

ИССЛЕДОВАНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ХЛОРОГЕНОВЫХ КИСЛОТ С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

И.П. Анисимович
В.И. Дейнека
Л.А. Дейнека

Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет, 308015
г.Белгород, ул.Победы 85
e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Методом ВЭЖХ определены константы образования комплексов включения изомеров хлорогеновых и кофейной кислоты с β -циклодекстрином. С использованием ^1H -ЯМР подтверждено образование двух типов комплексов в случае 5-кофеоилхинной кислоты. Выводы подтверждаются компьютерным моделированием с оптимизацией геометрии комплекса методом ММ+. Обсуждаются причины меньшей устойчивости комплексов 3- и 4-кофеоилхинных кислот.

Ключевые слова: комплексы включения, константа устойчивости, хлорогеновые кислоты, кофейная кислота, β -циклодекстрин, ВЭЖХ, ^1H -ЯМР

Введение

Необходимость употребления достаточных количеств антиоксидантов для сохранения здоровья человека является требованием современного урбанизированного общества [1]. Для любителей кофе основным антиоксидантом, поступающим в организм с пищей, является хлорогеновая кислота, потребление которой достигает 0.5 – 1 г в сутки [2]. Если не учитывать медико-биологическую проблему (потребление хлорогеновой кислоты приводит к увеличению концентрации гомоцистеина, вещества являющегося предвестником сердечнососудистых заболеваний, в крови [3]), то удивительно употребление в цитированной выше (и в ряде других публикаций) работе названия хлорогеновая кислота. Дело в том, что хорошо известно, что в кофе обнаруживаются несколько изомерных хлорогеновых кислот [3, 4]. Хлорогеновая кислота является эфиром кофейной кислоты (выступающей в качестве кислотной компоненты) и одного из изомеров хинной кислоты (спиртового компонента), причем таких изомеров может быть четыре, обнаруживаемых в растительных материалах [5].

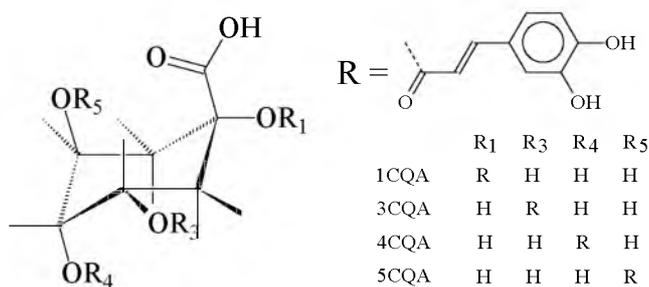


Схема 1. Структура изомеров хлорогеновых кислот

Обычно под термином «хлорогеновая кислота» подразумевают 5-кофеоилхинную кислоту. Высокая биологическая активность хлорогеновой кислоты объясняет интерес к этому веществу (6863 ссылки на публикации в научных журналах по данным SCIRUS), и по отношению к комплексам включения хлорогеновой кислоты и циклодекстринов. В работе [6] с использованием двух спектроскопических методов установлено, что β -циклодекстрин (CD) образует с хлорогеновой (5CQA) и кофейной кислотами комплексы включения состава 1:1 с константами устойчивости 424 и 278 моль/л, соответственно. При этом на основании анализа термодинамических па-



раметров комплексообразования и результатов молекулярного моделирования было сделано предположение о том, что в случае обеих кислот замещенный фенольный фрагмент занимает полость CD. Примерно то же значение константы устойчивости для комплекса хлорогеновой кислоты с β -циклодекстрином (465 моль/л) было получено с использованием флуоресцентной спектроскопии в другой работе [7]. Но с использованием метода ^1H -ЯМР [8] по изменениям химических сдвигов сигналов протонов в D_2O было найдено иное соотношение между константами комплексообразования: 504 и 936 моль/л для хлорогеновой и кофейной кислот, соответственно. Исследуя взаимодействие хлорогеновой кислоты с β -циклодекстрином флуоресцентным и калориметрическим методом, авторы работы [9] получили неодинаковые значения константы комплексообразования – от 207 до 351 для первого метода (в зависимости от использованной модели) и заметно большее значение – 442 моль/л для второго метода. Для объяснения полученных результатов было предположено, что хлорогеновая кислота образует два типа комплексов при постоянном соотношении «гость-хозяин» 1:1. В одном из них полость β -циклодекстрина занята ароматическим кольцом от кофейной кислоты, а во втором – циклогексановым фрагментом хинной кислоты, что подтверждено анализом двухмерных ^1H -ЯМР спектров. При этом обращается внимание на то, что спектроскопические методы (в отличие от калориметрического) не позволяют получить полную информацию о комплексообразовании в данном случае. Наконец, вхождение хлорогеновой кислоты в полость β -циклодекстрина фрагментом от хинной кислоты принимается в качестве основного механизма комплексообразования в работе [10].

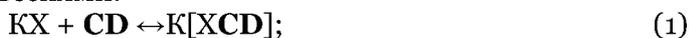
Целью настоящей работы является получение сведений о комплексообразовании β -циклодекстрина не только с 5-кофеилхинной кислотой, но с ее изомерами методом обращенно-фазовой ВЭЖХ – методом, позволяющим определять суммарную константу комплексообразования.

Объекты и методы исследования

В работе использовали хроматографическую систему, составленную из насоса высокого давления Beckman 110B, самодельного устройства - дегазатора, крандозатора Rheodyne 7125 с петлей 200 мкл. Спектрофотометрического детектора с изменяемой длиной волны (Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5.

Результаты и их обсуждение

Если хлорогеновые кислоты могут образовывать с β -циклодекстрином только комплексы в соотношении 1:1 (что подтверждается выводами всех известных нам опубликованных работ для данной пары соединений), но при этом возможны различные варианты занятия полости молекулы «хозяина» молекулой «гостя», то такие процессы описываются двумя равновесиями:



где KX – кофеилхинная кислота;

CD – β -циклодекстрин;

$\text{K}[\text{XCD}]$ – комплекс, в котором полость β -циклодекстрина занята фрагментом хинной кислоты;

$[\text{CDK}]\text{X}$ – комплекс, в котором полость β -циклодекстрина занята фрагментом кофейной кислоты.

Пренебрегая коэффициентами активностей (что оправдано в методе ВЭЖХ вследствие очень небольшой концентрации сорбатов), нетрудно определить долю кофеилхинной кислоты, находящейся в подвижной фазе в свободном состоянии:

$$\alpha(\text{KX}) = 1 / (1 + K_1 \cdot [\text{CD}] + K_2 \cdot [\text{CD}]) = 1 / (1 + (K_1 + K_2) [\text{CD}]), \quad (3)$$

где K_1 и K_2 – константы равновесий по уравнениям 1 и 2, соответственно.



Если комплексы с гидрофильной внешней поверхностью не удерживаются обращенной фазой, то удерживание сорбатов должно пропорционально уменьшиться при образовании таких комплексов в подвижной фазе:

$$k(KX) = k_0 \cdot \alpha(KX) = k_0 / (1 + (K_1 + K_2) [CD]), \quad (4)$$

где $k(KX)$ – фактор удерживания KX при данной концентрации CD ;

k_0 – фактор удерживания сорбата при отсутствии CD в подвижной фазе.

Уравнение (4) можно преобразовать в вид, наиболее удобный для обработки экспериментальных данных:

$$k_0/k(KX) = 1 + (K_1 + K_2) [CD]. \quad (5)$$

Для исследования комплексообразования изомерных хлорогеновых кислот с β -циклодекстрином крепкий водный настой кофе после фильтрования через бумажный фильтр пропускали через патрон ДИАПАК С18. Последующей десорбцией водно-ацетонитрильной смесью (80:20 об.%) была выделена фракция, содержащая в основном изомерные хлорогеновые кислоты, идентифицированные по УФ-спектрам индивидуально выделенных фракций, рис.1 и рис.2.

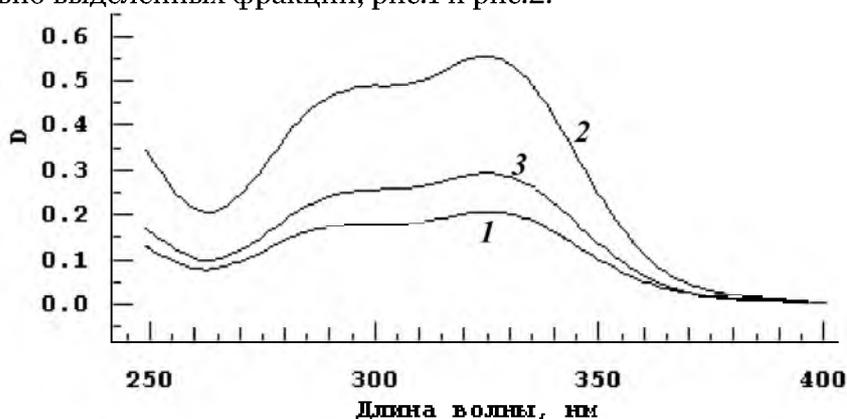


Рис. 1. УФ-спектры изомерных хлорогеновых кислот

Номера на рисунке соответствуют номерам пиков на хроматограмме, рис.2.

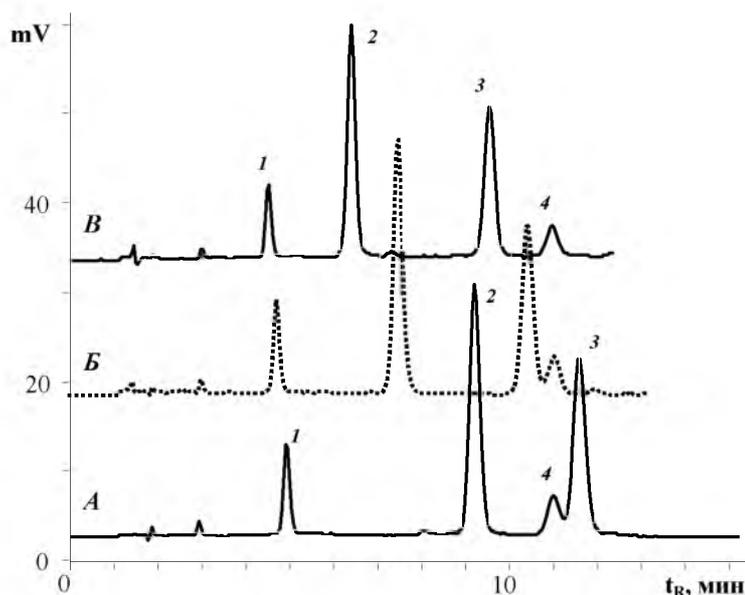


Рис. 2. Разделение изомерных хлорогеновых кислот в элюентах с добавкой β -циклодекстрина. Колонка 150×4.6 мм Kromasil 100-5C18, подвижная фаза: 7.5% CH_3CN , 2 % CH_3COOH в воде; 1 мл/мин. Детектор УФ 320 нм. Добавки β -циклодекстрина: А – 0; Б – 0.001874; В – 0.003679 моль/л. Соединения: 1 – 3-кофеилхинная, 2 – 5-кофеилхинная и 3- 4-кофеилхинная кислоты, 4 – кофеин.



Положение на хроматограмме пика 5-кофеоилхинной кислоты установили по стандартному образцу хлорогеновой кислоты. Для отнесения пиков остальных изомеров были использованы литературные данные [11-13], по которым изомерные хлорогеновые кислоты элюируются в порядке:

$$t_R(3CQA) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA). \tag{6}$$

Как следует из приведенных на рис.2 данных, при увеличении концентрации β-циклодекстрина удерживание трех хлорогеновых кислот уменьшается, но неодинаково; удерживание кофеина при этом практически не изменяется, что соответствует его неспособности образовывать комплексы с β-циклодекстрином [14]. Обработка экспериментальных данных по уравнению (5), рис.3, во-первых, показывает хорошую вероятность линейной аппроксимации (R^2 не ниже 0.998), что подтверждает образование комплексов в соотношении 1:1.

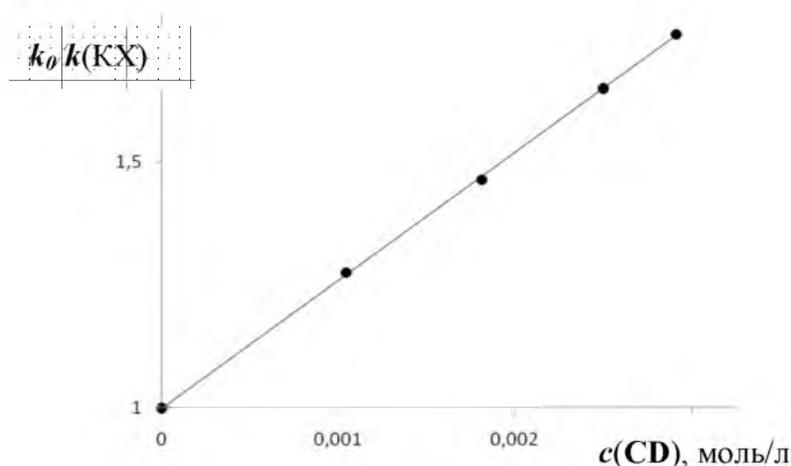


Рис. 3. Изменение удерживания 5CQA в подвижных фазах с добавкой CD

Во-вторых, константы устойчивости комплексов заметно различались для водных растворов, содержащих 7.5 об.% ацетонитрила и 2 об.% уксусной кислоты: 107 ± 12 , 163 ± 15 и 291 ± 10 моль/л для 3CQA, 4CQA и 5CQA. Поскольку возможна двоякая ориентация хлорогеновой кислоты в комплексе включения, то важную информацию можно было бы получить, исследуя комплексообразование с β-циклодекстрином не только изомерных хлорогеновых кислот, но и самой кофейной кислоты в одинаковых условиях. Такие данные были получены для двух составов подвижных фаз, табл.1.

Таблица 1

Константы устойчивости комплексов включения β-циклодекстрина с кофейной и хлорогеновыми кислотами

№	Объемная доля модификатора, %			$K_{(5.5)}/K_{(6.5)}$
	CH ₃ CN	5.5	6.5	
	CH ₃ COOH	5.0	5.0	
	Кислоты	Константы устойчивости комплексов, моль/л		
1	Кофейная	98 ± 6	72 ± 8	1.36
2	3-Кофеоилхинная	51 ± 6	37 ± 4	1.37
3	4-Кофеоилхинная	81 ± 6	60 ± 4	1.35
4	5-Кофеоилхинная	146 ± 12	116 ± 9	1.26

Существенное различие в устойчивости констант комплексообразования подтверждается и в этом случае. Более того, константа комплексообразования для 5CQA оказывается больше, чем для кофейной кислоты, что свидетельствует в пользу одновременного присутствия в растворе двух вариантов комплексов.



Константы комплексообразования других изомеров хлорогеновой кислоты оказались неожиданно небольшими. Так, для самого липофильного изомера 4CQA (с самым большим удерживанием) следовало бы предположить наибольшую константу, поскольку молекула «гостя» должна заполнить гидрофобную полость β -циклодекстрина. Однако константа комплексообразования для нее оказывается примерно на 20% ниже, чем константа комплексообразования кофейной кислоты. Наименьшее значение константы комплексообразования найдено для 3CQA, что, с одной стороны, неудивительно, поскольку такой изомер имеет наименьшее удерживание в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, но, с другой стороны, уменьшение константы вдвое по сравнению с константой для кофейной кислоты предположить было бы трудно. Поэтому в случае изомерных хлорогеновых кислот определяющими могут быть стерические эффекты для подходящих конформаций молекул.

То, что константа комплексообразования увеличивается при уменьшении концентрации ацетонитрила в растворе, является отражением конкуренции молекул этого соединения и хлорогеновых кислот за место в полости CD. Тогда чем больше молекул ацетонитрила высвобождаются при комплексообразовании, тем сильнее должна быть такая зависимость. Однако для 5CQA при уменьшении объемной доли ацетонитрила с 6.5% до 5.5% рост константы оказывается заметно меньше, чем для 4CQA, 3CQA и кофейной кислоты (для последней группы это изменение примерно одинаково), см. табл.1. Это также свидетельствует в пользу двоякого способа внедрения молекулы 5CQA в полость молекулы «хозяина», поскольку гидрофобность хинной кислоты (и число молекул ацетонитрила в сольватной оболочке) заметно меньше по сравнению с гидрофобностью кофейной кислоты: рассчитанные на сайте Virtual Computational Chemistry Laboratory (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>) ALOGPs равны -2.46 и 1.67, соответственно.

Действительно, только для 5CQA нами обнаружена компактная конформация, при которой *цис*-заместители - радикал кофейной кислоты и полярная карбоксильная группа в аксиальных положениях относительно циклогексанового кольца хинной кислоты направлены в одну сторону и не препятствуют вхождению этого фрагмента в полость β -циклодекстрина, что было подтверждено компьютерным моделированием комплекса в программной среде HyperChem 8.0 при оптимизации геометрии комплекса методом MM+, рис.4а.

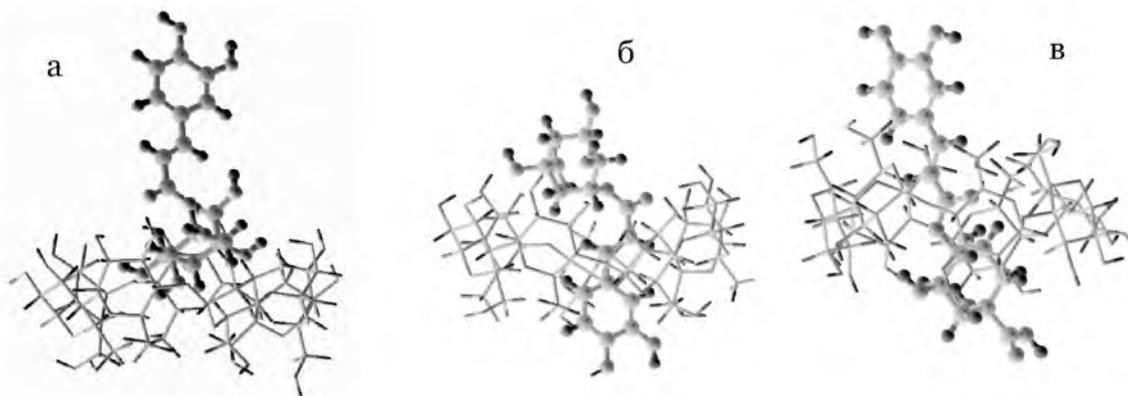


Рис. 4. Оптимизированная геометрия комплексов а) - 5CQA и CD: вариант по уравнению (1), б) - 5CQA и CD: вариант по уравнению (2); в) - 4CQA и CD

Для другой ориентации 5CQA оптимизированная структура комплекса предполагает существенно более глубокое внедрение в полость CD, рис.4б. Для других изомеров хлорогеновых кислот подобных устойчивых компактных конформаций нами не было найдено. Впрочем, для 4CQA оптимизация геометрии приводит к «вытянутой» конформации с экваториальным расположением карбоксильной группы и радикала кофейной кислоты, которые не должны создавать стерических препятствий



для образования комплекса с CD, рис.4в, что, возможно, и обеспечивает достаточно высокую константу устойчивости соответствующего комплекса.

Как отмечалось выше в трех работах по исследованию комплексообразования 5QA с CD методом ЯМР были получены различные результаты. Мы также использовали метод ¹H-ЯМР но при двойном сопоставлении изменения химических сдвигов, причем не только для 5QCA, но и для кофейной кислоты. Прямое сопоставление химических сдвигов для одних и тех же протонов в D₂O и в растворе β-циклодекстрина проводить не совсем корректно, поскольку изменения могут относиться и к молекулам, находящимся со внешней стороны молекулы «хозяина».

По этой причине дополнительно были записаны ЯМР-спектры для растворов этих кислот при добавках глюкозы, не способной к комплексообразованию. В настоящей работе использовано отнесение сигналов протонов для нумерации протонов по схеме 2, определенное в работе [15].

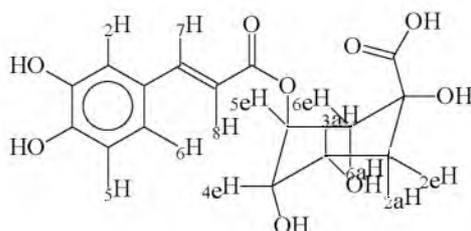


Схема 2. Нумерация протонов в молекуле 5-кофеилхинной кислоты

Как видно из представленных данных, табл.2, наибольшее изменение химических сдвигов для кофеоильного радикала при переносе хлорогеновой кислоты из воды в раствор β-циклодекстрина найдено для винильных протонов. Однако и перенос в раствор глюкозы приводит к почти тому же результату, хотя ни о каких комплексах включения здесь не может идти и речи. При этом показательным оказывается изменение химических сдвигов сигналов протонов при переносе 5CQA из водно-глюкозного раствора в водно-циклодекстриновый: наибольшему смещению подвержены сигналы протонов в положении 2, 6 и 5, что может отвечать за ориентацию 5CQA по направлению (2). Подобные изменения обнаружены и для кофейной кислоты, табл.3, только существенное изменение касается также и винильных протонов, что является основным отличием рассмотренной пары кислот.

Таблица 2

Химические сдвиги протонов кофеоильного радикала 5CQA

№ протона	D ₂ O	+ CD	+ глюкоза	Разность хим.сдвигов
2	7.1918	7.2089	7.2607	+0.0518 / +0.0171
5	6.9760	6.9722	7.0093	+0.0371 / -0.0038
6	7.1240	7.1200	7.1894	+0.0694 / -0.0040
7	7.6089	7.7078	7.6882	-0.0196 / +0.0989
8	6.3525	6.4398	6.4349	-0.0049 / +0.0873

Таблица 3

Химические сдвиги протонов кофейной кислоты

№ протона	D ₂ O	+ CD	+ глюкоза	Разность хим.сдвигов
2	7.2124	7.1473	7.2525	+0.1052 / -0.0651
5	6.9903	6.9959	7.0050	+0.0091 / +0.0056
6	7.1494	7.0851	7.1861	+0.1010 / -0.0643
7	7.6342	7.6172	7.6691	+0.0519 / -0.0170
8	6.3683	6.3133	6.4099	+0.0966 / -0.0550



С другой стороны, химические сдвиги протонов фрагмента хинной кислоты изменяются намного меньше при переносе 5CQA из водного в водно-глюкозный раствор по сравнению с переносом в раствор β -циклодекстрина. Это относится не только к протонам СН-групп - как в положении 3', так и в положении 5' (сигналы протонов в положении 4' сливаются с сигналами протонов CD или глюкозы), но и к сложной суперпозиции сигналов протонов двух метиленовых групп, рис.5.

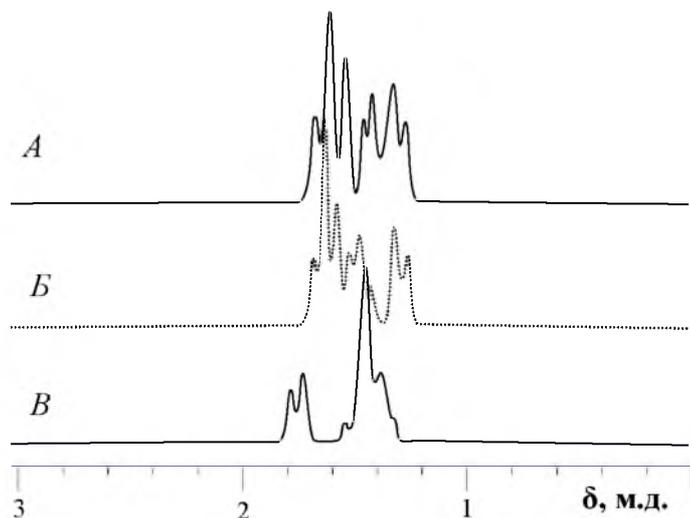


Рис. 5. Фрагмент ^1H -ЯМР – спектра 5-кофеоилхинной кислоты
А – раствор в D_2O , Б – добавкой глюкозы, В – с добавкой β -циклодекстрина

Это подтверждает образование комплексов включения 5CQA – CD с заполнением полости «хозяина» фрагментом хинной кислоты.

Заключение

Таким образом, метод ВЭЖХ позволяет исследовать комплексы включения при наличии нескольких различных ориентаций молекулы «гостя» относительно полости «хозяина», если доступны соответствующие образцы сравнения.

Список литературы

1. Федина П.Ф., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом // Химия растительного сырья. – 2010. - №.2. – С. 91-97.
2. Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans // J. Nutr. – 2001. – V.131. – P. 66–71.
3. Olthof M.R., Hollman P.C., Zock P.L., Katan M.B. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – V.73. – P. 532–538.
4. Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L.C., Donangelo C. Chlorogenic Acid Compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans // J. Nutr. – 2007. – V.137. – P. 2196–2201.
5. Lin L.-Z., Harnly J.M. Identification of Hydroxycinnamoylquinic Acids of Arnica Flowers and Burdock Roots Using a Standardized LC-DAD-ESI/MS Profiling Method // J. Agric. Food Chem. – 2008. – V.56. – P. 10105-10114.
6. Górnas P., Neunert G., Baczyński K., Polewski K., Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study // Food Chemistry. – 2009. – V.114. – P. 190–196.
7. Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L.A., Torresrivras F., Rodrigo-Garcia J., Gonzalez-Aguilar G.A. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD) // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2005. – V.53. – P. 121–129.



8. Rodrigues E., Vazi S., Gil V.M.S.S., Caldeira M.M., da Silva A.M.G.M. Inclusion of Polyphenol Oxidase Substrates in β -Cyclodextrin: A $^1\text{H-NMR}$ Study // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2002. – V.44. – P. 395–397.
9. Álvarez-Parrilla E., Palos R., de la Rosa L.A., Frontana-Urbe B.A., González-Aguilar G.A., Machi L., Ayala-Zavala J.F. Formation of Two 1:1 Chlorogenic Acid: β -cyclodextrin Complexes at pH 5: Spectroscopic, Thermodynamic and Voltammetric study // *J. Mex. Chem. Soc.* – 2010. – V.54(2). – P. 103-110.
10. Zhao M., Wang H., Yang B., Tao H. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity // *Food Chem.* – V.120. – P. 1138-1142.
11. Maldini M., Montoro P., Kapusta I., Oleszek W., Piacente S., Pizza C. Quantitative Analysis of Caffeoylquinic Acids and Styrylpyrones in *Sweetia panamensis* Bark by UPLC // *Chromatographia.* – 2009. – V.70. – P. 1621–1626.
12. Clifford M.N., Zheng W., Kuhneret N. Profiling the Chlorogenic Acids of Aster by HPLC–MSn // *Phytochem. Anal.* – 2006. – V.17. – P. 384–393
13. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids M.N. // *J. Agric. Food Chem.* - 2003. - V.51. - P. 2900–2911.
14. Терехова И.В., Кумеев Р.С., Альпер Г.А. Взаимодействие кофеина с замещенными циклодекстринами в воде // *Журнал физической химии.* – 2007. – Т.81, №7. – С. 1221-1226.
15. Tolonen A., Joutsamo T., Mattila S., Kämäräinen T., Jalonen J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and $^1\text{H-NMR}$ methods // *Phytochem. Anal.* – 2002. – V.13. – P. 316-328.

INVESTIGATION OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES OF CHLOROGENIC ACIDS WITH β -CYCLODEXTRIN

I.P. Anisimovich
V.I. Deineka
LA. Deineka

*Belgorod National Research Uni-
versity, 308015 Belgorod,
Pobeda Str.*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

By means of HPLC constants of complex formation of isomeric chlorogenic as well as caffeic acids with β -cyclidextrin. The formation of two complexes with different geometry for 5-caffeoylquinic acid has been proved by $^1\text{H-NMR}$ spectra. The reasons of complexes stabilities was considered discussed and confirmed by MM+ structure optimization.

Key words: supramolecular complexes, constants of complex formation, chlorogenic acids, caffeic acid, β -cyclodextrin, HPLC, $^1\text{H-NMR}$.