



УДК 543.054

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТВОРОВ КВЕРЦЕТИНА И РУТИНА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ

И. С. Решетникова, А. С. Романевич, С. Н. Штыков



Решетникова Ирина Сергеевна, аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, lrkasar@ya.ru

Романевич Анна Станиславовна, бакалавр кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, romanevichhhh@mail.ru

Штыков Сергей Николаевич, доктор химических наук, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, shtykovsn@mail.ru

Спектрофотометрическим методом изучено влияние pH и времени на изменение спектров поглощения молекулярной и диссоциированной по первой гидроксигруппе форм двух флавоноидов – кверцетина и рутина. Показано, что молекулярная форма кверцетина (pH 3–6) устойчива в водном растворе в течение 10 мин, а оптическая плотность диссоциированной формы (pH 8–10) в зависимости от pH быстро уменьшается уже в первые минуты. Интенсивность поглощения света молекулярной и диссоциированной форм рутина практически не изменяется на протяжении 10–20 минут. Установлено, что добавление в раствор сульфата натрия позволяет предотвратить окисление и стабилизировать оптическую плотность кверцетина в первые 1–2 минуты, что позволит изучать его протолитические свойства и взаимодействие с другими веществами.

Ключевые слова: кверцетин, рутин, спектры поглощения, протолитическое равновесие, устойчивость в растворе.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260

Введение

Кверцетин (3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) (КВ) и его гликозид рутин (3-О-рутинозид) (РУ) являются одними из наиболее распространенных соединений растительного происхождения, обладающих разнообразными лечебными свойствами и высокой антиоксидантной активностью [1–3]. Оба соединения также используются в качестве аналитических реагентов на ряд металлов [4]. В связи с этим двум указанным флавоноидам посвящены тысячи публикаций [3]. Анализ литературных данных по кверцетину показал, что константы диссоциации его гидроксигрупп сильно различаются [5–13]. Основная причина, по мнению авторов [5, 6, 8], состоит во влиянии рас-

творенного в воде кислорода, который окисляет кверцетин. Следовательно, этот факт необходимо учитывать как при определении рК флавоноидов, их количественном определении в растительных и пищевых объектах и применении в качестве аналитических реагентов.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в спектрофотометрическом изучении изменения во времени кислотно-основных форм кверцетина и рутина и разработке способа их стабилизации в водном растворе.

Экспериментальная часть

Использовали кверцетин дигидрат «Alfa Aesar», CAS 6151-25-3, 97% (Германия); рутин тригидрат «AlfaAesar», 97%, CAS 153-18-4 (Германия). Исходные растворы флавоноидов с концентрацией 2×10^{-4} моль/л готовили растворением точной навески препарата в 99% этаноле. Сульфит натрия, чда «Химмед» (Россия). Кислотно-основные свойства кверцетина и рутина изучали в диапазоне pH 3.0 – 11.0, используя ацетатно-аммиачные буферные (ААБ) растворы, приготовленные из исходных 2 М растворов аммиака и уксусной кислоты. Значения pH контролировали с помощью стеклянного электрода ЭСК-10601 на pH-метре pH-150 МИ (Гомель, Беларусь). Электронные спектры флавоноидов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония).

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены общая формула флавоноидов (1, а), формулы кверцетина (1, б) и рутина (1, в). Двум хромофорным центрам в спектре поглощения флавоноидов соответствуют две полосы поглощения: одна на границе УФ и видимой области в интервале 300–380 нм, которая связана с поглощением света частью молекулы под номером I, другая в УФ-области в интервале 340–280 нм, соответствующая поглощению света кольцом под номером II [14]. Наиболее чувствительной к условиям среды и химическому взаимодействию является полоса, отвечающая части I, изменение спектров которой использовалось для интерпретации процессов, протекающих в растворах.

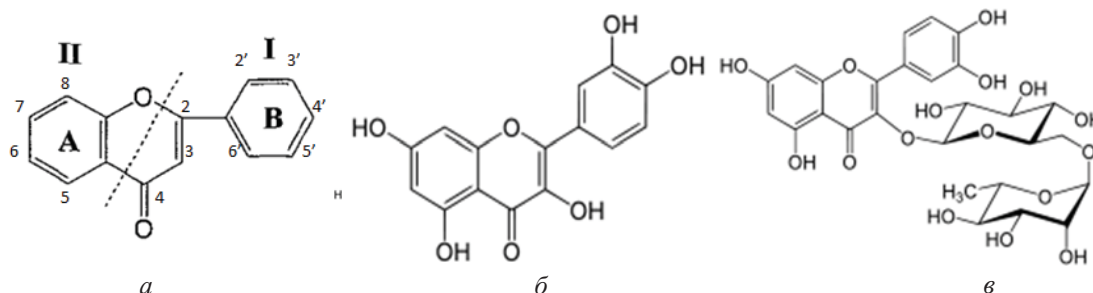


Рис. 1. Принципиальная структура флавоноидов (а), структурная формула кверцетина (б) и рутина (в)

Влияние времени и pH на спектры поглощения кверцетина

В соответствии с [5] pK_1 и pK_2 кверцетина равны 6.62 ± 0.04 и 9.7 ± 0.3 . В связи с этим в исследованном интервале pH 3–11 мы оценивали изменение во времени молекулярной и анионных форм флавоноидов. Примеры

спектров поглощения кверцетина при pH, соответствующих молекулярной (pH 3–6) и диссоциированной по одной из OH-групп форм реагента, представлены на рис. 2, а изменение оптической плотности в максимумах спектров указанных форм в течение 30 минут – на рис. 3.

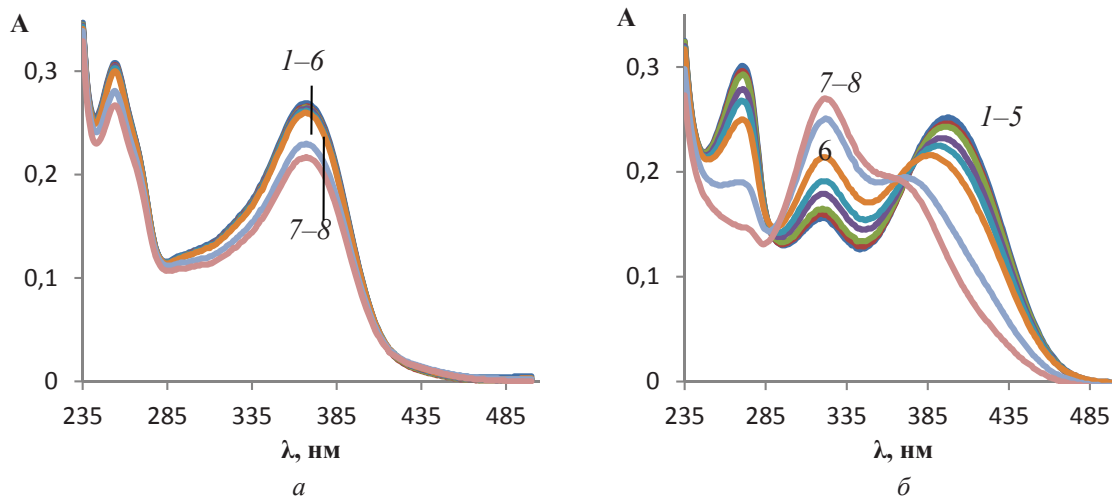


Рис. 2. Влияние времени на спектр поглощения кверцетина $C_{KB} = 1 \cdot 10^{-5}$ М при pH: а – 5; б – 9; t, мин: 1 – 0.2; 2 – 0.5; 3 – 1; 4 – 3; 5 – 5; 6 – 10; 7 – 20; 8 – 30

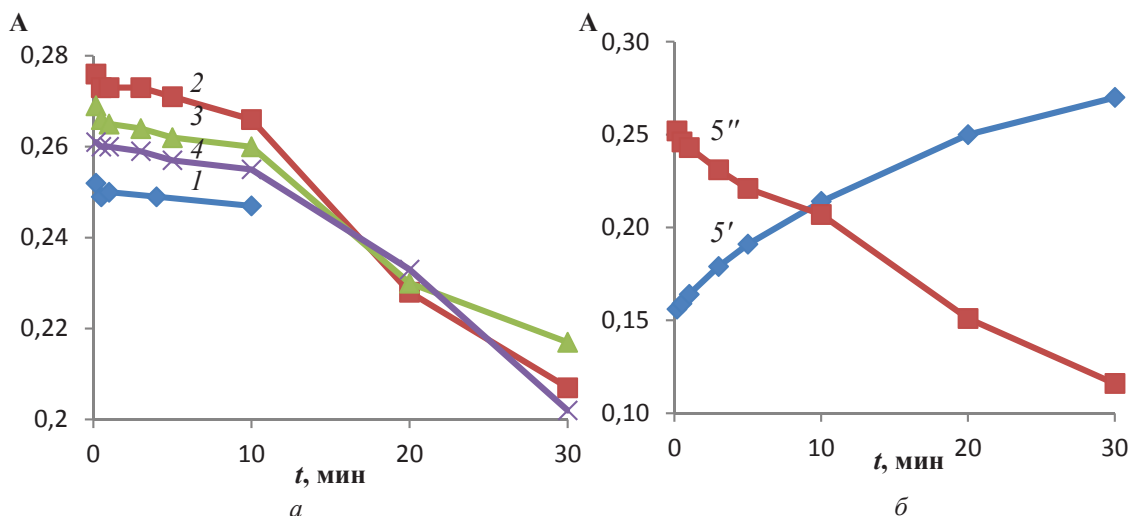


Рис. 3. Изменение оптической плотности кверцетина от времени, $C_{KB} = 1 \cdot 10^{-5}$ М при pH: а – 3–6 при $\lambda = 367$ нм и б – 9 при $\lambda = 398$ нм и $\lambda = 321$ нм; pH: (1) 3, (2) 4, (3) 5, (4) 6, (5') 9, $\lambda = 321$ нм; (5'') 9, $\lambda = 398$ нм



Из рис. 2, *а* видно, что форма спектра поглощения молекулярной формы со временем не изменяется. В первые 10 мин уменьшение оптической плотности не превышает 2–3%, т.е. незначительно. В последующие 20 мин оптическая плотность уменьшается примерно на 15% (рис. 3, *а*). Таким образом, можно заключить, что исследования в интервале рН 3–6 необходимо проводить в первые 10 мин после приготовления раствора.

Радикальное изменение спектра, соответствующего однократно диссоциированной форме кверцетина, происходит при рН 9 и в более щелочной области. Из рис. 2, *б* следует, что вследствие предполагаемого окисления полосы диссоциированной формы с максимумами при 398 и 270 нм исчезают и одновременно появляется новая сложная полоса с максимумом при 320 и плечом при 370 нм. Уменьшение оптической плотности при 398 нм и одновременный рост оптической плотности при 321 нм показаны на рис. 3, *б*. Видно, что в течение первых 5 мин оптическая плотность при $\lambda = 398$ нм уменьшается на 12%, а за 30 мин оптическая плотность исходной формы

уменьшается вдвое и полоса диссоциированной формы практически исчезает. Еще более быстро уменьшение оптической плотности диссоциированной формы происходит при рН 10 и 11. Следует отметить, что в спектрах поглощения кверцетина при его окислении в растворе наблюдаются две изобестические точки (рис. 2, *б*) при 288 и 368 нм, свидетельствующие о равновесии между однократно диссоциированной и окисленной формами флавоноида.

Влияние времени и рН на спектры поглощения рутина

Спектры поглощения на примере молекулярной (рН 3–7) и однократно диссоциированной формы (рН 9) рутина представлены на рис. 4. Видно, что в обоих случаях даже на протяжении 30 мин форма спектров практически не меняется, а изменения оптической плотности в максимумах обеих форм рутина незначительны и не превышают 5–10%. Это позволяет предположить, что окисление кверцетина происходит по гидроксильной группе в положении 3, которая в рутине отсутствует.

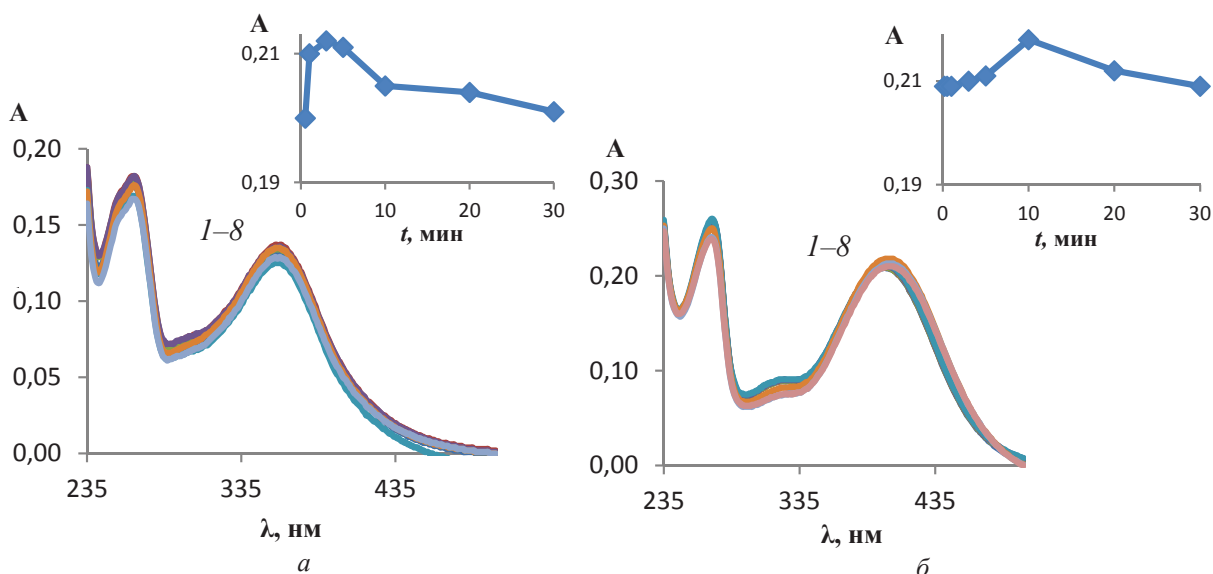


Рис. 4. Влияние времени на спектры поглощения рутина и изменение оптической плотности от времени при рН: *а* – $\lambda = 354$ нм и *б* – $\lambda = 398$ нм. $C_{\text{ру}} = 1 \cdot 10^{-5}$ М. *t*, мин: (1) 0.2; (2) 0.5; (3) 1; (4) 3; (5) 5; (6) 10; (7) 20; (8) 30

Влияние сульфита натрия на устойчивость растворов кверцетина

Если предположить, что резкие изменения спектров диссоциированной формы кверцетина связаны с окислением растворенным в воде кислородом воздуха, концентрация которого составляет $9,1 \text{ мг/дм}^3$ ($2,8 \cdot 10^{-4}$ М), то добавлением в раствор восстановителей можно будет временно удалить кислород и получить спектр истинной диссоциированной формы кверцетина. В связи с

этим нами изучено влияние добавок сульфита натрия на форму спектров и оптическую плотность кверцетина в щелочной среде (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что добавление сульфита натрия стабилизирует оптическую плотность диссоциированной формы кверцетина при 408 нм, по крайней мере, в течение 1–2 мин. Даже через 10 мин в спектре поглощения сохраняется полоса диссоциированной формы кверцетина (кривая 12). Таким образом, вместо пропускания через

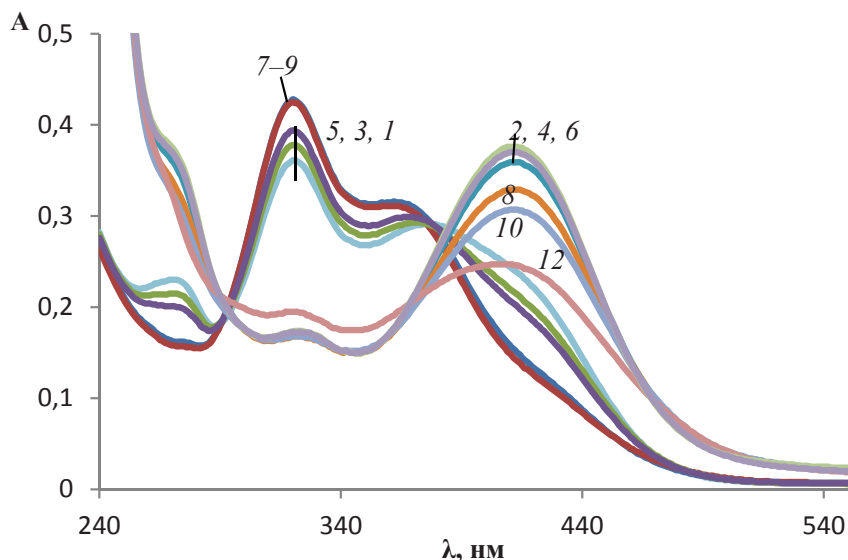


Рис. 5. Спектры поглощения кверцетина в присутствии (2, 4, 6, 8, 10, 12) и без добавления (1, 3, 5, 7, 9, 11) Na_2SO_3 , pH 10. ААБ. $C_{\text{КВ}} = 2 \cdot 10^{-5}$ М. $C_{\text{Na}_2\text{SO}_3} = 10^{-2}$ М. t , мин: (1, 2) 0,2; (3, 4) 0,5; (5, 6) 1; (7, 8) 3; (9, 10) 5; (11, 12) 10

раствор азота, рекомендованного в работе [5], который из-за образования пены может мешать определению констант диссоциации кверцетина в присутствии поверхностно-активных веществ, нами предлагается использовать сульфит натрия.

Заключение

Изучение влияния времени и pH на поведение в растворе кверцетина и рутина позволило установить, что их устойчивость определяется тремя факторами: природой реагента, кислотностью среды и присутствием в воде растворенного кислорода. Оптическая плотность спектров поглощения кверцетина в интервале pH 3–6 (молекулярная форма) в течение первых 10 мин уменьшается не более чем на 2–3%, а в течение 30 мин на 15%. При pH 9–11 устойчивость кверцетина в водном растворе резко уменьшается: оптическая плотность раствора падает на 12–15% в первые 5 мин и более чем на 50% в течение 30 мин. При этом вместо двух полос, соответствующих однократно диссоциированной ионной форме, появляется новая полоса, принадлежащая, по-видимому, окисленной форме реагента. Показано, что добавление в водный раствор сульфита натрия позволяет стабилизировать диссоциированную ионную форму кверцетина при pH 9–10 в течение 1–2 мин. Спектры рутина во всем интервале pH не изменяют своей формы, а оптическая плотность за 30 мин уменьшается не более чем на 5–10%.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-03-01029).

Список литературы

1. Корупкин Д. Ю., Абилов Ж. А., Музыкаева Р. А., Толстиков Г. А. Природные флавоноиды. Новосибирск : Тео, 2007. 232 с.
2. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдралилов Б. С., Музафаров Е. Н. Флавоноиды : биохимия, биофизика, медицина. Пушино : Synchronbook, 2013. 310 с.
3. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии : состояние проблемы и перспективы развития // Успехи химии. 2015. Т. 84, № 2. С. 194–224.
4. Марченко З., Бальцержак М. Методы спектрофотометрии в УФ и видимой областях в неорганическом анализе. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 711 с.
5. 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.
6. Zenkevich I. G., Eshchenko A. Yu., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Yu. G., Utsal V. A. Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature // *Molecules*. 2007. Vol. 12. P. 654–672.
7. Mezzetti A., Protti S., Lapouge Ch., Cornard J-P. Protic equilibria as the key factor of quercetin emission in solution. Relevance to biochemical and analytical studies // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13. P. 6858–6864.
8. Álvarez-Diduk R., Ramirez-Silva M. T., Galano A., Merkoçi A. Deprotonation Mechanism and Acidity Constants in Aqueous Solution of Flavonols : a Combined Experimental and Theoretical Study // *J. Phys. Chem. B*. 2013. Vol. 117, № 41. P. 12347–12359.



9. Барвиченко Н. А., Липковская Н. А., Федянина Т. В. Кето-енольная таутомерия кверцетина в растворах катионного ПАВ мирамистина // Коллоид. журн. 2014. Т. 76, № 1. С. 3–7.
10. Kuntic V., Pejic N., Micic S., Malesev D., Vujic Z. Determination of Dissociation Constants of Quercetin // Pharmazie. 2003. Vol. 58. P. 439–440.
11. Herrero-Martinez J. M., Repolles C., Bosch E., Roses M., Rafols C. Potentiometric Determination of Aqueous Dissociation Constants of Flavonols Sparingly Soluble in Water // Talanta. 2008. Vol. 74. P. 1008–1013.
12. Herrero Martinez J. M., Sanmartin M., Roses M., Bosch E., Rafols C. Determination of Dissociation Constants of Flavonoids by Capillary Electrophoresis // Electrophoresis. 2005. Vol. 28. P. 1886–1895.
13. Topolewski P., Zommer-Urbańska S. Spectrophotometric investigation of protolytic equilibria of rutin // Microchim. Acta. 1989. Vol. 97, № 1–2. P. 75–80.
14. Naseem B., Shah S. W. H., Hasan A., Shah S. S. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media : A UV–visible spectroscopic study // Spectrochim. Acta. Part A. 2010. Vol. 75. P. 1341–1346.

Spectrophotometric Study of the Stability the Quercetin and Rutin Solutions at Different Acidity of the Medium

I. S. Reshetnikova, A. S. Romanevich, S. N. Shtykov

Irina S. Reshetnikova, ORCID 0000-0002-1240-5991, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, lrkasar@ya.ru

Anna S. Romanevich, ORCID 0000-0001-7534-9408, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, romanevichhhh@mail.ru

Sergei N. Shtykov, ORCID 0000-0001-6753-5040, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shtykovsn@mail.ru

Flavonoids are a group of polyphenolic compounds present in many plants, fruits, vegetables, nuts, flowers etc. They exhibit a wide range of bioactivity and have gained much attraction last two decades because of its potential applications in biology, medicine, and chemical analysis due to their antioxidant, medicinal (antiviral, antibacterial, antiallergic effects) and complexation properties. One of the main properties of flavonoids especially quercetin is their oxidation by oxygen dissolved in water or organic solvents mainly in basic media. This is the main reason for non-reproducibility of quercetin acidity constants determined by several authors. Hence, the aim of our paper was to investigate the pH and time effects on the behavior of quercetin and rutin aqua solutions and to find possibility for stabilization of their solutions. It was established that their stability in solution is determined by three factors: the nature of flavonoids, acidity of the medium (created by acetate-ammonium buffers) and presence of oxygen in solution. It was found that quercetin solutions in the pH interval 3–6 are stable during first ten minutes but at the end of thirty minutes the optical density falls down about 15 percent. In basic media, especially at pH 9–11, the optical density of quercetin falls down at first 1–2 minutes and after 10 minutes the quercetin spectra transform their shape and maximum position that belong to oxidized form of the flavonoid. We found that addition of 0.01 M of sodium sulfite prevents oxidation and stabilizes optical density of quercetin at pH 9–10 during 1–2 minutes; therefore, it is possible to investigate the protolytic reactions and interaction with different substances. The rutin spectra are not significantly change in acidic and basic media during first ten minutes and during next twenty minutes the optical density in the basic media decreases by 15 percent.

Keywords: quercetin, rutin, absorption spectra, protolytic equilibrium, stability in solution.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-03-01029a).

Образец для цитирования:

Решетникова И. С., Романевич А. С., Штыков С. Н. Спектрофотометрическое изучение устойчивости растворов кверцетина и рутина при различной кислотности среды // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 256–260. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260

Cite this article as:

Reshetnikova I. S., Romanevich A. S., Shtykov S. N. Spectrophotometric Study of the Stability the Quercetin and Rutin Solutions at Different Acidity of the Medium. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 256–260 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260