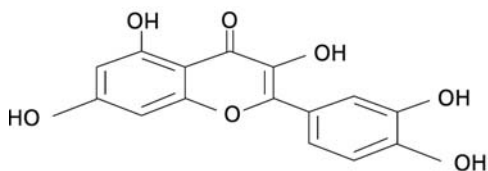


Ispitivanje reakcije degradacije kvercetina u vodenim sredinama

Ispitivan je uticaj različitih pufera na sastav proizvoda i kinetiku reakcije samooksidacije kvercetina. Ispitivani su sledeći puferi: Britton-Robinson, Tris-NaOH, i fosfatni pufer. Reakcija je praćena spektrofotometrijski. Utvrđeno je da brzina reakcije zavisi od vrste pufera i raste sa porastom pH vrednosti. Pri tom nije utvrđeno da dolazi do promene mehanizma reakcije. U fosfatnom puferu brzina reakcije je za 1-2 reda veličine veća no u ostalim puferima, pa je potrebno detaljnije ispitivanje mehanizma ove reakcije u prisustvu fosfatnog pufera u cilju otkrivanja uzroka uticaja ovog pufera na reakciju.

Uvod

Kvercetin je flavonoid. Kao i ostali flavonoidi on je jedan od najvažnijih polifenolnih sekundarnih proizvoda metabolizma biljaka (Dangles *et al.* 1999). Utvrđeno je da poseduje antialergijska, anti-inflamatorna i antikancerogena dejstva. Ovi efekti najčešće su povezani sa antioksidativnom aktivnošću kvercetina i njegovim reakcijama sa enzimima (Cotelle *et al.* 1996).



Slika 1. Kvercetin

Figure 1. Quercetin

Na pH > 8 kvercetin spontano podleže degradaciji u vodenim rastvorima, po mehanizmu prikazanom na slici 2.

Cilj eksperimenta bio je da se ispita zavisnost sastava proizvoda reakcije od pH vrednosti sredine, kao i uticaj komponenata sredine na kinetiku reakcije. Značaj ovakvih istraživanja je u mogućoj primeni kvercetina u farmaciji i medicini, koja se zasniva na antioksidativnim svojstvima kvercetina.

Materijal i metode

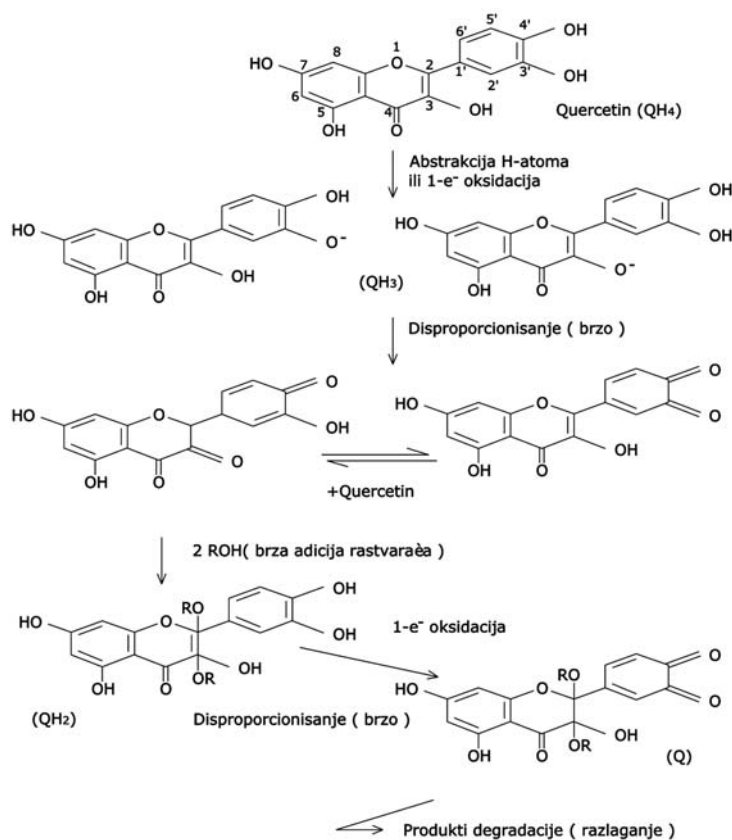
U ovom eksperimentu reakcija degradacije je praćena UV-Vis spektrofotometrijski, preko promene koncentracije međuproizvoda i proizvoda reakcije, u vodenim sredinama. Za eksperiment su pripremane serije rastvora u sledećim puferima navedenih koncentracija: Britton-Robinson $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, TRIS-NaOH $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, HPO_4^{2-} 0.2 mol/L. Takođe je napravljena i jedna serija rastvora u destilovanoj vodi. Rastvori su pripremani u kivetima koje su zatvarane gumenim čepovima ili parafilmom. U jednoj kiveti se rastvara 288 μL kvercetina koncentracije $8.2 \cdot 10^{-4}$ mol/L u 2812 μL pufera. Rastvor kvercetina čuvan je u frižideru na oko 8°C i temperiran je na sobnu temperaturu pre svakog pravljenja rastvora. Svaka serija sadržala je šest rastvora kvercetina u jednom puferu na različitim vrednostima pH u opsegu od 8 do 12. pH vrednost svakog rastvora u serijama data je u tabeli 1. pH vrednosti rastvora podešavane su 0.2 M NaOH i 0.1 M HCl, a pH vrednost merena je pH-metrom Hanna Instruments. Sve supstance koje su korišćene u radu bile su p.a. čistoće.

Željko Janićijević, Bošnjane (Paraćin), učenik 4. razreda Gimnazije u Paraćinu

Aleksandar Pantelić, Požega, Knez Mihajlova 2/4, učenik 4. razreda Medicinske škole u Užicu

MENTOR:

Dragana Vasić, student prve godine Fakulteta za fizičku hemiju u Beogradu



Slika 2.
Mehanizam reakcije
degradacije kvercetina

Figure 2.
Mechanism of quercetin
degradation reaction

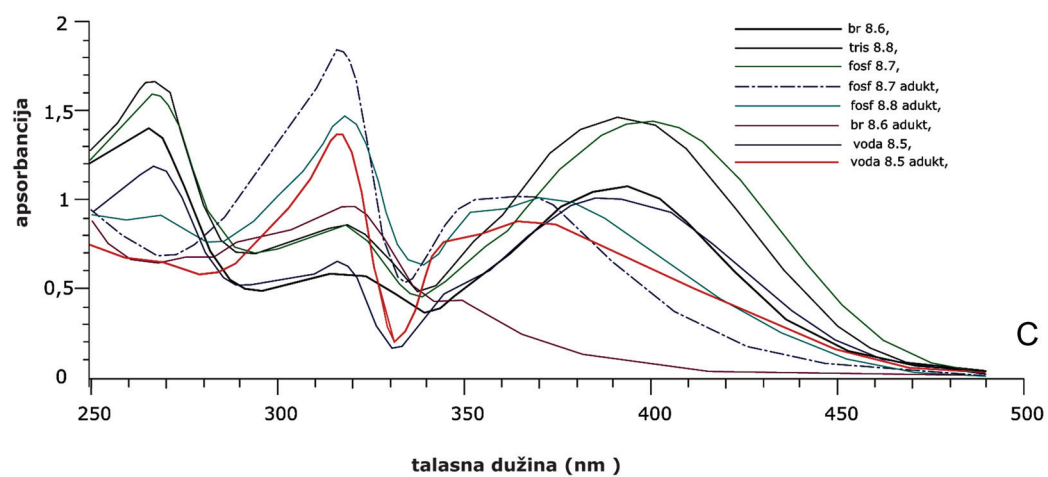
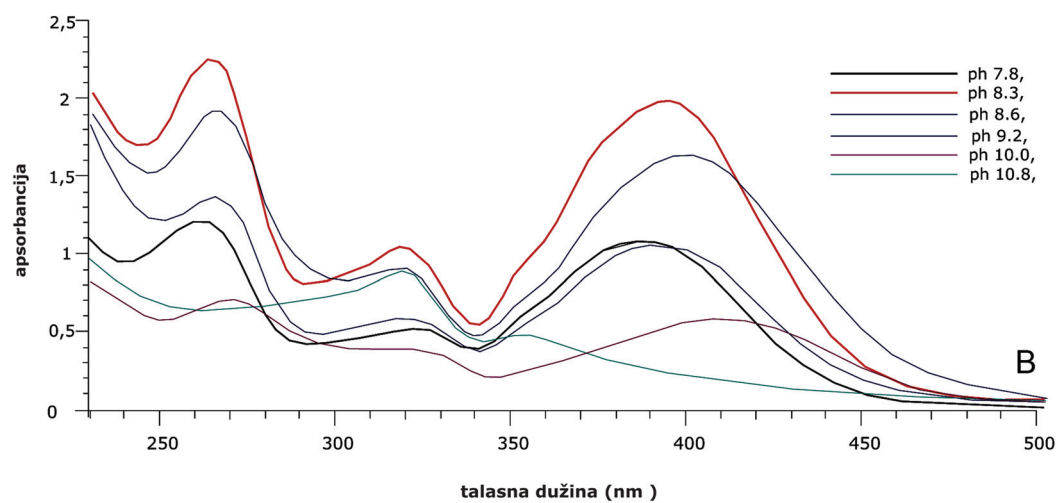
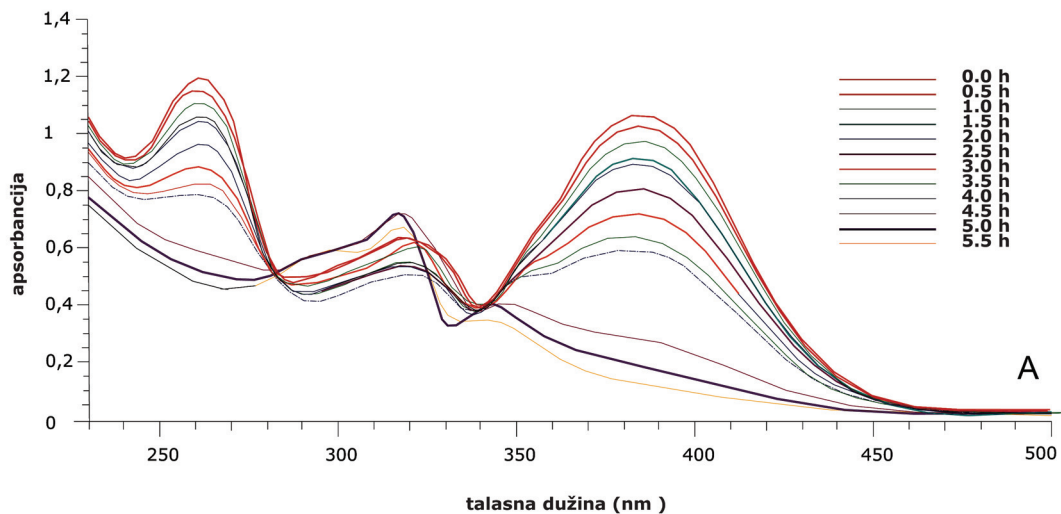
Rezultati i diskusija

Apsorpcioni spektri rastvora kvercetina koncentracije $7.4 \cdot 10^{-5}$ M u zavisnosti od vremena. Na slici 3A opažamo spektar koji je promenljiv u toku vremena. U početku se javljaju dva maksimuma apsorpcije na 260 nm i 390 nm koji sa vremenom postepeno opadaju, a na talasnoj dužini od 325 nm javlja se apsorpciona traka, što ukazuje na lagano formiranje određenog međuproizvoda ili proizvoda reakcije. Talasna dužina od 325 nm karakteristična je za vodene adukte (Dangles *et al.* 1999). Vodeni adukt je zapravo intermedijer koji predstavlja nestabilno jedinjenje nastalo adicijom vode na određeni jonski oblik reaktanta, u ovom slučaju kvercetina. U ovom slučaju on se može spektrofotometrijski detektovati. Takođe na slici uočavamo i dve tačke konstantne apsorpcije na 285 nm i 345 nm takozvane izobestične tačke, koje su u početnim uzastopno snimljenim spektrima dobro definisane. Na spek-

Tabela 1. pH vrednosti ispitivanih rastvora u zavisnosti od vrste pufera

Britton-Robinson	7.8	8.3	8.6	9.2	10.0	10.8
TRIS-NaOH	8.0	8.8	9.3	9.6	10.0	10.5
HPO ₄ ²⁻	8.7	9.2	9.6	10.0	10.5	10.9
destilovana voda	8.4	9.4	9.7	10.6	11.4	11.8

Apsorpcioni spektri rastvora snimani su spektrofotometrom GBC Cintra 10 UV Vis Spectrometer neposredno posle mešanja rastvora kvercetina sa ostalim reaktantima i kasnije su snimanja ponavljana u različitim intervalima vremena sledećih 48 sati.



Slika 3. (naspramna strana)

- A. Apsorpcioni spektri rastvora kvercetina u puferu Britton-Robinson na pH 8.7
- B. Apsorpcioni spektri rastvora kvercetina u Britton-Robinson puferu na različitim pH vrednostima
- C. Apsorpcioni spektri kvercetina (puna linija) i vodenog adukta (isprekidana linija) u različitim vodenim sredinama na pH 8.6 ± 0.2

Figure 3. (opposite page)

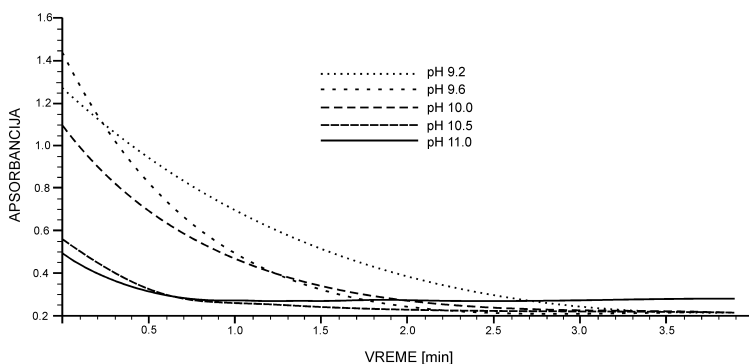
- A. Absorption spectra of quercetin solution in Britton-Robinson buffer at pH value 8.7
- B. Absorption spectra of quercetin solution in Britton-Robinson buffer at different pH values
- C. Absorption spectra of quercetin (filled line) and water aduct (broken line) in different water environment at pH value 8.6 ± 0.2

trima snimljenim posle pet sati ove tačke nestaju, što se uočava i sa slike 3A, i to ukazuje na postojanje dveju uzastopnih reakcija u rastvoru. Jedna je građenje vodenog adukta kada nastaju izobestične tačke, i druga je reakcija razlaganja adukta kada nestaju navedene izobestične tačke.

Zavisnost izgleda apsorpcionog spektra rastvora kvercetina od pH vrednosti. Na Slici 3B zapažamo da se izgled spektra razlikuje u zavisnosti od pH. Jonska jačina nije jednaka u svim rastvorima stoga je i intenzitet apsorpcije različit, a može postojati i uticaj delimične samooksidacije kvercetina pri pripremi rastvora za snimanje. Apsorpcioni maksimumi kvercetina na različitim pH vrednostima nisu na istim talasnim dužinama već su između 260-270 i 390-420 nm. Što je sredina baznija, tj. što je veća pH vrednost sredine maksimumi se pomeraju ka većim talasnim dužinama. Jedino nema pomeranja maksimuma na 320 nm, iz čega zaključujemo da on ne zavisi od pH. Na različitim pH reakcija ima verovatno različite brzine, pa samim tim i jonski oblik kvercetina nije isti na svim pH vrednostima, što može biti razlog pomeranja maksimuma. Mak-

simum na 320 nm verovatno potiče od intermedijera, tj. vodenog adukta, koji je nastao delimičnom degradacijom kvercetina, pa se time može objasniti konstantna talasna dužina ovog maksimuma. Verovatno vodeni adukt ne disosuje, jer su njegova tri protona stabilizovana vezama nastalim samooksidacijom, pa se na taj način može objasniti stabilnost ovog intermedijera.

Zavisnost izgleda apsorpcionog spektra rastvora kvercetina i vodenog adukta od vrste pufera. Na slici 3C prikazani su apsorpcioni spektri rastvora kvercetina u različitim vodenim sredinama: Britton-Robinson-ovom, fosfatnom, tris-NaOH puferu, kao i u destilovanoj vodi čiji je pH podešen dodavanjem NaOH i HCl u intervalu pH od 8.5 do 8.8. Apsorpcioni spektri prikazani isprekidanom linijom snimljeni su 30 minuta nakon pripreme rastvora. Posmatrajući deo grafika iscrtan isprekidanim linijama vidi se da na talasnoj dužini od 320 nm postepeno dolazi do građenja intermedijera, tj. vodenog adukta. Na slici 5 uočavamo da se položaj apsorpcionog maksimuma ne menja u zavisnosti od vrste pufera na istoj pH vrednosti osim u slučaju fos-

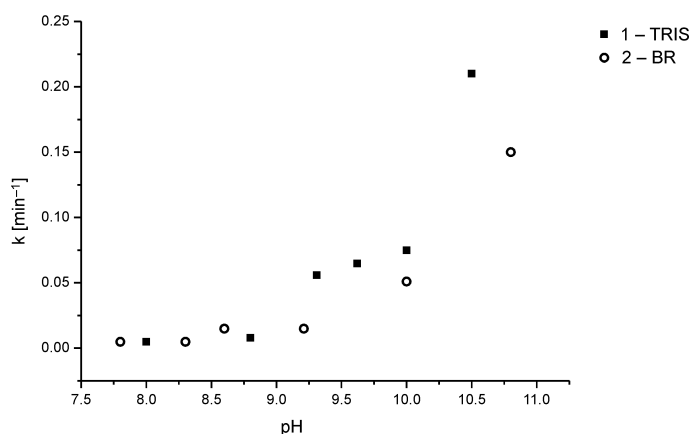


Slika 4.

Kinetičke krive stvaranja intermedijera (vodenog adukta) u fosfatnom puferu na različitim pH vrednostima na talasnoj dužini od 390 nm

Figure 4.

Kinetic curves of creating an intermedier (water aduct) in phosphate-buffer at different pH values and wavelength of 390 nm

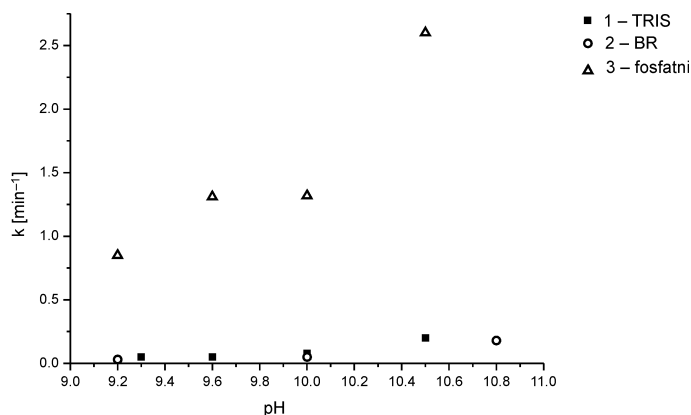


Slika 5a.

Zavisnost konstante brzine od pH vrednosti u puferima: TRIS-NaOH (TRIS) i Britton-Robinson (BR)

Figure 5a.

Speed constant dependence from pH values in TRIS-NaOH (TRIS) and Britton-Robinson (BR) buffers



Slika 5b.

Zavisnost konstante brzine od pH vrednosti u puferima: Britton-Robinson (BR), TRIS-NaOH (TRIS), i fosfatnom puferu

Figure 5b. Speed constant dependence from pH values in following buffers: Britton-Robinson (BR), TRIS-NaOH (TRIS), and phosphate buffer (3)

fatnog gde je pomeren za oko 10 nm. Ovo odstupanje možemo tumačiti time što se u ovoj oblasti pH nalazi neka od pKa vrednosti neke od -OH grupa kvercetina, pa i mala promena pH vrednosti u slučaju fosfatnog pufera može uzrokovati veliku promenu jonskog stanja, što može ukazati i na to da je ovde reakcija brža nego u ostalim puferima. Može se izvesti zaključak da vrsta pufera ne utiče na izgled apsorpcionih spektara. Takođe uočava se da vrsta pufera ne utiče na maksimum formiran na 320 nm koji potiče od vodenog adukta.

Kinetičke krive obrazovanja vodenog adukta.

Na slici 4 zapažamo kinetičke krive stvaranja vodenog adukta u rastvoru kvercetina koncentracije $7.4 \cdot 10^{-5}$ u fosfatnom puferu. Posmatran je maksimum apsorpcije na 390 nm. Prema izgledu krivih zaključuje se da postoje dva uzastopna procesa:

1. stvaranje intermedijera (vodenog adukta), kada apsorbcija opada na posmatranom maksimumu;
2. razlaganje intermedijera, kada apsorbcija na posmatranom maksimumu raste.

Ovaj zaključak je najevidentniji ako se posmatra kriva koja se odnosi na rastvor najveće pH vrednosti gde je za najkraće vreme reakcija prešla u drugu fazu. To još jednom potvrđuje pretpostavku o porastu brzine reakcije sa porastom pH vrednosti.

Kinetička kriva koja opisuje zavisnost apsorbanije od vremena stvaranja adukta je eksponencijalna funkcija koja zadovoljava zavisnost pseudoprvog reda, koja se opisuje sledećom jednačinom (Schmidt 1989):

$$A = A_{\infty} (1 - e^{-kt})$$

gde je A apsorbancija u trenutku t , A_{∞} apsorbancija u trenutku postizanja ravnoteže, a k konstanta brzine reakcije na talasnim dužinama gde apsorbancija raste, odnosno:

$$A = A_{\infty} \cdot e^{-kt}$$

gde je A apsorbancija u trenutku t , A_{∞} početna apsorbancija a k konstanta brzine reakcije kada apsorbancija opada.

Logaritmovanjem dobijenih zavisnosti dobijaju se prave linije:

$$\ln\left(1 - \frac{A}{A_{\infty}}\right) = -kt$$

kada apsorbancija raste odnosno:

$$\ln\left(\frac{A}{A_{\infty}}\right) = -kt$$

kada apsorbancija opada, čiji koeficijent pravca predstavlja konstantu brzine za datu koncentraciju kvercetina.

Zavisnost konstante brzine reakcije od pH sredine i vrste pufera. Obradom dobijenih krivih izračunate su konstante brzine u zavisnosti od pH vrednosti. Na slici 5a prikazana je zavisnost konstante brzine od pH vrednosti u Britton-Robinsonovom i TRIS-NaOH puferu. Slika 5a nam pokazuje da brzina reakcije građenja intermedijera sa vodom raste sa povećanjem pH vrednosti. Ovo se objašnjava otpuštanjem protona koje je favorizovano kada je sredina bazna (Dangles *et al.* 1999). To je u skladu sa prvim stepenom građenja intermedijera u mehanizmu samooksidacije (slika 2). Očigledno je da je reakcija brža u TRIS-NaOH puferu nego u Britton-Robinson puferu.

Sa slike 5b očigledno se uočava znatno povećanje brzine reakcije u fosfatnom puferu. Reakcija je brža u ovom puferu približno za 1 ili 2 reda veličine. U slučaju ovog pufera brzina reakcije takođe raste sa povećanjem pH što ukazuje na to da je mehanizam isti kao i kod ostalih pufera, iako je brzina znatno veća.

Zaključak

U vodenim sredinama na pH vrednostima većim od 8 kvercetin podleže reakciji samooksidacije, koja zavisi od pH vrednosti i komponenata sredine (vrste pufera). Brzina reakcije raste sa povećanjem pH

vrednosti. Stvaranje vodenog adukta i njegovo razlaganje, na šta ukazuju pojava i nestanak izobestičnih tačaka, kao i kinetika reakcije potvrđuju pretpostavljeni mehanizam reakcije.

Apsorpcioni spektri kvercetina sa povećanjem pH pomeraju se ka većim talasnim dužinama, što ukazuje na promenu jonskog oblika kvercetina i disocijaciju protona iz njegovih –OH grupa. S druge strane, vodenii adukt je stabilan u ovom intervalu pH. Izgled apsorpcionog spektra rastvora kvercetina i vodenog adukta ne zavisi od vrste pufera već samo od pH vrednosti sredine.

Kinetičke krive obrazovanja intermedijera zadovoljavaju zavisnost pseudoprvoeg reda. Povećavanje brzine reakcije sa porastom pH vrednosti objašnjava se olakšanom disocijacijom –OH grupa kvercetina, tj. otpuštanjem protona, što po mehanizmu predstavlja prvi stupanj reakcije samooksidacije.

Brzina reakcije zavisi od vrste pufera. Reakcija je najbrža u fosfatnom puferu i brža je za oko 1-2 reda veličine od reakcija u ostalim puferima, dok je reakcija malo brža u TRIS-NaOH puferu u odnosu na reakciju u puferu Britton-Robinson.

Za dalje istraživanje preporučujemo detaljnije ispitivanje mehanizma i kinetike reakcija oksidacije kvercetina u fosfatnom puferu, u cilju otkrivanja uzroka porasta brzine reakcije samooksidacije kvercetina u fosfatnom puferu.

Literatura

- Abul-Hajj Y. J., Tabakovic K., Tabakovic I. 1995. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 6144.
- Boulton D. W., Walle K. U. Walle T. 1999. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**: 353.
- Cotelle N., Bernier J. L., Catteau J. P., Pommery J., Wallet J. C., Gaydou E. M. 1996. *Free Radical Biol. Med.*, **20**: 35.
- Dangles O., Fargeix G., Dufour C. 1999. One electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Perkin*, 1387-1395.
- Hodnick W. F., Kung F. S., Roettger W. J., Bohmont C. W., Pardini R. S. 1986. *Biochem. Pharmacol.*, **35**: 2345.
- Kuhnle J. A., Windle J. J., Waiss A. C. 1969. *J. Chem. Soc. B*, (1969): 613-617.
- Odajima T., Yamazaki I. 1970. *Biochim. Biophys. Acta*, **206**: 71.

Olsen R. L., Little C. 1983. *Biochem. J.*, **209**: 781.

Schimid R., Sapunov V. N. 1982. U Non-Formal Kinetics (ur. H.F. Ebel), v. 14, 1st ed. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, Chap. 3, str. 51.

Željko Janićijević and Aleksandar Pantelić

Examination of Quercetin Degradation Reaction in Water Environments

The purpose of this work was examining the effects of different buffers to the structure of reaction products and reaction kinetics in the reaction of quercetin autooxidation. This purpose is justified because of the wide range of potential uses of quer-

cetin in medicine and pharmacy. Those uses of quercetin are based exactly on his antoxidative properties.

In this work the influence of the following buffers: Britton-Robinson, Tris-NaOH, and phosphate buffer on the autooxidation of quercetin was examined. The reaction was followed with a spectrophotometer. It is established that the reaction speed changes with the change of buffer species, and increases when the pH value is raised. However we have not established any changes in the mechanism of this reaction. In the presence of the phosphate buffer, the reaction speed is between 10 and 100 times bigger, in comparison with the reaction speed in the presence of other buffers. This is the reason why it is recommended to examine the mechanism of the reaction in this case more thoroughly, with the purpose of establishing the cause of phosphate buffer influence on this reaction.

