

STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA KVERCETINA**B. Gudžić¹, M. Milenković¹, P. Sibinović¹, S. Đorđević²**¹ DD Zdravlje Leskovac² Tehnološki fakultet, Leskovac***Structural characterization of quercetin; Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 2000: 151-164.***

Whitethorn (*Crateagus monogina* Jacq.) is an interesting plant species used in folk as well as in modern medicine. The principal action of this plant species is prevention of heart arrhythmia, and improvement of cardiovascular system function. In DD Zdravlje Pharmaceutical and Chemical Industry–Leskovac, well known Yugoslav phytopreparati on producer, a considerable interest for this plant exists, therefore the goal of this paper is isolation and structural characterization of quercetin from the floral part of the plant.

The plant material (floral part) was extracted using 0,1M HCl (ratio 1:10). Extract was concentrated to the small volume and treated with ether; etheric extract was evaporated to dryness. Dry residue was diluted in boiling water, and cooling of that solution gave yellow crystals of raw quercetin. Recrystallization was carried out from diluted methanol. Recrystallized quercetin was structurally characterized on the basis of UV-, IR-, NMR-spectra, and using HPLC method.

On the basis of obtained results and on the basis of comparison with the corresponding spectra of the standard substance, quercetin, it can be concluded that the isolated compound was quercetin.

UVOD

Beli glog (*Crateagus monogina* Jacq.) je interesantna biljna vrsta koja se primenjuje kako u narodnoj tako i u savremenoj medicini. Raste svuda, posebno na ogoljenim, kamenitim i suvim mestima./1/ Osnovno dejstvo ove biljne vrste je u sprečavanju aritmije srca kao i poboljšavanju funkcionisanja kardiovaskularnog sistema. U DD “Zdravlje” farmaceutske-hemijske industrije–Leskovac, poznatom Jugoslovenskom proizvođaču fitopreparata postoji interes za ovu biljnu vrstu te je cilj ovoga rada izolacija i strukturna karakterizacija kvercetina iz cvetnog dela biljke.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal prikupljen je sa lokaliteta jugoistočne Srbije, okolina Leskovca.

Pošto je cilj rada istraživanje biljnih pigmenata, za ispitivanje je korišćen isključivo cvetni deo biljke, pripremljen u skladu sa zahtevima međunarodnih farmakopeja.

Za sušenje gloga u literaturi se uglavnom pominje metoda sušenja na sobnoj temperaturi, u hladovini i na promajnom mestu. Stoga smo u našem radu koristili ovu metodu sušenja cvetnog dela biljke. Na ovaj način, za 5-7 dana, sadržaj vlage u biljnom materijalu pada ispod 15%, što je u skladu sa zahtevima međunarodnih farmakopeja, pri čemu se organoleptičke karakteristike nisu bitno promenile.

Ovako osušeni biljni materijal samleven je u električnom mlinu i prosejan kroz sito sa otvorima veličine 1 mm.

Prilikom izrade ovog rada od značajnijih metoda korišćene su ekstrakcija, UV/VIS i IR spektroskopija, HPLC i NMR metoda.

1. Ekstrakcija

Posebna pažnja posvećena je izboru rastvarača pogodnog za ekstrakciju.

Kao primarni rastvarači za ekstrakciju biljnog materijala korišćeni su vodeni rastvori etanola i metanola različitih koncentracija i hlorovodonične kiseline. Najbolji rezultati dobijeni su primenom 0.1M rastvora hlorovodonične kiseline pri odnosu droge i rastvarača 1 : 10.

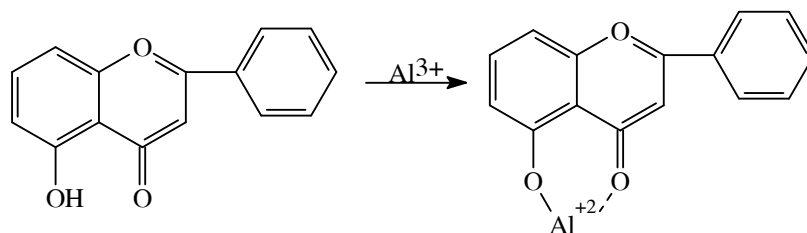
2. UV/VIS spektroskopija

Prilikom određivanja strukture flavonoida značajne podatke pruža UV/VIS spektroskopija.

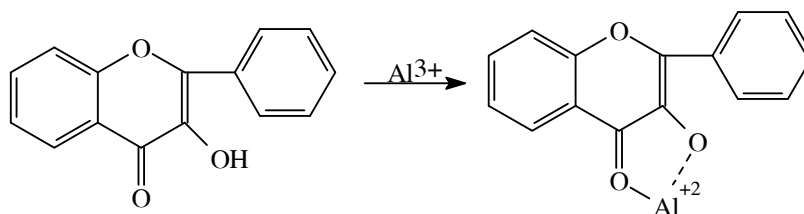
Flavonoidi apsorbuju najčešće između 320 i 390 nm (traka I) i između 250 i 270 nm (traka II).^{3/} Neki specifični reagensi mogu dati preciznije informacije o prisustvu i položaju OH grupe:

a) aluminijum hlorid

Većina prirodnih flavonskih derivata ima slobodnu OH grupu u položaju 5. Sa CO grupom joni Al^{3+} formiraju helat prema sledećoj reakciji:



Aluminijum takođe gradi helat sa OH grupom u položaju 3 u slučaju da ona nije angažovana u heterozidnoj vezi:



Ova helatizacija izaziva dublet apsorpcionih pikova i batohromno pomeranje trake I. Tri su mogućnosti :

- OH grupa u položaju 5: batohromni efekat na traku I je 40 nm
- OH grupa je u položaju 3: obrazovani kompleks je stabilniji pa je batohromno pomeranje izraženije i iznosi 40 nm
- OH grupe su u položaju 3 i 5: batohromna pomeranja nisu kumulativna, anhidrovani natrijum-acetat

Ova so je dovoljno bazna da bi jonizovala hidroksilne grupe u položaju 7,3 i 4'; druge hidroksilne grupe ne reaguju.

Jonizacija OH grupe u položaju 7 izaziva batohromno pomeranje od 8 – 20 nm trake II. Jedinjenja koja nemaju OH grupu u položaju 7 ili čija je OH grupa metilovana ili vezana za šećer neće dati značajno pomeranje trake II.

a) natrijum-borat

U prisustvu natrijum acetata, borna kiselina helatizuje ortodihidroksilna fenolna jedinjenja :

3) IR- spektrofotometrija

Kako je izgled IR-spektra (položaj, intenzitet, broj i oblik apsorpcionih maksimuma) u direktnoj vezi sa strukturom jedinjenja, to je on veoma karakterističan za svako jedinjenje. Jedan od načina korišćenja ove metode je poređenje IR-spektra nepoznatog jedinjenja sa IR-spektrom standarda snimljenog pod istim uslovima.

4) HPLC – metoda

Identifikacije jedinjenja počiva na poređenju elucionih zapremina ili još češće na bazi vremena zadržavanja poznatih jedinjenja i komponente koje se ispituju. Podrazumeva se da analitički uslovi, kao što su kolona, protok, temperatura i ostalo moraju biti isti. Kod savremenih instrumenata ove vrednosti se mogu dobro reprodukovati. Tipično standardna devijacija za vreme zadržavanja je reda veličine od 0,2 do 2% u zavisnosti od instrumenata, kolona i rastvora. Ovo je dovoljna preciznost na osnovu koje se može izvršiti identifikacija nepoznatih vrhova u poređenju sa vrhovima poznatih jedinjenja./4/

Uslovi hromatografiranja:

Aparat: HP HPLC 1100
Kolona: LiChrosorb RP-18, 10 µm, 250x4,6 mm
Petlja: 20 µl
Protok: 1 ml/min
Temperatura: 20°C
Detekcija: 254 nm
Mobilna faza voda : metanol 51,5:48,5
pH podešen na 3 fosforom kiselinom

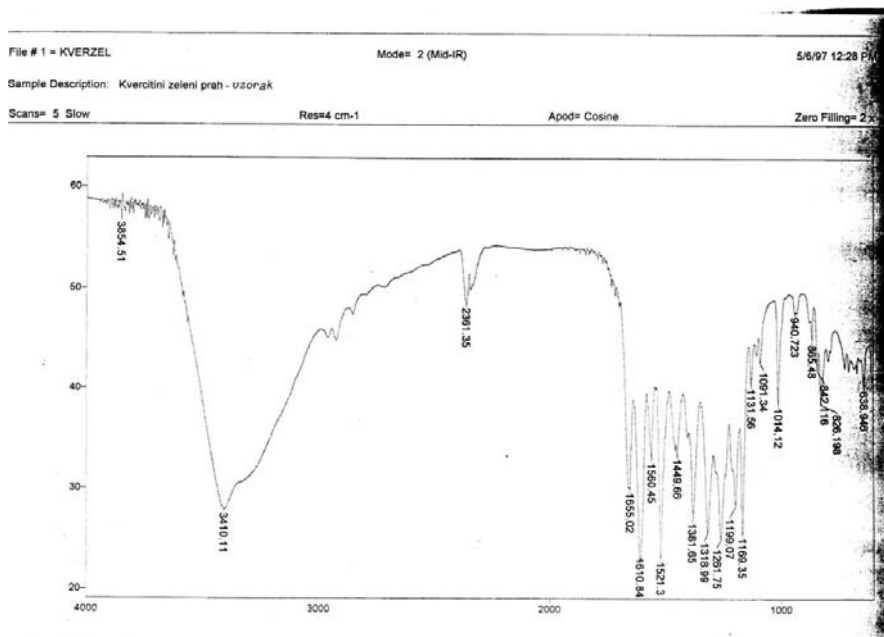
5) NMR – metoda

H-NMR-spektroskopija pruža značajne podatke o ispitivanom jedinjenju u pogledu vrste i broja protona, i njihovog okruženja. U zavisnosti od zaštitnog efekta elektrona koji okružuju vodonik, delotvorno magnetno polje nije isto za različite atome, pa je količina energije rezonancije koja se mora dovesti različita za različite gustine elektrona oko jezgra. Položaj maksimuma u H-NMR- spektru ukazuje na vrstu prisutnog vodonika, a površine ispod vrhova daju relativni broj svake vrste vodonika.

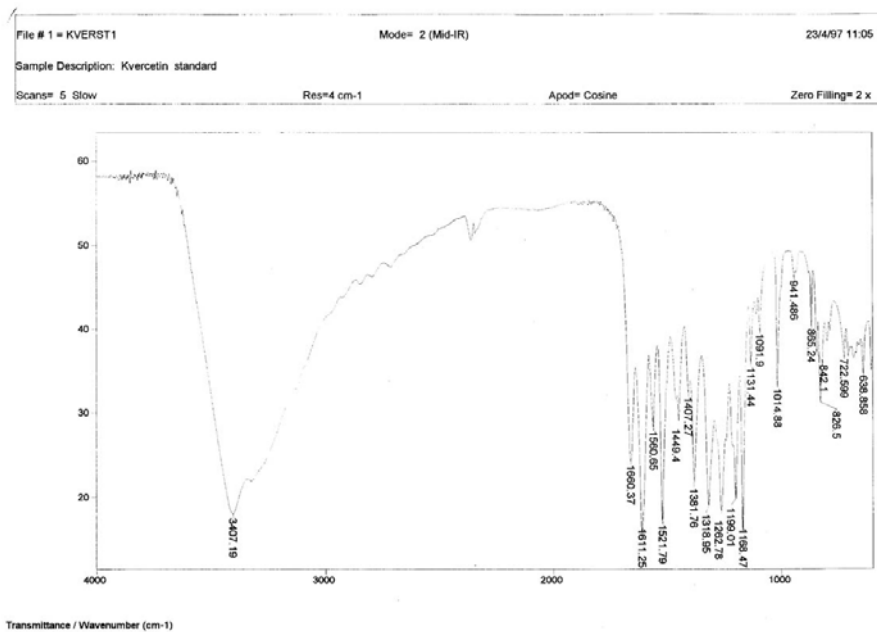
REZULTATI I DISKUSIJA

Za poređenje je korišćen kvercetin-referentna supstanca “Merck”- Darmstadt

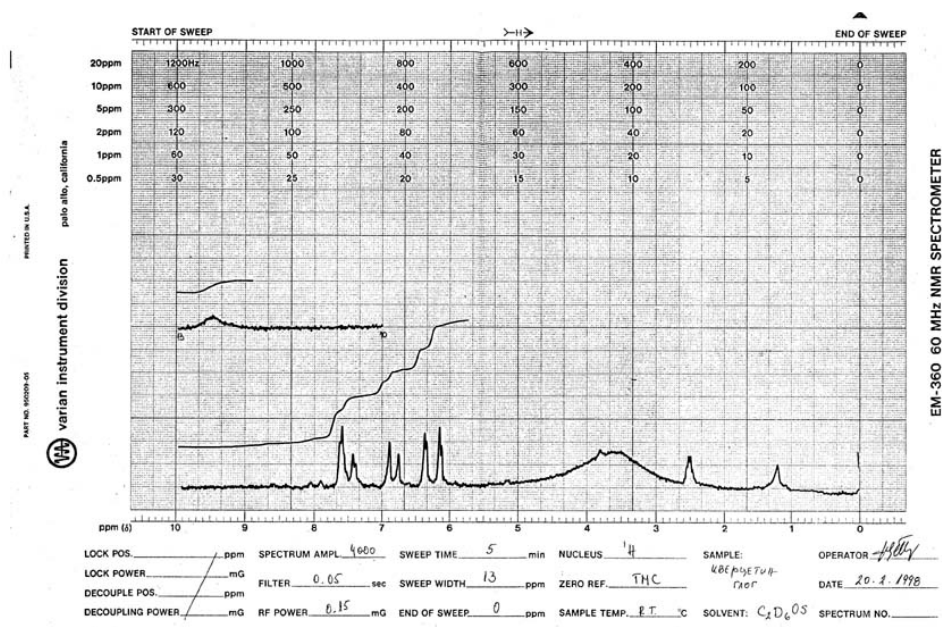
Na slikama su uporedno prikazani spektri referentne supstance i dobijenog uzorka.



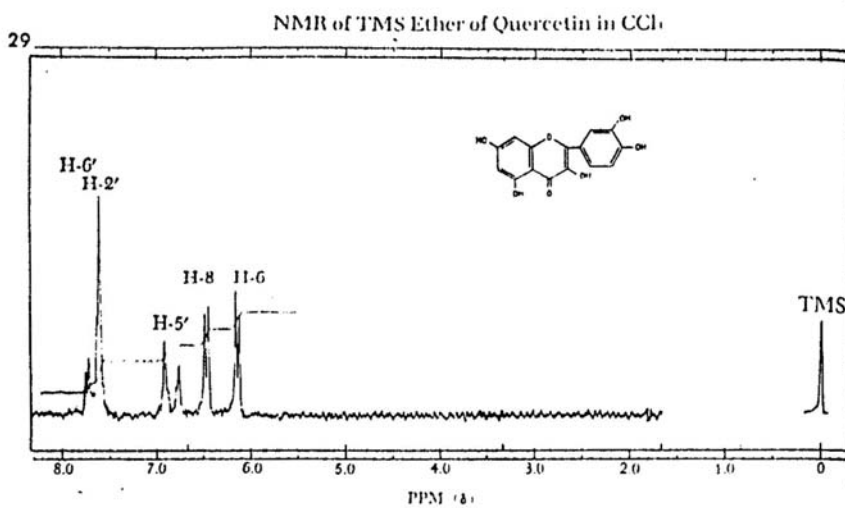
Slika 1: IR-spektar uzorka



Slika 2 IR-spektar standarda



Slika 3: NMR-spektrtar uzorka



Slika 4: NMR Spektar standarda

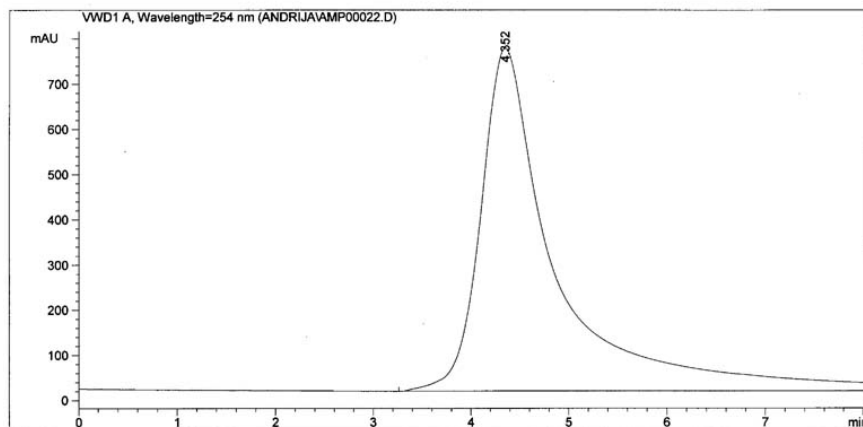
Data File D:\HPCHEM\1\DATA\ANDRIJA\AMP00022.D
analiza

Sample Name: quercetin -pedja

```

=====
Injection Date : 09-Feb-99 11:28:11 PM
Sample Name    : quercetin -pedja          Vial : 1
Acq. Operator  : verica
Method         : D:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRIJA.M
Last changed   : 09-Feb-99 11:00:54 PM by verica
                (modified after loading)
quercetin
=====

```



Normalized Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	4.352	PBA	0.7523	4.10105e4	759.47333	100.0000

Totals : 4.10105e4 759.47333

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Slika 5: HPLC-hromatogram uzorka

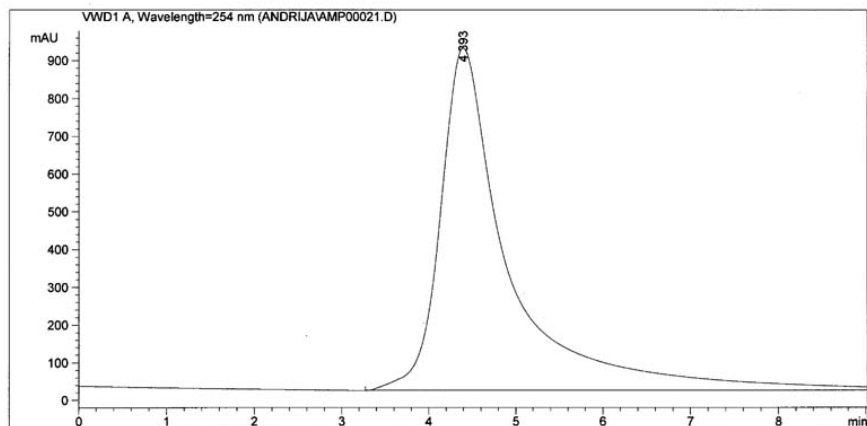
Data File D:\HPCHEM\1\DATA\ANDRIJA\AMP00021.D
analiza

Sample Name: quercetin 1

```

=====
Injection Date : 09-Feb-99 11:17:03 PM
Sample Name   : quercetin 1 Standard          Vial : 1
Acq. Operator : verica
Method       : D:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRIJA.M
Last changed  : 09-Feb-99 11:00:54 PM by verica
                (modified after loading)
quercetin
=====

```



Normalized Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

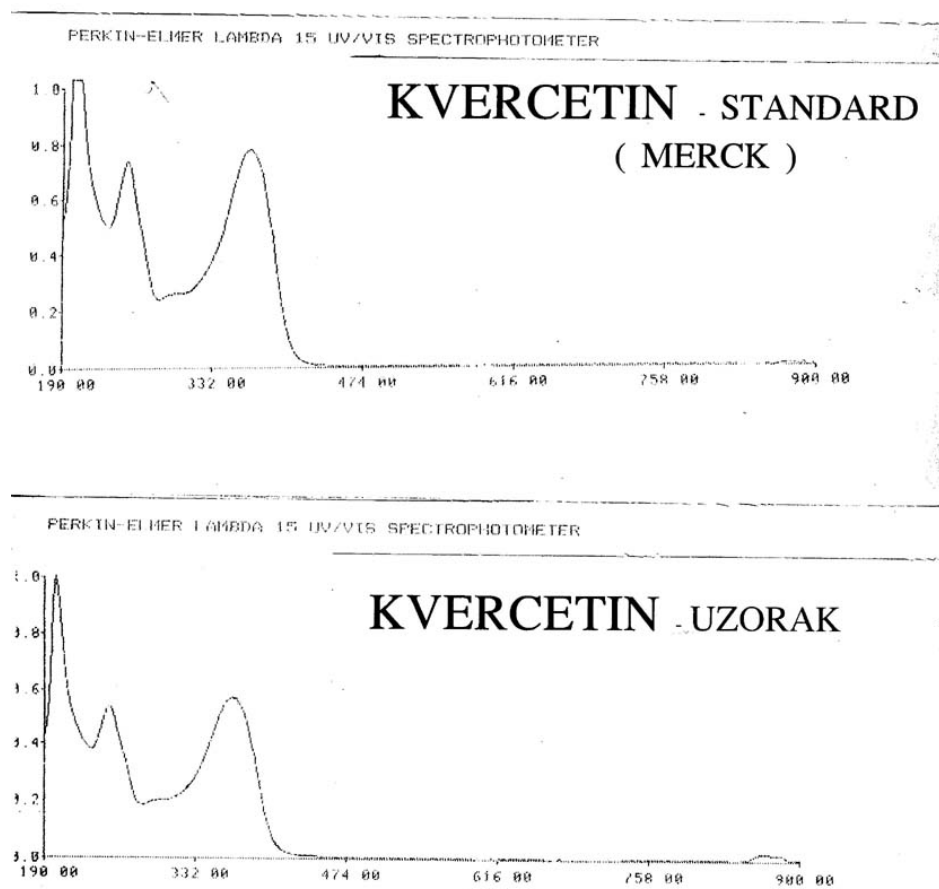
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.393	PBA	0.7852	5.03191e4	907.51019	100.0000

Totals : 5.03191e4 907.51019

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Slika 6: HPLC-hromatogram standarda



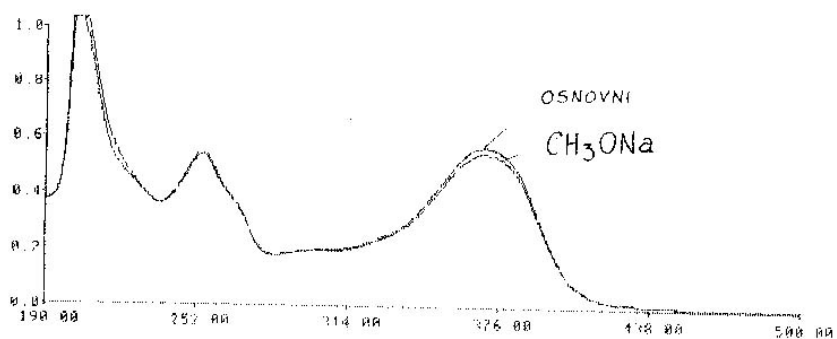
Slika 7: UV/VIS-spektri standarda i uzorka

PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

METHOD SCAN/SCAN/CM

SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
		+ 367.2 NM	0.573 A
		+ 254.0 NM	0.553 A
		+ 203.2 NM	1.007 A

PERKIN-ELMER LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

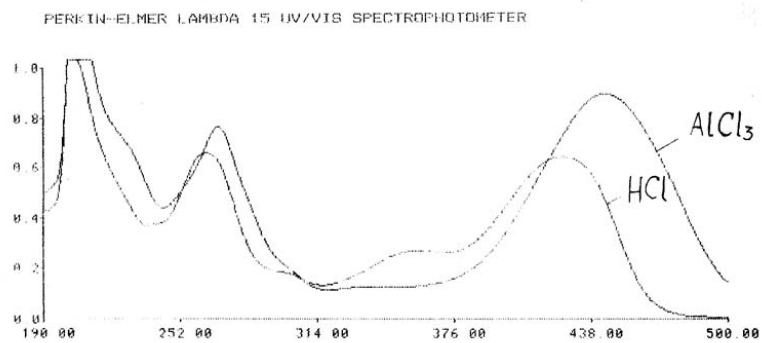


PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

METHOD SCAN/SCAN/CM

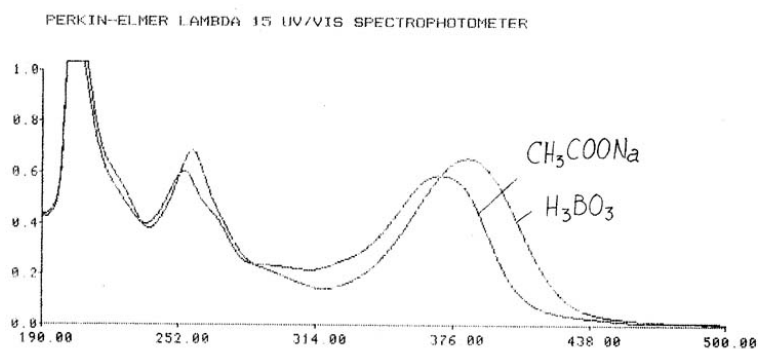
SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
		+ 370.0 NM	0.572 A
		+ 254.0 NM	0.553 A
		+ 203.2 NM	1.062 A
		+ 369.6 NM	0.551 A
		+ 254.0 NM	0.542 A
		+ 203.2 NM	1.135 A

Slika 9: UV/VIS-spektar standarda nakon tretiranja natrijummetoksidom



PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

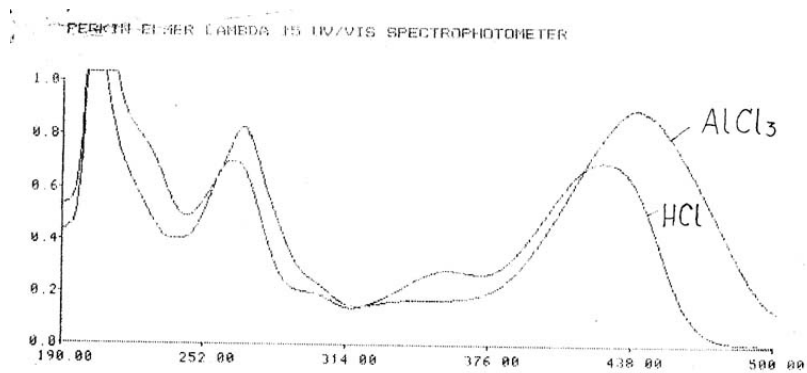
METHOD		SCAN/HANUAL	
SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
09		+ 445.2 NM	0.888 Å
		+ 269.2 NM	0.764 Å
		+ 205.6 NM	1.260 Å
10		+ 425.6 NM	0.639 Å
		+ 264.0 NM	0.657 Å
		+ 202.8 NM	1.074 Å



PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

METHOD		SCAN/HANUAL	
SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
15		+ 370.0 NM	0.590 Å
		+ 254.0 NM	0.604 Å
		+ 203.6 NM	1.210 Å
16		+ 382.8 NM	0.656 Å
		+ 258.0 NM	0.684 Å
		+ 204.8 NM	1.287 Å

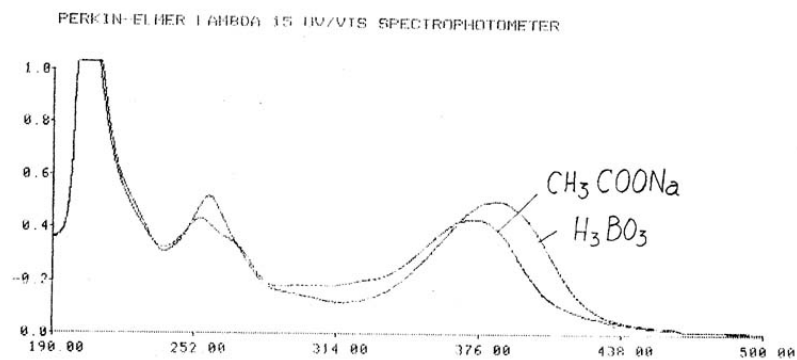
Slika 10: UV/VIS-spektar standarda nakon tretiranja aluminijumhloridom i natrijumacetatom



PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

METHOD: SCAN/MANUAL

SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
		+ 441.2 NM	0.895 A
		+ 269.2 NM	0.825 A
		+ 205.2 NM	1.366 A
		+ 426.0 NM	0.700 A
		+ 264.4 NM	0.700 A
		+ 203.2 NM	1.179 A



PERKIN-ELMER
LAMBDA 15 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

METHOD: SCAN/MANUAL

SAMPLE	CYCLE	ABSCISSA	ORDINATE
		+ 374.0 NM	0.431 A
		+ 254.8 NM	0.432 A
		+ 203.6 NM	1.431 A
		+ 383.6 NM	0.504 A
		+ 258.4 NM	0.518 A
		+ 201.0 NM	1.474 A

Slika 11: UV/VIS-spektar uzorka nakon tretiranja aluminijumhloridom i natrijumacetatom

Kao što se vidi na slikama 1, 2, 5-11, postoji veoma dobro slaganje spektara izolovane supstance i standarda kvercetina. Izvesne razlike javljaju se samo kod H-NMR spektara, slika 3 i 4. Naime, u H-NMR spektru izolovane supstance javlja se dodatna apsorpcija u području 3 i 4 ppm-a koja verovatno potiče od šećernih komponenti, kao i apsorpcija u području 1-3 ppm-a koja verovatno potiče od prisutnih neidentifikovanih nečistoća.

ZAKLJUČAK

Na bazi dobijenih rezultata i na osnovu poređenja sa odgovarajućim spektrima standardne supstance kvercetina može se zaključiti da je izolovano jedinjenje kvercetin. Izolovani kvercetin najverovatnije sadrži tragove nečistoća, u prvom redu šećernih komponenti.

LITERATURA

1. M. Josifović, Flora SR Srbije, VI, 254-471, 1972.
2. J. Pančić, Flora Kneževine Srbije, 237, 1874.
3. S. Miletić, G. Miletić, Hemija biljnih pigmenata, Filozofski fakultet, Niš, 1996.
4. V. Jovanović, M. Kopečni..., Hromatografija teorijski i praktični aspekti,
5. Institut za nuklearne nauke "Boris Kidrič"- Vinča, Beograd, 1988.