

ANNA GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO¹, HENRYK SZYMUSIAK²

INTERAKCJE MIĘDZY SKŁADNIKAMI SUPLEMENTÓW DIETY NA PRZYKŁADZIE KWERCETYNY I WITAMINY C

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem pH środowiska na aktywność przeciwrodnikową kwercetyny w obecności witaminy C (kwasu askorbinowego). Stwierdzono, że aktywność przeciwrodnikowa kwercetyny, zmierzona w teście TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ulega znacznemu obniżeniu w pH 4,5-9,0 w wyniku interakcji z kwasem askorbinowym. Wykonano odpowiednie obliczenia kwantowo-chemiczne w celu wyjaśnienia obserwowanego antagonistycznego oddziaływania pomiędzy tymi przeciwutleniaczami.

Słowa kluczowe: kwercetyna, witamina C, suplement diety, aktywność przeciwrodnikowa, TEAC.

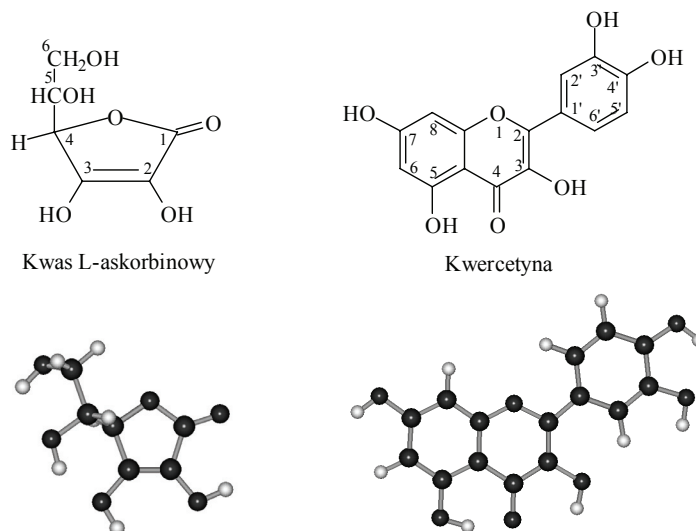
Wprowadzenie

Witamina C (kwas askorbinowy, 2,3-didehydro-L-treo-heksono-1,4-lakton, 3-keto-L-gulofuranolakton; Rys. 1) jest jednym z najważniejszych naturalnych przeciwutleniaczy. Występuje zarówno w płynach pozakomórkowych, jak i wewnątrz komórek. Chroni tkanki i płyny ustrojowe przed większością reaktywnych form tlenu. Bierze udział w unieczynnianiu takich cząsteczek, jak anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i rodniki nadtlenkowe. Wpływa na zachowanie prawidłowego potencjału oksydacyjnego w komórce. Kwas L-askorbinowy jest dodawany do produktów spożywczych w celu wzbogacenia ich w witaminę C oraz jako przeciwutleniacz. Jest również składnikiem wielu preparatów farmaceutycznych i suplementów diety. Jako substancja silnie redukująca ma istotny udział w utrwalaniu naturalnej barwy wielu surowców i produktów. Dzięki działaniu przeciwutleniającemu chroni produkty przed oksydacyjnym brunatnieniem, rozkładem tłuszczów i substancji smakowych [1].

¹ Dr inż. Anna Gliszczyńska-Świgło, Katedra Instrumentalnych Metod Oceny Jakości,

² Dr hab. prof. nadzw. Henryk Szymusiak, Katedra Technologii i Ochrony Środowiska, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Aleja Niepodległości 10, 61-875 Poznań,

Kwercetyna (Rys. 1) występuje w kwiatach, liściach i łodygach wielu roślin takich jak herbata, gryka, cebula i brokuł. Posiada zdolność neutralizacji wolnych rodników, a tym samym hamuje oksydacyjne uszkodzenia DNA. Ponadto wykazano, że posiada silne działanie przeciwzapalne poprzez spowolnienie wydzielania histaminy [2]. Kwercetyna (podawana razem z solami wapnia) i jej pochodne (m. in. rutyna, zwłaszcza w preparatach z kwasem askorbinowym) wykazują również właściwości przeciwalergiczne [3]. Kwercetyna i inne flawonoidy znalazły zastosowanie w leczeniu chorób naczyń o charakterze zakrzepowo-zatorowym [4]. Rutyna (3-rutynozyd kwercetyny) i jej pochodne półsyntetyczne są od dawna stosowane w leczeniu jako środki regulujące przepuszczalność naczyń włosowatych i poprawiające krążenie obwodowe.



Rys. 1. Struktury kwasu askorbinowego i kwercetyny
Fig.1. Structures of ascorbic acid and quercetin

Pomiędzy składnikami produktów spożywczych czy suplementów diety mogą zachodzić różne oddziaływania, wpływające na właściwości poszczególnych składników. Na rynku są dostępne suplementy diety zawierające w swym składzie witaminę C i flawonoidy np. „QUERCETIN + VITAMIN C” w postaci kapsulek z mieszaniną witaminy C (1400 mg) i dihydratu kwercetyny (500 mg) lub w postaci mieszaniny witaminy C z bioflawonoidami, np. “C-Plus Flavonoids” i “Lion Kids C”.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu obecności kwasu askorbinowego na aktywność przeciwrodnikową kwercetyny (i *vice versa*). Pomiary aktywności przeciwrodnikowej kwasu askorbinowego, kwercetyny i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych przeprowadzono w zakresie pH 2-9 przy użyciu testu TEAC. Dodatkowo, przeprowadzono modelowe obliczenia kwantowo-chemiczne.

Material i metody badań

Mikroperoksydazę-8 (MP-8) zakupiono w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA), 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian (ABTS) zakupiono w firmie Roche (Indianapolis, USA). Kwas 6-hydroksy-2,3,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy (Trolox[®]) zakupiono w firmie Aldrich (Steinheim, Germany). Dihydrat kwercetyny, kwas askorbinowy i H₂O₂ (30%) zakupiono w firmie Merck (Darmstadt, Germany).

Aktywność przeciwrodnikową badanych związków w zależności od pH środowiska wyznaczono zmodyfikowaną metodą TEAC. Metoda TEAC polega na absorpcjometrycznym ($\lambda=734$ nm) wyznaczeniu zdolności przeciwutleniacza do zmiatania niebieskozielonego kationorodnika ABTS^{•+} w porównaniu z aktywnością troloksu użytego jako antyoksydant wzorcowy [5]. W zmodyfikowanej metodzie TEAC [6] do wytworzenia kationorodnika ABTS^{•+} użyto zamiast metmioglobiny mikroperoksydazę (MP8). Zmodyfikowana metoda TEAC umożliwia pomiar aktywności przeciwutleniającej związków w szerokim zakresie pH [6].

Roztwory kationorodnika ABTS^{•+} o odpowiednim pH (2-9) otrzymano przez zmieszanie w stosunku 1:1 roztworu kationorodnika ABTS^{•+}, przygotowanego jak opisano wcześniej (7), z 0,2 M buforami fosforanowymi o różnym pH.

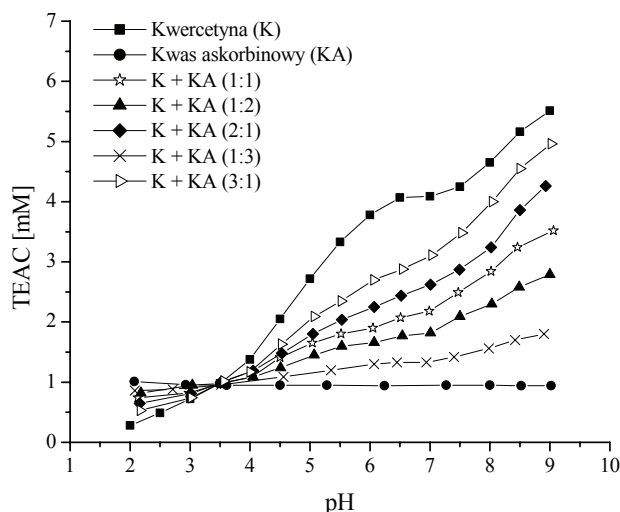
Obliczenia teoretyczne przeprowadzono za pomocą metody DFT/B3LYP dostępnej w programie Gaussian 98. Geometrie cząsteczek kwercetyny, kwasu askorbinowego i kompleksu kwercetyna-kwas askorbinowy, w różnych możliwych konformacjach i stanach redoks, były optymalizowane w atomowej bazie 6-31G(d,p). Parametry molekularne, takie jak energia wiązania OH (BDE), potencjał jonizacji (IP), energia deprotonacji (DE) i energia wiązania kompleksu (BE) obliczono w atomowej bazie 6-311G(d,p). Wartości wszystkich obliczonych parametrów molekularnych zostały wyrażone w kcal/mol i odnoszą się do tzw. obliczeń „w fazie gazowej”. Szczegóły związane z procedurą obliczeń można znaleźć we wcześniejszych pracach, jak np. [8].

Wyniki i dyskusja

Wyniki pomiarów aktywności przeciwrodnikowej kwercetyny, kwasu askorbinowego i ich mieszanin, przy różnych wartościach pH przedstawiono na rys. 2.

Wartości TEAC dla kwasu askorbinowego są stałe w całym zakresie pH, podczas gdy dla kwercetyny wzrastają w miarę wzrostu pH od kwaśnego do zasadowego. Profile zmierzone dla mieszanin kwercetyny i kwasu askorbinowego zawierają się między profilami zmierzonymi dla czystych składników. Obniżenie aktywności przeciwrodnikowej kwercetyny w obecności kwasu askorbinowego obserwuje się przy pH wyższym niż 4,5 przy wszystkich zastosowanych proporcjach wagowych kwercetyny do kwasu askorbinowego ((3:1), (2:1), (1:1), (1:2) i (1:3)). Wynik ten oznacza, że kwercetyna i kwas askorbinowy oddziałują ze sobą w sposób antagonistyczny – w pH powyżej

pKa₁ kwasu askorbinowego (pH = 4,17 dla C3-OH) następuje obniżenie aktywności przeciwrodnikowej kwercetyny. Z profili przedstawionych na Rys. 2 można wywnioskować, że efekt ten zależy od ilości kwasu askorbinowego: im wyższe stężenie kwasu askorbinowego tym większy spadek aktywności przeciwrodnikowej kwercetyny.



Rys. 2. Zależność wartości TEAC od pH środowiska wyznaczona dla kwercetyny, kwasu askorbinowego i ich mieszanin (w różnych stosunkach wagowych)

Fig. 2. Dependence of the TEAC values on pH determined for quercetin, ascorbic acid and their mixtures (at different ratios)

W celu wyjaśnienia antagonistycznego oddziaływania między kwercetyną i kwasem askorbinowym dodatkowo przeprowadzono obliczenia teoretyczne. Obliczono dwa użyteczne w opisie procesów wolnorodnikowych parametry takie, jak potencjał jonizacji (IP) opisujący łatwość oddawania elektronu przez cząsteczkę i energia wiązania grupy OH (BDE) opisująca łatwość odszczepiania atomu wodoru przez daną cząsteczkę (tab. 1). W interpretacji obliczonych dla danej cząsteczki parametrów IP i BDE stosuje się następującą regułę: im niższa wartość IP lub BDE tym, w zależności od dominującego mechanizmu procesu wolnorodnikowego, wyższa aktywność przeciwrodnikowa badanej cząsteczki.

Aby wyjaśnić, dlaczego kwas askorbinowy obniża aktywność przeciwrodnikową kwercetyny założono, że między cząsteczkami kwasu askorbinowego i kwercetyny tworzy się wiązany wodorowo kompleks molekularny. Na Rys. 3 przedstawiono strukturę kompleksu utworzonego między obojętnymi cząsteczkami kwercetyny i kwasu askorbinowego. Zgodnie z wynikami obliczeń najbardziej trwała struktura takiego kompleksu powstaje w wyniku utworzenia wiązań wodorowych między grupą C4'-OH układu katecholowego cząsteczki kwercetyny oraz grupą C2-OH i karbonylowym

atorem tlenu cząsteczki kwasu askorbinowego (rys. 1). Obliczona energia wiązania tego kompleksu (BE) wynosi 12,8 kcal/mol.

Tabela 1

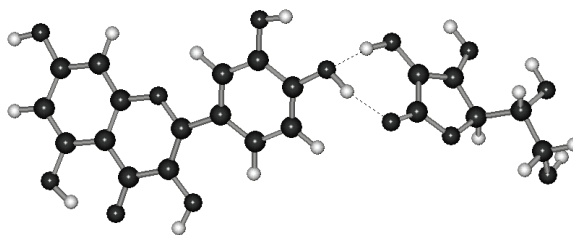
Obliczone wartości potencjału jonizacji (IP), energii wiązania grupy OH (BDE), energii wiązania kompleksu (BE) oraz energii deprotonacji (DE) dla kwasu askorbinowego, kwercetyny i ich obojętnych (N) oraz monoanionowych (A) kompleksów (w kcal/mol).

Calculated values of ionization potential (IP), bond dissociation energy of OH group, binding energy of complex (BE) and deprotonation energy (DE) for ascorbic acid, quercetin and their neutral (N) and monoanionic (A) complexes (in kcal/mol).

	IP(N)	BDE(N)	IP(A)	BDE(A)	BE	DE ^a
Kwas askorbinowy Ascorbic acid	190,2	78,2	65,4	71,0	-	328,0
Kwercetyna Quercetin	161,2	79,8	64,1	78,4	-	330,8
Kompleks obojętny Neutral complex	153,9	78,9	-	-	12,8	-
Kompleks monoanionowy Monoanionic complex	-	-	86,4	74,2	33,2	307,6

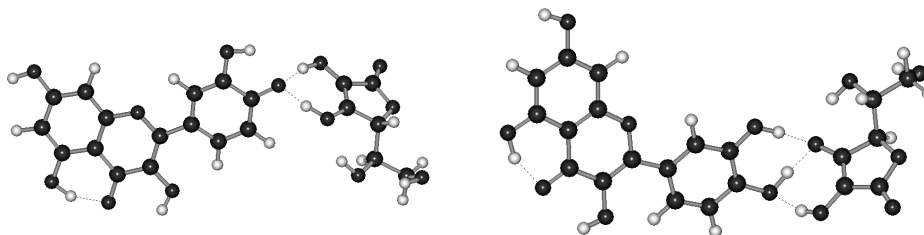
a – dla najłatwiej jonizującej grupy OH (na podstawie obliczeń).

a – for the most easy deprotonated OH group (according to calculations).



Rys. 3. Zoptymalizowana struktura najbardziej trwałego kompleksu kwercetyna-kwas askorbinowy utworzonego z cząsteczek obojętnych. Linią przerywaną oznaczono najsilniejsze wiązania wodorowe.

Fig. 3. Optimized structure of the most stable quercetin-ascorbic acid complex where both components appear in neutral form. Dotted lines indicate strongest H-bondings.



Rys. 4. Zoptymalizowane struktury najbardziej trwałego kompleksu kwercetyna-kwas askorbinowy, w którym jedna z cząsteczek występuje w formie monoanionu. Linią przerywaną oznaczono najsilniejsze wiązania wodorowe.

Fig. 4. Optimized structures of the most stable quercetin-ascorbic acid complex where one of the components appears in monoanionic form. Dotted lines indicate strongest H-bondings.

W roztworze o pH zbliżonym do pK_{a1} kwasu askorbinowego ($pH = 4,17$) i powyżej cząsteczki kwasu askorbinowego występują w formie zdysocjowanej. W tym przypadku możliwe jest utworzenie takiego kompleksu, w którym cząsteczka kwasu askorbinowego będzie występować w formie monoanionu a cząsteczka kwercetyny w formie obojętnej (pK_{a1} dla kwercetyny wynosi $7,03$). Na podstawie obliczeń stwierdzono istnienie dwóch izoenergetycznych struktur takiego kompleksu, przedstawionych na rys. 4. Obliczona wartość energii wiązania tego kompleksu wynosi $33,2$ kcal/mol. Biorąc pod uwagę niską wartość pK_{a1} kwasu askorbinowego kompleksy o strukturze pokazanej na rys. 4 mogą występować w roztworze w prawie całym badanym zakresie pH. Obliczone wartości energii deprotonacji (DE) dla kwasu askorbinowego i kwercetyny i wynoszą odpowiednio $328,0$ kcal/mol i $330,8$ kcal/mol, natomiast obliczona wartość energii deprotonacji dla kompleksu kwercetyna-kwas askorbinowy jest o około 20 kcal/mol niższa od wartości obliczonej dla cząsteczki kwasu askorbinowego (tab. 1). Przewidywana teoretycznie wyższa kwasowość kompleksu w stosunku do pojedynczych jego składników dodatkowo sugeruje, że struktury pokazane na rys. 4 mogą występować w roztworze nawet przy niskich wartościach pH. Interpretacja wyników doświadczalnych przedstawionych na rys. 2 jest utrudniona ze względu na możliwość istnienia równowagi między kompleksem kwercetyna-kwas askorbinowy a wolnymi cząsteczkami kwercetyny i kwasu askorbinowego. Ponadto, stała równowagi może zależeć od pH środowiska. Analiza wyników obliczeń teoretycznych pozwala jednak na wyciągnięcie następujących wniosków. Najbardziej reaktywna grupa OH układu katecholowego w cząsteczce kwercetyny ($C4'-OH$) jest związana wiązaniem wodorowym z polarnymi grupami cząsteczki kwasu askorbinowego i jest mniej dostępna dla reakcji z wolnymi rodnikami. Obliczona wartość parametru $BDE(N)$ (zdolność oddania atomu wodoru) dla grupy $C4'-OH$ wolnej obojętnej cząsteczki kwercetyny praktycznie nie ulega zmianie po jej związaniu się z cząsteczką kwasu askorbinowego w kompleks przedstawiony na rys. 3, natomiast wartość parametru $BDE(A)$ obliczona dla cząsteczki monoanionu kwercetyny maleje o około $4,2$ kcal/mol po jej związaniu się z cząsteczką kwasu askorbinowego w kompleks przedstawiony na rys. 4. Wynik ten jednak zdaje się nie mieć większego znaczenia, gdyż będąca donorem atomów wodoru grupa $C4'-OH$ jest związana mostkami wodorowymi z kwasem askorbinowym, sterycznie przesłonięta i tym samym mniej dostępna dla reakcji z wolnym rodnikiem. Obliczony potencjał jonizacji $IP(N)$ (zdolność oddania elektronu) dla kompleksu złożonego z obojętnych cząsteczek (rys. 3) jest o $36,3$ kcal/mol niższy niż obliczony dla obojętnej cząsteczki kwasu askorbinowego i o $7,3$ kcal/mol niższy niż obliczony dla obojętnej cząsteczki kwercetyny. Natomiast w przypadku kompleksu pokazanego na Rys. 4 obliczona wartość potencjału jonizacji $IP(A)$ jest o około $21,1$ kcal/mol wyższa od wartości obliczonej dla najbardziej trwałej cząsteczki monoanionu kwasu askorbinowego i około $22,3$ kcal/mol wyższa od wartości obliczonej dla najbardziej trwałej cząsteczki

monoanionu kwercetyny. Wyniki badań doświadczalnych i obliczeń teoretycznych wskazują więc, że kwercetyna po utworzeniu kompleksu z kwasem askorbinowym staje się mniej efektywnym zmiataczem rodników w wyniku znacznego obniżenia jej zdolności oddawania elektronu cząsteczce rodnika.

Wnioski

1. Aktywność przeciwrodnikowa kwercetyny, zmierzona w teście TEAC, silnie zależy od pH środowiska i wzrasta w miarę przesuwania się w kierunku pH zasadowego.
2. Aktywność kwercetyny w mieszaninie z kwasem askorbinowym w pH powyżej 4,5 maleje w zależności od proporcji składników w mieszaninie.
3. Na podstawie obliczeń teoretycznych stwierdzono możliwość tworzenia się silnie związanego wodorowo kompleksu molekularnego kwercetyna-kwas askorbinowy. Najbardziej prawdopodobna jest struktura kompleksu, w której jeden ze składników występuje w formie zdysocjowanej (monoanionu). Związanie się cząsteczki kwercetyny z cząsteczką kwasu askorbinowego powoduje obniżenie jej zdolności oddawania elektronu a jej najbardziej reaktywna grupa C4'-OH staje się mniej dostępna dla reakcji wolnorodnikowych.
4. Proponowany mechanizm tworzenia kompleksów kwas askorbinowy-kwercetyna jest próbą wyjaśnienia antagonistycznego oddziaływania obserwowanego między kwercetyną i kwasem askorbinowym w teście TEAC.
5. Ewentualne skutki fizjologiczne przedstawionych w niniejszej pracy antagonistycznych interakcji pomiędzy tymi dwoma popularnymi składnikami suplementów wymagają badań *in vivo*. Poznanie rodzaju oddziaływań zachodzących pomiędzy składnikami żywności, nutraceutyków czy suplementów diety może być użyteczne przy projektowaniu nowych produktów.

Literatura

- [1] Wójtowicz A.: Wpływ dodatku kwasu askorbinowego na teksturę ekstrudowanych makaronów przygotowanych, *Acta Agrophysica*, 2008, 12(1), 245-254.
- [2] Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A.: Kształtowanie się zawartości kwercetyny w naparach różnych rodzajów herbat w zależności od czasu parzenia, *Herba Polonica* 2006, 52(3), 43-44.
- [3] Padilla E., Ruiz E., Redondo S. i wsp.: Relationship between vasodilatation capacity and phenolics content of Spanish wines, *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 517, 84-91.
- [4] Ross J.A., Kasum C.M.: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu. Rev. Nutr.* 2002, 22, 19-34.
- [5] Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J. i wsp.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 1993, 84, 407-412.
- [6] Tyrakowska B., Soffers A.E.M.F., Szymusiak H. i wsp.: TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates, *Free Radical Biol. Med.* 1999, 27, 1427-1436.
- [7] Gliszczyńska-Świgło A., Muzolf M.: pH-Dependent radical scavenging activity of folates, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8237-8242.

- [8] Borkowski T., Szymusiak H., Gliszczyńska-Świgło A. i wsp.: Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5526-5534.

INTERACTIONS BETWEEN COMPONENTS OF DIETARY SUPPLEMENTS: A CASE OF QUERCETIN AND VITAMIN C

Summary

In the present study, the effect of pH of the surrounding medium on the radical-scavenging activity of quercetin in the presence of vitamin C (ascorbic acid) was investigated. It was found that at pH 4.5-9.0 radical-scavenging activity of quercetin in the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay is strongly reduced by ascorbic acid as a result of their interactions. Some relevant quantum-chemical calculations were performed to get some insight into the mechanism of observed antagonistic interaction between these two popular antioxidants.

Keywords: quercetin, vitamin C, dietary supplement, antiradical activity, TEAC. ☒