

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.48:547.814.5

## ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ КВЕРЦЕТИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2015 г. А. Н. Чеботарев<sup>1</sup>, Д. В. Снигур

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, химический факультет  
65082 Украина, Одесса, ул. Дворянская, 2

<sup>1</sup>E-mail: alexch@ukr.net

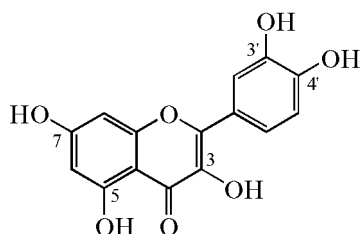
Поступила в редакцию 02.10.2013 г., после доработки 20.02.2014 г.

Методом химической цветотметрии изучены кислотнo-основные свойства кверцетина в водных растворах и определены его константы диссоциации ( $pK$ ). Значения  $pK$  отнесены к соответствующим функциональным группам кверцетина, и предложена вероятная схема их диссоциации. Построена диаграмма распределения ионно-молекулярных форм кверцетина в диапазоне  $pH$  1–13.

**Ключевые слова:** кверцетин, химическая цветотметрия, константы ионизации, диаграмма распределения.

DOI: 10.7868/S0044450215010077

Флавоноиды представляют собой одну из самых многочисленных и распространенных групп природных веществ, в значительных количествах накапливающихся в растениях [1, 2]. Эти полифенольные соединения являются сильными антиоксидантами [3, 4]. Растущий интерес к флавоноидам обусловлен их широкой фармакологической активностью. Знание констант диссоциации флавоноидов позволяет понять их фармакологическое поведение и оценить характер (направление, интенсивность) электростатических взаимодействий с компонентами биологических систем, а также транспортные свойства веществ в живых организмах [5–7]. В качестве объекта исследования нами выбран кверцетин, который является слабой пятиосновой кислотой  $H_5A$  и находит применение не только в качестве компонента биологически активных добавок и лекарственных препаратов, но и как аналитический реагент [8].



Можно было ожидать, что физико-химические характеристики, и в первую очередь  $pK$  такого распространенного и широко используемого соединения надежно определены. Однако на сегодняшний день не все функциональные группы

(ФГ) кверцетина охарактеризованы соответствующими значениями  $pK$ , а имеющиеся сведения разрознены, что затрудняет выбор согласующихся между собой результатов. Кроме того, кверцетин может существовать в протонированной по карбонильному атому кислорода катионной форме  $H_6A^+$  [9, 10]; соответствующая константа протонизации ( $pK = 2.28$ ) определена спектрофотометрически [9]. Отсутствие надежных данных о кислотнo-основных свойствах ФГ кверцетина в определенной степени усложняет описание процессов их взаимодействия с компонентами химических систем как неорганической, так и органической природы. В работе [11] систематизированы данные о  $pK$  кверцетина, полученные в 1954–2008 гг., и отмечено, что значения  $pK$  некоторых ОН-групп, установленные разными исследователями с привлечением независимых методов, отличаются на 2–4 единицы. Такую аномалию можно объяснить, по меньшей мере, двумя причинами: 1) легкой окисляемостью кверцетина, особенно в щелочной среде, и 2) близостью кислотнo-основных свойств ряда его ФГ. Последняя проблема наиболее трудно разрешима при определении  $pK$  классическими физико-химическими методами. Для уменьшения и возможного устранения мешающих факторов предложены различные варианты модификации потенциометрического и спектрофотометрического методов. Авторы работы [11] рекомендуют в процессе потенциометрического титрования в водно-спиртовые растворы кверцетина добавлять неионогенное ПАВ и барботировать реакционную смесь азотом. Таким спосо-

бом получены значения  $pK\ 6.62 \pm 0.04$  и  $9.69 \pm 0.25$ , не отнесенные к соответствующим ФГ. В работах [13, 14] для расчета  $pK$  в водном растворе был использован экстраполяционный подход, основанный на потенциометрическом определении  $pK$  в присутствии различного количества ПАВ ( $pK\ 6.51 \pm 0.03$ , 3-ОН-группа) [12] или при различном содержании метанола в исследуемом растворе ( $pK\ 7.59 \pm 0.06$ , 7-ОН-группа, и  $9.33 \pm 0.04$ ) [13]. Показана [14] возможность спектрофотометрического определения  $pK$  кверцетина в атмосфере азота. В работе [15] применили метод капиллярного электрофореза (КЭ), а значения  $pK\ 7.19$  (7-ОН), 9.36 и 11.56 рассчитаны на основе зависимостей времени миграции компонентов системы от  $pH$  ведущего электролита. При этом частичное окисление кверцетина не влияет на результаты, поскольку продукты окисления детектируются независимо. Однако КЭ не позволяет охарактеризовать все ФГ кверцетина соответствующими константами.

Следует отметить, что в цитируемых источниках отнесение  $pK$  к конкретным ФГ выполнено частично. Использование модифицированных методик позволяет преодолеть одну из указанных выше проблем и определить  $pK$  ФГ, заметно отличающихся по кислотности. Однако ни один из предложенных вариантов модифицированных потенциометрических и спектрофотометрических методик не позволяет определить  $pK$ , характеризующие равновесия между близкими по кислотно-основным свойствам формами кверцетина. Альтернативный вариант решения перечисленных выше проблем — использование метода химической цветометрии (МХЦ). Суть МХЦ заключается в расчете цветовых координат равновесных ионно-молекулярных форм на основе имеющихся спектрофотометрических характеристик кислотно-основных систем. Метод позволяет различать спектрально близкие формы исследуемых веществ и получать новые данные о них [16, 17]. Показаны [17, 18] перспективы использования МХЦ для определения  $pK$  синтетических органических реагентов в растворах. Возможность цветометрического определения  $pK$  в растворах красителей природного происхождения (на основе экстрактов из растительного сырья) на примере антоцианидинов пеларгонидина и цианидина рассмотрена нами в работах [19, 20].

Настоящая работа посвящена детальному изучению протолитических равновесий в водных растворах кверцетина методом химической цветометрии и определению  $pK$  его ФГ в широком диапазоне кислотности среды.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Растворы и реагенты.** Использовали реактивы квалификации не ниже ч. д. а. Исходный раствор кверцетина с концентрацией  $5 \times 10^{-4}$  моль/л готовили растворением точной навески реагента в

50%-м этаноле непосредственно перед использованием. Необходимую кислотность создавали добавлением растворов серной кислоты и гидроксида натрия.

**Аппаратура.** Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-56 (ОКБ “ЛОМО-Спектр”, С.-Петербург) в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см в интервале длин волн 380–780 нм. Кислотность среды контролировали стеклянным электродом ЭСЛ-63-07 в паре с хлоридсеребряным электродом сравнения ЭВЛ-1МЗ на иономере И-130, отградуированном по стандартным буферным растворам.

**Методика.** Для определения  $pK$  в ряд мерных колб емк. 50 мл вносили по 10 мл исходного раствора кверцетина. В каждом растворе создавали соответствующее значение кислотности среды в диапазоне  $pH\ 1–12$  с интервалом 1 ед.  $pH$  и разбавляли водой до метки. С целью предотвращения окисления кверцетина кислородом воздуха через исследуемые растворы пропускали азот со скоростью  $\sim 5$  мл/мин. При нечетком разделении максимумов и для большей дифференциации значений  $pK$ , дискретность изменения кислотности уменьшали до 0.10 ед.  $pH$ . Ионную силу растворов поддерживали постоянной на уровне 0.05 введением рассчитанного количества  $KCl$ . С учетом разбавления исходного раствора, содержание этанола в фотометрируемом растворе не превышало 10%. Известно [21], что содержание до 10% спирта заметно не влияет на величину  $pK$ , а полученные значения констант диссоциации кверцетина можно отнести к водным растворам. В качестве альтернативного цветометрии использовали спектрофотометрический метод при идентичных условиях эксперимента.

**Расчеты.** Использовали следующие цветометрические функции (ЦФ):  $X, Y, Z$  — координаты цвета в системе  $CIEXYZ$ ;  $L, A, B$  — координаты цвета в системе  $CIELAB$ ; насыщенность цвета ( $S$ ) и удельное цветовое различие ( $SCD$ ). Последние ЦФ для исследуемых растворов получали, исходя из координат цвета  $X, Y, Z$ , рассчитанных на основании зарегистрированных спектров светопоглощения по методу избранных ординат с помощью базового программного обеспечения спектрофотометра. Значения  $SCD$  растворов кверцетина определяли по формуле:

$$SCD = \frac{\Delta S}{\Delta pH}, \quad (1)$$

где  $\Delta pH = pH_1 - pH_2$ ,  $\Delta S = |S_1 - S_2|$ ,  $S_1$  и  $S_2$  — насыщенность цвета исследуемых растворов при  $pH_1$  и  $pH_2$  соответственно.

Для определения  $pK$  спектрофотометрическим методом полученные электронные спектры поглощения обрабатывали с помощью программы SpectroCalc-H<sub>3</sub>A. Алгоритм расчета  $pK$  основан на

методах итерации и множественного линейного регрессионного анализа по методу наименьших квадратов и пригоден для исследования веществ даже в случае значительного перекрыwania полос в спектрах поглощения отдельных форм [22].

Значения  $pK$  кверцетина теоретически прогнозировали, исходя из структур его ионно-молекулярных форм с оптимизированной геометрией, в среде программных пакетов Marvin 5.9.1. и ACDLabs Professional 6.0. Расчет  $pK$  основан на возможностях метода QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship – количественная взаимосвязь структура–свойство), которые используют в качестве дескрипторов промежуточные результаты квантово-химических расчетов [23].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных спектрофотометрических исследований в атмосфере воздуха и инертной атмосфере азота, а также соответствующих расчетов построены кривые зависимостей значений цветиметрической функций  $SCD$  растворов кверцетина от кислотности среды (рис. 1, кривые 1 и 2). Как видно, указанные кривые имеют идентичную форму и одинаковое число максимумов различной интенсивности. Значения  $pH$ , соответствующие максимумам на кривой 1, совпадают с аналогичными значениями на кривой 2. Наличие шести максимумов на представленных графических зависимостях однозначно указывает на существование в растворе семи ионно-молекулярных форм красителя, находящихся в динамическом равновесии в зависимости от кислотности среды. Значения  $pH$ , соответствующие каждому максимуму, численно равны значениям  $pK$  ФГ кверцетина в растворе (таблица).

Заметное понижение интенсивности максимумов на кривой 2, вероятно, связано с уменьшением содержания исходного кверцетина в результате окислительной деструкции его молекул кислородом воздуха. Известно [24], что кверцетин окисляется кислородом воздуха в довольно широком диапазоне  $pH$ , причем с увеличением  $pH$  скорость этого процесса возрастает. Установлено, что в щелочной среде разрушается  $\gamma$ -пироновый фрагмент с образованием флороглюцина, 2,4,6-триоксибензойной и 3,4-дигидроксibenзойной кислот [24]. Различие кривых 1 и 2 по интенсив-

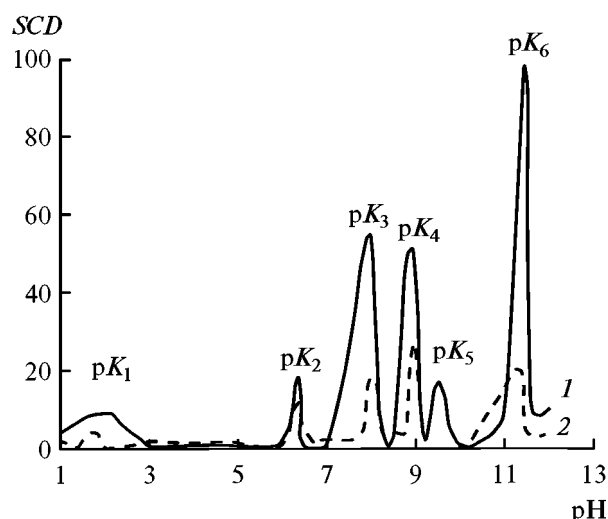


Рис. 1. Изменение величины цветиметрической функции  $SCD$  растворов кверцетина в зависимости от  $pH$  среды в атмосфере азота (1) и в атмосфере воздуха (2).

ности (рис. 1) дает основание считать, что, как и случае метода КЭ [15], продукты деструкции кверцетина в данном варианте МХЦ не детектируются. Это можно объяснить тем, что продукты окисления кверцетина поглощают свет в УФ-диапазоне, а для расчета цветиметрических функций используют спектроскопические данные видимого диапазона (380–780 нм).

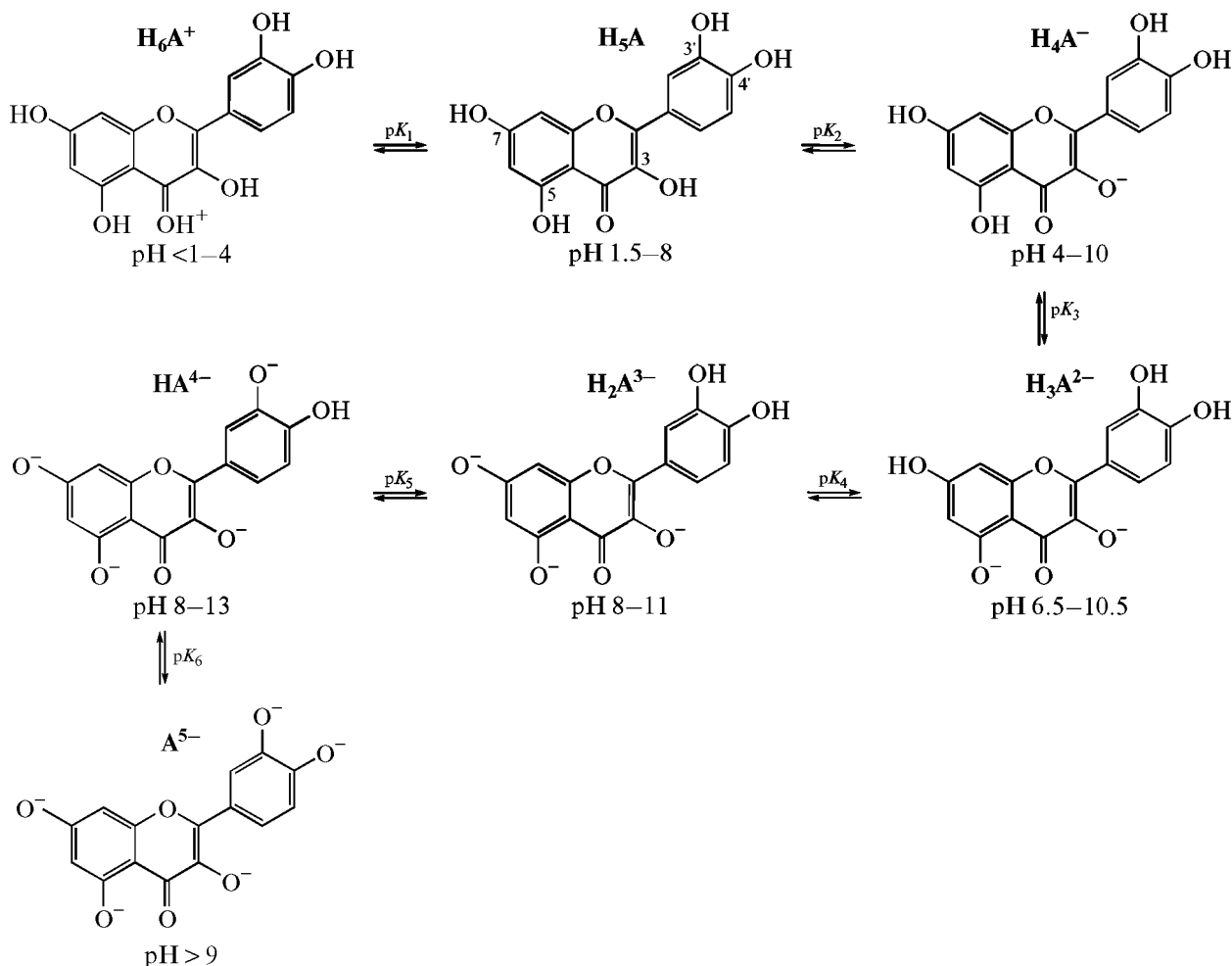
Как видно из таблицы, спектрофотометрическим методом не удается определить значения  $pK$  близких по кислотности гидроксильных групп в положениях 3' и 7, а также константу протонизации карбонильного атома кислорода. Использование подходов QSPR позволяет оценить значения  $pK$  ряда ФГ кверцетина и констатировать их близость к значениям  $pK$ , установленным методом цветиметрии. Это указывает на достоверность полученных результатов и принципиальную возможность использования МХЦ для исследования протолитических равновесий в растворах кверцетина. Из сравнительного анализа экспериментальных и расчетных данных, представленных в таблице, следует, что цветиметрическая методика характеризуется приемлемой воспроизводимостью и достаточно узким доверительным интервалом. С использованием критерия Стьюдента [25] установлено, что

Константы диссоциации кверцетина ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

| Метод       | $pK_{C=OH^+}$ | $pK_{3-OH}$   | $pK_{5-OH}$   | $pK_{7-OH}$   | $pK_{3'-OH}$  | $pK_{4'-OH}$   |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Цветиметрия | $1.8 \pm 0.1$ | $6.4 \pm 0.1$ | $8.1 \pm 0.1$ | $9.0 \pm 0.1$ | $9.6 \pm 0.1$ | $11.3 \pm 0.1$ |
| СФМ         | —             | $6.6 \pm 0.1$ | $8.1 \pm 0.1$ | —             | —             | $11.4 \pm 0.1$ |
| QSPR        | —             | $6.5 \pm 0.6$ | $8.1 \pm 0.6$ | $9.1 \pm 0.3$ | $9.5 \pm 0.2$ | —              |

средние значения  $pK$  ФГ кверцетина, полученные цветотриметрическим методом, значимо не отличаются от рассчитанных по спектрофотометрическим данным и на основе QSPR-анализа. Это позволяет заключить, что МХЦ свободен от систематических погрешностей, и свидетельствует о правильности полученных результатов.

По совокупности результатов цветотриметрических и спектрофотометрических исследований, а также на основании данных расчетов предложена вероятная схема ионно-молекулярных равновесий кверцетина в растворах в широком интервале  $pH$  (1–13):



Согласно представленной схеме при повышении  $pH$  среды происходит отщепление протона от протонированной карбонильной группы ( $H_6A^+$ ) с образованием электронейтральной молекулы кверцетина ( $H_5A$ ). Анализ взаимосвязи структура–реакционная способность дает основание утверждать, что вначале диссоциирует 3-ОН-группа, которая находится в *o*-положении к электроакцепторной карбонильной группе, вследствие чего в растворе образуется первая анионная форма ( $H_4A^-$ ). Это подтверждают данные о величинах энергий гетеролитического разрыва  $O-H$ -связей [12]. В свою очередь ионизация гидроксильной группы в положении 3 приведет к сильному мезомерному эффекту с переносом электронной плотности на

пирокатехиновый фрагмент, что затруднит диссоциацию  $OH$ -групп в положениях 3' и 4'. Следует ожидать, что кислотные свойства  $OH$ -группы в положении 5 по сравнению с гидроксигруппами в положениях 7, 3' и 4' выражены сильнее, о чем свидетельствует возможность комплексообразования кверцетина с ионами металлов с участием  $OH$ -группы в положении 5 и карбонильной группы в положении 4 при блокировании 3-ОН-группы [26]. Можно предположить диссоциацию 5-ОН-группы с образованием формы  $H_3A^{2-}$ , что, в свою очередь, усложнит диссоциацию гидроксильных групп пирокатехинового фрагмента. На основании изложенного выше наиболее вероятными представляются диссоциация 7-ОН-группы и появление в

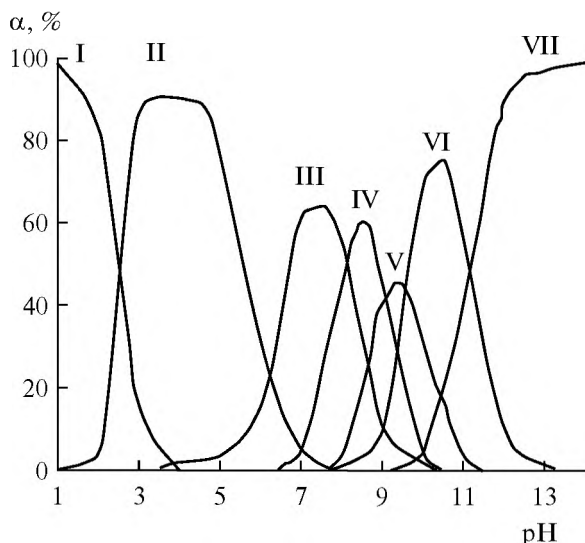


Рис. 2. Диаграмма распределения ионно-молекулярных форм кверцетина в растворе: I –  $H_6A^+$ , II –  $H_5A$ , III –  $H_4A^-$ , IV –  $H_3A^{2-}$ , V –  $H_2A^{3-}$ , VI –  $HA^{4-}$ , VII –  $A^{5-}$ .

растворе формы  $H_2A^{3-}$ . Проведенные квантово-химические расчеты в среде программы Nunc-Chem Pro 6 полуэмпирическим методом CNDO позволяют судить о протекании последующей ступенчатой диссоциации ОН-групп в положениях 3' и 4' с образованием в растворе анионных форм  $HA^{4-}$  и  $A^{5-}$  соответственно. Существующие в водном растворе ионно-молекулярные формы кверцетина находятся в динамическом равновесии в зависимости от кислотности среды и могут быть представлены в виде соответствующей диаграммы распределения (рис. 2).

Как видно из рис. 2, в узком интервале pH 8–10 в водном растворе кверцетина одновременно могут существовать пять–шесть его кислотно-основных форм, что значительно затрудняет определение значений  $pK$ , характеризующих равновесия между этими формами, оптическими и электрохимическими методами. Об этом свидетельствует отсутствие в литературе сведений о  $pK$  близких по кислотности гидроксильных групп в положениях 7 и 3'. Однако наложение такого числа протолитических равновесий не препятствует определению  $pK$  цветометрическим методом (таблица), который позволяет регистрировать тонкие различия в спектральных характеристиках индивидуальных кислотно-основных форм кверцетина в виде соответствующих значений ЦФ.

Следует отметить, что использование значений цветометрических функций ионно-молекулярных форм красителей различной природы в качестве аналитического сигнала расширяет возможности исследования их кислотно-основных свойств и позволяет получить целостную картину о существующих протолитических равновесиях в

широком диапазоне pH. Показаны преимущества МХЦ перед классическими физико-химическими методами при изучении протолитических равновесий в растворах красителей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larsen L., Nielsen J., Sorensen H. // *Phytochem.* 1982. V. 21. № 5. P. 1029.
2. The Flavonoids / Eds. Harborne J.B., Williams C.A., Harborne J.B. London, 1988. P. 303.
3. Rice-Evans C., Parker L. *Flavonoids in Health and Diseases*. New York: Marcel Dekker, 1998. 568 p.
4. Magnani L., Gaydou E., Hubaud J. // *Anal. Chim. Acta.* 2000. V. 411. № 1–2. P. 209.
5. Шорина Н.В., Косяков Д.С., Боголицын К.Г. // *Журн. прикл. химии.* 2005. Т. 78. № 1. С. 27.
6. Рогинский В.А. *Фенольные антиоксиданты*. М.: Наука, 1988. 247 с.
7. Grotewold E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer, 2006. P. 273.
8. Хольцбехер З., Дивиш Л., Крал М., Шуха Л., Влчил Ф. *Органические реагенты в неорганическом анализе*. М.: Мир, 1979. С. 752.
9. Пилипенко А.Т., Волкова О.И., Гетьман Т.О., Кукибаев Т.У. // *Укр. хим. журн.* 1972. Т. 38. № 9. С. 907.
10. Апрелькова Н.Ф., Матвеев Д.А., Арбузова Е.А., Карачун Т.В., Крайковский П.Б. // *Химия растительного сырья*. 2010. № 4. С. 83.
11. Зенкевич И.Г., Гущина С.В. // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65. № 4. С. 382.
12. Біла Н.І., Білий О.В., Пронько Л.М., Попов О.А. // *Вісн. Донецького Ун-ту. Серія А: Природничі науки*. 2012. № 2. С. 110.
13. Herrero-Martinez J., Repolles C., Bosch E., Roses M., Rafols C. // *Talanta*. 2008. V. 74. № 4. P. 1008.
14. Momčič T., Savič J., Cernigoj U., Trebse P., Vasič V. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2007. V. 72. № 11. P. 1447.
15. Herrero-Martinez J., Sanmartin M., Roses M., Bosch E., Rafols C. // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. № 10. P. 1886.
16. Prasad K., Raheem S., Vijayalekshmi P., Sastri C. // *Talanta*. 1996. V. 43. № 8. P. 1187.
17. Иванов В.М., Кузнецова О.В. // *Успехи химии*. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.
18. Иванов В.М., Адамова Е.М., Фигуровская В.Н. // *Журн. аналит. химии*. 2010. Т. 65. № 5. С. 488.
19. Чеботарьев О.М., Ефимова И.С., Борисюк Н.А., Снігур Д.В. // *Методы и объекты хим. анализа*. 2011. Т. 6. № 4. С. 207.
20. Чеботарев А.Н., Снігур Д.В., Гузенко Е.М., Ефимова И.С., Щербакова Т.М. // *Вестн. Одесского Ун-та. Сер. Химия*. 2012. Т. 16. № 4. С. 28.
21. Лайтнинен Г.А. *Химический анализ*. М.: Химия, 1966. 656 с.
22. Совин О.Р., Пацай И.О. // *Методы и объекты хим. анализа*. 2012. Т. 7. № 2. С. 74.
23. Kunal Roy, Paul L. Popeliet A. // *J. Phys. Org. Chem.* 2009. V. 22. № 3. P. 186.
24. Zenkevich I.G., Eshchenko A.Yu., Makarova S.V., Vitenberg A.G., Dobryakov Yu.G., Utsal V.A. // *Molecules*. 2007. V. 12. № 3. P. 654.
25. Вершинин В.И., Перцев Н.В. *Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента*. Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. 216 с.
26. Jurd L. // *Phytochem.* 1969. V. 8. № 2. P. 445.