

AKTYWNOŚĆ ANTYUTLENIAJĄCA WODNYCH ROZTWORÓW  
KWERCETYNY ZAWIERAJĄCYCH  $\beta$ -CYKLODEKSTRYNĘ\*

*Marcin Łukasiewicz<sup>1</sup>, Stanisław Kowalski<sup>1</sup>, Magdalena Kulig<sup>1</sup>, Halina Gambuś<sup>1</sup>,  
Bohdan Achremowicz<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Katedra Technologii Węglowodanów, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
ul. Balicka 122, 30-149 Kraków  
e-mail: rrlukasi@cyf-kr.edu.pl

<sup>2</sup>Katedra Technologii i Oceny Jakości Produktów Roślinnych, Uniwersytet Rzeszowski  
ul. A. Zelwerowicza 4 bud. D9, 35-601 Rzeszów

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono wyniki badań nad właściwościami trójskładnikowych układów, kwercetyna/ $\beta$ -cyklodektryna/woda. Stwierdzono zwiększenie rozpuszczalności kwercetyny w wodzie na drodze kompleksowania tego związku przez cyklodektrynę. Określono zdolność zmiatania wolnych rodników przez otrzymane układy oraz podstawowe parametry opisujące proces kompleksowania. Po raz pierwszy zastosowano modele Apelblata i Buchowskiego-Książczaka do modelowania procesu zwiększenia rozpuszczalności kwercetyny na drodze kompleksowania. W pracy przeprowadzono także badania nad dynamiką procesu kompleksowania. Stwierdzono, że kwercetyna tworzy z  $\beta$ -cyklodektryną kompleksy o stechiometrii 1:1. Powstanie kompleksu zwiększa rozpuszczalność kwercetyny w wodzie, jednak nie wiąże się to bezpośrednio ze wzrostem właściwości antyutleniających otrzymanych roztworów. Fakt ten jest najprawdopodobniej konsekwencją ograniczenia dostępności niektórych grup funkcyjnych kwercetyny na drodze maskowania wewnątrz cząsteczki cyklodektryny.

**Słowa kluczowe:** kompleksowanie, cyklodektryna, antyutleniacze, kwercetyna, rozpuszczalność

## WSTĘP

Kwercetyna (QC), w sensie chemicznym, należy do grupy flawonoidów i jest związkiem szeroko rozpowszechnionym w świecie roślin (w żywności głównym jej źródłem są owoce i warzywa) (Erlund 2004). Z danych literaturowych wynika,

---

\*Praca finansowana ze środków MNiSW/NCN w latach 2011-2013 jako projekt nr N312 331240.

że wykazuje ona szereg funkcji korzystnych dla zdrowia człowieka. W licznych badaniach stwierdzono między innymi jej silne działanie antyutleniające, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe (Bischoff 2008). Jako aglikon flawonoidu jest ona jednak związkiem o bardzo niskiej rozpuszczalności w wodzie, co dramatycznie ogranicza jej wchłanianie w przewodzie pokarmowym, gdzie procesy transportu zachodzą głównie w fazie wodnej (Zheng i in. 2005). Wiadomo także, że w warunkach alkalicznych kwercetyna jest podatna na degradację. Zjawiska te prowadzą do bardzo niskiej biodostępności kwercetyny, nawet podczas spożywania żywności bogatej w ten składnik lub farmaceutyków ją zawierających (Buttress i Saltmarsh 2000).

Kompleksowanie na poziomie supramolekularnym jest techniką powszechnie stosowaną w celu zwiększenia rozpuszczalności składników żywności, leków itd., które są słabo rozpuszczalne w wodzie. Wśród makrocząsteczek stosowanych w tym celu cykliczne oligosacharydy-cyklodekstryny (CD) są jednymi z najczęściej używanych (Dodziuk 2006). Wynika to między innymi z bezpieczeństwa ich stosowania oraz łatwości kompleksowania wielu niskocząsteczkowych związków organicznych (Saravana Kumar in. 2013). CD należą do grupy oligosacharydów składających się z jednostek anhydroglukozowych. Jednostki te tworzą pierścień, przez co cała cząsteczka może być opisana jako ścięty stożek o hydrofobowej, niepolarniej wnęce i hydrofilowej, polarnej części zewnętrznej (Szejtli 2009). Wspomniane różnice w polarności są jedną z sił napędowych przy tworzeniu kompleksów a polarna budowa części zewnętrznej odpowiada za dobrą rozpuszczalność CD lub jej kompleksu w wodzie. Dzięki temu składniki niepolarne mogą w postaci kompleksu przedostawać się do roztworów wodnych, zwiększając biodostępność składnika kompleksowanego.

Jak do tej pory otrzymano stałe kompleksy kwercetyny z  $\beta$ -cyklodekstryną oraz niektórymi jej pochodnymi (Alvarez-Parrilla in. 2005, Borghetti i in. 2009, Dong i in. 2013, Jullian i in. 2007, Kim i in. 2009, Lucas-Abellán i in. 2007). W literaturze przedmiotu brakuje natomiast wiarygodnych danych odnośnie wpływu trwałości kompleksów  $\beta$ -cyklodekstryny na właściwości funkcjonalne, głównie antyutleniające kompleksów. Jak do tej pory nie podjęto także badań nad możliwością opisu procesu kompleksowania przy użyciu modeli rozpuszczalności związków małych cząsteczkowych, takich jak model Apelblata (Apelblat i Manzurola 1999) czy Buchowskiego-Ksiazczaka (Buchowski i in. 1980). W związku z tym w pracy skupiono się na tych, brakujących aspektach wiedzy o kompleksowaniu kwercetyny, określając także stałe trwałości kompleksów metodą Higuchi-Connors (Connors 1995, Higuchi i in. 1965) jak i zmianę entalpii, entropii oraz energii swobodnej procesu kompleksowania w szerokim zakresie temperatur.

## METODYKA BADAŃ

Badania rozpuszczalności kwercetyny w roztworach wodnych przeprowadzono przy zastosowaniu spożywczej  $\beta$ -cyklodekstryny – *Roquette* (Francja). Pozostałe użyte odczynniki: kwercetyna – *Sigma-Aldrich* (Polska); difenylpikrylohydrazyl (DPPH) – *Sigma Aldrich* (Polska); metanol – *POCH* (Polska); etanol 96% *POCH* (Polska); acetonitryl *POCH* (Polska) charakteryzowały się klasą czystości cz.d.a. i użyte były bez dodatkowych operacji oczyszczania.

Analizę właściwości otrzymanych roztworów przeprowadzono na drodze analizy chromatograficznej (HPLC) w następującym układzie analitycznym: eluent, mieszanina MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH – 43:52:5 % (v/v), szybkość przepływu 1 ml·min<sup>-1</sup>, objętość próbki 20  $\mu$ L. System pomiarowy składał się z pompy, detektora UV-VIS oraz termostatu kolumny (40°C). Do oznaczeń stosowano kolumnę pracującą w trybie RP: C<sub>18</sub>-LiChrospher 100-05 (*Knauer* Niemcy). Analizę kwercetyny przeprowadzano przy długości fali 360 nm. Analizę ilościową wykonano w oparciu o krzywą kalibracyjną.

Badania rozpuszczalności były przeprowadzane w zakresach temperatur 30-60°C dla roztworów  $\beta$ -CD o stężeniach od 0 mM (czysta woda) do 15 mM. W wialkach na 7 ml odważano QC (w stosunku molowym QC:CD 5:1). Naważki zadano roztworami CD o stężeniach 0-15 mM. Zawiesiny utrzymywano w stałych temperaturach (30, 40, 50 i 60°C), aż do osiągnięcia stanu równowagi. Zmiany stężenia roztworu QC w fazie wodnej były monitorowane przy użyciu HPLC. Po zakończeniu eksperymentu (ustaleniu się równowagi) próbki zostały poddane filtracji na filtrze strzykawkowym o średnicy porów 0,2  $\mu$ m i poddane analizie chromatograficznej. Otrzymane wyniki zostały użyte do obliczenia dynamiki kompleksowania/rozpuszczalności QC, jak również do oszacowania stałej równowagi oraz termodynamicznych parametrów kompleksowania.

Do wyznaczenia rozpuszczalności QC użyto zmodyfikowanego równania Apelblata, jak również równania Buchowskiego-Ksiazczaka. Model Apelblata określa zależność temperaturową ( $T$ ) ułamka molowego substancji rozpuszczanej ( $x_{mol}$ ) zgodnie z równaniem (1) (Apelblat i Manzurola 1999).

$$\ln(x_{mol}) = A + \frac{B}{T} + C \cdot \ln(T) \quad (1)$$

W modelu występują trzy stałe A, B i C. Stałe A i B wyjaśniają różnice we współczynniku aktywności roztworu, a parametr C dostarcza informację na temat wpływu składu roztworu rzeczywistego na entalpię rozpuszczania. Z drugiej strony równanie Buchowskiego-Ksiazczaka (2) jest często używane jako model opisujący zjawisko rozpuszczalności w roztworach rzeczywistych:

$$\ln \left( 1 + \frac{\lambda \cdot (1 - x_{mol})}{x_{mol}} \right) = \lambda \cdot H \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (2)$$

Opisuje ono również zależność stężenia substancji rozpuszczonej od temperatury, jednak zawiera tylko dwa parametry, tzn.  $\lambda$  i  $H$ . Odzwierciedlają one odstępstwa od idealności roztworu ( $\lambda$ ) oraz entalpię jego powstawania ( $H$ ). Parametr  $T_m$  jest stały i równy temperaturze topnienia substancji rozpuszczonej. W niniejszej pracy oba równania zostały użyte, aby powiązać dane doświadczalne rozpuszczalności. Parametry równań (1-2) były optymalizowane przy użyciu programu Statistica™ (Statsoft, Polska). Program ten wykonuje nieliniowe dopasowanie krzywej przy użyciu algorytmu Levenberga-Marquardt. Średnie odchylenie kwadratowe (RMSD) – miara statystyczna – było używane do pomiaru różnic pomiędzy wartościami przewidywalnymi a obserwowanymi wartościami doświadczalnymi. RMSD jest definiowane zgodnie z równaniem (3):

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i^m - x_i^e)^2}{N}} \quad (3)$$

gdzie:  $x_i^m$  jest ułamkiem molowym obliczonym z modelu, a  $x_i^e$  jest wartością eksperymentalną (N stanowi liczbę punktów eksperymentalnych). Wszystkie analizy były powtarzane dwukrotnie.

Stała trwałości  $K_F$  dla kompleksu QC/CD była estymowana przy użyciu klasycznej metody Higuchi-Connors (Connors 1995, Higuchi i Connors 1965) z wykorzystaniem chromatografii HPLC do określania stężenia QC w fazie wodnej. Metoda wykorzystuje zależność stężenia gościa ( $GT$ ) od stężenia gospodarza ( $HT$ ). Pozwala to, przy założeniu, że zależność ta jest liniowa, oszacować stałą trwałości w oparciu o równania:



$$K_F = \frac{[(HT-GT)_{complex}]}{[HT][GT]} \quad (4)$$

$$[G]_T = \frac{K_F \cdot [GT_0]_t \cdot [HT]_t}{1 + K_F \cdot [GT_0]} + GT \quad (5)$$

gdzie:  $GT_0$  stanowi stężenie równowagowe  $GT$  dla czystego rozpuszczalnika,  $[GT]_t$  całkowite stężenie  $GT$  (skompleksowane i nieskompleksowane) oraz  $[HT]_t$  stanowi całkowite stężenie  $HT$ . Równanie (4) może być sformułowane w postaci równania (5), co pozwala oszacować stałą równowagi za pomocą prostej zależności  $[GT] = f([CD])$ , która jest liniowa. Parametry równania tej funkcji stanowią

$GT_0$  – wyraz wolny oraz  $SL$  – współczynnik kierunkowy prostej. Znajomość obu parametrów jest wystarczająca do obliczenia  $K_F$  z równania (6):

$$K_F = \frac{SL}{GT_0 \cdot (1 - SL)} \quad (6)$$

Stała  $K_F$  była szacowana w zakresach temperatur od 30 do 60°C. Obliczenie jej pozwala także uzyskać wartość zmian standardowej entalpii i entropii kompleksowania (López-Nicolás i in. 2009). Obliczenia wykonano przy użyciu termodynamicznej zależności (7) – równanie van't Hoffa:

$$\ln K_F = \frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad (7)$$

W (7) parametry są oznaczone następująco:  $T$  jest temperaturą (w K),  $R$  jest uniwersalną stałą gazową,  $\Delta H^0$  oraz  $\Delta S^0$  są zmianami standardowej entalpii i entropii kompleksowania. Z liniowej zależności  $\ln(K_F) = f(1/T)$  określić można współczynnik kierunkowy i punkt przecięcia z osią y (wyraz wolny). Oba z nich są definiowane odpowiednio jako (8a) oraz (8b):

$$\frac{-\Delta H^0}{R} \quad (8a)$$

$$\frac{\Delta S^0}{R} \quad (8b)$$

Dodatkowo zmiana wolnej energii Gibbsa ( $\Delta G^0$ ) dla procesu kompleksowania została obliczona zgodnie z równaniem Helmholtza:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (9)$$

Do oznaczania aktywności antyutleniającej określonej jako zdolność zmiatania wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu – DPPH<sup>\*</sup>, 2 ml roztworu QC/CD zostały wymieszane z 1 ml 0,15 mM DPPH<sup>\*</sup> (roztwór w metanolu). W próbie ślepej roztwór QC/CD został zastąpiony metanolem. Po inkubacji bez dostępu światła w temperaturze pokojowej (30 minut) została zmierzona spektrofotometrycznie (Spectro UV-VIS Dual Beam UVS-2800, Labomed, Inc. USA) absorbancja przy długości fali 517 nm. Zdolność zmiatania wolnych rodników ( $S_A$ ) została wyrażona jako procent tłumienia rodnika DPPH<sup>++</sup> i obliczona według poniższego równania:

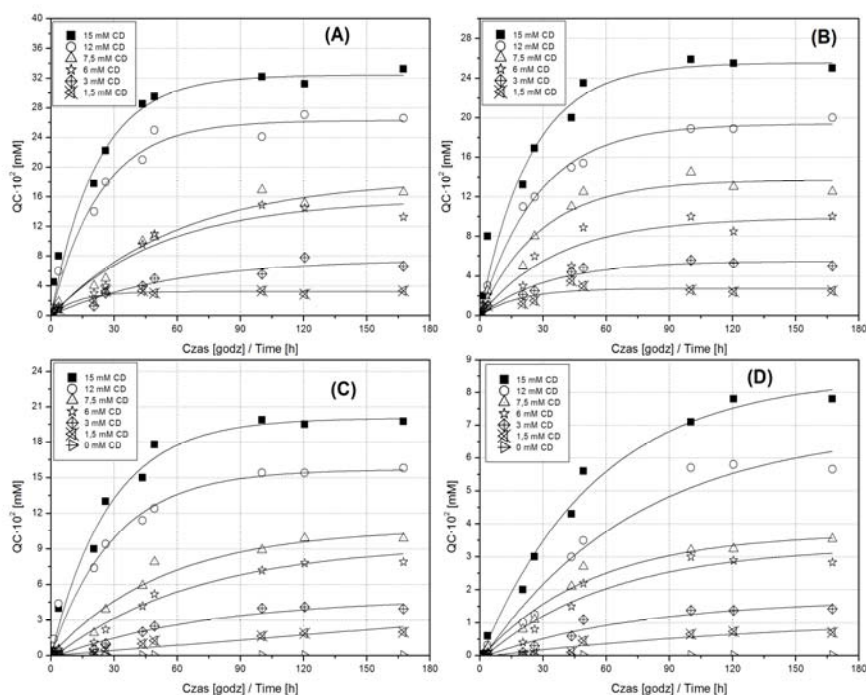
$$S_A = \frac{(A_b - A_s)}{A_b} \cdot 100\%$$

gdzie:  $S_A$  – zdolność do zmiatania wolnych rodników DPPH<sup>\*</sup>,  $A_b$  – absorbancja próby ślepej,  $A_s$  – absorbancja próbki BHT/CD.

Dodatkowo zdolność do zmiatania wolnych rodników przeliczono, używając danych z badań rozpuszczalności i wyrażając ją jako wydajność QC dostępnej i aktywnej w roztworze wodnym. Wszystkie analizy były przeprowadzane dwukrotnie.

### WYNIKI BADAŃ I ICH ANALIZA

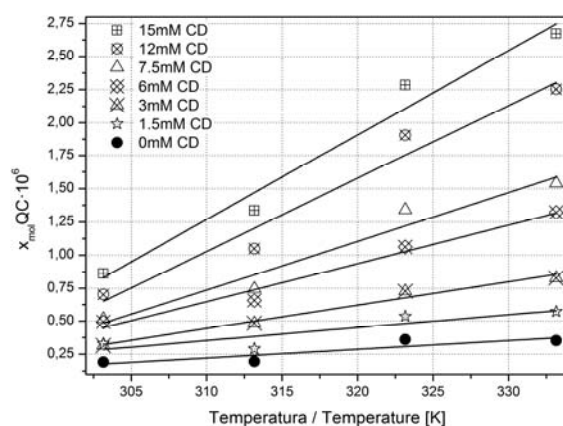
Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują na zwiększenie rozpuszczalności tego związku wraz ze wzrostem stężenia cyklodekstryny. Rozpuszczalność QC jest więc ściśle związana z kompleksowaniem tego związku. Jak widać na wykresie (rys. 1), ilość QC w roztworze wzrasta w czasie około 60-90 godzin, osiągając stan nasycenia/równowagi. Zależność ta jest spełniona w całym zakresie badanych stężeń oraz temperatur. Zawartość QC w roztworze zwiększa się także wraz z temperaturą w przypadku czystej wody. Jest to jednak konsekwencja wzrostu ogólnej rozpuszczalności tego związku, niezależnej od procesu kompleksowania. Obserwowane zjawisko wpływu stężenia wskazuje na zachodzący proces kompleksowania gościa – QC przez gospodarza – CD. Największa liczba „gości” obecna jest w roztworze zawierającym największą liczbę „gospodarzy”.



**Rys. 1.** Dynamika kompleksowania QC w obecności CD: A) 30°C; B) 40°C; C) 50°C; D) 60°C

**Fig. 1.** Dynamics of QC complexation in the presence of CD: A) 30°C; B) 40°C; C) 50°C; D) 60°C

Zwiększenie się rozpuszczalności kwercetyny w wodnych roztworach cyklodekstryny wraz z temperaturą potwierdzają badania nad rozpuszczalnością oraz obliczenia modeli Apelblata i Buchowskiego-Ksiazczaka. Analizując krzywą  $x_{mol} = f(T)$  – rysunek 2, we wszystkich badanych układach zaobserwować można, że rozpuszczalność w każdym przypadku zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury, a przyrost ten ma charakter liniowy. Jak widać, krzywa rozpuszczalności przebiega zgodnie z kolejnością od najbardziej rozcieńczonego roztworu CD do najbardziej stężonego. Otrzymane wyniki wskazują na wpływ gospodarza – CD, obecnego w układzie, na transfer kwercetyny ze stanu stałego do bardzo polarnego roztworu wodnego. Kompleksowanie w tym przypadku wydaje się być jedną z głównych sił napędowych procesu. Drugą jest zapewne istotny wpływ zwiększenia rozpuszczalności kwercetyny w wodzie wraz ze wzrostem temperatury.



Rys. 2. Rozpuszczalność QC w roztworach CD

Fig.2. QC solubility in solutions of CD

W ramach badań parametry obu stosowanych modeli rozpuszczalności, to jest modelu Apelblata i modelu Buchowskiego-Ksiazczaka, dopasowano do danych doświadczalnych (tab. 1). Wskazują one dość dobrą korelację, którą łatwo dostrzec, analizując wielkość RMSD.

W badanym układzie model Buchowskiego-Ksiazczaka wydaje się być nieco dokładniejszy niż model Apelblata (niższe wartości RMSD), w całym zakresie stężeń cyklodekstryny. Rozbieżność obserwowana jest tylko dla czystej wody. Dokładność obu modeli różni się jednak w zależności od stężenia CD. Na podstawie wartości RMSD stwierdzić można, że model Apelblata wykazuje wzrasta-

jącą rozbieżność w stosunku do danych eksperymentalnych wraz ze wzrostem stężenia CD w roztworze. Jest to szczególnie widoczne dla układów o stężeniu CD powyżej 5mM.

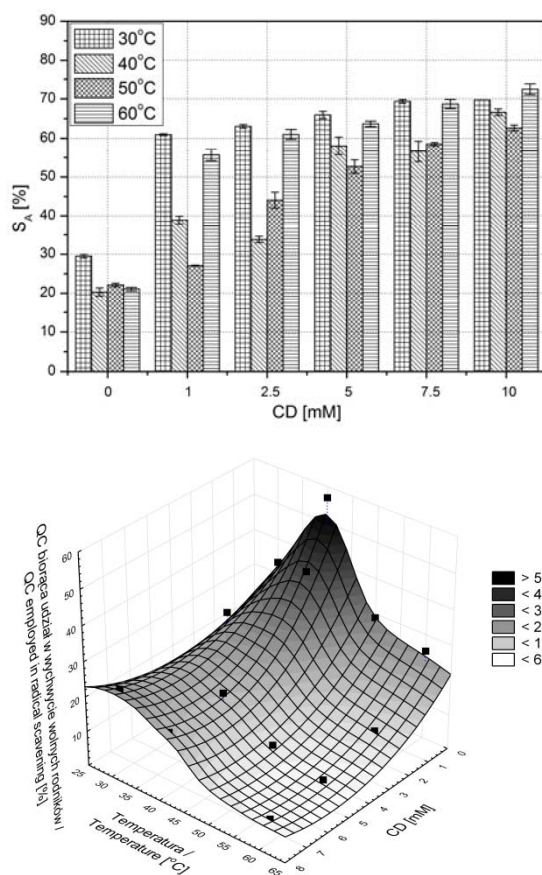
**Tabela 1.** Parametry równań opisujących rozpuszczalność QC  
**Table 1.** Model parameters for QC solubility

Parametr Parameter	Stężenie CD – CD concentration (mM)						
	15,0	12,0	7,5	5,0	2,5	1,0	0,0
model Apelblata – Apelblat model							
A	775,1	595,0	588,6	633,2	855,9	-798,6	-16,2
$B \cdot 10^{-3}$	-40,43	-32,12	-31,64	-6,58	-43,73	34,87	-2,06
C	-114,8	-88,1	-87,3	-9,81	-127,2	117,0	1,3
$RMSD \cdot 10^6$	0,490	0,295	0,151	0,050	0,140	0,061	0,039
model Buchowskiego-Ksiazczaka – Buchowski-Ksiazczak model							
$\lambda \cdot 10^6$	-0,330	-0,331	-0,332	-0,334	-0,335	-0,338	-0,339
H	63,07	63,63	57,03	49,14	45,04	29,03	29,61
$RMSD \cdot 10^6$	0,167	0,143	0,105	0,045	0,046	0,057	0,125

Wzrost rozpuszczalności QC i jej transfer do fazy wodnej powinny spowodować zwiększenie aktywności antyutleniającej tego roztworu. Otrzymane wyniki badań tej aktywności zaprezentowano na rysunku 3.

Analizując aktywność antyutleniającą układów QC/CD, stwierdzono, że trójskładnikowy system QC/CD/woda posiada znaczne właściwości przeciwutleniające. Jak widać, także system podwójny QC/woda wykazuje takie właściwości, jednak wychwytywanie wolnych rodników DPPH<sup>•</sup> osiąga w tym przypadku około 20% (35% dla temperatury 30°C). Wyższe stężenie CD powoduje wzrost aktywności wychwytywania rodników, jednak zmiany te nie są duże i sięgają maksymalnie 70%. Najwyższa wartość  $S_A$  została zaobserwowana w układzie z 10 mM roztworem CD w 60°C, jednak nawet tutaj nie przekracza ona 70%. W całym zakresie stężeń obserwuje się przy tym wzrost aktywności antyutleniającej wraz ze wzrostem stężenia cyklodekstryny, przy czym największe wahania temperaturowe tych wielkości obserwuje się w roztworach bardziej rozcieńczonych (do 5 mM CD). W układach o większym stężeniu CD różnice aktywności antyutleniającej w zależności od temperatury są niewielkie.





**Rys. 3.** Zdolność zmiatania wolnych rodników przez układy QC/CD/woda o różnym stężeniu cyklodekstryny (górny) oraz efektywność zmiatania wolnych rodników przez te roztwory (dolny)  
**Fig. 3.** Radical scavenging of QC/CD/water systems (up) and scavenging activity (down)

W ramach badań oceniono również skuteczność usuwania wolnych rodników przez układ QC/CD/woda – rysunek 3. Najmniejszą skutecznością zmiatania charakteryzują się stężone roztwory cyklodekstryny działające w podwyższonych temperaturach. Wyższe stężenie przeciwutleniacza nie idzie w parze z wysoką wydajnością zmiatania, szacowaną jako procent zużycia QC zdolnych do usuwania rodników DPPH'. Porównując teoretyczną wartość  $S_A$  wynikającą z rzeczywistej zawartości QC w roztworze z wartością doświadczalną, widać, że zdolność zmiatania wolnych rodników wzrasta, gdy stężenie CD w układzie maleje. Skłania to do wniosku, iż skompleksowana QC wykazuje obniżone zdolności anty-

utleniające. Wytłumaczeniem takiego zjawiska może być fakt, że w kompleksie inkluzyjnym znaczna część cząsteczki gościa (lub cała cząsteczka gościa) znajduje się we wnętrzu cyklodekstryny. CD chroni w ten sposób gościa przed wpływem zewnętrznym (światło, tlen, etc). Konsekwencją jest jednak także zablokowanie sterycznych grup funkcyjnych gościa i obniżenie jego funkcjonalności. Potwierdzeniem tej teorii może być określenie stechiometrii kompleksu oraz jego stałej trwałości  $K_F$ . W wyniku przeprowadzonych badań określono wartość stałej trwałości kompleksu i podstawowych parametrów termodynamicznych procesu kompleksowania – tabela 2.

Otrzymane metodą Higuchi-Connors (rys. 4) wartości są zbliżone, chociaż w każdym przypadku nieco niższe w stosunku do danych literaturowych (Jullian i in. 2007, Zheng i in. 2005b). W trakcie badań stwierdzono, iż krzywa rozpuszczalności jest krzywą typu A (wzrost stężenia gospodarza implikuje wzrost stężenia gościa). Wskazuje to na tworzenie się rozpuszczalnego kompleksu inkluzyjnego (rys. 4). Doprecyzowując typ krzywej rozpuszczalności, stwierdzić można, że jest to typ  $A_L$ . Oznacza to, że obserwowany jest w całym oknie obserwacji liniowy wzrost rozpuszczalności gościa – QC, jako funkcja stężenia CD. Diagram  $A_L$  wskazuje przy tym na powstawanie kompleksu pierwszego rzędu w stosunku do gospodarza (CD) i pierwszego lub wyższego rzędu w stosunku do gościa, tzn.  $GT_2CD$ ,  $GT_3CD$  itd. (Del Valle, 2004). W przypadku QC wartości współczynnika kierunkowego tej zależności są stosunkowo małe, w związku z czym można założyć, że powstający kompleks ma stechiometrię 1:1 (Del Valle 2004).

**Tabela 2.** Termodynamiczne parametry kompleksu QC/CD

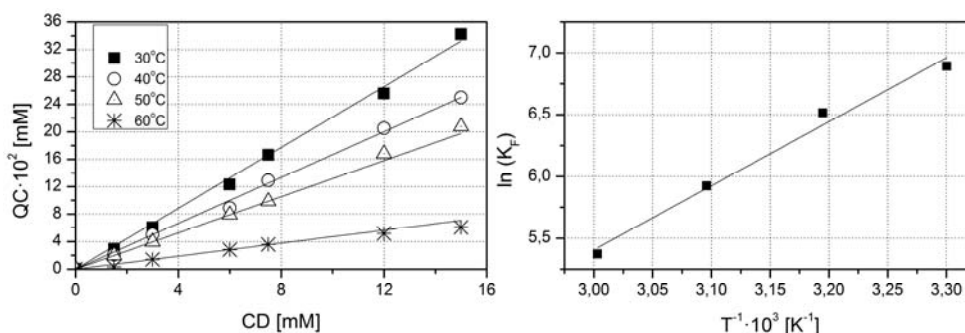
**Table 2.** Thermodynamic properties of QC/CD complexes

Temperatura Temperature (°C)	$K_F$ (m·M <sup>-1</sup> )	$\Delta G^0$	$\Delta H^0$	$\Delta S^0$
		(kJ·mol <sup>-1</sup> )		(J·(mol·K) <sup>-1</sup> )
30	0,984±0,012			
40	0,675±0,031	-17,35*	-43,17*	80,05*
50	0,374±0,007	±0,87	±0,98	±1,05
60	0,215±0,036			

\*obliczone dla temperatury 298 K – estimated at 298 K.

Nie można jednak wykluczyć kompleksowania wyższego rzędu. Na podstawie przeprowadzonych obliczeń należy także stwierdzić, że stała kompleksowania  $K_F$  maleje wraz z temperaturą o około półtora rzędu wielkości. Może to świadczyć o zmniejszaniu oddziaływań typu gość – gospodarz wraz z temperatu-

ra. W rezultacie wzmocnione zostają oddziaływania hydrofobowe kosztem wiązań wodorowych (Del Valle 2004, Lopez-Nicolas i in. 2009). Obliczone na podstawie reguły van't Hoffa (rys. 4) parametry termodynamiczne procesu kompleksowania zebrano w tabeli 2. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że kompleksowanie kwercetyny przez CD jest procesem egzotermicznym ( $\Delta H^0 < 0$ ). Uzyskane wartości zmiany entalpii wskazują na występowanie zmian oddziaływań powodujących uwalnianie energii w trakcie kompleksowania. Jest to zachowanie typowe dla oddziaływań hydrofobowych, gdzie we wnętrzu cząsteczki CD następuje wymiana polarnych cząsteczek wody przez niepolarne cząsteczki gościa. W badanym kompleksie QC/CD entropia zmienia się w niewielkim stopniu, lecz wartość tej zmiany jest dodatnia, podobnie jak obserwuje się to w wielu innych układach zawierających cyklodekstryny (Del Valle 2004). Wartości  $\Delta S^0$  bliskie zeru mogą świadczyć o tworzeniu się kompleksu, w którym cała cząsteczka gościa znajduje się we wnętrzu gospodarza (Loftsson in. 1993). Interpretacja taka potwierdza hipotezę o całkowitym pokryciu cząsteczki QC przez molekułę gospodarza – CD.



**Rys. 4.** Wykres rozpuszczalności fazowej QC w roztworach CD – wykres Higuchi-Connorsa (lewy) oraz temperaturowa zależność stałej trwałości  $K_F$  – wykres van't Hoffa

**Fig. 4.** Phase solubility plot for QC/CD aqueous system – Higuchi-Connors plot (left) and temperature dependence of stability constant  $K_F$  – van't Hoff dependencies

Sytuacja taka umożliwia wnioskowanie, że w badanym układzie przeważać będzie wzrost rozpuszczalności QC wraz z temperaturą w stosunku do wzrostu stężenia skompleksowanego QC (zmiany w wartościach  $K_F$  jako funkcja temperatury).

#### WNIOSKI

Przeprowadzono badania dotyczące rozpuszczalności oraz aktywności antyoksydacyjnej w potrójnym układzie kwercetyna/cyklodekstryna/woda. W odniesieniu do uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

1. Cyklodekstryna obecna w roztworze powoduje wzrost rozpuszczalności kwercetyny na drodze kompleksowania, tworząc układy typu „gospodarz-gość”.
2. Powstające kompleksy mają prawdopodobnie stechiometrię 1:1 i powstają samorzutnie ( $\Delta G^0 < 0$ ).
3. Zmodyfikowane modele rozpuszczalności Apelblata oraz Buchowskiego-Książczaka w sposób dobry opisują proces zwiększenia rozpuszczalności kwercetyny w roztworach wodnych w obecności cyklodekstryny. Skuteczność opisu modelu zależy jednak od stężenia cyklodekstryny. Lepsze dopasowanie obu modeli stwierdzono dla układów zawierających niższe stężenie cyklodekstryny (0 do 5 mM).
4. Otrzymane roztwory posiadają właściwości antyoksydacyjne. Właściwości te są raczej konsekwencją zwiększenia stężenia nieskompleksowanego antyutleniacza niż zwiększenia stężenia kompleksu, ponieważ skompleksowanie cząsteczki QC przez CD wiąże się z maskowaniem aktywnych grup funkcyjnych antyutleniacza.
5. Przeprowadzone badania wskazują na konieczność prowadzenia dalszych eksperymentów z kompleksowaniem związków fenolowych przez cyklodekstryny. Połączenia tego typu otwierają bowiem nowe możliwości do stosowania niepolarnych, nierozpuszczalnych fenolowych przeciwutleniaczy także w roztworach wodnych.

#### PIŚMIENNICTWO

- Alvarez-Parrilla E., Rosa L., Torres-Rivas F., Rodrigo-Garcia J., González-Aguilar G., 2005. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53(1), 121-129.
- Apelblat A., Manzurola, E., 1999. Solubilities of o-acetylsalicylic, 4-aminosalicylic, 3,5-dinitrosalicylic, and p-toluic acid, and magnesium-DL-aspartate in water from T=(278 to 348) K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 31(1), 85-91.
- Bischoff S.C., 2008. Quercetin: Potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(6), 733-740.
- Borghetti G., Lula I., Sinisterra R., Bassani V., 2009. Quercetin/ $\beta$ -Cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS Pharm-SciTech*, 10(1), 235-242.
- Buchowski H., Książczak A., Pietrzyk S., 1980. Solvent activity along a saturation line and solubility of hydrogen-bonding solids. *The Journal of Physical Chemistry*, 84(9), 975-979.
- Connors K.A., 1995. Population characteristics of cyclodextrin complex stabilities in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(7), 843-848.
- Del Valle E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- Dodziuk H., 2006. *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications* (1. wyd.). Wiley-VCH, Nowy Jork.
- Dong L., Liu M., Chen A., Wang Y., Sun D., 2013. Solubilities of quercetin in three  $\beta$ -cyclodextrin derivative solutions at different temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, 177, 204-208.
- Erlund I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851-874.

- Higuchi T., Connors K.A., 1965. Chapter 4. Phase Solubility Studies. W *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. 117-212.
- Jullian C., Moyano L., Yañez C., Olea-Azar C., 2007. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(1), 230-234.
- Kim H., Choi J., Jung S., 2009. Inclusion complexes of modified cyclodextrins with some flavonols. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64(1), 43-47.
- Loftsson T., Ólafsdóttir B. J., Friðriksdóttir H., Jónsdóttir S., 1993. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 95-101.
- Lucas-Abellán C., Fortea I., Gabaldón J. A., Núñez-Delicado E., 2007. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J. Agric. Food Chem.*, 56(1), 255-259.
- Buttress J., Saltmarsh M., 2000. Functional foods. British Nutrition Foundation, Food Chemistry Group. Royal Society of Chemistry, Wielka Brytania
- Saravana Kumar K., Sushma M., Prasanna Raju R., 2013. Dissolution enhancement of poorly soluble drugs by using complexation technique – A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 120-124.
- Szejtli J., 2009. *Cyclodextrin Technology*. Springer Netherlands.
- Zheng Y., Haworth I.S., Zuo Z., Chow M.S.S., Chow A.H.L., 2005. Physicochemical and structural characterization of Quercetin- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(5), 1079-1089.

#### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF QUERCETIN WATER SOLUTIONS CONTAINING $\beta$ -CYCLODEXTRIN

*Marcin Łukasiewicz<sup>1</sup>, Stanisław Kowalski<sup>1</sup>, Magdalena Kulig<sup>1</sup>, Halina Gambuś<sup>1</sup>,  
Bohdan Achremowicz<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Carbohydrate Technology, University of Agriculture in Krakow  
ul. Balicka 122, 30-149 Kraków  
e-mail: rrlukasi@cyf-kr.edu.pl

<sup>2</sup>Department of Technology and Quality Evaluation of Plant Products, University of Rzeszów  
ul. A. Zelwerowicza 4 bud. D9, 35-601 Rzeszów

**Abstract.** The paper presents the results of research on the properties of ternary systems, quercetin/ $\beta$ -cyclodextrin/water. There was observed an increase in water solubility of quercetin by means of complexation with cyclodextrin. It was shown that the systems derived have a high ability to scavenge free radicals, and some basic parameters describing the complexation process were determined. For the first time, Apelblat and Buchowski-Ksiazczak solubility models were used to describe the process of increasing the solubility of quercetin by complexation. The paper presents also a study on the dynamics of the complexation process. It was found that quercetin forms 1:1 stoichiometry complexes with  $\beta$ -cyclodextrin. Formation of the complex increases the solubility of quercetin in water, but that does not relate directly to an increase in antioxidant properties of the solutions obtained. This fact is probably the consequence of limiting the availability of certain functional groups of quercetin by masking them inside of the cyclodextrin molecule.

**Keywords:** complexation, cyclodextrin, antioxidant, quercetin, solubility