
Marin Kuntić

Spektrofotometrijsko određivanje konstanti vezivanja i termodinamičkih parametara kvercetina i morina za goveđi albumin seruma

U ovom radu predstavljena je spektrofotometrijska metoda za određivanje konstanti vezivanja kvercetina i njegovog strukturnog izomera morina za goveđi albumin seruma (BSA), koji je homolog humanom albuminu seruma (HSA) i odličan model za praćenje reakcije ligand-protein. Spektrofotometri su mnogo dostupniji instrumenti od fluorimetara i polarizacionih fluorimetara, na kojima su rađena dosadašnja istraživanja na ovom polju. Stehiometrija reakcije je određena Jobovom metodom kontinualnog variranja. Dobijen je odnos flavonoida i BSA od 6:1 i za kvercetin i za morin. Konstante vezivanja kvercetin-BSA i morin-BSA dobijene su sa Jobove krive na po 3 različite temperature i znatno su niže od literaturnih konstanti (3. do 4. reda veličine), što je posledica stehiometrije reakcije. Niske konstante vezivanja ukazuju da se flavonoidi mogu lakše otpuštati sa proteina nosača, čime se njihovo farmakološko dejstvo pojačava. Dobijena razlika u konstantama vezivanja između kvercetina i morina sa BSA može biti posledica sternog efekta koji je uzrokovan različitim položajem -OH grupa na fenilnom prstenu. Termodinamički parametri vezivanja su određeni sa Van't Hofove krive. Pozitivne vrednosti ΔH i ΔS u slučaju oba flavonoida sugerišu da je većina veza između flavonoida i BSA hidrofobnog karaktera, ali se ne smeju isključiti i druge vrste interakcije. Negativna vrednost ΔG vezivanja kod oba flavonoida govori o spontanosti reakcije.

Uvod

Flavonoidi (flavus: žut) ili bioflavonoidi su polifenolna jedinjenja koja su prisutna u velikom broju viših biljaka (jabuke, citrusno voće, grožđe), odnosno hrani i piću napravljenim na bazi bilja (voćni sokovi, vino, kafa, pivo). Do sada je identifikovano više od 5000 različitih flavonoida, a taj broj se stalno povećava. Počev od 1938. godine kada je Szent-Gyorgyi objavio prvi rad o flavonoidima, gde je pokazano da flavonoidi smanjuju permeabilnost kapilara pa do danas, objavljen je veliki broj radova u kojima se opisuje njihova struktura i dokazuju brojne biološke i

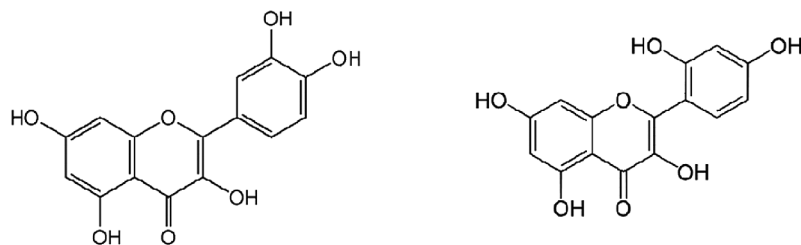
*Marin Kuntić (1993),
Beograd, Poručnika
Spasića i Mašere 110,
učenik 4. razreda XIII
beogradske gimnazije*

farmakološke aktivnosti (antimikrobna, antikancerogena, kardioprotektivna, uticaj na krvne sudove). Neki flavonoidi se koriste kao dijetetski suplementi, a neki kao lekovi.

Uneti u organizam, flavonoidi se vezuju za proteine krvne plazme, prvenstveno za albumin krvnog seruma, koji čini preko 60% od ukupnih proteina plazme i predstavlja transportni protein za najveći broj lekova i metabolita. Vezivanjem za albumin seruma, smanjuje se koncentracija slobodnog flavonoida u krvnoj plazmi, čime se umanjuje njegovo farmakološko delovanje. Što je vezivanje za albumin jače, odnosno što je konstanta vezivanja veća, farmakološko delovanje flavonoida je manje.

U literaturi je opisana reakcija vezivanja flavonoida i humanog albumina seruma (HSA – human serum albumin), kao i reakcija vezivanja flavonoida za goveđi serum albumin (BSA – bovine serum albumin), koje je strukturni homolog HSA i odličan model za praćenje reakcija ligand-protein. Reakcija vezivanja flavonoida i BSA praćena je uglavnom fluorimetrijski, pošto je BSA fluorescentni molekul čija fluorescencija potiče od fluorofore (aminokiselina triptofana i tirozina). Flavonoid vezivanjem za BSA gasi fluorescenciju, odnosno smanjuje intenzitet emitovane svetlosti, pošto se vezuje za aktivno mesto koje sadrži fluoroforu, a takođe menja i fluorescentnu anizotropiju. Na osnovu ovih promena u fluorescenciji, moguće je izračunati jačinu vezivanja, odnosno konstantu asocijacije kompleksa flavonoid-BSA.

Određivanje konstante vezivanja moguće je i spektrofotometrijski, pošto su flavonoidi hromofore – UV-VIS spektri većine flavonoida pokazuju dva glavna apsorpciona maksimuma: prvi, koji se nalazi u opsegu 240-285 nm (naziva se traka II) i drugi, u opsegu 300-400 nm (traka I). Takođe, i BSA apsorbuje u UV delu spektra, na oko 280 nm. Jedna od metoda određivanja konstante vezivanja spektrofotometrijski je i Jobova metoda.



Slika 1.
Strukturne formule
kvercetina (levo) i
morina (desno)

Figure 1.
Structural formula of
quercetin (left) and
morin (right)

Cilj rada bio je odrediti konstante vezivanja dva flavonoida, kvercetina i morina sa BSA, kao i termodinamičke parametre vezivanja spektrofotometrijski, pošto su spektrofotometri instrumenti koji se standardno nalaze u svakoj laboratoriji i dostupniji su od fluorimetara i

polarizacionih fluorimetara. Kvercetin je izabran jer je jedan od naj-rasprostranjenijih flavonoida u biljnom svetu i široko je prisutan na tržištu kao dijetetski suplement. Morin je izomer kvercetinu, po strukturi se razlikuje samo po položaju -OH grupe u fenilnom prstenu (slika 1), pa je cilj bio i utvrditi da li razlika u položaju jedne -OH grupe utiče na konstantu vezivanja sa BSA.

Materijal i metode

Korišćene su sledeće hemikalije: morin (Fluka), kvercetin (Merck), BSA (Fisher Chemical), natrijum-hidrogenfosfat (Alkaloid p.a.) i natrijum-dihidrogenfosfat (Merck Alkaloid p.a.). Napravljeni su osnovni rastvori kvercetina i morina koncentracije 20 μ M u smeši etanola i vode (1 : 100) i rastvor BSA koncentracije 20 μ M u fosfatnom puferu (pH = 7.4).

Sva spektrofotometrijska merenja vršena su na spektrofotometru CESIL CE 2021 na talasnoj dužini od 418 nm u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm.

Da bi se ispitalo da li su fomirani kompleksi flavonoida i BSA, snimljeni su spektri rastvora kvercetina, morina i BSA pojedinačno u oblasti od 250 do 600 nm, a zatim je snimljen spektar smeše kvercetina sa BSA, odnosno morina sa BSA. Nakon što je ustanovljeno da je nastao kompleks (došlo je do pomeranja apsorpcionog maksimuma flavonoida sa 388 nm za kvercetin, odnosno 399 nm za morin, na 418 nm), snimljeni su spektri smeše kvercetina i BSA, odnosno morina i BSA, a za baznu liniju je uzet spektar kvercetina, odnosno morina. Na taj način su dobijeni spektri nagrađenog kompleksa. Za dalji rad korišćena je talasna dužina koja odgovara maksimumu spektra razlike ($\lambda_{max} = 418$ nm).

Jobova metoda

Za određivanje konstanti vezivanja flavonoid-BSA korišćena je Jobova metoda. Ova metoda se sastoji u tome da se napravi serija rastvora odmeravanjem različitih zapremina ekvimolarnih rastvora flavonoida i BSA tako da rastvori serije imaju konstantnu ukupnu koncentraciju i zapreminu, a različit odnos flavonoida i BSA. U radu, osnovni rastvori kvercetina, odnosno morina i BSA, pomešani su u 12 različitih odnosa (1.1 : 0.9, 1.2 : 0.8, 1.3 : 0.7, 1.4 : 0.6, 1.5 : 0.5, 1.6 : 0.4, 1.7 : 0.3, 1.75 : 0.25, 1.8 : 0.2, 1.85 : 0.15, 1.9 : 0.1, 1.95 : 0.05) pri konstantnoj ukupnoj koncentraciji od 20 μ M. Snimljena je apsorbcija ovih rastvora, a slepa proba za svaki od rastvora bio je rastvor kvercetina, odnosno morina, odgovarajuće koncentracije. Za dobijene rezultate nacrtan je grafik zavisnosti apsorbcije od molskog udela kvercetina, odnosno morina.

Maksimum tog grafika određuje stehiometrijski odnos u kome se kvercetin, odnosno morin vezuje za BSA.

Izračunavanje konstanti vezivanja

Konstante vezivanja kvercetina i morina za BSA određene su iz podataka dobijenih Jobovom metodom. Ekstrapolacijom Jobove krive, dobija se teorijska vrednost apsorbancije, odnosno ona vrednost apsorbancija koju bi kompleks imao da su reaktanti potpuno izreagovali u odgovarajućem stehiometrijskom odnosu. Odnos teorijske i izmerene vrednosti apsorbancije smeše kvercetina i BSA, odnosno morina i BSA, predstavlja koncentraciju nastalog kompleksa, koja se može izraziti preko izraza (1):

$$[\text{BSA:F}] = \frac{A_m}{A_{\text{ext}}} \cdot C \quad (1)$$

gde je $[\text{BSA:F}]$ koncentracija kompleksa koji grade flavonoid i BSA, A_m merena apsorbancija, A_{ext} ekstrapolisana apsorbancija, a C ukupna koncentracija flavonoida ili BSA.

Za određivanje konstanti vezivanja pored koncentracije kompleksa potrebne su i ravnotežne koncentracije flavonoida i BSA. One se mogu izraziti kao razlika početne koncentracije flavonoida i BSA i koncentracije nastalog kompleksa. Tada se dobija sledeći izraz za konstantu vezivanja:

$$K = \frac{\frac{A_m}{A_{\text{ext}}} \cdot C}{\left(C_{\text{BSA}} - \frac{A_m}{A_{\text{ext}}} \cdot C \right) \cdot \left(C_{\text{F}} - n \cdot \frac{A_m}{A_{\text{ext}}} \cdot C \right)^n} \quad (2)$$

gde su C_{F} i C_{BSA} i početne koncentracije flavonoida, odnosno BSA, a n je stehiometrijski odnos flavonoida i BSA.

Izračunavanje termodinamičkih parametara reakcije

Za određivanje termodinamičkih parametara (ΔS , ΔH , ΔG) konstruisan je grafik zavisnosti prirodnog logaritma konstante vezivanja od recipročne vrednosti apsolutne temperature. Pošto su po Van't Hofovoj jednačini:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

nagib, odnosno odsečak prave $\ln K = k \cdot (1/T) + l$ proporcionalni promeni entalpije, odnosno entropije reakcije, ove termodinamičke veličine se mogu izraziti preko jednačina:

$$\Delta H = -R \cdot k \quad (4)$$

$$\Delta S = R \cdot l \quad (5)$$

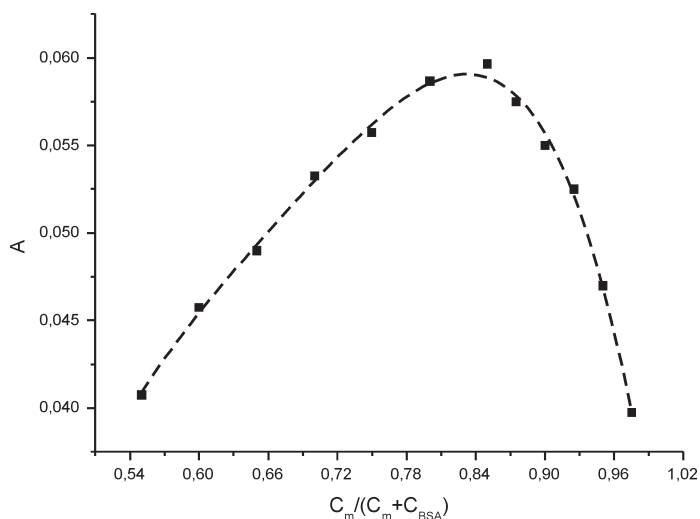
gde je l odsečak, a k nagib Van't Hofove prave. Promena Gipsove slobodne energije određuje se iz jednačine:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (6)$$

gde je K konstanta vezivanja, a R univerzalna gasna konstanta ($R = 8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$).

Rezultati i diskusija

Stehiometrija reakcije vezivanja flavonoida za BSA određena je Jobovom metodom na gore opisani način. Kroz 12 tačaka grafika zavisnosti apsorbancije kompleksa flavonoid-BSA od molskog udela flavonoida, konstruisana je kriva čiji maksimum određuje odnos u kome reaguju flavonoid i BSA. Oba flavonoida su reagovala sa BSA u odnosu 6:1, pa je stoga prikazana samo kriva morina sa BSA (slika 2). Iako je



Slika 2.
Grafik zavisnosti
apsorbancije od
molskog udela morina u
reakcionoj smeši na
293 K

Figure 2.
Plot of absorbance
against mol fraction of
quercetin at 293 K

Jobova metoda rađena na više temperatura (283, 293 i 303 K za kvercetin i 293, 303 i 313 K za morin), odnos u kojem flavonoid i BSA reaguju nije se menjao sa promenom temperature reakcione smeše.

Reakcija vezivanja nekih flavonoida sa BSA opisana je u literaturi, gde je nađeno da flavonoid i BSA reaguju u odnosu 1 : 1 (Gutzeit *et al.* 2004, Hu *et al.* 2012, Liu *et al.* 2010, Wang *et al.* 2007, Zsila *et al.* 2003). Opisane metode su fluorimetrijske, odnosno zasnivaju se na gašenju fluorescencije samog molekula BSA kada se za njega veže flavonoid. Fluorimetrijskom metodom može se pratiti samo reakcija vezivanja

flavonoida kod fluorofore BSA, pa je verovatno stoga dobijen stehiometrijski odnos 1 : 1, jer se flavonoid vezao samo za aktivni centar proteina koji sadrži fluoroforu. Spektrofotometrijska metoda nema ova ograničenja i moguće je pratiti vezivanje flavonoida na čitav molekul BSA, pa dobijen stehiometrijski odnos 6 : 1 ukazuje da se flavonoid vezuje na više različitih mesta na BSA.

Konstante vezivanja dobijene su iz odnosa teorijske i izmerene vrednosti apsorbancije (2) pri odnosu flavonoida i BSA 6 : 1 i prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Konstante vezivanja na različitim temperaturama (M^{-6})

	283 K	293 K	303 K	313 K
Kvercetin	6.3	10.0	29.8	
Morin		17.0	39.9	257.5

Dobijene konstante vezivanja ukazuju na slabu vezu između flavonoida i BSA. Poređenjem sa literaturnim podacima, gde je nađeno da se konstante stabilnosti kompleksa kvercetin-BSA kreću u intervalu 1.5×10^4 - $4.0 \times 10^6 M^{-1}$, uočava se da su dobijene konstante niže čak za 3 do 4 reda veličine, što je direktna posledica stehiometrijskog odnosa flavonoid-BSA 6 : 1, pa je u jednačini (2) eksponent 6, $n = 6$. Razlike između konstanti vezivanja kvercetina i morina sa BSA nisu značajne, ali ipak postoje i ukazuju da položaj -OH grupa u fenilnom prstenu utiče na jačinu ostvarene veze sa proteinom. Hidroksilne grupe u meta položaju kod morina verovatno su sterno povoljnije za reakciju sa BSA od hidroksilnih grupa u orto položaju kod kvercetina, što rezultira jačom vezom. Takođe, iz tabele 2 može se uočiti da konstante stabilnosti kompleksa rastu u ispitivanom opsegu temperatura, što ukazuje da je reakcija vezivanja u oba slučaja endotermna.

Termodinamički parametri reakcije vezivanja dobijeni su iz zavisnosti prirodnog logaritma konstante vezivanja od recipročne vrednosti temperature kao nagib i odsečak prave (3). Poznajući termodinamičke parametre, moguće je odrediti tip veze koji postoji između flavonoida i BSA u formiranom kompleksu. Tipovi interakcija mogu biti Van der Valsove interakcije, hidrofobne interakcije, vodonične veze ili elektrostatičke interakcije. Kod tipične hidrofobne interakcije promena entalpije i entropije su pozitivne vrednosti, dok kod Van der Valsovih interakcija i vodonične veze imaju negativne vrednosti. Dobijene vrednosti termodinamičkih parametara predstavljene su u tabelama 2 i 3.

Tabela 2. Vrednosti promena entropije i entalpije

	<i>l</i>	<i>k</i>	ΔS (J/mol)	ΔH (kJ/mol)
Kvercetin	25±6	-6.6±1.7	210±50	55±14
Morin	45±10	-12±3	370±80	100±24

Tabela 3. Vrednosti promene Gibbsove slobodne energije

Temperatura (K)	ΔG (kJ/mol)	
	Kvercetin	Morin
283	-4.3	
293	-5.6	-6.9
303	-8.5	-9.3
313		-14.4

Iz tabela 2 i 3 može se uočiti da i kvercetin i morin imaju pozitivne vrednosti ΔH i ΔS , kao i negativnu vrednost ΔG . Pozitivne vrednosti ΔH i ΔS ukazuju da su interakcije između flavonoida i BSA hidrofobnog karaktera. U radovima gde se reakcija vezivanja flavonoida i BSA pratila fluorimetrijski, dobijene su negativne vrednosti ΔH i pozitivne vrednosti ΔS , što pokazuje da se flavonoid vezuje za aktivni centar proteina koji sadrži fluoroforu nekim drugim tipom veze, koja je jača od hidrofobnih interakcija. Iako se spektrofotometrijskom metodom mogu potvrditi samo veze hidrofobnog karaktera, ne može se isključiti ni postojanje drugih veza elektrostatičke prirode. Negativne vrednosti ΔG ukazuju da je reakcija vezivanja flavonoida za BSA u vodenom rastvoru na datim temperaturama spontan proces. Razlike koje postoje u vrednostima ΔH i ΔS formiranja kompleksa BSA sa kvercetinom, odnosno morinom, posledica su nastajanja veza različite jačine, što je opet posledica različite strukture ova dva flavonoida, odnosno različitih položaja -OH grupa u fenilnom prstenu.

Zaključak

U ovom radu određena je stehiometrija reakcije vezivanja kvercetina za BSA, odnosno morina za BSA, koja u oba slučaja iznosi 6 : 1. Izračunate su konstante vezivanja kompleksa kvercetin-BSA i morin-BSA koje su znatno niže od literaturnih podataka. Pozitivne vrednosti ΔH i ΔS ukazuju da su interakcije između flavonoida i BSA većinom hidrofobnog karaktera, dok negativna vrednost ΔG pokazuje da je formiranje kompleksa pri datim uslovima spontan proces. Razlike u konstantama vezivanja,

kao i u termodinamičkim parametrima između kompleksa kvercetin-BSA i morin-BSA postoje usled razlike u položaju hidroksilnih grupa u fenilnom prstenu flavonoida. Niske konstante vezivanja ukazuju na to da se flavonoidi lakše otpuštaju sa proteina nosača, čime se pojačava njihovo farmakolosko dejstvo i proširuje njihova primena kao lekova.

Literatura

- Gutzeit H. O., Henker Y., Kind B., Franz A. 2004. Specific interaction of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **318**: 490.
- Hirose K. 2001. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **39**: 193.
- Hu Y., Yue H., Li X., Zhang S., Tang E., Zhang L. 2012. Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **112**: 16.
- Kitson T. M. 2004. Spectrophotometric and Kinetic Studies on the Binding of the Bioflavonoid Quercetin to Bovine Serum Albumin. *Biosci. Biotechnol. Biochemistry*, **68** (10): 2165.
- Liu E., Qi L., Li P. 2010. Structural Relationship and Binding Mechanisms of Five Flavonoids with Bovine Serum Albumin. *Molecules*, **15**: 9092.
- Tajmir-Riahi H. A. 2007. An Overview of Drug Binding to Human Serum Albumin: Protein Folding and Unfolding. *Scientia Iranica*, **14** (2): 87.
- Todorović M., Đurđević P., Antonijević V. 1997. *Optičke metode instrumentalne analize*. Beograd: Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
- Wang Y., Zhang H., Zhang G., Tao W., Tang S. 2007. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence*, **126**: 211.
- Zsila F., Bikadi Z., Simonyi M. 2003. Probing the bind of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochemical Pharmacology*, **65**: 447.
- Zhong W., Wang Y., Yu J., Liang Y., Ni K., Tu S. 2004. The Interaction of Human serum Albumin with a Novel Antidiabetic Agent SU-118. *Journal of Pharmaceutical Science*, **93** (4): 1039.

Spectrophotometric Determination of Binding Constants of Quercetin and Morin with Bovine Serum Albumine and their Thermodynamic Parameters

Flavonoids are one of the largest groups of polyphenolic natural compounds. A considerable number of plant medicines that contain flavonoids have antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, antineoplastic, cardioprotective and vasodilatory actions. Administered in human organisms, flavonoids are transported by the serum protein albumin. Since only unbounded flavonoid exhibits pharmacological properties, the investigation of binding of flavonoids to the protein is of great importance.

In this paper spectrophotometry was used to determine the binding constants of quercetin and its structural isomer morin with bovine serum albumin (BSA), which is a structural homolog with human serum albumin (HSA) and a suitable model for protein-ligand studies. Spectrophotometers are much more affordable instruments than fluorimeters and polarization fluorimeters which have been used in this field before. Stoichiometry of the reaction was determined from Job's method of continuous variation. The obtained stoichiometry for the flavonoid-BSA complex was 6 : 1 for both quercetin and morin. Binding constants were also determined from the Job's plot at 3 different temperatures for each flavonoid. The calculated constants were much lower than those found in the literature (3 to 4 orders of magnitude), because of the stoichiometry of the reaction. Differences in binding constants values between quercetin and morin could be caused by the position of the -OH group on the phenyl ring. Low values of the binding constants indicate that flavonoids can be released from the protein much easier and therefore be more effective as drugs. Thermodynamic parameters were obtained from Van't Hof's plot. Positive values of ΔH and ΔS for both quercetin and morin suggest that most of the flavonoids have hydrophobic interactions with BSA, but other types of interactions cannot be excluded. Negative ΔG values for both flavonoids indicate that binding with BSA is spontaneous.

