

# Ispitivanje stabilnosti kvercetina i njegove reakcije sa jonima Cu(II)

---

*Spektrofotometrijski je ispitana stabilnost  $1.0 \times 10^{-3}$  M rastvora kvercetina u organskim rastvaračima etanolu i dimetilsulfoksidu. Nađeno je da je kvercetin u oba rastvarača stabilan oko tri dana. Ispitan je uticaj fosfatnog pufera, Britton-Robinsonovog pufera, biološkog medijuma i vode na stabilnost kvercetina koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M na pH 7. Nađeno je da su rastvori pripremljeni iz standardnog rastvora etanola stabilni u svim ispitanim puferima, a najstabilniji u vodi. U rastvorima pripremljenim iz standardnog rastvora u DMSO dolazi do procesa degradacije kvercetina u zavisnosti od vremena. Kvercetin sa bakrom obrazuje kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 410 nm. Sastav kompleksa 1:1 određen je metodom kontinualnih varijacija (spektrofotometrijske titracije).*

---

## 1. Uvod

Flavonoidi su fenolna jedinjenja veoma rasprostranjena u biljkama sa povoljnim dejstvom na ljudsko zdravlje (Wagner 1986). Otkriveno je da poseduju antiinflamatorna, antialergijska, antiosteoporotička i antikancerogena dejstva (Davies i Moodley 1982). Mnogi od ovih efekata su povezani sa njihovim reakcijama sa enzimima i antioksidantnom aktivnošću, koja može biti odgovorna za njihovu sposobnost uništavanja slobodnih radikala (Harborne 1986). Iako slobodni radikali imaju i korisne fiziološke funkcije, oni mogu da oštete biomolekule i da, prema tome, budu odgovorni za starenje i nastanak nekih bolesti.

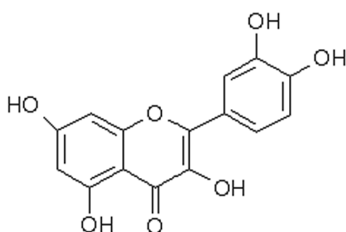
Drugi antioksidantni mehanizam flavonoida potiče od reakcije sa metalnim jonima pri čemu nastaju kompleksi koji sprečavaju učešće ovih jona u reakcijama nastajanja slobodnih radikala (Harborne 1986). Tako na primer joni bakra i gvožđa imaju posebno značajnu ulogu u nastajanju veoma reaktivnog hidroksil radikala (HO\*) (Cody *et al.* 1986). Zbog toga reakcije građenja kompleksa flavonoida sa metalnim jonima mogu odigrati odlučujuću ulogu u prevenciji nastajanja slobodnih radikala. Osim toga, flavonoidi kao prirodni ligandi, imaju prednost u odnosu na sintetičke ligande zbog njihove moguće toksičnosti (Cody *et al.* 1986).

---

*Jelena Blagojević  
(1986), Beograd,  
Petefijeva 22, učenica  
3. razreda XIII  
beogradske gimnazije*

Flavonoidi su po pravilu nerastvorni u vodi, a rastvorni u organskim rastvaračima kao što su dimetil-sulfoksid (DMSO) i etanol (EtOH). Žute su boje (lat. *flavus* – žut), a najstabilniji su na pH 7 (Terezhliny *et al.* 1978).

U grupu flavonoida spada i kvercetin koji poseduje protektivne efekte protiv srčanih oboljenja i antikancerogenu aktivnost, a takođe i sposobnost da gradi helatne komplekse sa jonima prelaznih metala. Kvercetin je flavonoid sa heterocikličnim prstenom, molekulskom formulom  $C_{15}H_{10}O_7$  i molarnom masom 302.23 g/mol. To je osnovni flavonoid kantariona (*Hippericum perforatum*), a izolovan je iz američkog oraha (*Quercus tinctoria*) (Cody *et al.* 1988).



Strukturna formula  
kvercetina

Structural formula of  
quercetin

Za razumevanje mehanizma protektivnog dejstva kvercetina potrebno je poznavati njegove fizičko-hemijske osobine, kao što su rastvorljivost u sredinama različite kiselosti, protolitičke konstante, stabilnost, a takođe i mehanizam njegove interakcije sa bioelementima.

**Cilj** ovog rada je bio da se spektrofotometrijski ispita stabilnost kvercetina u različitim organskim rastvaračima i u vodenim rastvorima u neutralnoj sredini, jer se njegovi biološki efekti najčešće prate na pH oko 7. Posebno je bilo značajno ispitati uticaj biološkog medijuma, koji se najčešće koristi za ispitivanje bioloških efekata kvercetina, na potencijalne promene ovog jedinjenja. Osim toga, bilo je potrebno izvršiti karakterizaciju reakcije sa  $Cu^{2+}$  jonima koja obuhvata ispitivanje afiniteta prema obrazovanju kompleksa, njegove vremenske stabilnosti i određivanje empirijske formule kompleksa.

## 2. Eksperiment

### 2.1 Hemikalije

U radu su korišćene hemikalije kvaliteta p. a. Standardni rastvori kvercetina (Merck) koncentracije  $1.0 \times 10^{-3}$  M napravljeni su u etanolu (Zorka, Šabac, 96%) i dimetilsulfoksidu (Merck). Standardni rastvor  $Cu(NO_3)_2$  (Merck) koncentracije  $1.0 \times 10^{-2}$  M napravljen je u destilovanoj vodi. Stabilnost kvercetina ispitivana je u fosfatnom i Britton-Robinsono-

vom puferu koji su napravljeni prema standardnoj proceduri. Biološki medijum, sredina u kojoj se ispituju efekti na ćeliji, sastojao se iz više organskih jedinjenja i metalnih jona (Cu, Mg, Ca).

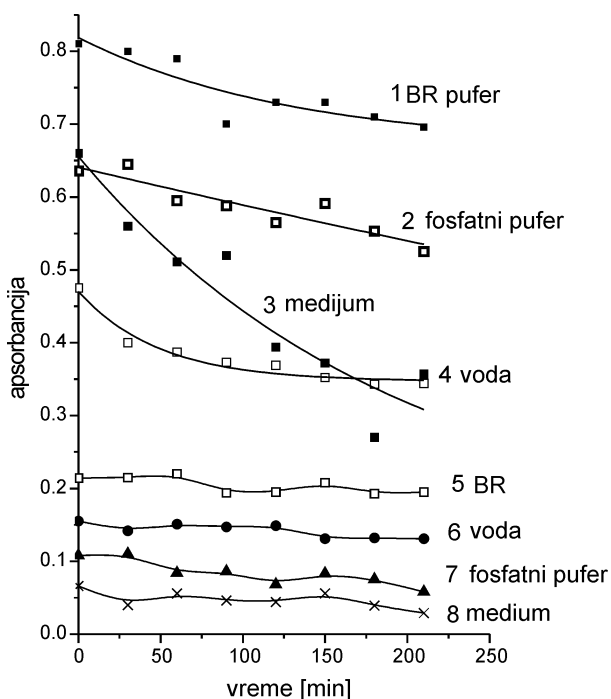
## 2.2 Aparatura

Spektrofotometrijska merenja vršena su na spektrofotometru GBC CINTRA 10 UV-Vis, u kvarcnim kivetama svetlosnog puta 1 cm. Kiselost sredine je proveravana na pH-metru. Za merenje mase čvrstih uzoraka je korišćena analitička vaga, a za merenje zapremine rastvora mikropipeta.

## 3. Rezultati i diskusija

### 3.1. Stabilnost kvercetina u vodenoj sredini u prisustvu različitih pufera

Odgovarajući alikvoti osnovnih rastvora kvercetina u EtOH i DMSO koncentracija  $1.0 \times 10^{-5}$  M su dodati u biološki medijum, fosfatni pufer, Briton-Robinsonov pufer i u vodu, tako da je koncentracija bila  $1.0 \times 10^{-5}$  M, a kiselost sredine pH 7.4, Spektri ovih rastvora su snimani odmah nakon pravljenja rastvora, kao i nakon intervala od po 30 minuta u narednih 3.5 sata.



Slika 1.

Zavisnost apsorbcije  $10^{-5}$  M rastvora kvercetina na 375 nm od vremena u različitim sredinama:

- 1, 2, 3, 4 – standardni rastvor u DMSO;
- 5, 6, 7, 8 – standardni rastvor u etanolu.

Figure 1.

Dependence of absorption of  $10^{-5}$  M solution of quercetin at 375 nm from time in different solutions: standard solution in DMSO:

- 1 – Britton-Robinson buffer
- 2 – phosphate buffer
- 3 – medium
- 4 – water
- standard solution in ethanol:
- 5 – Britton-Robinson
- 6 – water
- 7 – phosphate buffer
- 8 – medium

Na slici 1 prikazana je promena apsorbancije kvercetina u zavisnosti od vremena u ispitanim sredinama na 375 nm. Sa slike 1 se vidi, da su promene apsorbancije rastvora pripremljenih iz etanola neznatne u periodu od 250 min, dok iz rastvora pripremljenih iz DMSO apsorbancija opada sa vremenom. Opadanje intenziteta maksimuma apsorpcije kvercetina proporcionalno je opadanju koncentracije ovog jedinjenja, najverovatnije zbog njegove degradacije. Ovaj proces može se opisati eksponencijalnom jednačinom oblika (Schmid, Sapunov 1982):

$$A_t = A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

gde je:

$A_t$  – apsorbancija rastvora u trenutku  $t$

$A_0$  – apsorbancija rastvora pri  $t = 0$

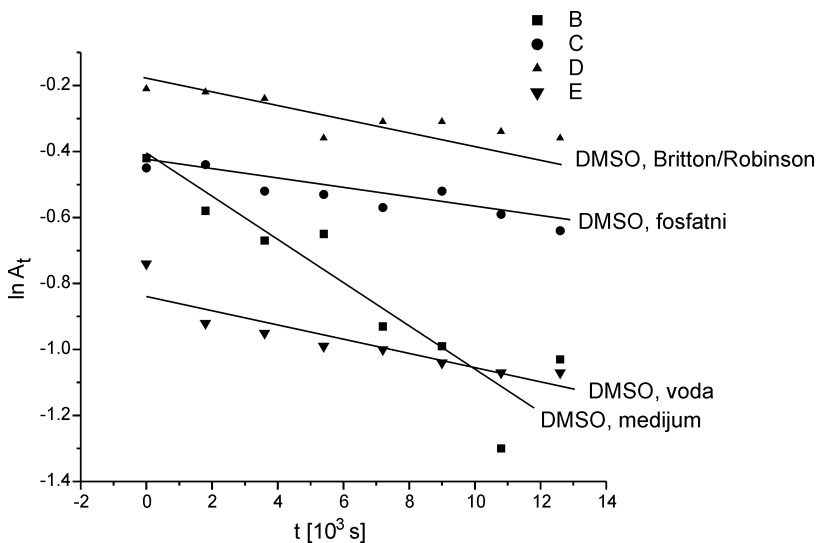
$k$  – konstanta brzine degradacije

$t$  – vremenski interval od pravljenja rastvora do posmatranog trenutka

Jednačina (1) predstavlja izraz za brzinu reakcije prvog reda, koja obično opisuje reakcije hidrolize ili degradacije (Schmid, Sapunov 1982). Logaritmovanjem jednačine (1) se dobija izraz:

$$\ln A_t = -k t + \ln A_0 \quad (2)$$

kojim se izračunava konstanta brzine degradacije kvercetina u različitim sredinama. Zavisnost  $\ln A_t$  od vremena prikazana je na slici 2. Dobijene su prave linije iz čijeg je nagiba izračunata vrednost konstante brzine degradacije kvercetina,  $k$ . Vrednosti poluvremena reakcije  $t_{1/2}$  dobijene su kao recipročne vrednosti konstante  $k$ . Rezultati su dati u tabeli 1.



Slika 2.  
Određivanje konstante brzine degradacije kvercetina prema jednačini (2)

Figure 2.  
Determination of velocity constant of degradation of quercetin according equation (2)  
B – DMSO, water  
C – DMSO, phosphate  
D – DMSO, BR  
E – DMSO, medium

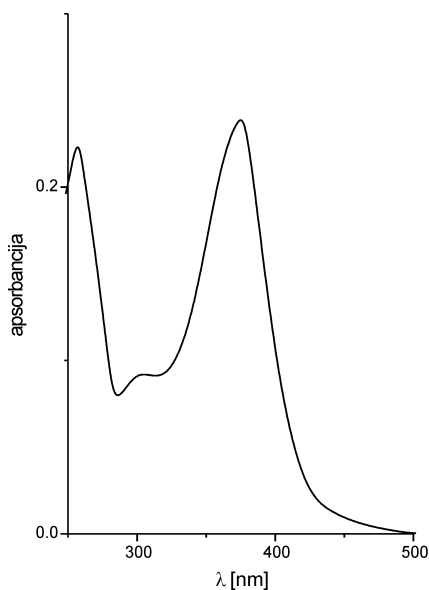
Tabela 1. Konstante brzine degradacije kvercetina koncentracije  $1.0 \times 10^{-5}$  M iz standardnog rastvora u DMSO u prisustvu različitih pufera na pH 7.4

Pufer	$k$ [ $s^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [h]
Britton-Robinson	$1.2 \cdot 10^{-5}$	23.15
biološki medium	$4.9 \cdot 10^{-5}$	5.67
fosfatni	$1.5 \cdot 10^{-5}$	18.52
voda	$2.6 \cdot 10^{-5}$	10.68

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju da je najsporiji proces degradacije kvercetina u Britton-Robinsonovom puferu. Kao posledica toga, konstanta brzine reakcije degradacije najmanja je u tom puferu, a najveća u biološkom medijumu, gde se kvercetin najbrže raspada.

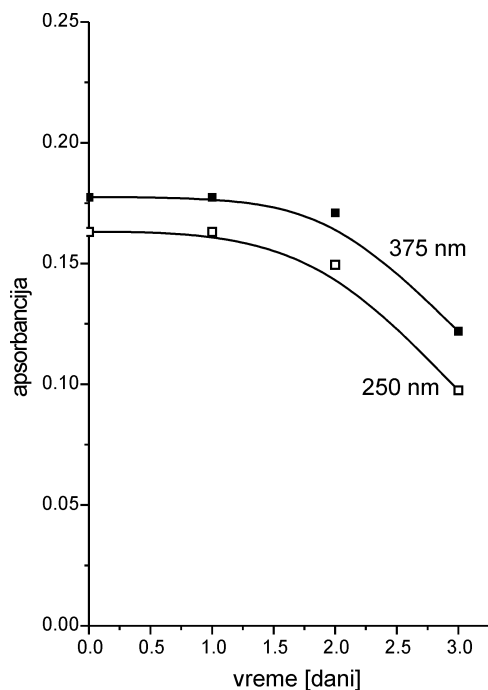
### 3.2 Ispitivanje stabilnosti standardnog rastvora kvercetina u etanolu

Na osnovu rezultata u odeljku 3.1, može se zaključiti da je u toku nekoliko sati najstabilniji rastvor kvercetina u vodenoj sredini bez pufera. Stabilnost rastvora kvercetina u etanolu ispitivana je tokom nekoliko dana, tako što je svaki dan napravljen svež rastvor koncentracije  $1.0 \times 10^{-5}$  M iz standardnog rastvora. Neposredno nakon pripremanja rastvora snimljen je apsorpcioni spektar u oblasti talasnih dužina od 250 nm do 500 nm. Postupak je ponovljen u razmaku od 24 h u naredna tri dana. Apсорpcioni



Slika 3.  
Apsorpcioni spektar  $10^{-5}$  M rastvora kvercetina u u vodi na pH 7.4 iz standardnog rastvora u etanolu odmah nakon pripremanja rastvora

Figure 3.  
Absorption spectra of  $10^{-5}$  M solution of quercetin in water at pH 7.4 from standard solution in ethanol just after preparing solution



Slika 4.  
Promene apsorbancije  
 $10^{-5}$  M rastvora  
kvercetina u vodi na  
pH 7.4 iz standardnog  
rastvora u etanolu u  
zavisnosti od  
vremena

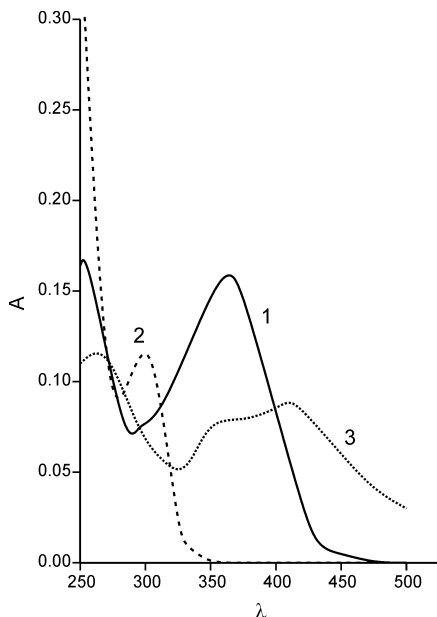
Figure 4.  
Changes of  
absorption of  $10^{-5}$  M  
solution of quercetin  
in water at pH 7.4  
from standard  
solution in ethanol  
depending from time

spektar kvercetina snimljen odmah prikazan je na slici 3. Sa slike 3 se vidi da kvercetin ima dobro definisan apsorpcioni spektar sa dva maksimuma apsorpcije u UV-oblasti, na 250 nm i 375 nm. Na slici 4 prikazana je promena apsorbancije u toku 3 dana, praćena na 375 nm i 250 nm. Rezultati pokazuju da u toku prva dva dana nema značajne promene apsorbancije, dok je trećeg dana apsorbancija opala. Ovi rezultati pokazuju da je standardni rastvor kvercetina u etanolu stabilan najmanje dva dana.

### 3.3. Reakcija kvercetina sa Cu(II)

Da bi se utvrdilo da li kvercetin reaguje sa jonima bakra, snimljeni su spektri  $1.0 \times 10^{-5}$  M rastvora kvercetina u vodi i etanolu, zbog toga što je on tu pokazao najveću stabilnost,  $1.0 \times 10^{-5}$  M rastvora  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  u istoj sredini i njihove smeše u kojoj su koncentracije komponenti bile  $1.0 \times 10^{-5}$  M. Ovi rezultati prikazani su na slici 5. Vidi se da rastvor bakra date koncentracije ima maksimum apsorpcije na 300 nm, ali se u smeši sa kvercetinom javlja nova apsorpciona traka sa maksimumom apsorpcije na 410 nm. Ove promene apsorpcionih spektara pokazuju da u rastvoru dolazi do reakcije obrazovanja kompleksa između kvercetina i jona bakra.

Empirijska formula kompleksa je određena metodom spektrofotometrijske titracije. Snimani su apsorpcioni spektri rastvora u kojima je menjana koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  jona, a koncentracija kvercetina je bila kon-

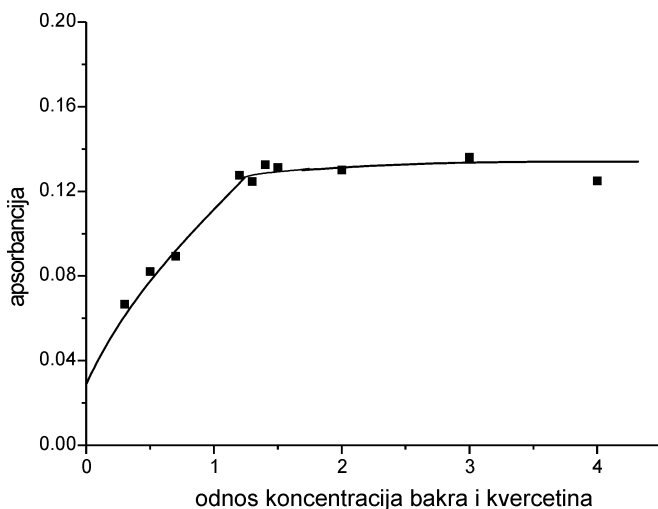


Slika 5.  
Apsorpcioni spektri  
 $10^{-5}$  M kvercetina  
(1),  $10^{-5}$  M  $\text{CuSO}_4$   
(2) i njihove smeše  
(3) u vodi na pH 7.4

Figure 5.  
Absorption spectras  
of  $10^{-5}$  M quercetin  
(1),  $\text{Cu(II)}$  ions (2)  
and their mixture (3)  
in water at pH 7.4.

stantna ( $1.0 \times 10^{-5}$  M). Praćena je promena apsorbanije rastvora u zavisnosti od odnosa koncentracija komponenti u rastvoru. Rezultati su prikazani na slici 6. Iz rezultata se vidi da je u ovim uslovima obrazovan kompleks u kome molarni odnos bakra i kvercetina iznosi 1:1, pa je empirijska formula ovog kompleksa  $\text{CuC}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ .

Da bi se utvrdila vremenska stabilnost obrazovanog kompleksa, spektri su snimani odmah nakon pripreme rastvora i nakon 10, 30, 50 i 70 minuta od pripreme. Praćena je apsorbanija na talasnim dužinama 270 nm, 374 nm i 413 nm (gde su odgovarajući pikovi u spektru 3 – slika 6), a rezultati su dati u tabeli 2.



Slika 6.  
Određivanje sastava  
kompleksa kvercetina  
sa  $\text{Cu(II)}$  metodom  
kontinualnih varijacija  
 $c_{\text{kvercetin}} = 1.0 \times 10^{-5}$  M

Figure 6.  
Determination of  
stoichiometry of  
complex of quercetin  
and  $\text{Cu(II)}$  by molar  
ratio method  
 $c_{\text{quercetin}} = 1.0 \times 10^{-5}$  M

Tabela 2 Uticaj vremena na stabilnost kompleksa

Vreme [min]	Apsorbancija na		
	269.6 nm	374.68 nm	412.96 nm
0	0.1259	0.0971	0.0893
10	0.1244	0.1041	0.0881
30	0.1224	0.0826	0.0856
50	0.1214	0.0948	0.0838
70	0.1213	0.0883	0.0834

## 4. Zaključak

Spektrofotometrijsko ispitivanje kvercetina u različitim sredinama je pokazalo da je kvercetin najstabilniji u rastvorima koji su pravljani iz rastvora etanola ( $10^{-3}$  M), naročito u vodi bez pufera. U ovoj sredini je stabilan približno dva dana.

Sa Cu(II) jonima gradi kompleks u kome je molski odnos kvercetina i bakra 1:1. Ovaj kompleks je stabilan tokom prvih sat vremena.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Momiru Živanoviću iz Instituta za nuklearne nauke Vinča na savetima, sugestijama i pomoći oko same ideje istraživanja, kao rukovodiocima i saradnicima programa hemije Istraživačke stanice Petnica na podršci i pomoći oko merenja.

## Literatura

- Breet E. L. J. i Van Eldik R. 1983. *Inorg. Chim. Acta*, **76**: 1301
- Cody V., Middleton E. Jr., Harborne J. 1986. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, Vol. 1. New York: Alan R. Liss
- Cody V., Middleton E. Jr., Harborne J., Beretz A. 1988. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, Vol. 2, New York: Alan R. Liss
- Cromer-Morion M. i Schraff J. P. 1979. *Analyt. Chim. Acta*, **104**: 299
- Davies R. J. i Moodley I. 1982. Antiallergic compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, **17**: 279
- Harborne J. 1986. *Nature: Distribution and Function of Plant Flavonoids*. New York: Alan R. Liss, str. 15-24
- Lurie J. 1978. *Handbook of Analytical Chemistry*. Moscow: Mir Publishers
- Peter K. i Vollhardt C. 1996. *Organska hemija*. Beograd: Hajdigrad
- Schmid R. i Sapunov V. N. 1982. *Non-formal kinetics*. Basel: Verlag chemie
- Szent-Gyorgyi A. i Rusznyaks S. 1936. Vitamin P: flavonoids as vitamins. *Nature*, **138**: 27



Terezhally G., Bottomley W., Pelleu G. 1978. The use of water-soluble bioflavonoidascorbic acid complex in the treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, **45**: 56

Todorović M. 1993. *Optičke metode instrumentalne analize*. Beograd: Hemijski fakultet

Wagner H. 1986. *Antihepatotoxic Flavonoids*. New York: Alan R. Liss

---

*Jelena Blagojević*

## Investigation of Stability of Quercetin and Its Reaction with Cu(II) Ions

The most convenient method for this investigation is spectrophotometry, because quercetin has a characteristic absorption spectra with a maximum in the UV-area (Wagner 1986), so all the changes connected with its stability and activity are expected to be reflected on spectral characteristics. All the specters were followed in the wavelength range from 250 to 500 nm.

The stability of quercetin was investigated in different solutions. The aim was to find a convenient solution where quercetin is stabile enough for investigation of the reaction of complex formation.

Solutions of quercetin in DMSO and EtOH ( $c = 10^{-3}$  M) were being diluted by biological medium, phosphate buffer, Britton-Robinson buffer and water until the concentration of quercetin became  $10^{-5}$  M. In that way eight solutions were prepared and their specters were followed every 30 minutes during 3.5 hours (Figure 1).

It was concluded that quercetin is the most stabile in solutions prepared with ethanol, particularly in water without buffers. The investigation was continued with that solution.

The results obtained in DMSO are shown in Figure 2 and Table 1.

It was found that quercetin is stabile in the solution with ethanol and water for about two days (Figure 4).

The complex was formed (Figure 5) and its stoichiometry was determined according to the molar ratio method (Todorović 1993) (Figure 6). This method showed that the stoichiometrical ratio of the components which form the complex is 1:1. The complex remained stabile during one hour after forming.

