Еще одним компонентом в смеси продуктов окисления 4изопропилфенола в мягких условиях оказывается гидрофобное соединение с  $t_R$ 22.7 (режим I) и 18.9 мин (режим II), формально соответствующее димеру 136(C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O) – 1(H)×2 с молекулярной массой 270 Да (регистрируется только при детектировании отрицательно заряженных ионов). Образование подобного димера в достаточно разбавленных водных растворах (0.8 – 1.0 мг/мл = 5.7 – 7.4 ммоль/л) требует специальных комментариев. Исходный 4-изопропилфенол 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 71 кислородом воздуха наблюдается лишь при приближении pH раствора к значению pK<sub>a</sub> фенола (pK<sub>a</sub> = 10).

По современным представлениям, первой стадией взаимодействия соединений RH, содержащих подвижные атомы водорода при третичных атомах углерода, является образование свободных радикалов R· и, далее, пероксидных радикалов RO<sub>2</sub>, гидропероксидов RO<sub>2</sub>H и других продуктов (схема 4.1). В молекуле 4-изопропилфенола таким атомом водорода является αатом водорода изопропильной группы. Можно предположить, что в случае 4изопропилфенола 71 первично образующиеся радикалы 72 могут стабилизироваться и иным способом – с образованием нестабильных промежуточных интермедиатов, относящихся к классу хинон-метидов, для 4изопропилфенола это 4-(1-метилэтенил)циклогекса-2,5-диен-1-он 73 (схема 4.3).

Схема 4.3



При отсутствии заместителей в *пара*-положении к гидроксильной группе фенолы при окислении образуют *пара*-бензохиноны [54]. Хинон-метиды как интермедиаты разнообразнее всего представлены в химии лигнина [55]; их наиболее характерным химическим свойством, также как их структурных аналогов – хинонов [56, 57], является присоединение нуклеофильных реагентов (нуклеофильное сопряженное присоединение). Сопряженное присоединение нуклеофильных реагентов NuH к хинон-метидам может протекать в положения 2-, 3- и 5- относительно карбонильной группы, что в случае 71 должно приводить к продуктам: 74, 75, 76 (схема 4.4). Иногда хинон-метиды позиционируют именно как сшивающие (cross-linking) агенты [58].

### Схема 4.4



Водные растворы 4-изопропилфенола содержат два потенциальных нуклеофильных реагента: воду и исходный 4-изопропилфенол. Если нуклеофильным реагентом является исходный 71, это должно приводить к образованию изомерных 77, 78, а также 79 с M = 270 (схема 4.5).

#### Схема 4.5



Единственным продуктом окисления 71 в мягких условиях оказывается гидрофобное соединение с  $t_{\rm R}$  22.7 (режим I) и 18.9 мин (режим II), соответствующее димеру с молекулярной массой 270 Да 2×136(C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O)–2, регистрирующееся только при детектировании отрицательно заряженных ионов). Появление такого продукта согласуется со свойствами промежуточного хинон-метида 73, а именно его последующим взаимодействием с исходным фенолом 71 (схема 4.5). Поскольку в составе продуктов окисления

присутствует лишь один из возможных изомеров (схема 4.5), то уточнение его только хроматомасс-спектрометрического структуры средствами анализа невозможно. Если бы удалось зарегистрировать все изомеры, то ИХ бы идентификация была возможна основании либо на порядка хроматографического элюирования (по увеличению гидрофобности), либо их относительной стабильности (оценки энергий основных состояний), либо обоих критериев в совокупности.

### 4.2. ВЭЖХ-МС разделение и детектирование продуктов окисления диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов в реакционных смесях 1алканолов с трихлоридом фосфора.

Производные фосфорсодержащих кислот широко применяют В промышленности в качестве детергентов, пестицидов, антиоксидантов, стабилизаторов полимеров, антипиренов (огнезащитных добавок) и др., что определяет актуальность контроля содержания таких соединений в природных и сточных водах, пищевых продуктах, биологических жидкостях и иных объектах [59, 60]. Синтезированы уникальные представители этой группы, в том числе *mpuc*-(нонилфенил)фосфит (тривиальное название Naugard P), *mpuc*-(2,4-ди-трет-бутил-фенил)фосфит (Irgafos 168). трис-(биснонилфенил)фосфит),3,9-бис-октадецилокси)-2,4,8,10-тетраокса-3,9-дифосфаспиро[5.5]ундекан (добавка 14) и другие. Фосфорсодержащие фрагменты молекул: (-О)<sub>3</sub>Р=О, (-О)<sub>3</sub>Р, (-О)<sub>2</sub>РН=О и т.п. представляют собой «плохие» хромофоры (с низкими экстинкциями), вследствие чего анализ подобных соединений, не содержащих арильных заместителей, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием не получил широкого распространения. Чаще всего для них применяют сочетания газохроматографического разделения (в том числе с предварительной дериватизацией) и масс-спектрометрического детектирования [61, 62]. При использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии масс-спектрометрические способы детектирования (сочетания ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС-МС и др.) также предпочтительны [63-65].

Одна из целей настоящей работы состояла в оценке целесообразности и возможностей определения аналитических параметров диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов методом ОФ ВЭЖХ на примере реакционных смесей 1-бутанола и 1-гептанола с PCl<sub>3</sub>.

На рисунке 4.1 приведена хроматограмма реакционной смеси 1-бутанола PCl<sub>3</sub>, записанная по суммарному ионному току при регистрации с положительно заряженных ионов в диапазоне *m/z* 125-500. Выбор нижней границы диапазона *m/z* обусловлен необходимостью исключения сигнала такого компонента реакционных смесей как N,N-диметиланилин (M = 121), добавляемого для регулирования их рН. Индекс удерживания этого соединения в обращенно-фазовой ВЭЖХ равен 907 ± 4, так что интенсивный пик этого амина (сигнал ионов, соответствующих протонированной молекуле [M+H]<sup>+</sup>) в области времен удерживания 4.9-6.0 минут может маскировать сигналы некоторых аналитов. Аналогичная хроматограмма реакционной смеси 1гептанола с PCl<sub>3</sub> воспроизведена на рисунке 4.2. Обе хроматограммы соответствуют уровню интенсивности сигналов ~ $(1-5) \times 10^8$  усл. ед.

Результаты интерпретации однозначно идентифицированных основных компонентов реакционных смесей представлены в таблице 4.2. Включенные в нее компоненты обозначены символом «\*» на рисунках. Поскольку подробный состав реакционных смесей предварительно был определен методом ГХ-МС [46], то идентификация основных компонентов структурно малоинформативным методом ВЭЖХ-МС фактически представляет собой соотнесение набора ожидаемых компонентов с аналитическими параметрами в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ.



**Рисунок. 4.1.** Хроматограмма реакционной смеси 1-бутанола с  $PCl_3$  по суммарному ионному току (m/z = 125-500) в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Символом «\*» обозначены пики идентифицированных компонентов, указанные в таблице 4.2.



**Рисунок. 4.2.** Хроматограмма реакционной смеси 1-гептанола с  $PCl_3$  по суммарному ионному току (m/z = 125-500) в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Символом «\*» обозначены пики идентифицированных компонентов, указанные в табл. 4.2.

### Таблица 4.2

Однозначно идентифицированные основные компоненты реакционных смесей 1-бутанола и 1-гептанола с PCl<sub>3</sub>

1- Алкан ол	<i>t</i> <sub>R</sub> , мин	RI	$m/z$ $[M+H]^+$	<i>m/z</i> других ионов	Результат идентификации (М)	log <i>P</i> (ACD)
1-Бу-	7.1	1014	239	183 = 239 - 56	$(C_4H_9O)_2(C_2H_5O)P + [O] \rightarrow$	3.20 ±
танол				127 = 183 - 56	(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O) <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)P=O (238)	0.30
				99 = 127 - 28		
				261 = 238 + 23		
	10.7	1164	267	211 - 267 - 56	$(C_4H_9O)_3P + [O] \rightarrow$	4.26 ±
				155 = 211 - 56	(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O) <sub>3</sub> P=O (266)	0.30
				99 = 155 - 56		
				289 = 266 + 23		
1-Геп-	5.4	932	279	181 = 279 - 98	Предположительно,	4.98 ±
танол					(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O) <sub>2</sub> P-OH (278)	0.58*
	6.1	967	295	197 = 295 - 98	$(C_7H_{15}O)_2PH=O+[O] \rightarrow$	5.39 ±
					(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O) <sub>2</sub> PO-OH (294)	0.58
	16.0	1360*	279	181 = 279 - 98	(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O) <sub>2</sub> PH=O (278)	5.07 ±
		*		301 = 278 + 23		0.19
	17.8	1423	323	225 = 323 - 98	$(C_7H_{15}O)_2(C_2H_5O)P + [O] \rightarrow$	6.39 ±
				127 = 225 - 98	$(C_7H_{15}O)_2(C_2H_5O)P=O(322)$	0.30
				345 = 322 + 23		

20.7	1521	393	295 = 393 - 98	$(C_7H_{15}O)_3P + [O] (392)$	8.64 ±
			197 – 295 – 98		0.20
			415 = 392 + 23		
22.4	1578	393	295 = 393 - 98	$(C_7H_{15}O)_3P + [O] \rightarrow$	9.05 ±
			197 = 295 - 98	(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O) <sub>3</sub> P=O (392)	0.30
			415 = 392 + 23		

Примечание: \* – алгоритм ACD дает для этого соединения явно завышенную величину 7.97  $\pm$  0.63; приведенное значение вычислено исходя из log*P* = 5.39  $\pm$  0.58 для (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>O)<sub>2</sub>PO-OH и инкремента -0.41 для трансформации структуры (RO)<sub>3</sub>P=O, -(RO)<sub>3</sub>P; \*\* – курсивом набраны значения RI, превышающие значение RI последнего из используемых реперных компонентов (бутирофенон, RI = 1000) более чем на 200 ед. индекса, которые можно рассматривать лишь как ориентировочные.

В реакционной смеси 1-бутанола с PCl<sub>3</sub> идентифицированы (в порядке их газохроматографического удерживания) 2-бутокси-2,1,3-диоксафосфолан (M = 164), бутилдиэтилфосфит (194), бутилэтилфосфонат (166), дибутилэтилфосфит (222), дибутилфосфонат (194) и трибутилфосфит (250) [46]. Достаточно неожиданно, что ни одно из перечисленных соединений не было обнаружено методом ВЭЖХ-МС, что может быть обусловлено несколькими (минимум Первая невозможность образования двумя) причинами. ионов, соответствующих протонированным молекулам [М+Н]<sup>+</sup>, из-за низкого сродства аналитов к протону – представляется маловероятной, поскольку даже ограниченное число известных справочных значений энергий сродства к протону [66, 67] позволяет сделать вывод, что для фосфорсодержащих веществ они сравнимы по величине с величинами для соединений, не содержащих фосфор. Несколько значений энергий сродства к протону приведены в таблице 4.3.
Сродство некоторых фосфорсодержащих соединений к протону, кДж/моль

## [66,67]

Тип соединений	Соединение	Сродство к протону, кДж/моль	
Содержащие фосфор	(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> PO	887	
	$(C_2H_5O)_3PO$	909	
	(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> PH=O	895	
	(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> P	923	
	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> P	950	
	$(C_2H_5)_3P$	969	
Не содержащие фосфор	С <sub>6</sub> Н <sub>6</sub> (бензол)	$748 \pm 2$	
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	882	
	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	836	

Вместо перечисленных продуктов взаимодействия 1-бутанола с PCl<sub>3</sub> в реакционной смеси были обнаружены два компонента, в масс-спектрах которых регистрируются сигналы ионов с m/z = 239 + 261 и 267 + 289. Минимальные значения *m/z* в каждой паре соответствуют ионам [M+H]<sup>+</sup>, тогда как большие превышают их на 22 Да и обусловлены ионами [M+Na]<sup>+</sup>. Формально, ионов натрия в составе элюента нет, но, видимо, их следовые количества, присутствующие даже в специально подготовленной воде, молекулами эффективно фосфорсодержащих захватываются аналитов. Соотнесение найденных значений *m/z* с перечисленными выше молекулярными массами (М) ожидаемых продуктов взаимодействия 1-бутанола с PCl<sub>3</sub> показывает, что они равны  $M[(C_4H_9O)_2(C_2H_5O)P]+16$  и  $M[(C_4H_9O)_3P]+16$ , т.е. продуктов окисления триалкилфосфитов. молекулярным массам Таким образом, второй причиной невозможности обнаружить ожидаемые продукты взаимодействия представляется их окисление либо при хранении реакционных

смесей, либо в процессе анализа, например на стадии электрораспылительной ионизации.

Продукты окисления эфиров кислот фосфора (III) кислородом воздуха реакционной смеси 1-бутанола с PCl<sub>3</sub> ранее не были обнаружены [46]. Однако их образование нельзя исключить при хранении образцов в контакте с воздухом, так как равновесные концентрации атмосферного кислорода (часто «растворимость») органических используют термин В растворителях значительно выше, чем в воде (~9.2 мг/л при 20 °C) [68]. Кроме того, их появление согласуется с применением фосфитов в качестве антиоксидантов. Если это так, то время от момента приготовления образцов до их анализа должно быть минимальным, а в нашем случае оно составляло около двух Другой недель. возможностью представляются электрохимические превращения аналитов В процессе электрораспылительной ионизации. Возможность восстановления органических соединений в таких условиях обсуждали в литературе [69-71], но к однозначным выводам придти не удалось, так что подобные предположения остаются дискуссионными [72]. В работе [73] для их проверки специально был синтезирован и проанализирован оксим ацетофенона, но его восстановление в условиях электрораспыления не подтверждено. В нашем же случае речь идет о возможности протекания альтернативных процессов, а именно об окислении фосфитов в процессе анализа. Однако доказательство или опровержение этого предположения требует дополнительных экспериментов, специальных поэтому ΜЫ ограничились только предположением.

Масс-спектр дибутилэтилфосфата (компонент с  $t_{\rm R} = 7.1$  минуты) приведен на рисунке. 4.3. Массовые числа основных ионов соответствуют отщеплению от ионов [M+H]<sup>+</sup> последовательно двух олефиновых фрагментов C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> и, на последней стадии, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, т.е. 239 – 56 = 183; 183 – 56 = 127; 127 – 28 =

74

99. Такая совокупность процессов приводит к ионам  $[P(OH)_4]^+$  с m/z = 99, характеристичным для алкилфосфатов.



**Рисунок. 4.3.** Масс-спектр компонента реакционной смеси 1-бутанола с PCl<sub>3</sub> со временем удерживания 7.1 минуты (дибутилэтилфосфат). Числа над пиками – значения *m/z*, округленные до целых величин.

Помимо перечисленных продуктов в смеси обнаружено несколько неидентифицированных соединений. Так, в масс-спектре компонента с временем удерживания 10.2 минуты (достаточно заметный пик на хроматограмме) присутствуют признаки наличия атома хлора в молекуле (изотопные пики с соотношением интенсивностей 3 : 1).

Базируясь на аналогичной логике рассуждений, в реакционной смеси 1 гептанола с PCl<sub>3</sub> в которой в интервале времен удерживания 5.4 - 22.4 минуты обнаружены шесть фосфорсодержащих соединений. Все они дают надежно регистрируемые сигналы ионов, соответствующих протонированным молекулам [M+H]<sup>+</sup>, а большинство – дополнительные сигналы ионов [M+Na]<sup>+</sup>. Однако только одно из них ( $t_R = 16.0$  минут) соответствует ожидаемому продукту реакции – дигептилфосфонату ( $C_7H_{15}O_2PH=O$  с M = 294. При этом в реакционной смеси присутствует еще один компонент с такой же молекулярной массой, имеющий значительно меньшее время удерживания ( $t_R = 5.4$  минуты). Это может быть связано с его существенно большей гидрофильностью,

обусловленной, например, свободной гидроксильной группой. Если так, то можно предположить, что этим компонентом является изомер дигептилфосфоната, а именно «классический» дигептилфосфит (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>O)<sub>2</sub>P-OH.

Вопрос о возможности таутомерного равновесия:  $(RO)_2P-OH \Leftrightarrow (RO)_2PH=O$  остается дискуссионным до настоящего времени. Заметим, что прототропные таутомеры диалкилфосфонатов ранее никогда не обнаруживали в результате газохроматографического анализа. Однако существует некоторая вероятность того, что они могут регистрироваться в условиях анализа методом ВЭЖХ, не предполагающего нагревания образцов.

компоненты реакционной смеси 1-гептанола Остальные PCl<sub>3</sub> С представляют собой продукты окисления дигептилфосфоната ( $t_{\rm R} = 6.1$  мин), дигептилэтилфосфита (t<sub>R</sub> = 17.8 мин) и тригептилфосфита (t<sub>R</sub> = 22.4 мин). Особый интерес представляет собой пара компонентов с временами удерживания 20.7 и 22.4 минуты, массы ионов [М + Н]<sup>+</sup> которых одинаковы (m/z = 393), а масс-спектры практически идентичны. Поскольку только один из них (второй) можно приписать продукту окисления – тригептилфосфату, то происхождение первого нуждается в специальных комментариях. Скорее всего (по параметрам удерживания) он соответствует тригептилфосфиту, который окисляется до соответствующего фосфата в условиях электрораспылительной ионизации. Тем не менее, как было отмечено выше, возможность окисления аналитов в таких условиях требует дополнительного подтверждения.

Окисление дигептилфосфоната ( $C_7H_{15}O$ )<sub>2</sub>PH=O приводит к образованию дигептилфосфата ( $C_7H_{15}O$ )<sub>2</sub>P(=O)-OH. Ранее было показано, что газохроматографическое определение подобных кислых эфиров фосфорной кислоты без предварительной дериватизации невозможно [74]. Следовательно, если этот эфир и присутствовал в реакционной смеси, то он не мог быть выявлен средствами ГХ-МС анализа, тогда как на определение таких эфиров в условиях ОФ ВЭЖХ не существует никаких ограничений. В масс-спектре компонента с временем удерживания 10.7 минуты присутствуют признаки наличия двух атомов хлора (изотопные пики с соотношением интенсивностей 9 : 6 : 1), однако он остался не идентифицированным.

Анализ обоих образцов при детектировании отрицательно заряженных ионов не привел к регистрации и идентификации каких-либо компонентов. При этом уровень интенсивностей сигналов [~(1-1.5)×10<sup>7</sup> усл. ед.] оказался на порядок меньшим, чем при детектировании положительных ионов. Следовательно, анализ подобных образцов целесообразен при детектировании именно положительно заряженных ионов.

Для подтверждения правильности идентификации для всех компонентов реакционных смесей с использованием модифицированной аддитивной схемы, реализованной в программном обеспечении ACD, вычислены значения факторов гидрофобности logP. Порядок элюирования аналитов в обращенно-ВЭЖХ фазовой соответствует возрастанию их гидрофобности И. следовательно, увеличению значений logP. Как следует из таблицы 4.2, это условие выполняется во всех случаях, за исключением пары компонентов  $(C_7H_{15}O)_2$ PO-OH ( $t_R = 6.1$  минуты,  $\log P = 5.39 \pm 0.58$ ) и ( $C_7H_{15}O)_2$ PH=O ( $t_R = 16.0$ минут,  $\log P = 5.07 \pm 0.19$ ). Однако, учитывая невысокую точность оценок  $\log P$ по аддитивным схемам, особенно для соединений разных классов, такие незначительные несоответствия можно считать допустимыми.

Таким образом, в результате ВЭЖХ-МС анализа реакционных смесей двух 1-алканолов (1-бутанола и 1-гептанола) с трихлоридом фосфора в присутствии N,N-диметиланилина для регулирования pH, в их составе преобладали продукты окисления производных P(III) до производных P(V), а именно соответствующие триалкилфосфаты (RO)<sub>3</sub>P=O. Из чего можно сделать вывод о протекании окисления производных P(III) кислородом воздуха при их хранении.

# 4.3. Хроматомасс-спектрометрическое определение продуктов окисления алкилфенолов хлоридом железа (III)

При действии FeCl<sub>3</sub>, водный раствор фенола приобретает интенсивную красно-фиолетовую окраску ( $\lambda_{\text{макс}} = 558$  нм) [75], исчезающую в кислой среде. По современным представлениям появление окраски связано с образованием комплексных ионов вида [Fe(OAr)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> [76]. Это одна из известнейших в аналитической химии цветных реакций, как на фенолы, так и на ионы Fe<sup>3+</sup>.

С другой стороны, в синтетической органической химии соли железа (III) (как правило, хлорид железа и гексацианоферрат калия) используют как реагенты для окисления фенолов. Такое окисление часто приводит к димерным продуктам [77–79], в том числе с образованием новых связей С–С [78]. Возможность окисления определяется достаточно высоким значением окислительно-восстановительного потенциала процесса:  $\text{Fe}^{3+}_{(водн)} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}_{(водн)} + x\text{H}_2\text{O}$  (+0.77 B).

Основному продукту окисления *n*-крезола хлоридом железа (III) приписывали структуру 4,4а-ди-гидро-8,9b-диметилдибензофуран-3-она *80* (кетон Пуммерера) а 2,6-ксиленола – 3,5,3',5'-тетраметилдифениленхинона *81*.



Для окисления не только фенолов, но и других органических соединений, применяют растворы FeCl<sub>3</sub> в органических растворителях (например, в хлороформе [79]), комплексы с органическими лигандами (например, комплекс с диметилформамидом (ДМФА), [Fe(ДМФА)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>[FeCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>) [80, 81], а также твердый хлорид железа [82]. Один из предложенных для таких процессов

механизмов включает промежуточное образование катион-радикальных интермедиатов типа ArO<sup>+.</sup>.

Обращает "неэквивалентность" на себя внимание описаний аналитических и препаративных аспектов действия хлорида железа(III) на фенолы. Однако они не противоречат друг другу: при непосредственном смешении растворов фенолов и FeCl<sub>3</sub> действительно образуются окрашенные продукты, но спустя несколько часов растворы обесцвечиваются и из них выпадают осадки продуктов окисления. Задачей настоящей работы является ВЭЖХ уточнение состава таких продуктов методом с массспектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) на примерах о-, м-, пкрезолов и 4-изопропилфенола, что представляет интерес для объяснения образования димерных продуктов окисления природных флавоноидов в водных растворах растворенным кислородом воздуха [48, 49], а также необычных электрохимических реакций фенолов [83].

Специальное рассмотрение состава продуктов окисления 4изопропилфенола в водных растворах растворенным кислородом воздуха при pH  $\approx pK_a$  [83] показало, что основные продукты этой реакции согласуются с образованием таких интермедиатов, как хинон-метиды (схема 4.3).

Сами хинон-метиды среди продуктов окисления не обнаружены из-за их высокой реакционной способности. Их важнейшим химическим свойством является сопряженное присоединение нуклеофильных реагентов (NuH) [55, 58], которое может протекать в положения 2-, 3- и 5-относительно карбонильной группы (схема 4.4).

Нуклеофильное присоединение исходного 4-изопропилфенола приводит к формально димерным продуктам окисления. В отсутствие других нуклеофильных реагентов могут получаться продукты присоединения воды. Присоединение хинон-метидами нуклеофильных реагентов, аналогичное

79

свойствам хинонов и хинон-иминов [56, 57], объясняет легкость образования так называемых "димерных" продуктов окисления природных флавоноидов даже в разбавленных водных растворах. Следует заметить, что аналогичные реакции (восстановление хинонов и хинон-иминов бисульфитом натрия) составляют основу химии фотографических процессов [84].

Оптимальным по чувствительности и селективности способом массспектрометрического детектирования соединений фенольной природы в методе ВЭЖХ-МС представляется электрораспылительная ионизация с регистрацией отрицательно заряженных ионов. Однако даже в таких условиях масс-спектры могут быть сильно искажены сигналами фона прибора и примесей в образцах. По этой причине в современной практике при их представлении (см., например, [49]) принято указывать не все регистрируемые сигналы, а ограничиваться лишь частью наиболее характеристичных из них. Для более детального рассмотрения мы использовали хроматограммы по полному ионному току в сочетании с масс-фрагментограммами по массовым числам ионов [M–1]<sup>-</sup> ожидаемых соединений, приведенные на рисунке 4.4 для продуктов окисления *n*-крезола и на рисунке 4.5 для продуктов окисления 4-изопропилфенола.







**Рисунок 4.4.** Хроматограммы продуктов окисления *n*-крезола по полному ионному току (а) и по выделенным ионам с массовыми числами *m/z* 213 (б), 319 (в), 425 (г), 531 (д) и 637 (е) в режиме элюирования V.







**Рисунок 4.5.** Хроматограммы продуктов окисления 4-изопропилфенола по полному ионному току (а) и по выделенным ионам с массовыми числами *m/z* 269 (б), 403 (в), 537 (г), 671 (д) и 419 (е) в режиме элюирования V.

В таблице 6.1 приложения сопоставлены времена и ИУ главных продуктов окисления хлоридом железа (III) охарактеризованных алкилфенолов, В различных режимах градиентного элюирования детектируемых ПО приведенным значениями *m/z* ионов [M–H]<sup>-</sup>. Помимо указанных, в каждой из реакционных смесей обнаружено несколько минорных компонентов с такими же значениями m/z, относящихся, скорее всего, к изомерам. В качестве ИУ реперных компонентов при вычислении использовали три алкилфенилкетона с ИУ в диапазоне 800-1000, так что бо́льшую часть ИУ (до 84

2000) продуктов вычисляли экстраполяцией. Точность такой операции по мере увеличения ИУ закономерно уменьшается, так что большие значения ИУ следует рассматривать как сугубо ориентировочные. Сравнение состава всех реакционных смесей показывает, что наибольшие количества продуктов окисления, детектируемых в режиме электрораспылительной ионизации по массовым числам ионов [M–H]<sup>-</sup>, наблюдаются для *пара*-замещенных алкилфенолов, что согласуется с концепцией промежуточного образования хинон-метидов. Таблица 6.1 перенесена в приложение, так как приведенная в ней информация, носит справочных характер.

Идентификация продуктов окисления *n*-крезола хлоридом железа (III). На хроматограмме по полному ионному току (рисунок 4.4 a) в условиях наиболее "жесткого" градиентного элюирования (режим V, таблица 6.1 приложения) регистрируются шесть основных пиков с временами удерживания 7.0, 10.4 (максимальный), 13.2, 16.2, 18.3 и 20.0 мин. Первое предположение о химической природе этих продуктов можно сделать в результате использования такого математического (хемометрического) приема, как рассмотрение первых и вторых конечных разностей [89] их времен удерживания (таблица 4.4).

### Таблица 4.4

$t_{\rm R}$ , МИН	Первые разности	Вторые разности	
7.0			
	3.4		
10.4		0.2	
	3.2		
13.2		0.2	
	3.0		
16.2		0.1	
	2.9		

Первые и вторые разности времен удерживания продуктов окисления *n*-крезола

18.3		0.2
	2.7	
20.0		

Математический смысл постоянства вторых разностей состоит в том, что рассматриваемый набор значений t<sub>R</sub> может быть аппроксимирован полиномом второй степени [85]. Однако этому факту можно придать и химический смысл, а именно: все регистрируемые продукты относятся к соединениям одинаковой химической природы, например, к структурным аналогам. С учетом окисления 4-изопропилфенола в иных [83] результатов условиях И литературных данных среди продуктов окисления фенолов хлоридом железа (III) можно было ожидать присутствия аналогов кетона Пуммерера либо продуктов превращения хинон-метидов. Молекулярные массы этих изомерных соединений равны 2M – 2, где M – молекулярная масса исходного фенола. Заметим, что уже по этому критерию можно исключить образование аналогов дифениленхинона с массами 2M – 4, так как они соответствуют бо́льшей степени окисления исходных фенолов.

Таким образом, если молекулярная масса первичного "димерного" продукта окисления *n*-крезола равна 108 - 2 + 108 = 214, то он должен регистрироваться на масс-фрагментограмме по массовому числу иона [M–H]<sup>-</sup> с *m/z* 213, что иллюстрирует рисунок 4.4 б. Фрагмент масс-спектра этого компонента приведен на рисунке 4.6а. В нем присутствует достаточно интенсивный сигнал молекулярных ионов с *m/z* 214 и максимальный сигнал ионов  $[M-H]^-$  с m/z 212.8  $\approx$  213. Такое сочетание сигналов типично для ароматических соединений. сопряженных Однако, учитывая низкую структурную специфичность масс-спектров отрицательных ионов, полученных в условиях ионизации электрораспылением, на этом этапе рассмотрения результатов невозможно отдать предпочтение ни структурам типа 80, ни аддуктам хинон-метидов (схема 4.4).



**Рисунок 4.6.** Фрагменты масс-спектров продуктов окисления *n*-крезола в режиме разделения V с временами удерживания 7.0 мин (а) и 18.3 мин (б): (а) – димер с молекулярной массой 214, (б) – «гексамер» с молекулярной массой 638.

Для кетона 80 трудно предположить какие-либо приемлемые направления его дальнейших превращений, так как он не содержит активных атомов водорода, в отличие от аддуктов исходного *n*-крезола и промежуточно образующихся хинон-метидов. Такие аддукты сохраняют способность к последующему окислению с образованием более сложных хинон-метидных интермедиатов, которые снова могут присоединять исходные алкилфенолы. В случае *n*-крезола это позволяет объяснить образование как более гидрофобного продукта с временем удерживания 10.4 мин, так и всех остальных компонентов в результате последовательных циклов окисление/присоединение исходного *n*крезола (схема 4.6).

### Схема 4.6



В результате молекулярные массы серии олигомерных продуктов взаимодействия *n*-крезола с FeCl<sub>3</sub> оказываются равными 108 - 2 + 108 = 214(димер, детектируемый по массовому числу ионов  $[M-H]^-$  с m/z 213, рисунок 4.4 б); 214 - 2 + 108 = 320 (тример, m/z 319, рисунок 4.4 в); 320 - 2 + 108 = 426(тетрамер, m/z 425, рисунок 4.4 г); 426 – 2 + 108 = 532 (пентамер, m/z 531, рисунок 4.4 д) и 532 – 2 + 108 = 638 (гексамер, m/z 637, рисунок 4.4 е). Фрагмент масс-спектра гексамера с молекулярной массой 638, приведенный на рисунке 4.6 б, аналогичен спектру димера (рисунок 4.6 а) с тем лишь отличием, что в нем присутствует заметный сигнал ионов  $[M-107] = [M-CH_3C_6H_4O]^- c m/z$ 531, совпадающий по положению с ионами [М–Н]<sup>-</sup> предыдущего олигомера (пентамера). Аналогичные сигналы регистрируются на всех массфрагментограммах (рисунок 4.4 б-е), причем их интенсивность увеличивается при переходе к каждому последующему продукту окисления. Тем не менее, масс-спектрометрические данные позволяют однозначно провести не структурно-химическое отнесение таких сигналов изомеров с большими временами удерживания. Во-первых, они могут принадлежать ионам [М–107] = [M-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O]- олигомеров с бо́льшими молекулярными массами, однако в этом случае положения их максимумов должны точно совпадать с временами удерживания таких олигомеров. Во-вторых, они могут относиться к изомерам, образующимся в меньших количествах. Если полагать, что основной

присоединению нуклеофильного соответствует реагента компонент В положение 3 относительно карбонильной группы, то изомер с большим временем удерживания может отвечать более гидрофобному (за счет образования внутримолекулярной водородной связи) продукту присоединения в положение 2 (схема 4.4). В случае *n*-крезола значения фактора гидрофобности (logP) составляют для 4-метил-3-(4-метилфенокси)фенола и 4-метил-2-(4метилфенокси)фенола 5.94 ± 0.33 и 6.33 ± 0.32 соответственно (расчетные значения получены с использованием программного обеспечения ACD). Наиболее гидрофильным из возможных продуктов присоединения *n*-крезола к хинон-метиду является 4-[(4-метилфенил)метил]фенол (log $P = 5.09 \pm 0.25$ ), и если основной сигнал принадлежит этому изомеру, то минорный может относиться к какому-либо из двух других.

Во всех этих случаях положения максимумов таких пиков на разных хроматограммах не должны совпадать. Наблюдаемые незначительные отличия времен удерживания не позволяют однозначно говорить о присутствии в реакционной смеси продуктов каждого типа. Более того, на рисунке 4.4 (б–г) отчетливо наблюдается перекрывание нескольких сигналов, что допускает оба варианта интерпретации результатов.

За гексамером с временем удерживания 18.3 мин на хроматограмме (рисунок 4.4 а) регистрируется сигнал еще одного компонента с  $t_{\rm R} = 20.0$  мин, фрагмент масс-спектра которого представлен на рисунке 4.7. Судя по времени удерживания, он должен принадлежать гептамеру с молекулярной массой 744, а не 638, что подтверждается отсутствием в нем сигналов с m/z 638 – 107 = 531. Другим отличием его масс-спектра (рисунке 4.7) от масс-спектров предыдущих олигомеров является незначительная интенсивность пиков молекулярных ионов (не отличимы от фоновых сигналов). Можно предположить, что он принадлежит соединению с вероятной структурой 71 для которой

фрагментация с образованием ионов  $[M - 107] = [M - CH_3C_6H_4O]^-$  с m/z 637 становится преобладающей.



**Рисунок 4.7.** Фрагмент масс-спектра продукта окисления *n*-крезола с временем удерживания 20.0 мин в режиме разделения V.

Помимо олигомерных продуктов, молекулярные массы которых в случае крезолов принадлежат последовательности 108, 214, 320, 426, 536, 638, ..., в реакционных смесях обнаруживаются несколько продуктов с другими массовыми числами. Так, один из продуктов окисления *n*-крезола (M = 442) образуется в результате окисления тетрамера с последующим присоединением воды: 426 - 2 + 18 = 442.

Индексы удерживания являются более информативной характеристикой аналитов чем их времена удерживания [86, 87]. В нашем случае точность ИУ ограничена использованием всего трех реперных компонентов (ацето-, пропиои бутирофеноны), что для гидрофобных аналитов приводит к необходимости вычисления индексов путем экстраполяции в область больших значений времен удерживания. Тем не менее, значения ИУ (RI) продуктов с M = 214, 320 и 426, разности которых составляют ~164 ± 25 (таблица 4.5), характеризуются неплохой аддитивностью и только для двух последних соединений **82**, **83** наблюдаются заметные отклонения, обусловленные как "удаленной" экстраполяцией ИУ, так и, возможно, их соответствием присоединению арильных фрагментов не в бензольное кольцо, а в α-положение к нему.

#### Таблица 4.5

Разности индексов удерживания некоторых продуктов окисления п-крезола

М продукта	214	320	426	532	638	744
RI	990	1151	1292	1482	~1600	~1690
ΔRI		161	141	190	~120	~90

Последовательность циклов окисление/присоединение исходного 71, аналогичная изображенной на схеме 4.6, приводит к образованию продуктов с молекулярными массами 136 – 2 + 136 = 270 (димер, детектируемый по массовому числу ионов [М–Н]<sup>–</sup> с m/z 269, рисунок 4.5 б), 270 – 2 + 136 = 404 (тример, m/z 403, рисунок 4.5 в), 404 – 2 + 136 = 538 (тетрамер, m/z 537, рисунок 4.5 г) и 538 – 2 + 136 = 672 (пентамер, m/z 671, рисунок 4.5 д), принадлежащих последовательности 136, 270, 404, 538, 672, ... Помимо этого среди минорных продуктов окисления обнаружены соединения с молекулярными массами 286 (детектируется по массовому числу ионов [М–Н]<sup>–</sup> с m/z 285), 420 (по массовому числу ионов [М-Н]<sup>–</sup> с m/z 419, рисунок 4.5 е), а также 420 – 2 + 136 = 554 (m/z553). Они представляют собой продукты присоединения воды к димеру (270 – 2 + 18 = 286), тримеру (3 × 134 + 18 = 420) и тетрамеру (4 × 134 + 18 = 554) соответственно. Такой состав соответствует наборам продуктов окисления 71 в водных растворах растворенным кислородом воздуха при рН  $\approx pK_a$  [83].

Как отмечено при рассмотрении продуктов окисления *n*-крезола, основной причиной неопределенности состава является сложность структурного отнесения минорных сигналов на масс-фрагментограммах. Замена метильной группы в *n*-крезоле изопропильным фрагментом позволила

установить, что, по крайней мере для рассматриваемого 4-изопропилфенола, речь идет не о сигналах  $[M-135] = [M-C_3H_7C_6H_4O]^$ более сложных олигомеров, a 0 сигналах разных изомеров. Действительно, на фрагментограмме тримера регистрируется сигнал с  $t_{\rm R} = 20.3$  мин, тогда как основной компонент тетрамера имеет время удерживания 22.0 мин. Аналогично примесь в тетрамере имеет  $t_{\rm R} = 24.0$  мин, а для пентамера  $t_{\rm R} = 25.9$ мин. Таким образом, можно утверждать, что при окислении алкилфенолов FeCl<sub>3</sub> каждая группа продуктов превращения хинон-метидов содержит несколько изомеров.

Закономерности формирования состава продуктов окисления *о-* и *м*крезолов аналогичны рассмотренным на примерах *n*-крезола и 4изопропилфенола.

Таким образом, на основании результатов идентификации продуктов окисления алкилфенолов хлоридом железа (III) можно утверждать, что их состав аналогичен составу продуктов окисления алкилфенолов кислородом воздуха в водных растворах. Основные из них соответствуют присоединению исходных фенолов к промежуточно образующимся реакционноспособным интермедиатам – хинон-метидам.

# 4.4. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация необычных продуктов электрохимического окисления 4-изопропилфенола в водных растворах

Для наиболее подробно изученного из природных флавоноидов кверцетина известно, что наборы продуктов его свободнорадикального (растворенным кислородом воздуха), ферментативного и электрохимического окисления во многом сходны [88], что предопределяет как возможность их

92

сравнения, так и моделирования процессов окисления. По этой причине в качестве дополнения к свободнорадикальному представляется целесообразным рассмотреть электрохимическое окисление 71. Если первичным интермедиатом и в этом случае является соответствующий хинон-метид, то возможен процесс, изображенный на схеме 4.7.

Схема 4.7



Фенолы относятся к электрохимически активным компонентам, что позволяет применять для их детектирования в ВЭЖХ электрохимические детекторы [89, 90]. При этом, в отличие от химических процессов, степень конверсии аналитов 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 [91–94]. Установлено, что потенциалы до 1.5 В не обеспечивают приемлемую степень конверсии 71, а их увеличение до 3.0 В позволило зарегистрировать более десятка продуктов окисления.

В таблице 4.6 приведены времена удерживания продуктов электрохимического окисления 71 (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 logP (программное обеспечение ACD), используемые контроля последовательности хроматографического ДЛЯ

93

элюирования. Для исходного 71 указано экспериментальное значение logP, изомеры охарактеризованы диапазонами вариаций этого параметра.

## Таблица 4.6

Аналитическая информация для компонентов, обнаруживаемых в результате электрохимического окисления *71* в водном растворе при pH ~7.4 (режим разделения II): времена удерживания, индексы удерживания, массовые числа сигналов [M–H]<sup>-</sup> и (в скобках) главных фрагментных ионов в режиме AutoMS/MS (выборочно с интерпретацией), значения logP

t <sub>R</sub> , DI		$m/z [M-H]^-$ ,		1 D	
МИН	мин ( <i>m/z</i> фрагментных ионов)		Соединение	logP	
			4-изопропилнирокатехин или 4-		
9.2*	822	151 (110 [M–H–C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ], 82)	ч-изопропилирокатехии или +- изопропилрезорнин**	2.22	
12.1	929	135	4-изопропилфенол ( <i>исходный</i> )**	2.90	
			изомер лигилрокси-(4-	5.01-	
12.3	937	285 (267 [M–H–H <sub>2</sub> O])	изопропилфенокси)изопропилбензола	5.78	
12.8	959	419 (391 [M–H–H <sub>2</sub> O], 373, 347,	изомер дигидрокси-бис-(4-	8.04–	
12.0		305, 221, 203, 187, 139)	изопропилфенокси)изопропилбензола	8.93	
	006		изомер дигидрокси-(4-изопропил	5.01-	
13.4	986	$285 (242 [M-H-C_3H_7])$	фенокси)изопропилбензола	5.78	
15.7	1097	269 (226 [M–H–C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ])	4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-	5.09	
			метилэтил]фенол**		
17.0	1164	285 (267 [M–H–H <sub>2</sub> O], 257, 242,	изомер дигидрокси-(4-изопропил	5.01-	
17.0	1164	221)	фенокси)изопропилбензола	5.78	
		410 (401 [M H H-O] 383	HOMED THEN THORSE AND A HOMEDOTHE	8.04	
17.5	1191	$(401 [101 - 11 - 11_20], 583, 343)$	менокси)изопропилбензола	8.04- 8.93	
		515)		0.75	
18.0	1217	419 (401 [M–H–H <sub>2</sub> O], 383,	изомер дигидрокси-бис-(4-изопропил	8.04–	
10.0	1217	203)	фенокси)изопропилбензола	8.93	
10.0	1000	269 (251 [M–H–H <sub>2</sub> O], 225 [M–	4-изопропил-3-(4-	( 22	
18.9	1266	$H-C_3H_8])$	изопропилфенокси)фенол**	6.33	
10 /	1204			0.04	
19.4	1294	419 (401 [M–H–H <sub>2</sub> O], 376,	изомер дигидрокси-бис-(4-изопропил	8.04–	

		283)	фенокси)изопропилбензола	8.93
20.0	1327	419 (401 [M–H–H <sub>2</sub> O], 376, 283, 265)	изомер дигидрокси-бис-(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-бис-(4-изопропил фенокси)изопропилбензола	8.04– 8.93
21.9	_***	419	изомер дигидрокси-бис-(4-изопропил фенокси)изопропилбензола	8.04– 8.93
23.6	_***	403 (385 [M–H–H <sub>2</sub> O])	изомер 4-изопропил-бис-(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  $RI = a \times logP + b$ ; \*\*\*) Времена удерживания двух элюируемых последними компонентов выходят за пределы области линейного градиента (20 мин); изменение режима элюирования делает невозможным вычисление их индексов удерживания.

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<sub>R</sub> 12.1 мин, продукт присоединения воды к хинон-метиду 73, которому можно приписать структуру 4-изопропилпирокатехина или 4-изопропилрезорцина (М = 152,  $t_{\rm R}$  9.2 мин), минорный продукт присоединения 71 к хинон-метиду – 4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-метилэтил]фенол (M 270, 15.7 =  $t_{\rm R}$ мин) И соответствующий главный продукт такого присоединения – 4-изопропил-3-(4изопропилфенокси) фенол (M = 270,  $t_{\rm R}$  18.9 мин). Все остальные продукты соответствуют более «грубым» уровням групповой идентификации [95] «с точностью» до изомеров с одинаковыми молекулярными массами, в том числе дигидрокси-(4-изопропилфенокси)-изопропилбензолы (М = 286, 3 изомера), дигидрокси-*бис*-(4-изопропилфенокси)изопропилбензолы (М = 420, 7 изомеров) и другие.

В смеси продуктов электрохимического окисления 71 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 77, 78 и 79 (схема 4.5) были оценены методами MM+ и AM-1 (программное обеспечение HyperChem), а значения их факторов гидрофобности  $\log P$  – с использованием программного обеспечения ACD (табл. 4.7).

### Таблица 4.7

Оценки энергий основных состояний продуктов присоединения 71 к хинонметиду 73 с использованием метода молекулярной механики (MM+) и полуэмпирического метода (AM-1) и их факторов гидрофобности (logP)

Изомер	77	78	79
Е(ММ+), кДж/моль	24.6	24.2	4.9
Е(АМ-1), кДж/моль	-4396.1	-4397.6	-4392.7
logP	$6.3\pm0.3$	$5.9\pm0.3$	$5.1 \pm 0.2$

На основании полученных данных можно предположить, что минорный изомер 79, как наиболее гидрофильный (logP = 5.1), должен быть первым по порядку элюирования ( $t_R$  15.7 мин, RI = 1097), а наиболее гидрофобный изомер 77 (logP = 6.3) – последним ( $t_R$  18.9 мин, RI = 1266). Меньшее значение E(AM-1) этого изомера соответствует его преобладанию в смеси продуктов окисления. Относительно же изомера 78 можно заметить, что совпадение его параметров удерживания с параметрами удерживания изомера 77 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 78 либо не образуется в сопоставимых с другими изомерами количествах при присоединении исходного фенола к хинон-метиду 73, либо по сравнению с ними намного быстрее вступает в последующие реакции.

Смесь продуктов электрохимического окисления 71 (таблица 4.6) содержит три изомерных дигидрокси-(4-изопропилфенокси)изопропилбензола с М = 286. Теоретическое число таких изомеров равно шести; регистрация выше, объясняется либо меньшего их числа, как И неодинаковыми вероятностями их образования, либо совпадением параметров удерживания. Они могут образовываться в результате присоединения воды к продуктам последующего окисления димеров 77 и 78 (но не 79, так как этот продукт не содержит атома водорода в заместителе в α-положении к ароматической системе) и характеризуются значениями  $\log P$  в диапазоне 5.0–5.8. И, наконец, в составе продуктов зафиксированы семь соединений с М = 420, представляющие изомерные дигидрокси-*бис*-(4-изопропилфенокси)изопропилбензолы, собой образующиеся в результате нескольких циклов «окисление – присоединение нуклеофильных реагентов». Последний зарегистрированный компонент с М = 404 соответствует одному из изомерных 4-изопропил-бис-(4-изопропилфенокси)фенолов.

На рисунке 4.8 приведена типичная хроматограмма по полному ионному току продуктов электрохимического окисления 71, а на рисунке 4.9 (а-д) масс-(ВЭЖХ-МС, спектры электрораспылительная ионизация, режим отрицательно ионов) детектирования заряженных четырех идентифицированных компонентов. Сравнение масс-спектров разных компонентов небезынтересно в отношении степени их искажения фоном прибора и хроматографической колонки. Сигнал исходного 4-изопропилфенола

97

(масс-спектр 4.9 б) 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 (4.9 д) записан на более «грубой» шкале  $2 \times 10^7$  усл. ед., и, в результате, он практически не искажен фоновыми сигналами.



**Рисунок 4.8.** Типичная хроматограмма по полному ионному току продуктов электрохимического окисления 4-изопропилфенола. Времена удерживания соответствуют данным, представленным в таблице 4.6. Звездочкой обозначен пик исходного 71.





Рисунок **4.9**. Масс-спектры режиме AutoMS/MS В основных идентифицированных электрохимического 4продуктов окисления изопропилфенола: a) 4-изопропилпирокатехин (M = 152,  $t_{\rm R}$  9.2 мин), б) исходного 71 (М = 136,  $t_{\rm R}$  12.1 мин), в) 4-[1-(4-изопропилфенокси)-1-(M = 270, *t*<sub>R</sub> 15.7 мин) и г) 4-изопропил-3-(4метилэтил]фенола изопропилфенокси)фенола (M = 270, t<sub>R</sub> 18.9 мин). Ромбиками отмечены сигналы ионов, подвергаемых последующей фрагментации за счет соударений с атомами гелия.

Окисление 71 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, logP. Поскольку (таблица 4.6) таких соединений всего четыре: 4-изопропилпирокатехин (RI = 822, logP = 2.22), исходный 4-изопропилфенол (RI = 929, logP = 2.90), 4-изопропил-3-(4-изопропил-фенокси)фенол (RI = 1266, logP = 6.33) и 4-[1-метил-1-(4-изопропилфенокси)этил]фенол (RI = 1097, logP = 5.09), то параметры соответствующего уравнения линейной регрессии вычисляют по четырем точкам. Близкая к линейной зависимость RI = alogP + b, (рисунок 4.10) подтверждает правильность идентификации этих соединений. Параметры уравнения линейной регрессии:  $a = 101 \pm 9$ ,  $b = 610 \pm 41$ , r = 0.991,  $S_0 = 30$ .



**Рисунок 4.10.** Зависимость RI =  $a\log P + b$  индексов удерживания в обращеннофазовой ВЭЖХ (RI) от параметров гидрофобности (log*P*) для 4изопропилфенола и трех идентифицированных продуктов его окисления. Параметры уравнения линейной регрессии:  $a = 101 \pm 9$ ,  $b = 610 \pm 41$ , r = 0.991,  $S_0 = 30$ .

## 4.5. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах

# 4.5.1. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация низкомолекулярных продуктов окисления кверцетина

Кверцетин 57 является наиболее распространенным представителем такого класса природных соединений, как флавоноиды, обладает широким спектром биологического действия и антиоксидантной активностью, проявляющейся в способности инактивировать различные активные формы кислорода [96].



Механизм действия 57 как антиоксиданта, несмотря на большое число публикаций, до настоящего времени остается до конца не выясненным, поэтому важно установить и систематизировать структуры продуктов, получающихся при окислении 57, в частности, кислородом воздуха в водных растворах.

Авторами работ [48, 96–110] были идентифицированы многочисленные продукты и установлены некоторые закономерности окисления 57 в различных условиях. Многие продукты ферментативного [97–102], электрохимического [103] и автоокисления (по свободнорадикальному механизму) [48, 104–108] и т.д. в слабощелочной среде совпадают. Следовательно, предположения о структурах продуктов, получающихся при окислении 57, можно использовать для интерпретации масс-спектров веществ, полученных нами, безотносительно к методу окисления, примененному в каждом конкретном случае. В некоторых

условиях среди таких продуктов обнаружены димеры и олигомеры [111, 112]. Задачи настоящей работы включали окисление 57 кислородом воздуха в водных растворах в слабощелочной среде (pH ~ 8–9) в присутствии этанола (для увеличения растворимости кверцетина), хроматомасс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-ЭР-МС-МС) полученной смеси и систематизацию литературных сведений о продуктах окисления для сопоставления с нашими данными.

В результате окисления 57 в водно-спиртовом растворе в слабощелочной кислородом хроматомасс-спектрометрического среде воздуха, анализа полученной смеси, систематизации литературных данных о продуктах окисления 57 и их сопоставления с полученными нами данными, удалось соотнести основные известные продукты окисления 57 с параметрами удерживания зарегистрированных нами компонентов. Типичная обзорная хроматограмма продуктов окисления кверцетина представлена на рисунке 4.11. В интервале времен удерживания 2.9–24.7 мин зарегистрировано 57 продуктов. Продукты окисления 57 и важнейшие параметры для их ВЭЖХ-МС анализа приведены в таблице 6.2 приложения в порядке увеличения времён удерживания; для всех компонентов приведены индексы удерживания (RI). Жирным шрифтом выделены времена удерживания компонентов, обнаруженных во всех реакционных смесях и стабильных при их хранении; курсивом отмечены времена удерживания компонентов, содержание которых в реакционных смесях увеличивается со временем; подчеркнуты времена удерживания нестабильных компонентов, которые могут быть обнаружены в реакционных смесях в течение не более чем трех часов после начала процесса. Массовые числа ионов, пики которых имеют наибольшие интенсивности в масс-спектрах компонентов, перечислены в столбце (m/z)<sub>макс</sub>, в отдельный столбец вынесены массовые числа ионов [М-Н]<sup>-</sup>, в последней графе перечислены массовые числа остальных интенсивных сигналов масс-спектров

продуктов окисления. Приведены предполагаемые в результате сопоставления литературных данных структуры продуктов, названия соединений (IUPAC) и коэффициенты гидрофобности, вычисленные в программах ChemDraw и ACD. Таблица 6.2 перенесена в приложение ввиду её большого объема.



**Рисунок 4.11.** Типичная хроматограмма смеси продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водно-спиртовом растворе (звездочкой обозначен пик кверцетина).

На приведенном ниже рисунке 4.12 изображены структуры некоторых соединений, образующихся в результате окисления кверцетина в водноспиртовом растворе в слабощелочной среде кислородом воздуха.





В смеси продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах были обнаружены соединения следующих классов:

Кислоты. Сопоставление литературных данных с нашими результатами позволяет установить структуры карбоновых кислот, а именно 2,4,6-тригидроксибензойной кислоты ( $t_R$  6.0 мин) 64 и 3,4-дигидроксибензойной кислоты ( $t_R$  6.9 мин) 63. Однако флороглюцин, который упоминается в литературе как продукт декарбоксилирования 64, в нашем случае не был обнаружен, так как декарбоксилирование происходит при нагревании, в том числе при высушивании продуктов окисления [48], а в нашем случае эту операцию мы не проводили.

В смеси продуктов окисления был обнаружен пик неизвестного соединения со временем удерживания 2.9 мин и приведенными в таблице 6.2 приложения главными сигналами масс-спектра. Для этого соединения в результате сопоставления с литературными данными можно предложить две структуры: 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-оксоуксусной кислоты 84 и этил-3,4дигидроксибензоата. Однако наиболее вероятна именно структура кислоты, так как при замене этанола на метанол в составе растворителя положение и относительная интенсивность пика этого продукта на хроматограмме не изменяется. Образование 84 отмечают авторы статьи [103], где описано электрохимическое окисление кверцетина в растворе этанол/натрий-фосфатный буферный раствор (1:1, v/v, pH 7.4). Кроме того, полученные нами результаты позволяют уточнить структуру соединения со временем удерживания 5.2 мин. Можно предположить, что это не этил-2,4,6-тригидроксибензоат, а 2-оксо-2-(2,4,6-тригидрокси-фенил) уксусная кислота 85, (идентифицирована в работе [103]), потому что сигнал ЭТОГО компонента также сохраняется на хроматограмме реакционной смеси, содержащей метанол вместо этанола. Еще одним доводом в пользу наших рассуждений служат расчетные коэффициенты гидрофобности этил-3,4-дигидроксибензоата и этил-2,4,6-тригидроксибензоата: они больше, чем коэффициенты гидрофобности кислот 64 и 63, элюирующихся со временами удерживания 6.0 и 6.9 мин; следовательно, продукты окисления кверцетина с временами удерживания 2.9 мин и 5.2 мин по этому критерию не являются этиловыми эфирами.

Среди продуктов окисления присутствует компонент со временем удерживания 8.8 мин и массовым числом иона [М-Н]<sup>-</sup> = 351. В статье [103] описан продукт с молекулярной массой 352 и структурой 2-карбокси(3,4дигидроксифенил)(гидрокси)метокси-4,6-дигидроксибензойной кислоты **86**. В результате гидролиза соединения **86** могут образовываться **84** и **64**. Кетали и полукетали. В соответствии с литературными данными можно предположить [100, 103, 106, 107], что продукт со временем удерживания 14.7 мин и массовым числом иона [М-Н]<sup>-</sup> = 363 имеет структуру 1-(3,4дигидроксифенил)-2-этокси-2-гидрокси-3-(2,4,6-тригидроксифенил)пропан-1,3диона 87. Доказательством такого предположения является тот факт, что интенсивность пика этого соединения уменьшается в 10 раз на хроматограмме смеси, полученной в растворе, содержащем метанол вместо этанола. Это соединение относится к классу этиловых эфиров кеталей, существующих только в растворах, поэтому его выделение в индивидуальном виде представляется маловероятным.

К этому же типу продуктов относятся обнаруженные нами алфитонин 2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидроксибензофуран-3(2H)-он **65** ( $t_R$  11.1 мин) [100, 102, 106] и 2-(3,4-дигидроксифенил)-2,5,7-тригидроксихроман-3,4дион ( $t_R$  10.3 мин) **88**. Соединения **65** и **88** являются полукеталями и, следовательно, существуют только в растворах.

составе реакционных Пероксиды. смесей был зафиксирован В нестабильный продукт со временем удерживания 9.6 мин, пиками ионов [M-H]<sup>-</sup> = 333 в масс-спектрах и возможной структурой 2-(3,4-дигидроксифенил)-2гидроперокси-5,7-дигидроксихроман-3,4-диона 89. Дальнейшее окисление этого интермедиата может приводить к образованию 2-(3,4-диоксоциклогекса-1,5-диен-1-ил)-2-гидроперокси-5,7-дигидроксихроман-3,4-диона 90, содержание которого в смеси увеличивается со временем. После завершения барботирования кислорода через раствор этот продукт регистрируется в смеси в течение недели и дольше, поэтому его можно считать одним из самых стабильных продуктов этой реакции. Для доказательства его хиноидной структуры реакционная смесь была обработана гидроксиламином. 0 протекании реакции судили по исчезновению пика соединения с массовым числом иона  $[M-H]^{-}$ = 331 на хроматограмме. Параллельно был

106

зарегистрирован УФ-спектр смеси, в которой соединение 2 было основным компонентом; максимум поглощения в этом спектре соответствует 325 нм. Ранее в работе [108] был опубликован спектр смеси, полученной в ходе окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах в щелочной среде, положение максимума в котором составляло 314 нм. Авторы статьи [108] приписывают основному продукту этой смеси хиноидную структуру. При титровании раствора кверцетина с целью установления его константы кислотности [48] был зарегистрирован УФ-спектр смеси продуктов окисления кверцетина при рН 10 с максимумом поглощения 324 нм.

Значительный интерес представляет сравнение двух обсуждаемых в литературе механизмов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах. Первый из них в качестве промежуточного продукта предполагает образование так называемого депсида 2-((3,4-дигидроксибензоил)окси)-4,6дигидроксибензойной кислоты 91 (схема 4.8) [99, 106, 110], второй алфитонина (2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-три-гидроксибензофуран-3(2H)она) 65 [100, 102, 106]. В полученной нами смеси продуктов окисления кверцетина присутствует депсид 91 со временем удерживания  $t_{\rm R}$  12.00 мин (схема 4.8). Однако мы обнаружили и алфитонин (2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидроксибензофуран-3(2Н)-он) 65, время удерживания которого составляет *t*<sub>R</sub> 11.1 мин. Механизм образования алфитонина включает окисление кето-таутомера кверцетина с образованием гидроксильной группы в положении 2 (формально – полукеталь) с последующей его изомеризацией 92 и образованием нового полукеталя 65, содержащего пятичленный цикл вместо шестичленного. Следует заметить, что в составе реакционных смесей были обнаружены три компонента с пиками ионов [М-Н]<sup>-</sup> = 317 в масс-спектрах. Возможно, они относятся к нестабильным интермедиатам 88, 92 (схема 4.9).



Схема 4.8. Механизм окисления кверцетина кислородом воздуха, предполагающий образование депсида *91* в качестве промежуточного продукта.



Схема 4.9. Механизм окисления кверцетина кислородом воздуха, предполагающий образование алфитонина 65 в качестве промежуточного продукта.

В результате окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах, в слабощелочной среде (pH ~ 8–9) в присутствии этанола (для увеличения растворимости), хроматомасс-спектрометрического анализа 108
продуктов реакции и систематизации литературных сведений о продуктах окисления для сопоставления с нашими данными, были установлены основные продукты. Подтверждено, что многие из продуктов окисления кверцетина относятся к таким классам органических соединений как: кетали, полукетали и пероксиды и, следовательно, стабильны только в растворах и не могут быть выделены из водных растворов.

обсуждаемых в литературе механизма Два основных окисления промежуточное образование соединений кверцетина предполагают с «алфитонин». тривиальными названиями «депсид» И Установлено ИХ совместное присутствие в составе продуктов, но отмечена их различная устойчивость и время жизни в растворах.

# 4.5.2. Моделирование механизма образования димерных и олигомерных продуктов окисления флавоноидов с использованием результатов окисления 4-изопропилфенола в водных растворах

Для объяснения образования димерных продуктов, часто обнаруживаемых при окислении природных флавоноидов (в том числе наиболее распространенного из них – кверцетина) даже в разбавленных водных растворах, целесообразно рассмотреть свободнорадикальное И электрохимическое окисление более простого субстрата – 4-изопропилфенола (п. 4.4). Цель настоящей работы состоит в попытке объяснения образования димерных продуктов окисления флавоноидов путем моделирования процесса окисления 57 на примере более простого соединения 4-изопропилфенола.

Известные схемы окисления кверцетина [49, 88] предполагают подобный процесс с участием атома водорода во 2-м положении пиранового фрагмента его таутомерной формы (57\*) (отмечен на схеме 4.2 стрелкой).

Дальнейшие превращения образующихся промежуточных продуктов окисления 57 весьма сложны. Одной из наиболее интересных особенностей продуктов окисления флавоноидов в водных растворах даже при низких концентрациях оказывается образование димеров с молекулярными массами (2M – 2), где М – молекулярная масса исходного флавоноида (для кверцетина 2\*302 – 2 = 602 Да), тримеров и более сложных олигомеров [49]. 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, 93) [98, 100, 101, 113, 114]. Ниже изображена структура с (2*S*,3*S*)-конфигурацией хиральных центров, но присутствует и второй энантиомер:



Димер альтернативного строения получается в результате 2,4'сочленения мономерных фрагментов через атом кислорода (2,4'-О-димер, 94). В результате прототропной таутомерии он способен к дальнейшей циклизации с образованием циклического продукта (95) (2,4'-О:3,3'-О-циклодимер) [101, 103, 106, 115-118]:



Образование димеров 94 и 95 отмечено в результате как химического (свободнорадикального), так и электрохимического, а также ферментативного (энзиматического) окисления 57. Однако известны упоминания димерных продуктов, В молекулах которых сочленение мономерных фрагментов осуществляется за счет образования связей С-С (С-димеры) [97, 114, 115]. Так, их образование предполагали в условиях восстановления флавонов цинком в кислой среде [119]. 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 [114]. Несколько димеров и тримеров обнаружено в составе продуктов окисления 57 кислородом воздуха в водном растворе (0.1 мг/мл » 0.3 мМ/л) при pH = 8 [49]. При МАЛДИ-МС анализе осадка, образовавшегося при окислении кверцетина кислородом воздуха были обнаружены продукты полимеризации кверцетина с молекулярными массами до 1500 Да, но их структуры не были установлены.

Изменение состава продуктов такого окисления при варьировании pH водной фазы, отмеченное в работе [111], можно объяснить уменьшением вклада свободнорадикальных процессов (схема 4.2) при уменьшении pH до ~7, когда образование димерных продуктов 57 начинает преобладать среди нескольких параллельных процессов.

Одним из направлений превращений радикальных интермедиатов окисления 57, образующихся из его таутомерной формы 57\* (Схема 4.2), считают образование *орто*-хинона (96, схема 4.10):

Схема 4.10



Образование такого хинона согласуется с появлением интенсивной красной окраски раствора смеси продуктов окисления 57, исчезающей с течением времени [49, 88, 100]. В работе [49] отмечено, что УФ-спектр раствора смеси продуктов окисления 52 соответствует УФ-спектрам хинонов. Такой хинон 96 может находиться в прототропном равновесии как минимум с тремя таутомерами, имеющими структуры так называемых хинон-метидов кверцетина 3 - 97, 5 - 98 и 7 - 99 (Схема 4.10). Сравнение оценок энергий основных состояний этих хинон-метидов методами молекулярной механики (MM+) и полуэмпирическим методом (AM-1), приведенное в таблице 4.9, показывает, что предпочтительной структурой является о-хиноновая 96. Вклады хинон-метидных структур несколько меньше, причем среди них преобладает структура 3-хинон-метида кверцетина 97, энергия которой всего на  $\sim 5(AM-1) - 10(MM+)$  кДж/моль превышает значение для о-хинона.

Оценки энергий основных состояний орто-хинона (o-QQ) и таутомерных хинон-метидов (3-QM, 5-QM и 7-QM) с использованием метода молекулярной механики (MM+) и полуэмпирического метода (AM-1)

Структура	Энергия основного					
	состояния, кДж/моль					
	MM+	AM-1				
96	25.5	-3568.0				
97	35.9	-3562.9				
98	41.6	-3547.8				
99	39.8	-3543.8				

Таким образом, показано, что как свободнорадикальное окисление 4изопропилфенола в водных растворах растворенным кислородом воздуха, так и его электрохимическое окисление в аналогичных условиях приводит к образованию димерных и, в общем случае, олигомерных продуктов, что объясняется промежуточным образованием хинон-метидных интермедиатов. Этот же механизм позволяет объяснить образование димеров с массами (2М-2) и олигомеров при окислении флавоноидов в водных растворах. Так, образование димера *94* может быть представлено следующей схемой, включающей присоединение 4'-гидроксильной группы кверцетина в положение 5 хинон-метидного таутомера его окисленной формы *97* (схема 4.11):



# 4.5.3. Свойства кверцетина и их влияние на его аналитические характеристики

Легкость окисления кверцетина в растворах осложняет получение многих его спектральных и физико-химических характеристик, например регистрацию УФ-спектров [48, 108] и определение констант диссоциации ( $pK_a$ ) [120]. Для предотвращения окисления 57 в процессе потенциометрического титрования предложено исключить контакт его растворов с атмосферным воздухом с помощью заполненной азотом пены ПАВ [121, 122]. Из необычных химических свойств 57 и других флавоноидов можно упомянуть обратимое образование гидратов (геминальных диолов) в водных растворах, что приводит к аномально сильной зависимости их индексов удерживания (RI) в обращенно-фазовой ВЭЖХ от содержания воды (C) в элюенте; значения dRI/dC кверцетина достигают 9 ед. инд. на 1% изменения ее концентрации [123]. 4.6. Изучение электрохимического поведения пестицидов и фунгицидов с целью установления основных продуктов их окисления кислородом воздуха в водных средах

## 4.6.1. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов электрохимического окисления дифеноконазола в растворах

Интенсивное использование пестицидов В сельском хозяйстве, несоблюдение условий их хранения и утилизации являются причинами загрязнения почвы, грунтовых вод, рек, озер, дождевой воды и воздуха [124]. При попадании в окружающую среду пестициды претерпевают различные химические превращения. К ним относятся: гидролиз в водных средах, окисление кислородом воздуха и распад при воздействии растительных ферментов [125, 126]. Во многих случаях такие процессы ускоряются под влиянием света. Многие пестициды быстро разрушаются в водной среде, поэтому их применение в сельском хозяйстве в борьбе с вредителями культивируемых растений, болезнями и сорными растениями не влечет за собой последствий. Основной критерий отрицательных детоксикации пестицидов в почве - скорость и полнота их распада на нетоксичные компоненты. Однако некоторые пестициды могут подвергаться химическому или фотохимическому окислению, приводящему к образованию метаболитов, которые могут быть токсичнее чем исходные вещества [127].



Дифеноконазол [*цис*, *транс*-3-хлор-4[4-метил-2-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-1,3-диоксолан-2-ил-]фенил-4-хлорфениловый эфир] **69** – синтетический фунгицид класса производных триазола. Допустимая суточная доза для человека – 0.01 мг/кг массы тела человека, ориентировочная допустимая концентрация в почве – 0.1 мг/кг почвы, ПДК в воде – 0.001 мг/дм<sup>3</sup> [128]. Установление механизмов окисления различных органических экотоксикантов, в том числе дифеноконазола, важно для понимания процессов их разложения. В структуре дифеноконазола содержится атом водорода при третичном атоме углерода в 4-м положении 1,3-диоксоланового цикла, ЧТО объясняет возможность окисления 69 кислородом воздуха в водных растворах по свободно-радикальному механизму. Наличие в структуре 69 триазольного фрагмента и хлорфенильных заместителей позволяет предполагать, что его окисление может приводить к образованию продуктов, представляющих большую опасность для окружающей среды, чем исходный фунгицид. На примере природного флавоноида кверцетина и 4-изопропилфенола нами было подтверждено известное ранее положение, что наборы продуктов свободнорадикального окисления (растворенным в водных средах кислородом воздуха, иное название – автоокисление) и электрохимических превращений во многом идентичны, что делает возможным как их сравнение [49, 83], так и электрохимическое моделирование процессов окисления. При проведении электрохимического окисления в жестких условиях пестицидов похожего строения, установлено образование хлорфенолов [129, 130]. Однако в более мягких условиях окисления, в окружающей среде, образование таких продуктов не выявлено. По этой причине представляется целесообразным рассмотреть электрохимическое окисление 69 в качестве модели его свободнорадикального окисления кислородом воздуха в водных растворах

В литературе электрохимические процессы с участием *69* описаны недостаточно подробно. В частности, отсутствуют результаты идентификации продуктов трансформации *69* методом ВЭЖХ-МС. Поэтому нами была

116

проведена хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов электрохимического окисления дифеноконазола в водных растворах.

На рисунке 4.12 приведена хроматограмма продуктов электролиза раствора дифеноконазола, полученная в режиме детектирования положительных ионов.



**Рисунок 4.12.** Хроматограмма продуктов электролиза дифеноконазола в режиме детектирования положительно заряженных ионов. Номера пиков на рисунке соответствуют нумерации компонентов в таблице 4.10.

Продукты электролиза дифеноконазола и важнейшие аналитические параметры для их ВЭЖХ-МС идентификации перечислены в таблице 4.10 в порядке увеличения их времён удерживания; для всех компонентов указаны индексы удерживания (RI), массовые числа ионов [M+H]<sup>+</sup>, номера наиболее вероятных структур продуктов, а также соответствующие им коэффициенты гидрофобности (logP), вычисленные с использованием ПО ChemDraw. Массовые числа ионов, пики которых имеют наибольшие интенсивности в масс-спектрах компонентов, выделены жирным шрифтом. Для проведения электрохимического окисления дифеноконазола в качестве рабочего электрода выбрали допированный бором алмазный электрод. Его аналитические характеристики привлекательны: высокая электрохимическая весьма стабильность, низкий фоновый ток, стабильный отклик И низкая

чувствительность к кислороду. Этот электрод может быть использован в широком диапазоне потенциалов, что необходимо для окисления многих пестицидов [129, 130]. Поэтому именно этот электрод выбран нами в качестве рабочего для установления состава продуктов окисления дифеноконазола.

#### Таблица 4.10

# Аналитические параметры продуктов трансформации дифеноконазола в условиях электрохимического окисления в водном растворе.

$t_{\rm R},$	$t_{\rm R},$	Относи			m/z	Соотношение	Предпола-	
МИН	МИН	тельна	RI	M	главных	интенсивностей	гаемая	logP
(град	(град	Я			сигналов	изотопных	структура	
иент	иент	интенс				пиков		
VII)	VIII)	ИВ-						
		ность						
6.9	1.2	сл	760	311	<b>312</b> *, 243,	3:1 (312)**	115	2.3
					197, 179,			
					157			
8.1	1.4	сл	775	295	<b>296</b> , 227,	3:1 (296)	116	2.3
					199, 181,			
					141			
8.5	1.4	сл	784	346	<b>347</b> , 289	3:1 (347)	-	
8.8	1.7	сл	792	386	<b>386</b> , 328,	нет хлора	-	
					231	-		
12.0	2.9	сл	914	387	<b>388</b> , 319,	3:1 (388, 319,	107	4.2
					273, 233	273, 233)		
12.6		сл	943	421	422, 337,	9:6:1 (337, 251)	114	3.5
					251			
12.8	3.9	сл	953	435	<b>436</b> , 420,	9:6:1 (436, 378)	112	3.9
					378, 348			
13.3	-	сл	979	348	<b>348</b> , 279,	9:6:1 (348)	102	
					251		-	
13.5	-	сл	989	421	422, 353,	-	-	
					337, 291,			
					251, 152			
13.6	4.8	сл	995	435	<b>436</b> , 367,	9:6:1 (436)	96	3.9
					332, 251			
13.7		сл	1000	421	422, 353,	9:6:1 (422)	-	
					267, 251	3:1 (353, 267)		
13.8	5.1	сл	1005	462	<b>463</b> , 348,	9:6:1(463, 348)	Примесь	
					336		_	
13.9		сл	1011	421	<b>422</b> , 348,	-	-	
					251, 184,			
					128			

14.0	5.6	сл	1016	349	<b>350</b> , 281, 273	9:6:1 (350)	106	3.8
14.1	5.6	сл	1022	349	<b>350</b> , 322, 260	9:6:1 (350)	-	
14.3	6.1	сл	1033	421	<b>422</b> , 353, 267	9:6:1 (422) 3:1 (353, 267)	107	4.4
14,6		сл	1050	421	<b>422</b> , 348, 267, 251	9:6:1 (422, 348, 251) 3:1 (267)	-	
14.8	7.4	c	1061	347	<b>348</b> , 279, 251	9:6:1 (348)	102	3.5
15.0	7.4	сл	1072	421	<b>422</b> , 404, 368, 348, 293, 251, 166	9:6:1( 422, 348, 251) 3:1	-	4.7
15.2	8.4	c	1084	405	<b>406</b> , 337, 291, 251	9:6:1 (406, 251) 3:1 (337, 291)	100, 101	4.2
15.4	8.8	с	1096	405	<b>406</b> , 337, 291, 251	9:6:1 (406, 251) 3:1 (337, 291)	100, 101	4.2
15.7	9.8	c	1113	371	<b>372</b> , 303, 257, 217	3:1 (372)	105, 106	4.2
	11.3	сл	-	419	<b>420,</b> 348, 251	9:6:1 (420, 348 251)	113	4.7
	13.0	сл	-	419	<b>420</b> , 348, 251	9:6:1 (420, 348, 251)	113	4.7
16.1	-	c	1137	421	<b>422</b> , 348, 251	9:6:1 (422, 348, 251)	109	4.7
16.5	-	c	1162	421	<b>422</b> , 348, 251	9:6:1 (422, 348, 251)	108	4.8
16.8	14.0	с	1180	405	<b>406</b> , 337, 291, 251	9:6:1 (406, 251) 3:1 (337, 291)	69	4.8
17.5	-	c	1224	421	<b>422</b> , 351, 251	9:6:1 (422, 251) 3:1 (351)	-	
17.9	-	c	1250	421	<b>422</b> , 351, 265, 251	9:6:1 (422, 265, 251) 3:1 (351)	-	

**Примечания:** \*) Жирным шрифтом выделены массовые числа ионов, пики которых имеют наибольшие интенсивности в масс-спектрах; \*\*) В скобках приведены массовые числа ионов, для которых указано соответствующее изотопное распределение

В исходном растворе 69 и в реакционной смеси содержатся компоненты 100 и 101 с молярными массами 405 (т.е. такими же, как и у самого дифеноконазола) и временами удерживания 15.2 мин и 15.4 мин. Можно полагать, что эти вещества являются побочными продуктами синтеза 69 [131, 132]. Заключительной стадией синтеза дифеноконазола, скорее всего, является взаимодействие кетона 102 и диола 103, приводящее к образованию 1,3диоксоланового фрагмента молекулы (схема 4.12). Можно предположить, что в тех случаях, когда замыкание диоксоланового цикла не происходит, образуются изомеры 100 и 101. Установить порядок их элюирования не представляется возможным из-за близости их параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Схема 4.12



В смеси продуктов электролиза дифеноконазола был обнаружен пик соединения с молекулярной массой 349 и временем удерживания 14 мин, наиболее вероятной структурой этого компонента представляется структура спирта 104. Его образование может происходить в результате восстановления кетона 102 – продукта гидролиза 69, или в результате восстановления 69. Возможность протекания такого процесса описана в литературе [133]. Восстановление может происходить в электрохимической ячейке. Авторы [134] отмечают необходимость учета возможности протекания статьи процессов восстановления/окисления на индикаторном электроде. Кроме того, известно генерирование продуктов в больших объемах одновременно на аноде перспективным катоде (парный электросинтез), считается И на ЧТО направлением в электрохимии [135, 136].



120

В реакционной смеси был обнаружен ещё один продукт восстановления 69 с молекулярной массой 371, содержащий только один атом хлора в молекуле. Для этого компонента смеси можно предположить структуры: 105 или 106. Восстановление хлорбензолов в разных условиях, например водородом [137], используют в химическом синтезе. Кроме того, в смеси продуктов было обнаружено соединение с молекулярной массой 387, соответствующее продуктам окисления 105 и 106 с возможными изомерными структурами 107. Возможно, образование соединения 107 происходит в результате замещения хлора в ароматическом ядре гидроксильными группами, такой процесс известен при деградации полихлорированных бифенилов [138].



Основную часть продуктов электролиза **69** составляют продукты его окисления. В реакционной смеси было обнаружено 11 изомеров с молекулярными массами 421, которые в большинстве случаев являются продуктами присоединения кислорода к **69**.

Возможности соотнесения структур этих изомеров с их временами удерживания ограничены из-за невысокой информативности и воспроизводимости масс-спектров при ионизации электрораспылением, что объясняет отсутствие масс-спектров этих соединений в базах данных.

Окисление дифеноконазола участием 1,3-диоксоланового C фрагмента. Окисление алициклических фрагментов, присутствующих в структурах многих органических соединений, - распространенный путь деградации экотоксикантов в объектах окружающей среды. Такой механизм окисления включает замещение атомов водорода при атомах углерода гидроксильными группами. Наибольшую реакционную способность проявляют атомы водорода, находящиеся при третичном атоме углерода, меньшую - при вторичном и первичном атомах углерода [139]. Так, при окислении ибупрофена *in vivo* образуются продукты присоединения кислорода как к третичному, так и к первичному атомам углерода [140]. Окисление дифеноконазола по третичному, вторичному и первичному атомам углерода может приводить к одновременному образованию соединений 108, 109 и 110, соответственно. Учитывая упомянутые выше закономерности окисления алициклических фрагментов органических соединений, относительные количества изомеров в реакционной смеси должны убывать в ряду: 108, 109 и 110.

Дальнейшее окисление первичного спирта 110 может приводить к образованию соответствующих альдегида 111 и карбоновой кислоты 112. Несмотря на присутствие на хроматограмме двух пиков соединений с временами удерживания 11.3 мин и 13.0 мин (градиент VIII) и массовыми числами ионов  $[M+H]^+ = 420$ , нельзя однозначно утверждать присутствие 111 в реакционной смеси, так как расчетное значение фактора гидрофобности (logP) альдегида 111 (3,63) не позволяет приписать этим соединениям структуру именно альдегида так как, в таком случае порядок элюирования аналитов не будет соответствовать возрастанию их гидрофобности и увеличению logP. Соединениям с временами удерживания 3.9 мин и 4.8 мин (градиент VIII) и массовыми числами ионов  $[M+H]^+ = 436$  может соответствовать карбоновая кислота 112. Ввиду невысокой информативности масс-спектров однозначно приписать структуру кислоты 112 какому-либо их этих двух пиков нельзя.

Окисление вторичных спиртов происходит легче, чем окисление первичных, а третичных хуже, чем первичных. Продуктам с молекулярными массами 419 и 435 можно приписать структуры *111* и *112*, образующиеся при дальнейшем окислении первичного спирта *110*.

Вещества с временами удерживания 11.3 и 13.0 минут и массовыми числами ионов [M+H]<sup>+</sup> = 420 могут иметь структуру циклического лактона *113*, образование которого может происходить при окислении вторичного спирта *110*. Последующие превращения соединения *113* могут приводить к продуктам еще более глубокого окисления.

Соединение 108 относится к классу полукеталей, следовательно, возможна его изомеризация с образованием кетона 114. Подобные процессы хорошо известны для продуктов свободнорадикального окисления кислородом воздуха; например, одна из стадий окисления природного флавоноида кверцетина предполагает протекание аналогичного процесса. Изомеризация промежуточно образующегося из кверцетина полукеталя приводит к продукту, которому приписывают структуру алфитонина [141].



Соединение 114 с молекулярной массой 421 и расчетным значением фактора гидрофобности 3.5 присутствует на хроматограмме продуктов окисления дифеноконазола с временем удерживания 12.6 мин.

Кроме того, обнаружены компоненты, которым могут быть приписаны структуры продуктов дальнейшего окисления *115* продукта гидролиза дифеноконазола *116*.



Окисление дифеноконазола с участием фенильных фрагментов. В заключение целесообразно кратко прокомментировать возможность окисления дифеноконазола с участием бензольных колец. По современным 124 представлениям, при окислении фенильных фрагментов, наиболее вероятно группой замещение гидроксильной атома водорода В стерически незатрудненном *пара*- положении с повышенной электронной плотностью. Электроноакцепторные заместители замедляют процесс гидроксилирования, а донорные ускоряют. Например, в структуре молекулы диазепама содержится два бензольных кольца, но гидроксилированию подвергается только одно из них (не содержащее атома хлора). Аналогично происходит окисление хлорпромазина; бензольное кольцо, содержащее электроноакцепторный заместитель - хлор, не подвергается гидроксилированию [142]. Окисление бензольных колец молекулы дифеноконазола затруднено из-за наличия электроноакцепторных заместителей (-Cl). Можно предположить, что продукты окисления фенильных радикалов молекулы дифеноконазола присутствуют в реакционной смеси лишь в следовых количествах.

В результате электрохимического окисления дифеноконазола в водном растворе, в нейтральной среде (pH 7.4) в присутствии ацетонитрила (для увеличения растворимости) с последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом реакционных смесей были установлены основные продукты окисления. В случае дифеноконазола преобладают процессы, связанные с деструкцией 1,3-диоксоланового фрагмента молекулы.

# 4.6.2. Хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов электрохимических превращений крезоксим-метила в растворах

Крезоксим-метил [метил (*E*)-2-метоксиимино-[2-(2-метилфеноксиметил)фенил]ацетат, M = 313] **70** – синтетический фунгицид класса стробилуринов. В аэробных условиях, в том числе в биологически активных почвах, крезоксимметил быстро разрушается (ДТ<sub>90</sub> менее трёх дней). Допустимая суточная доза для человека – 0.1 мг/кг, ориентировочная допустимая концентрация в почве – 0.2 мг/кг, ПДК в воде – 0.01 мг/дм<sup>3</sup> [143]. Крезоксим-метил, подобно кверцетину и 4-изопропилфенолу, содержит атом водорода при атоме углерода в α-положении к бензольному кольцу, что объясняет возможность его окисления кислородом воздуха в водных растворах по свободно-радикальному механизму [144]. По этой причине представляется целесообразным рассмотреть электрохимическое окисление крезоксим-метила в качестве модели его свободнорадикального окисления кислородом воздуха.



В литературе электрохимические процессы с участием 70 описаны недостаточно подробно. В частности, отсутствуют данные об идентификации продуктов превращений 70 методом ВЭЖХ-МС. Поэтому нами была проведена хроматомасс-спектрометрическая идентификация продуктов электрохимической трансформации крезоксим-метила в водных растворах.

На рисунках 4.13 и 4.14 приведены хроматограммы продуктов электролиза раствора крезоксим-метила, полученные в режимах детектирования положительных и отрицательных ионов.



**Рисунок 4.13.** Хроматограмма продуктов электролиза крезоксим-метила в режиме детектирования положительных ионов.



Рисунок 4.14. Хроматограмма продуктов электролиза крезоксим-метила в режиме детектирования отрицательных ионов.

Продукты электролиза крезоксим-метила и важнейшие аналитические параметры для их ВЭЖХ-МС идентификации перечислены в таблице 4.11 в порядке увеличения их времён удерживания; для всех компонентов указаны индексы удерживания (RI), массовые числа ионов [M+H]<sup>+</sup> и [M-H]<sup>-</sup>, предполагаемые наиболее вероятные структуры продуктов, a также коэффициенты гидрофобности, вычисленные с использованием ПО ChemDraw ACD. Массовые числа ионов, пики которых имеют наибольшие И интенсивности в масс-спектрах компонентов, выделены жирным шрифтом.

Кроме того, в этой таблице приведены используемые далее в тексте номера продуктов превращения 70.

Для проведения электрохимического окисления в качестве рабочего электрода выбрали допированный бором алмазный электрод. Этот электрод может быть использован в широком диапазоне потенциалов, что необходимо для окисления многих пестицидов. Например, окисление, сходного по структуре с крезоксим-метилом трифлоксистробина регистрируется при значении потенциала 1.74 В относительно хлорсеребряного электрода. Окисление трифлоксистробина в водной среде на поверхности BDD электрода это двухстадийный необратимый процесс, каждая из стадий которого представляет собой двухэлектронную полуреакцию [144]. Поэтому именно этот электрод выбран нами в качестве рабочего для установления состава продуктов окисления крезоксим-метила.

крезоксим-метила Гидролиз. В структуре как сложного эфира содержится метоксикарбонильная группа. Известно [145, 146], что деградация крезоксим-метила в почве включает достаточно быстрое образование продукта его гидролиза – соответствующей карбоновой кислоты 117, причем продукт гидролиза оказался более токсичным, чем исходный пестицид 70. В смеси продуктов электрохимического окисления крезоксим-метила (M = 313) в водноорганической среде нами был обнаружен продукт его деметилирования (t<sub>R</sub> 7.3 мин,  $[M+H]^+ = 300$ ). С учетом литературных данных это соединение можно идентифицировать как карбоновую кислоту 117, либо как оксим 118, образование которого в живых организмах отмечали авторы работы [147].



128

Окисление. Компоненту со временем удерживания 8.4 мин может быть приписана структура гидроксамовой кислоты *119*. Такое соединение может получаться в результате декарбонилирования продукта *бис*-деметилирования *120*, образующегося в результате гидролиза крезоксим-метила *70*. Следы продукта *120* обнаруживаются на хроматограмме в виде малоинтенсивного пика со временем удерживания 16.0 мин. Формально гидроксамовая кислота *119* является единственным зарегистрированным продуктом электрохимического окисления крезоксим-метила (схема 4.13).

#### Схема 4.13



В статье [147] описаны возможные продукты метаболизма крезоксимметила в живых организмах. Почти все из них являются продуктами гидролиза крезоксим-метила и только некоторые из них могут быть отнесены к продуктам его окисления. С учетом этих данных можно заключить, что гидролиз крезоксим-метила протекает быстрее, чем процессы его окисления, что осложняет их характеристику и электрохимическое моделирование.

Кетон *121* со временем удерживания 12.2 мин и молекулярной массой 270 образуется, скорее всего, в результате еще более глубокого гидролиза соединения *120*. По литературным данным образование кетонов из оксимов возможно в достаточно мягких условиях [148, 149].



Восстановление. В смеси продуктов окислении был обнаружен пик соединения со временем удерживания 7.7 мин и молекулярной массой 271. Молекулярная формула этого компонента была установлена по данным массспектрометрии высокого разрешения. Относительное отклонение измеренной массы иона  $[M+H]^+$  этого соединения от расчетной массы иона  $[M+H]^+$  с брутто формулой C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> составляет 1 ppm, следовательно, ему можно приписать молекулярную формулу C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>. Наиболее вероятной структурой этого компонента представляется структура амина 122. Такой амин мог образоваться в результате восстановления соответствующего оксима 123 – продукта гидролиза крезоксим-метила (схема 4.14). Важно заметить, что относительная интенсивность хроматографического пика такого амина В режиме детектирования отрицательных ионов больше, чем в режиме детектирования положительных ионов. Это подтверждает наличие в молекуле карбоксильной группы, способной к образованию ионов RCO<sub>2</sub><sup>-</sup> при pH элюента 7.4. В кислой среде (при pH < 7) должно преобладать протонирование аминогруппы, вследствие аналитический детектирования чего сигнал В режиме ионов быть более положительных должен интенсивным, чем при детектировании отрицательных ионов.

Схема 4.14



В реакционной смеси обнаружен еще один возможный продукт восстановления оксима *118* со временем удерживания 9.1 мин и молекулярной массой 285, наиболее вероятная структура которого отвечает формуле *124* (схема 4.15).

Схема 4.15



В отличие от компонента 123, пик соединения 124 интенсивен при детектировании положительно заряженных ионов И отсутствует при проведении анализа в режиме детектирования отрицательных ионов. Это обусловлено тем, что в структуре соединения нет способных к диссоциации карбоксильных групп, но возможно протонирование аминогруппы. Брутто формула соединения 124 была установлена по данным масс-спектрометрии высокого разрешения. Относительное отклонение измеренной массы иона [M+H]<sup>+</sup> этого соединения от расчетной массы иона [M+H]<sup>+</sup> с брутто формулой C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub> составляет 1 ppm, следовательно, для компонента со временем удерживания 9.1 мин можно принять формулу C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>. При проведении электрохимического восстановления раствора крезоксим-метила при потенциале -2.8 В, были также получены соединения 122 и 124, что является подтверждением того, что это продукты восстановления, а не окисления. Процессы восстановления оксимов с образованием аминов известны, их широко используют для препаративного получения аминов из оксимов. Авторы статьи [150] сообщают о синтезе амина 125 из оксима 126 в щелочной среде при комнатной температуре с выходом продукта 88%. В качестве восстановителя использовали NaBH<sub>4</sub>, катализатора – аморфный оксид никеля (схема 4.16).

Схема 4.16



сообщают получении [151] Авторы статьи 0 α-аминокислот восстановлением соответствующих α-оксиминокарбоновых кислот. Восстановление оксимов происходит в мягких условиях, при комнатной температуре в умеренно щелочной среде. Электрохимическое восстановление оксимов до аминов лежит в основе электрохимического метода их определения. Авторы отмечают сильную зависимость параметров этого процесса от рН среды; при увеличении рН катодный пик восстановления оксима смещается в область отрицательных потенциалов [152].

Небезынтересно заметить, что в литературе упомянута возможность органических соединений восстановления В процессе ионизации электрораспылением [69-71]. Этот эффект был выявлен при проведении массспектрометрического анализа именно в режиме детектирования отрицательных ионов. В то же время авторы статьи [72] считают подобные предположения дискуссионными. Для того чтобы подтвердить или опровергнуть возможность восстановления оксимов в условиях электрораспылительной ионизации, нами ацетофенона и был синтезирован оксим проведен хроматомассего спектрометрический анализ. В результате было подтверждено, что восстановление этого оксима в выбранных нами условиях электрораспыления не наблюдается, следовательно, восстановление оксимов происходит исключительно в электрохимической ячейке. Авторы статьи [134] говорят о необходимости предусматривать протекания процессов возможность восстановления/окисления на индикаторном электроде. Кроме того, известно

генерирование продуктов в больших объемах одновременно на аноде и на катоде (парный электросинтез), что считается перспективным направлением в электрохимическом синтезе [135, 136].

При характеристике окисления-восстановления крезоксим-метила циклической методом вольтамперометрии, на анодной ветви вольтамперограммы были зарегистрированы пики с максимумами + 1420 мВ и +1700 мВ относительно хлорсеребряного электрода [153]. Процесс окисления крезоксим-метила является двухэлектронным и имеет необратимый характер [153]. Авторы этой работы высказывают предположения о возможном механизме электрохимического окисления крезоксим-метила. Они предполагают, что первоначально происходит образование карбокатиона 127. Далее (при проведении процесса в водной среде) в результате нуклеофильной атаки молекулы воды возможно образование полуацеталя 128, расщепление которого приводит к соединениям 129 и 130 (схема 4.17).

Схема 4.17



Среди продуктов электрохимических превращений крезоксим-метила преобладают продукты его гидролиза и восстановления. Продукты окисления присутствуют лишь в незначительных количествах. На основании этого можно

сделать вывод, что электрохимическое моделирование окисления экотоксикантов, относительно устойчивых к окислению, но легко подвергающихся гидролизу может сопровождаться неопределенностями, обусловленными, в том числе, восстановлением продуктов гидролиза.

#### Таблица 4.11

Аналитические параметры продуктов трансформации крезоксим-метила в условиях электрохимического окисления.

$t_{\rm R},$	RI	Главные	Главные	М,	Предпола-	LogP
МИН		сигналы в	сигналы в	a.e.	гаемая	
		спектре, МС+	спектре,	м.	структура	
			MC-			
7.3	763	118, 178, 223,		299	117	3.87 <sup>a</sup>
		282, <b>300</b> *, 314				$3.76 \pm 0.59$ <sup>6</sup>
					118	3.87 <sup>a</sup>
						$3.76 \pm 0.59$ <sup>6</sup>
7.7	768	118, 164, 209,	107, 162,	271	122	2.59 <sup>a</sup>
		272	270, 541,			$3.19 \pm 0.39$ <sup>6</sup>
			563			
84	781	105 133 150		257	110	Δ1 <sup>a</sup>
0.4	/01	105, 155, 150, 195, 223, <b>258</b>		237	117	$3.56 \pm 0.55^{6}$
9.1	800	118 178 209	284 379	285	124	$2.86^{a}$
7.1	000	<b>1</b> 10, 170, 207, <b>286</b>	515 650	205	127	2.00 3 38 + 0 38 <sup>6</sup>
		200, 571(цимер	515,050			$5.50 \pm 0.50$
		образуется в				
117	000	116 122 206			Ца	
11./	900	110, 152, 200,			пе	
		312, <b>3</b> /1			идентифи-	
		187, 303, 322,			цирован	
10.0	000	334, <b>393</b>	107 110	270	101	
12.2	923		107, 113,	270	121	3.22 "
			161, 197,			$2.72 \pm 0.58$ <sup>6</sup>
			269			

13.2	974	198, 229, 262,		Не	
		278, 292, 322,		идентифи-	
		338, 350, <b>368</b>		цирован	
		315, 245, 278,			
		308, 336, 366,			
		384			
16.0	1131	<b>286</b> , 475	285	120	3.61 <sup>a</sup>
					$3.16 \pm 0.51^{-6}$
16.7	1174	116, 132, 206,	313	70	4.13 <sup>a</sup>
		222, 238, 250,			$4.34 \pm 0.58$ <sup>6</sup>
		<b>267</b> , 282, 314			
		[M+H], 336			

**Примечания:** \* — жирным шрифтом выделены массовые числа ионов, пики которых имеют наибольшие интенсивности в масс-спектрах компонентов; <sup>а</sup> — коэффициенты гидрофобности, вычисленные в программе ChemDraw 12.0; <sup>6</sup> — коэффициенты гидрофобности, вычисленные в программе ACD/ChemSketch.

\*\*\*

Из рассмотренных в нашей работе примеров окисления можно сделать вывол. что оптимальным методом определения продуктов окисления органических соединений (как кислородом воздуха, так и другими реагентами) в водных растворах является обращенно-фазовая ВЭЖХ-МС. Этот метод позволяет исключить проблемы, связанные с подготовкой проб, в частности, с извлечением аналитов из разбавленных водных растворов и обусловленных этим искажений состава образцов. Сложность состава реакционных смесей обусловливает необходимость использования градиентного элюирования для компонентов. При проведении успешного разделения всех массспектрометрического детектирования, для получения максимально полной информации об образце, необходимо проводить детектирование как положительных, так и отрицательных ионов. Дополнительную информацию о структуре компонентов смеси можно получить при проведении фрагментации MC-MC, поскольку объективно такой способ ВЭЖХ-ЭР-МС как характеризуется невысокой структурной информативностью. Нестабильность

многих продуктов окисления органических соединений, обусловливает необходимость проведения их аналитического определения сразу после проведения окисления. Наличие лабильных соединений в смеси следует учитывать при проведении пробоподготовки, многие соединения стабильны только в растворах, их выделение из смеси в сухом виде невозможно. Также следует учитывать возможность протекания конкурирующих процессов, таких как гидролиз и восстановление (при проведении электрохимического окисления).

#### 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На примерах нескольких органических соединений различной химической природы и назначения (алкилфенолы, пестициды, природный флавоноид, алкилфосфиты, алкилфосфонаты и алкилфосфаты) подтверждено, что одним из общих процессов их трансформации в водных растворах (в том числе в водных объектах окружающей среды) является окисление растворенным в воде кислородом атмосферного воздуха. Установлено сходство наборов продуктов и, как следствие, механизмов свободнорадикального и электрохимического окисления таких аналитов.

2. Установлено, что как свободнорадикальное, так и электрохимическое окисление алкилзамещенных фенолов при pH  $\approx pK_a$  сопровождается образованием димерных и, в общем случае, олигомерных продуктов. Механизм их образования соответствует генерированию реакционноспособных хинонметидных интермедиатов, основным свойством которых является взаимодействие с присутствующими нуклеофильными реагентами, прежде всего водой и исходными фенолами. Последний процесс и приводит к образованию димеров, а повторение циклов «окисление – присоединение» – олигомерных продуктов.

3. Установление механизма окисления алкилфенолов в водных растворах позволило переосмыслить особенности протекания известной в аналитической химии цветной реакции фенолов с хлоридом железа (III). Входящие в состав первоначально образующихся окрашенных комплексов молекулы фенолов через некоторое время окисляются с образованием хинонметидных интермедиатов и, далее, плохо растворимых в воде олигомерных продуктов.

4. Показано, что для идентификации сложного набора продуктов окисления природного флавоноида кверцетина кислородом воздуха в водных растворах с использованием недостаточно структурно специфичного метода ВЭЖХ-МС

137

наиболее информативен подход, предполагающий систематизацию ранее известных продуктов окисления. Таким способом удалось выявить присутствие ряда нестабильных соединений (гидропероксиды, пероксиды, полуацетали, ацетали, соответствующие кетали, и др.), препаративное выделение которых из водных растворов невозможно.

5. Аналогия процессов окисления природных флавоноидов (на примере кверцетина) и окислительной димеризации алкилфенолов позволило впервые предложить механизм образования их димеров и олигомеров, часто обнаруживаемых во многих природных объектах.

6. На примере двух пестицидов [дифеноконазол (I) и крезоксим-метил (II)] охарактеризованы продукты их электрохимических превращений в водных растворах. Показано, что в случае (I) преобладают процессы окисления, затрагивающие преимущественно 1,3-диоксолановый фрагмент молекулы, а в случае (II) – процессы гидратации и восстановления, что затрудняет прямое сопоставление электрохимических процессов и свободнорадикального окисления кислородом воздуха.

7. Показано, что хранение при доступе воздуха реакционных смесей, содержащих диалкилфосфонаты и триалкилфосфиты приводит к почти полному окислению этих производных фосфора (III) с образованием соответствующих производных фосфора (V) – ди- и триалкилфосфатов. Для определения таких соединений, особенно нелетучих диалкилфосфатов, рекомендован метод ВЭЖХ-МС с регистрацией положительно заряженных ионов.

Фрагмент работы, посвященный анализу продуктов взаимодействия спиртов с фосфорилхлоридом, выполнен в соответствии с темой гранта РФФИ № 18-03-00151/а.

138

### 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Coats J. R. Chapter 2. Pesticide Degradation Mechanisms and Environmental Activation // Pesticide transformation products / Entomology Publications. 1991. 379 p.

2. Mill T. Hydrolysis and oxidation processes in the environment // Environ. Toxicol. Chem. 1982. V.1. P.135-141.

3. Исидоров, В.А. Органическая химия атмосферы / Санкт-Петербург: Химиздат, 2001. 352 с.

4. Pal. R., Chakrabarti K., Chakraborti A., Chowdhury A. Degradetion and effects of pesticides on soil microbiological parameters – a review // Int. J. Agri. Res. 2006. V.3. №1. P.240-258.

5. Поруцкий Г.В. Биохимическая очистка сточных вод органических производств / Москва: Химия, 1975. 255 с.

6. https://www.britannica.com/science/hydrosphere/Impact-of-human-activitieson-the-hydrosphere (дата обращения: март 2019 г.)

7. McKeown E., Waters W.A. The oxidation of organic compounds by "singlet" oxygen // J. Chem. Soc. (B). 1966. V.0. P.1040-1046.

8. Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. Синглетный кислород, методы получения и обнаружения // Успехи химии. 1981. Т.1. №3. С.406-428.

9. Taube H. Mechanisms of oxidation with oxygen // J. Gen. Physiol. 1965. V.49. №1. P.29-50.

10. Foote C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation // Science. 1968. V.162. №3857. P.963–970.

11. Barclay L.R.C., Ingold K.U. Autoxidation of biological molecules. 2. The autoxidation of a model membrane. Comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene // J. Am. Chem. Soc. 1981. V.103. №21. P.6478–6485.

12. Li L., Chen P., Gloyna E.F. Generalized kinetic model for wet oxidation of organic compounds // AIChE J. 1991. V.37. №11. P.1687–1697.

13. Перкель А.Л., Воронина С.Г. Особенности определения продуктов окисления органических веществ молекулярным кислородом и пероксидными соединениями. І. Каналы образования продуктов в процессе анализа // Вестник КузГТУ. 2014. №6. С.73-79.

14. https://www.lenntech.com/periodic/water/oxygen/oxygen-and-water.htm (дата обращения: март 2019 г.)

15. Fenton H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron // J. Chem. Soc., Trans. 1894. V.65. P.899-910.

16. Haber F., Weiss J. Uber die Katalyse des Hydroperoxydes // Naturwissenschaften. 1932. V.51. №20. P.948-950.

17. http://geocleanse.com/fentonsreagent.asp (дата обращения: март 2019 г.)

18. Bishop D.F. Hydrogen peroxide catalytic oxidation of refractory organics in municipal waste waters // Ind. Eng. Chem. 1968. V.7. P.1110-1017.

19. Wang C., Zhang S., Zhang Z., Zeng M., Yuji S. Optimization and interpretation of Fenton and UV/Fenton processes for degradation of syringyl lignin // J. Environ. Anal. Chem. 2014. V.1. №2. P.1-5.

20. Soloway S., Wile S. Improved ferric chloride test for phenols // Anal. Chem. 1952. V.24. №6. P.979-983.

21. Burrows H.D., Canle M.L., Santaballa J.A., Steenken S. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides // J. Photochem. Photobiol. 2002. V.67. P.71-108.

22. Boreen A.L., Arnold W.A., McNeill K. Additional information for photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review // Aquat. Sci. 2003. V.65. No. 4. P.320-341.

23. Zhu L., Santiago-Schübel B., Xiao H., Thiele B., Zhu Z., Qiu Y., Hollert H., Küppers S. An efficient laboratory workflow for environmental risk assessment of organic chemicals // Chemosphere. 2015. V.131. P.34–40.

24. Oberacher H., Pitterl F. Life science applications of electrochemistry coupled to liquid chromatography-mass spectrometry // LC/GC Special Issue. 2018. V.39. №10. P.26-33.

25. Warhurst A.M. An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols // J Appl. Ecol. 1995. V.32. №4. P.890-905.

26. Lu Z., Gan J. Oxidation of nonylphenol and octylphenol by manganese dioxide: kinetics and pathways // Environ. Pollut. 2013. V.180. P.214-220.

27. Nakedia G.C.S., Carvalho M.F., Horn A., Lachter Jr.E.R., Antunes O.A.C. Oxidation of aromatic compounds by hydrogen peroxide catalyzed by mononuclear iron (III) complexes // J. Mol. Catal. A: Chem. 2016. Accepted.

28. Richards J.A., Evans D.H. Electrochemical oxidation of 2,6-di-tert-butyl-4-isopropylphenol // J. Electroanal. Chem. 1977. V.81. P.171-187.

29. Thompson D.C., Thompson J.A., Sugumaran M., Moldeus P. Biological and toxicological consequences of quinone methide formation // Chem.-Biol. Interactions. 1992. V.86. P.129-162.

30. Turner A.B. Quinone methides // Q. Rev. Chem. Soc. 1964. v.18. P.347-360.

31. Bolton J.L., Comeau E., Vukomanovic V. The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended  $\pi$ -conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol // Chem.-Biol. Interact. 1995. V.95. P.279-290.

32. Перкель А.Л., Воронина С.Г. Особенности определения продуктов окисления органических веществ молекулярным кислородом и пероксидными соединениями. II. Определение пероксидных соединений // Вестник КузГТУ. 2014. №6. С.80-90.

33. Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions // Trends Plant. Sci. 2007. V.12. №1. P.500-514.

34. Brodowska K.M. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues // Eur. J. Biol. Res. 2017. V.7. №2. P.108-123.

35. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies // Methods Enzymol. 1990. V.186. P.343-355.

36. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress // Curr. Top. Med. Chem. 2001. V.1. P.569-590.

37. Guyot S., Vercauterent J., Cheyn1er V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase // Phytochemistry. 1996. V.42. №5, P.1279-1288.

38. Desentis-Mendoza R.M., Hernandez-Sanchez H., Moreno A., Rojas E., Chel-Guerrero L., Tamariz J., Jaramillo-Flores M. E. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from Ustilago Maydis // Biomacromolecules. 2006. V.7. P.1845-1854.

39. Dufour C., Loonis M. Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V.1770. P.958-965.

40. Перкель А.Л., Воронина С.Г. Особенности определения продуктов окисления органических веществ молекулярным кислородом и пероксидными соединениями. III. Определение непероксидных продуктов // Вестник КузГТУ. 2014. №6. С.91-100.

41. Boxall A.B.A., Sinclair C.J., Fenner K., Kolpin D., Maund S.J. Peer reviewed: when synthetic chemicals degrade in the environment // Environ. Sci. Technol. 2004. V.38. №19. P.368-378.

42. Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities // Science. 2013. V.341. №6147. P.752.

43. Dieter H.H. The relevance of "non-relevant metabolites" from plant protection products (PPPs) for drinking water: The German view"// Regul. Toxicol. Pharmacol. 2010. V.56. №2. P.121-125.

44. Cardeal Z.L., Souza A.G., Amorim L.C.A. Chapter 29. Analytical methods for performing pesticide degradation studies in environmental samples // Pesticides - formulations, effects, fate / InTech. 2011. 808 p.

45. Зенкевич И.Г., Носова В.Э. Хромато-масс-спектрометрическая характеристика диалкилфосфитов // Журн. аналит. химии. 2018. Т.73. №9. В печати.

46. Зенкевич И.Г., Носова В.Э. Особенности обнаружения триалкилфосфитов в составе реакционных смесей и их хромато-масс-спектрометрическая характеристика // Масс-спектрометрия. 2018. Т.15. №2. С.139-151.

47. Зенкевич И.Г., Носова В.Э. Хромато-масс-спектрометрическая характеристика триалкилфосфитов // Аналитика и контроль. 2018. Т.22, №2. С.157-167.

48. 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 oxygenat ambient temperature // Molecules. 2007. V.12. №3. P.654-672.

49. Зенкевич И.Г., Пушкарева Т.И. Систематизация результатов хроматомасс-спектрометрической идентификации продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах // ЖАХ. 2017. Т.72. №10. С.890-903.

50. Sangster J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1989. V.18. №3. P.1111-1229.

51. Зенкевич И.Г., Ищенко Е.В., Макаров А.А., Сончик О.Е. Окисление органических соединений кислородом воздуха в водных растворах. Экохимические и экологические аспекты. // Экол. хим. 2010. Т.19. №1. С.1-13.

52. Zenkevich I.G., Makarov A.A., Schrader S., Moeder M. A new version of an additive scheme for the prediction of gas chromatographic retention indices of the 211 structural isomers of 4-nonylphenol // J. Chromatogr. (A). 2009. V.1216. P.4097-4106.

53. Зенкевич И.Г., Ротару К.И., Селиванов С.И., Костиков Р.Р. Дискуссионные моменты определения диалкилфталатов в различных объектах // Вестн. СПбГУ. Сер. физ.-хим. 2015. Т.2. №4. С.386-394.

54. Uliana M.P., Vieira Y.W., Donatoni M.C., Correa A.G., Brocksom U., Brocksom T.J. Oxidation of mono-phenols to *para*-benzoquinones: a comparative study // J. Braz. Chem. Soc. 2008. V.19. №8. P.1484-1494.

55. Шевченко С.М., Апушкинский А.Г. Хинонметиды в химии древесины // Усп. хим. 1992. Т.61. №1. С.195-245.

56. Katritzky A.R., Fedoseenko D., Mohapatra P.P., Steel P.J. Reactions of pbenzoquinone with sulfur nucleophiles // Synthesis. 2008. №5. P.777-787.

57. Gulaborski R., Bogeski I., Mirceski V., Saul S., Pasieka 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. V.3. №1. P.1-8.

58. Freccero M. Quinone methides as alkylating and cross-linking agents // Mini-Rev. Org. Chem. 2004. V.1. №4. P.403-415.

59. O'Lenick J., Parkinson J.K. Phosphate esters: chemistry and properties // Surfactants. 1995. №11. P.17-20.

60. Bolgar M., Hubball J., Goeger J., Meronek S. Handbook for the Chemical Analysis of Plastic and Polymer Additives / 2nd Edn. Boca Raton: CRC Press. 2016. 608 p.

61. Bravo R., Driskell W.J., Whitehead R.D., Needham L.L., Barr D.B. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MSMS with isotopic internal standards // J. Anal. Toxicol., 2002. V.26. №4. P.245-252.

62. Singh B., Dodra T.D. Rapid method for the determination of some organophosphorous insecticides in a small amount of serum in emergency and occupation toxicology cases // Indian J. Occup. Environ. Med. 2009. V.13. №2. P.84-87.

63. Hernandes F., Sancho J.V., Pozo P.J. Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002. V.16. №18. P.1766-1773.

64. Eisert R., Levsen K., Wusch G. Analysis of polar thermally labile pesticides using different solid-phase extraction (SPE) materials with GC and HPLC techniques // Int. J. Environ. Anal. Chem. 2005. V.58. P.103-120.

65. Radford S.A., Panuwet P., Hunter R.E., Barr D.B., Ryan P.B. HPLC-MS/MS method for the measurement of insecticide degradates in baby food // J. Agr. Food Chem. 2014. V.62. P.7085-7091.

66. The NIST 17 Mass Spectral Library (NIST17/2017/EPA/NIH). Software/Data Version (NIST17); NIST Standard Reference Database, Number 69, June 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899: http://webbook.nist.gov (Accessed: August 2018.).

67. William J. Modern inorganic chemistry / New York: McGraw-Hill. 1991. 655 p.

68. Sato T., Hamada Y., Sumikawa M., Araki S., Yamamoto H. Solubility of oxygen in organic solvents and calculation of the Hansen solubility parameters of oxygen // Ind. Eng. Chem. Res. 2014. V.53, №49. P.19331-19337.

69. Smith C.D., Bartley J.P., Bottle S.E., Micallef A.S., Reid D.A. Electrospray ionization mass spectrometry of stable nitroxide free radicals and two isoindoline nitroxide dimmers // J. Mass Spectrom. 2000. V.35, №10. P.607-611.

70. Karancsi T., Slégel P., Novák L., Pirok G., Kovács P., Vékey K. Unusual behavior of some isochromene and benzofuran derivatives during electrospray ionization // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997. V.20. №11. P.81-84.

71. Charbonnier F., Berthelot L., Rolando C. Differentiating between capillary and counter electrode processes during electrospray ionization by opening the short circuit at the collector // Anal. Chem. 1999. V.71. №3. P.1585-1591.

72. Mora J.F., Berkel G.J., Enke C.G., Cole R.B., Martinez-Sanchez M., Fenn J.B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 2000. V.35. №5, P.939-952.

73. Пушкарева Т.И., Ермаков С.С., Зенкевич И.Г. Хроматомассспектрометрическая идентификация продуктов электрохимических превращений крезоксим-метила в растворах // Аналитика и контроль. 2018. Т.22. №3. С.245-252.

74. Зенкевич И.Г., Носова В.Э. Ограничения газохроматографического анализа соединений с активными атомами водорода. Диалкилфосфаты // Аналитика и контроль. 2016. Т.20, №4. С.307-313.

75. Wesp E.F., Brode W.R. The absorption spectra of ferric compounds. I. The ferric chloride – phenol reaction // J. Am. Chem. Soc. 1934. V.56. №5. P.1037-1042.

76. Gilbert J.C., Martin S.F. Experimental Organic Chemistry. A Miniscale and Microscale Approach / 5th ed. Boston: Cengage Learning. 2011. 966 p.

77. Trahanovski W. Oxidation in Organic Chemistry / Amsterdam: Elsevier. 2012.262 p.

78. Sarham A.A.O., Bolm C. Iron(III) chloride in oxidative C–C coupling reactions // Chem. Soc. Rev. 2009. V.38. №9. P.2730-2744.

79. The Chemistry of Phenols / Ed. Rappoport Z. Chichester: J. Wiley & Sons, 2003. 1506 p.

80. Tobinaga S. A review: synthesis of alkaloids by oxidative phenol and nonphenol coupling // Bioorg. Chem. 1975. V.4. P.110-125.

81. Tobinaga S., Kotani E. Intramolecular and intermolecular oxidative coupling reactions by a new iron complex  $[Fe(DMF)_3Cl_2][FeCl_4]$  // J. Am. Chem. Soc. 1972. V.94. P.309-310.

82. Toda F., Tanaka K., Iwata S. Oxidative coupling reactions of phenols with iron(III) chloride in the solid state // J. Org. Chem. 1989. V.54. P.3007-3009.

83. Зенкевич И.Г., Пушкарева Т.И. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация необычных продуктов окисления 4-изопропилфенола в водных растворах // Журн. общей химии. 2018. Т.88. №1. С.9-17.

84. Яштолд-Говорко В.А. Фотосъемка и обработка / Москва: Искусство, 1964. 444 с.

85. Демидович Б.П., Марон И.А., Шувалова Э.З. Численные методы анализа / Москва: Наука, 1967. 368 с.

86. Зенкевич И.Г., Кочетова М.В., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Индексы удерживания как наиболее воспроизводимые хроматографические параметры для характеристики фенольных соединений в обращено-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2005. Т.60. №7. С.734-746.

87. Zenkevich I.G., Kochetova M.V., Larionov O.G., Revina A.A., Kosman V.M. Retention indices as the most reproducible retention parameters in reversed phase HPLC. Calculation for hydrophylic phenolic compounds using reference n-alkyl phenyl ketones // J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 2005. V.28. P.2141-2162.

88. Зенкевич И.Г., 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.

89. Рубан В.Ф., Похвощев Ю.В. Определение изомеров крезола в водных растворах с использованием микро ВЭЖХ и двухдетекторной регистрации сигнала // Журнал аналитической химии. 2007. Т.62. №5. С.515–517.

90. 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. V.76. №1. P.79-90.

91. Karst U., Lohmann W., Baumann A. Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: tools, technologies and trends // LC-GC Europe. 2010. V.23. №1. P.8-16.

92. 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. V.3. №12. P.1291-1296.
93. Faber H., Vogel M., Karst U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies – a review // Anal. Chim. Acta. 2014. V.834. P.9-21.

94. Oberacher H., Pitterl F., Erb R., Plattner S. Mass spectrometric methods for monitoring redox processes in electrochemical cells // Mass Spectrom. Rev. 2015. V.34. №1. P.64-92.

95. Зенкевич И.Г. Особенности использования дифференциальных характеристик органических соединений для их групповой идентификации // Журнал общей химии. 2017. Т.87. №4. С.665-676.

96. Tyukavkina N. A., Zurabyan S. E, Beloborodov V. L. Book Two: Special Course // Organic chemistry. In two books / Moscow. Drofa. 2008. 592 p.

97. Ramos F.A., Takaishi Y., Shirotori M., Kawaguchi Y. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (allium cepa) skin // Agr. Food Chem. 2006. V.54. P.3551-3557.

98. Schreier P., Miller E. Studies on Flavonol Degradation by Peroxidase (Donor: H2O2-oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 2 – Quercetin // Food Chem. 1985. V.18. P.301-317.

99. Brown S. B., Rajananda V., Holroyd J. A., Evanst E. G. V. A study of the mechanism of quercetin oxygenation by 180 labelling. A comparison of the mechanism with that of haem degradation // Biochem. J. 1982. V.205. P.239-244.

100. 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. V.378. №2. P.224-233.

101. 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. V.43. P.861-867.

102. Kubo I., Nihei K., Shimizu K. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase // Bioorg. Med. Chem. 2004. V.12. P.5343–5347.

103. Zhou A., Kikandi S., Sadik O.A. Electrochemical degradation of quercetin: Isolation and structural elucidation of the degradation products // Electrochem. Commun. 2007. V.9. P.2246-2255.

104. Buchner N., Krumbein A., Rohn S., Kroh L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V.20. P.3229-3235.

105. Mocek M., Richardson P. J. Kinetics and mechanism of quercetin oxidation // Journal of The Institute of Brewing. 1972. V.78. P.459-465.

106. 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. V.17. P.795-804.

107. Hvattum E., Stenstrom Y., Ekeberg D. Study of the reaction products of flavonols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl using liquid chromatography coupled with negative electrospray ionization tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2004. V.39. P.1570-1581.

108. Yang L., Li P., Gao Y., Wu D. Qualitative observation of chemical change rate for quercetin in basic medium characterized by time resolved UV–vis spectroscopy // J. of Mol. Liq. 2010. V.151. P.134-137.

109. Zenkevich I.G., Features of the application of linear-logarithmic retention index system in reversed phase high performance liquid chromatography // Zh. Prikl. Khim. 1995. V.68. P.1321-1327.

110. Fahlman B. M., Krol E. S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin // J. Photochem. Photobiol. B. 2009. V.97. P.123-131.

111. Гущина С. В., Косман В. М., Зенкевич И. Г. // Вестн. СПбГУ. Сер. физ.хим. 2009. №1. С.96-103.

112. Chervyakovsky E. M., Bolibrukh D. A., Kurivaskii D. L., Gilep A. A., Vlasova T. M., Kurchenko V. P., Usanov S. A. // Chem. Nat. Compd. 2008. V.44. №4. P.427-437.

113. Cherviakovsky 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 hemeproteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V.342. P.459-464.

114. Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.-H. Mechanistic study in the enzymatic oxidation of flavonoids // Tetrahedr. Lett. 2008. V.49. P.619-623.

115. Gazak R., Sedmera P., Marzorati M., Riva S., Kren V. Laccase-mediated dimerization of the flavonolignan silybin // J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. 2008. V.50. P.87-92.

116. 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. V.40. P.7-14.

117. Zhou A., Sadik O.A. Comparative analysis of quercetine oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study // J. Agric. Food Chem. 2008. V.56. P.12081-12091.

118. 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. V.427. P.415-420.

119. Bergot B.J., Jurd L.J. Anthocyanins and related compounds – V. Formation of bisflavenylidenes from flavones by reductive dimerization // Tetraherdon. 1965. V.21. P.657-661.

120. Alvarez-Diduk R., Ramirez-Silva M.T., Galano A., Merkoci A. Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution of flavonols: a combined experimental and theoretical study // J. Phys. Chem. 2013. V.117. P.12347-12359.

121. Зенкевич И.Г., Гущина С.В. О причинах и устранении невоспроизводимости констант диссоциации кверцетина // Успехи современного естествознания. 2009. №9. С.10-14.

122. Зенкевич И.Г., Гущина С.В. Определение констант диссоциации соединений, окисляющихся кислородом воздуха в водных растворах (на примере кверцетина) // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. №4. С. 382-387.

123. Зенкевич И.Г., Гущина С.В. Аномальные свойства флавоноидов в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физ. химии. 2011. Т.85. №9. С.1762-1768.

124. Gil Y., Sinfort C. Emission of pesticides to the air during sprayer application: a bibliographic review // Atmos. Environ. 2005. V.39. P.5183-5193.

125. Akiyama Y., Yoshioka N., Tsuji M. Studies on pesticide degradation products in pesticide residue analysis // J. Food Hyg. Soc. JPN. 1998. V.39. P.303-309.

126. Andreu V., Pico Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods // Trends Analyt. Chem. 2004. V.23. P.772-789.

127. Rashidi M.Al. The heterogeneous photo-oxidation of difenoconazole in the atmosphere// Atmos. Environ. 2011. V.45. P.5997-6003.

128. http://www.pesticidy.ru/active\_substance/difenoconazole (дата обращения: март 2019 г.)

129. Urzua J., Gonzalez-Vargas C., Sepulveda F., Ureta-Zanartu M.S. Degradation of conazole fungicides in water by electrochemical Oxidation // Chemosphere. 2013. V.93. P.2774-2781.

130. Hana W., Zhonga C., Liang L., Suna Y. Electrochemical degradation of triazole fungicides in aqueous solutionusing TiO2-NTs/SnO2-Sb/PbO2 anode: Experimental and DFT studies // Electrochim. Acta. 2014. V.130. P.179-186.

131. http://www.allindianpatents.com/patents/249242-process-for-preparing-

triazole-compounds (дата обращения: март 2019 г.)

132. Reet G.V., Heeres J., Wals L. Triazole derivatives. United States Patent, № 4.079.062, 1978.

133. Hu A., Chen X., Tang J., Ye J., Zhang M. Process for preparation of 2-(4-phenoxyphenyl)oxirane derivatives. Chine Patent, № CN 102432566, 2005.

134. Green R.A., Brown R.C.D., Pletcher D. Understanding the performance of a microfluidic electrolysis cell for routine organic electrosynthesis // J. Flow. Chem. 2015. V.5. №1. P.31-36.

135. Steckhan E. Environmental protection and economization of resources by electroorganic and electroenzymatic syntheses // Chemosphere. 2001. V.43. P.63-73.

136. Paddon C.A. Towards paired and coupled electrode reactions for clean organic microreactor electrosyntheses // J. Appl. Electrochem. 2006. V.41. №61, P.617-634.

137. Pelisson C.-H., Denicourt-Nowicki A., Meriadec C., Greneche J.-M., Roucoux A. Magnetically recoverable palladium (0) nanocomposite catalyst for hydrogenation reactions in water // Chem. Cat. Chem. 2015. V.7. P.309-315.

138. Zenkevich I.G., Moeder M., Koeller G., Scharder S. Using new structurally related additive schemes in the precalculation of GC retention indices of polychlorinated hydroxybiphenyls on HP-5 stationary phase // J. Chromatogr. A., 2004. V.1025, P.227-236.

139. https://pharmaxchange.info/2014/09/phase-i-metabolism-oxidative-reactionsoxidation-of-aliphatic-and-alicyclic-compounds (дата обращения: март 2019 г.) 140. Ferrando-Climent L., Collado N., Buttiglieri G., Gros M., Rodriguez-Roda I., Rodriguez-Mozaz S., Barceló D. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment // Sci. Total Environ. 2012. V.438. P.404-413.

141. Пушкарева Т.И., Зенкевич И.Г. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах // Вестник СПбГУ. Сер. 4. 2017. №1. С.57-70.

142. https://pharmaxchange.info/2014/02/phase-i-metabolism-oxidative-reactionsoxidation-of-aromatic-compounds (дата обращения: март 2019 г.)

143. http://www.pesticidy.ru/active\_substance/kresoxim\_methyl (дата обращения: март 2019 г.).

144. Almeida J.M.S., Toloza C.A.T., Dornellas R.M., Silva A.R., Aucélio R.Q. Electrooxidation of trifloxystrobin at the boron-doped diamond electrode: electrochemical mechanism, quantitative determination and degradation studies // Int. J. Environ. Anal. Chem. 2016. V.96. №10. P.959-977.

145. Khandelwal A., Gupta S., Gajbhiye V.T., Varghese E. Degradation of kresoxim-methyl in water: impact of varying pH, temperature, light and atmospheric  $CO_2$  level // Bull Environ. Contam. Toxicol. 2016. V.96. No1. P.130-136.

146. Khandelwal A., Gupta S., Gajbhiye V.T., Varghese E. Degradation of kresoxim-methyl in soil: impact of varying moisture, organic matter, soil sterilization, soil type, light and atmospheric CO<sub>2</sub> level // Chemosphere. 2014. V.111. No1. P.209-217.

147. Herman J.L. Kresoxim-methyl. In: Joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide in food and the environment and WHO core assessment group on pesticide residues. Report. Rome, 1998. P. 147-160.

148. Krishnaveni N. S., Surendra K., Nageswar Y. V. D., Rama Rao K. Deoximation of oximes with 2-iodylbenzoic acid in water in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin // Synthesis. 2013. V.40. No13. P.1968-1970.

149. Quan N., Shi X.-X., Nie L.-D., Dong J., Zhu R.-H. A green chemistry method for the regeneration of carbonyl compounds from oximes by using cupric chloride dihydrate as a recoverable promoter for hydrolysis // Synlett. 2011. V.20. №7. P.1028-1032.

150. Liu S., Yang Y., Zhen X., Li J., He H., Fenga J., Whiting A. Enhanced reduction of C–N multiple bonds using sodium borohydride and an amorphous nickel catalyst // Org. Biomol. Chem. 2012. V.663. №30. P.663-670.

151. Micskei K., Holczknecht O., Hajdu C., Patonay T., Marchis V., Meo M., Zucchi C., Palyi G. Asymmetric synthesis of amino acids by Cr(II) complexes of natural amino acids // J. Organomet. Chem. 2003. V.682. №4. P.143-148.

152. Topcu S. Electrochemical and theoretical studies of some aromatic oxime derivatives carrying -C=O and -NH-R groups in the  $\alpha$ -position // J. Electrochem. Soc. 2016. V.163. No. P.122-126.

153. Dornellas R.M., Franchini R.A.A., Silva A.R., Matos R.C., Aucelio R.Q. Determination of the fungicide kresoxim-methyl in grape juices using square-wave

voltammetry and a boron-doped diamond electrode // J. Electroanal. Chem. 2013. V.708. №1. P.46-53.

## 7. ПРИЛОЖЕНИЕ

### Таблица 6.1

m/z	Гради	ент III	Гради	ент IV	Гради	ент V	$\mathrm{RI}\pm S_{\mathrm{RI}}$
	$t_{\rm R}$ , мин	RI	$t_{\rm R}$ , МИН	RI	$t_{\rm R}$ , мин	RI	
	•		о-Крезол	•			775±17*
213	18.5**	1029	15.2**	1031**	7.6**	1006**	1022±14**
319	18.6	1034	15.2	1031	7.6	1006	1024±15
	19.3	1070	16.0	1068	8.5	1057	1065±11
	21.0	1160	17.8	1155	10.7	1181	1065±21
			18.3	1179	11.2	1209	1194±21
	23.0	1273	19.9	1260	13.3	1324	1286±34
425	19.8	1095	16.6	1097	9.2	1097	1096±1
	20.3	1123	17.0	1116	9.7	1125	1121±5
	21.5	1188	18.3	1179	11.5	1225	1197±24
	22.2	1227	19.0	1214	12.4	1275	1239±32
			21.1	1322	13.7	1346	1334±17
			23.5	1450	15.0	1417	1434±23
531	20.9	1155	17.8	1155	10.7	1181	1181
	21.3	1177	18.1	1170	11.3	1214	1187
	22.3	1233	19.3	1230	12.6	1286	1250
	22.7	1256	19.7	1250	13.2	1319	1275
			22.4	1391	17.0	1526	1526***
637					14.0	1363	1363
	•		м-Крезол				$760 \pm 15$
213	16.4	930	12.8	928	5.5	882	$913\pm27$
	17.8	995	14.4	996	7.0	971	987 ± 14
319			13.0	936	5.3	870	870
	17.3	971	13.8	970	6.0	912	951 ± 34
	18.5	1029	15.0	1022	7.4	994	$1015\pm18$
	19.3	1070	15.9	1064	8.3	1046	$1060 \pm 12$
	19.9	1101	16.5	1092	9.3	1102	$1098 \pm 6$

# Времена и индексы удерживания главных продуктов окисления алкилфенолов хлоридом железа (III) в различных режимах элюирования

	20.7	1144	17.5	1140	10.3	1159	$1148 \pm 10$
425	19.0	1055	15.7	1054	8.2	1040	$1050\pm8$
	21.5	1188	18.3	1179	11.3	1214	$1194 \pm 18$
			п-Крезол				<b>760</b> ± 23
213	17.9	1000	14.5	1000	7.0	971	<b>990</b> ± 17
319	20.8	1150	17.5	1140	10.4	1164	$1151 \pm 12$
	22.7	1256	19.6	1245	13.0	1308	$1270\pm34$
425	22.0	1216	18.9	1209			$1212 \pm 5$
	23.3	1291	20.0	1265	13.2	1319	$1292 \pm 27$
					15.9	1466	1466
531	22.8	1262	22.0	1370	16.2	1482	1482
	23.6	1308	23.5	1450	18.3	1596	1596
637			23.6	1456	18.3	1596	1596
			25.8	1576	20.0	1687	1687
		4-Из	опропилф	енол			$973\pm14$
269			19.5	1240	12.1	1258	$1249 \pm 13$
403			23.7	1461	17.9	1574	1574
					20.3	1703	1703
537					22.0	1794	1794
					24.0	1901	1901
671					25.9	2003	2003
419			17.7	1150	10.1	1147	$1148 \pm 2$
			18.3	1179	10.7	1181	$1180 \pm 1$
553			21.8	1359	15.7	1455	1455
			22.5	1397	16.5	1498	1498

\*Для исходных фенолов приведены статистически обработанные справочные значения индексов удерживания [86, 87]. \*\*Жирным шрифтом здесь и далее выделены значения для основных компонентов реакционных смесей. \*\*\* Если стандартные отклонения средних значений ИУ в разных режимах разделения превышают 40, то вместо средних величин указаны только значения ИУ в режиме V.

## Таблица 6.2

Аналитические параметры продуктов окисления кверцетина кислородом воздуха в водных растворах (I) – Режим регистрации спектров по общему ионному току (*AutoMS*); (II; M) – Режим регистрации спектров в условиях изолирования и фрагментации ионов с указанными в скобках массовыми числами (*MRM*).

	RI	(m/)	$(m/z)_{[}$	Предполагаемые структуры компонент	Предполагаемые структуры компонента, ссылка, значения ( <i>logP</i> ), комментарии			
$I_{\rm R}$		$(M/Z)_{\text{макс}}$	M-H]	(выделены курсивом)		интенсивных сигналов, <i>m</i> /z		
<b>2.9</b> A	_	109	181	ОН о́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́́	осос носос он этил-3,4-дигидроксибензоат [97] (1,41 <sup>b</sup> ) ( <i>Структура исключена, см. текст</i> )	97; 125; 137 (I)		
<i>4.0</i> B		349		Не иденти	237; 261; 305; 335; 358 (I)			

5.2		197	197	<ul> <li>Он</li> <li>Он</li> <li>Он</li> <li>Он</li> <li>2-оксо-2-(2,4,6-тригидроксифенил)-</li> <li>уксусная кислота [98, 103], (-0,04<sup>a</sup>, 0,69<sup>b</sup>)</li> </ul>	но но он он этил-2,4,6-тригидроксибензоат (1,02 <sup>a</sup> ) ( <i>Структура исключена, см. текст</i> )	109; 125; 153 (I) 125; 153 (II; 197)
5.5	_	180	197	но н	он – – – – – – – – – – – – – – – – – – –	109; 137; 153 (I)
6.0	670	169	169	но 2,4,6-тригидроксибензойная кислота	соон он (98, 99, 103, 108, 109], (0,42 <sup>a</sup> , 2,04 <sup>b</sup> )	151 (I) 125; 151 (II; 169)

68 C	671	279		Не илентифицирован	151; 169; 173; 193; 243; 287
<u>0.0</u> 0	071	215		пендентнұнцарован	(I)
				СООН	109; 113; 125 (I)
6.9	671	153	153	но он	109 (II; 153)
				3,4- дигидроксибензойная кислота [98, 99, 103, 104, 108, 109], (0,81 <sup>a</sup> , 1,01 <sup>b</sup> )	
7.1	672	615		Не илентифицирован	153; 169; 285; 303; 317; 330;
<u> </u>					485; 569 (I)
7.3	672			Не идентифицирован	269; 287; 331 (I)
8.6	677	635: 317	317	Не идентифицирован	191; 299; 441; 657 (I)
		,			, , , , , , , ,
					169; 271; 289; 317; 333; 483;
				ОН	497 (I)
8.8	678	351	351	СООН	151; 169; 181; 271; 289; 333
					(II; 351)
				2-(карбокси(3,4-дигидроксифенил)(гидрокси)метокси)-4,6-дигидроксибензойная	
				кислота [103] (1,46 <sup>a</sup> )	
<u>8.8</u>	678	351	351	но соон он но соон он соон 2-(карбокси(3,4-дигидроксифенил)(гидрокси)метокси)-4,6-дигидроксибензойная кислота [103] (1,46 <sup>a</sup> )	169; 271; 289; 317; 33 497 (I) 151; 169; 181; 271; 28 (II; 351)

<u>8.8</u>	678	317		Не иден	тифицирован	113; 207; 431; 561 (I)
<u>9.1</u>	680	191; 351		Не иден	151; 163; 169; 207; 273; 273; 289; 299; 307; 317; 333; 339; 347; 361 (I)	
<u>9.6</u>	683	179; 333; 667	333	HO + G + G + G + G + G + G + G + G + G +	$\downarrow \downarrow $	151; 153; 197; 317; 333; 355; 447; 651; 667; 689; 705 (I) 197; 333; 513; 531 (II; 667)



9.6	683	331	331	но	оон 	151; 179; 269; 287; (I) 269; 287 (II; 331)
<u>9.8</u>	684	179		Не идент	гифицирован	107; 153; 197; 281; 299; 317; 333; 355 (I)
<u>10.3</u>	688	317	317	но с с с с с с с с с с с с с с с с с с с	H0 <sub>+</sub> (+)+(-)+ +(-)+(-)+(-)+ -(-)	191; 207; 299; 431; 499; 635; 657 (I)

				но с с с с с с с с с с с с с с с с с с с		
<u>10.6</u>	690	317		Не иден	тифицирован	191; 207; 287; 331; 497; 513; 635; 649 (I)
<u>11.1</u>	695	635	317	но – (3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-триг 106], (1,06 <sup>a</sup> ,2,64 <sup>b</sup> ) ( <i>Тривиальное назва</i> л	он он он он он он он он он (100, 102, ние «Алфитонин»)	191 (I) 163; 191; 207; 231; 245; 255; 273; 299 (II; 317)
<u>11.4</u>	697			Не иден	тифицирован	163; 191; 207; 231; 245; 255; 273; 299 (II; 317)

<u>11.6</u>	699	453	453	но но но но но но но но но но	317; 333; 434; 497; 617; 631; 651; 752 (I)
<u>11.7</u>	700	317		Не идентифицирован	253; 317; 333; 434; 452; 468; 497; 591; 609; 630; 647 (I)
<u>12.0</u> D	703	497	305	он но сон он 2-((3,4-дигидроксибензоил)окси)-4,6-дигидроксибензойная кислота [99, 106, 110], (1,52 <sup>a</sup> , 2,05 <sup>b</sup> ) ( <i>Тривиальное название «Депсид»</i> )	497 (I) 177; 195; 287 (II; 305)
<u>12.3</u>	706	667		Не идентифицирован	271; 289; 315; 333; 667; 689 (I)

				271; 289; 297; 315 (II; 667)
<u>12.3</u>	706	617	Не идентифицирован	317; 333; 434; 453; 497; 519; 617; 633 (I)
12.8	711	331	Не идентифицирован	434; 453; 499; 627; 869; 891 (I)
<u>12.9</u>	712	331	Не идентифицирован	434; 452; 497; 615; 633 (I)
13.2	716		Не идентифицирован	303; 317; 331; 499; 435; 453; 615; 633; 751; 766 (I)
<u>13.7</u>	722	331	ОН НО С С )-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-1-(2,4,6- тригидроксифенил)проп-2-ен- 1-он (0,47 <sup>a</sup> ) [110]	303; 423; 434; 445; 465; 481; 499; 631; 663 (I)
<u>14.2</u>	728	479	Не идентифицирован	311; 355; 421; 437; 465; 479

				(II; 617)
<u>14.4</u>	731	897	Не идентифицирован	303; 331; 347; 448; 485; 515; 562; 633; 753; 779; 829; 867; 933 (I)
<u>14.5</u>	732	345	но с с с с с с с с с с с с с с с с с с с	273; 303; 317; 469; 479; 573; 617; 709; 727 (I)
<u>14.6</u>	733	733	Не идентифицирован	303; 347; 448; 481; 630; 744; 779; 933 (I)

14.7	735	363	363	но с с с с с с с с с с с с с с с с с с с	но <sub>ң</sub> () +ю <sub>ң</sub> () -(3,4- дигидроксифенил)-2- этокси- 3,3,5,7-тетрагидроксихроман-4-он [104, 106], (1,91 <sup>а</sup> )	300; 345; 409; 431; 477; 709 (I) 345; 363 (II; 727)
<u>15.6</u>	747	465		Не иден	Не идентифицирован	
16.8	765	331		Не иден	113; 331; 379; 453; 483; 615; 634 (I)	
17.2	772	601		Не иден	птифицирован	327; 451; 517; 601; 631; 653; 725 (I)

						295; 315; 339; 449 (II; 603)
17.6	779	603	301	но	он о	415 (I) (II; 603)
<u>18.9</u>	802	617		Не иден	тифицирован	(I) 573; 599 (II; 617)
20.0	823	435		Не идентифицирован		113; 389; 500; (I)
20.1	825	285	601			299; 327; 431; 449; 465; 513; 557(II; 601)
				1а-(3,4-дигидроксифенил)-7а-(2-	1а-(3,4- дигидроксифенил)-4,6-	

				(3,4-дигидроксифенил)-3,5,6- тригидрокси-4-оксо-4H-хромен-7- yl)-4,6-дигидрокси-1аH-окси- peно[2,3-b]хромен-7(7аH)-он, димер [97, 98], (1,55 <sup>a</sup> )	дигидрокси-7а-(2-гидрокси-4-(3,5,7- тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2- ли)фенокси)-1аН-оксирено[2,3- b]хромен7(7аН)-он, димер [104, 106]	
20.3	829	601		Не иден	тифицирован	285; 435; 571; 871; 901 (I)
<u>20.5</u>	833	449	601	Димер	о кверцетина	431; 449 (II; 601) 637; 647; 669; 691; 715 (I)
<u>21</u>	844	901		Не иден	тифицирован	299; 329; 397; 663; 685; 777; 993 (I)
<u>21.2</u>	848	901		Не иден	тифицирован	299; 329; 663; 685; 731; 753; 777 (I)
21.4	852	435	315	HO (E) 2-(4.5-лиги прокси-6-оксоник того		315; 599; 600; 713 (I)
				(E)-2-(4,Э-дигидрокси-б-оксоциклоге	кса-2,4-диен-1-илиден)-5,/-	

				дигидроксихроман-3,4-дион [105] (-2,94 <sup>a</sup> )	
	0.5.6	001			113; 145; 191; 218; 347; 381;
<u>21.6</u>	856	901		Не идентифицирован	485; 520; 587; 677; 711; 776; 805; 917 (I)
22.0	865	615			585 (I)
22.1	868	463			571 (II; 617)
22.4	874	917		Не идентифицированы.	299; 459; 617; 963 (I)
22.5	876	585			303; 449; 621; 735; 917(I)
<u>22.8</u>	883	603			299; 345; 603; 648; 695; 715; 902; 931 (I)
23.0	888	601	901		271; 299 (I)
<u>23.3</u>	895	901	901	Тримеры кверцетина.	299; 329; 435; 451; 601; 937 (I)
23.7	905	901	901		435; 599; 693; 735; 825; 849 (I)

23.9	910	901	901
	020	0.01	0.01
	930	901	901

#### Примечания :

А - жирным шрифтом выделены времена удерживания компонентов присутствующих во всех реакционных смесях и стабильных при их хранении;

В – курсивом выделены времена удерживания компонентов, содержание которых в реакционных смесях увеличивается со временем;

С – подчеркнуты времена удерживания нестабильных компонентов, которые могут быть обнаружены в реакционых смесях в течение не более трех часов после начала процесса;

D – время удерживания депсида, хроматографический пик которого появляется приблизительно через час после начала процесса и исчезает через три часа.

Надстрочным символом <sup>а</sup> обозначены коэффициенты гидрофобности вычисленные в программе ChemDraw, надстрочным символом <sup>b</sup> обозначены коэффициенты гидрофобности посчитанные в программе ACD.