

Cecylia Mielczarek, Dorota Kusztal

## BADANIA WŁAŚCIWOŚCI KWASOWO-ZASADOWYCH GALANGINY\*)

Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Medycznej  
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik: prof.dr hab. E. Brzezińska

*Wyznaczono stałe dysocjacji galanginy metodami analitycznymi. Metodami chemii kwantowej AM1, PM3 i ab initio modelowano reakcje dysocjacji galanginy. Analiza parametrów fizykochemicznych otrzymanych tymi metodami pozwoliła na ustalenie właściwości kwasowo-zasadowych grup hydroksylowych flawonu. Przeprowadzono analizę wyboru deskryptorów istotnych dla podjęcia dalszych badań w kierunku wyjaśnienia zależności między kwasowością grup hydroksylowych, a ich działaniem biologicznym.*

Słowa kluczowe: flawonoidy, modelowanie molekularne, parametry fizykochemiczne.

Key words: flavonoids, molecular modelling, acidity constants, physicochemical properties.

Wśród konwencjonalnych metod leczenia coraz większym uznaniem cieszy się apiterapia wykorzystująca lecznicze działanie standaryzowanych czynnych farmakologicznie frakcji otrzymanych z produktów pszczelich. Jednak właściwości alergenne tych preparatów ograniczają pełne wykorzystanie ich właściwości leczniczych. Należy więc badać możliwości wykorzystywania terapeutycznego czystych związków chemicznych zawartych w preparatach propolisowych. Preparaty propolisowe są bogatym źródłem głównie węglowodanów, zawierają również m.in. związki fenolowe i flawonoidowe o dużym potencjale antyutleniającym. Flawonoidy należą do związków o różnorodnym i ważnym udokumentowanym działaniu biologiczno-terapeutycznym (1–6). Preparaty z miodu są w Polsce głównym źródłem flawonu – galanginy.

W wyniku badań przeprowadzonych *in vitro* na modelowych komórkach nabłonkowych żołądka (human gastric adenocarcinoma cells – AGS) zainfekowanych *Helicobacter pylori* stwierdzono, że galangina w stężeniu 60 mmol/dm<sup>3</sup> i wyższym wykazuje działanie antybakteryjne w stosunku do *H. pylori*. W doświadczeniu tym porównywano flawonoidy (chryzynę, kwercetynę, kemferol, flawanon, galanginę) pod względem siły hamowania sekrecji interleukiny 8. Okazało się, że najsilniejszym inhibitorem wśród badanych związków jest galangina (3).

---

\*) Praca wykonana w ramach badań statutowych UM w Łodzi nr. 503/3-016-03/503-01.

Inne badania dowodzą, że propolis, w skład którego wchodzi m.in. galangina, podany śródtrzewnowo zapobiega u myszy „stresowi oksydacyjnemu” komórek mózgu i w związku z tym może zapobiegać ich niedotlenieniu (4).

W doświadczeniu przeprowadzonym *in vitro* na komórkach mięśnia wypieracza pęcherza świni i szczura odkryto, że galangina w stężeniu  $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup> zapobiega obniżeniu ich kurczliwości. Dzieje się tak dzięki antyoksydacyjnym właściwościom tego flawonoidu, które zostały potwierdzone w badaniu na mikrosomach wątroby szczura. Jeśli wyniki tych badań zostaną potwierdzone *in vivo*, galangina może stać się nowym środkiem zapobiegania i/lub leczenia dysfunkcji pęcherza (5, 6). Galangina okazała się również potencjalnym inhibitorem metabolizmu DMBA (6) dimetylobenz[*a*]antracenu – znanego związku rakotwórczego. Pobudzenie receptora AhR (aryl hydrocarbon receptor) zapoczątkowuje proces nowotworowy. W badaniach *in vitro* dowiedziono, że galangina jest skutecznym nietoksycznym inhibitorem tego receptora, dzięki czemu wykazuje właściwość zapobiegania nowotworom (6).

Działania biologiczne galanginy zostały szeroko zbadane, jednak wyjaśnienie tych działań powinno być poprzedzone badaniami właściwości kwasowo-zasadowych tego związku. Równowagi kwasowo-zasadowe związków biologicznie czynnych odgrywają zasadniczą rolę w przewidywaniu wzajemnych stosunków ilościowych form o różnym stopniu protonowania w płynach fizjologicznych o określonych wartościach pH. Zależności te, ściśle wiążą się z możliwością transportu leku przez błony biologiczne, odgrywają rolę w bezpośrednim oddziaływaniu leku z receptorem. Relacje pomiędzy stałą dysocjacji, a stężeniem leku związanego z białkami osocza, mięśni oraz enzymów są ważnym czynnikiem wpływającym na dystrybucję, metabolizm i wydalanie leku (7). Dlatego celem pracy było poznanie tych relacji dla galanginy jako istotnego składnika miodu pszczelego.

Badania własne (8, 9) wybranych parametrów kwantowo-chemicznych flawonów wykazały możliwość wykorzystania energii wiązania i ciepła tworzenia do ustalania kwasowości grup hydroksylowych na przykładzie rutyny i jej aglikonu kwercetyny. Wielokierunkowość w działaniu biologicznym tych związków o podobnej strukturze chemicznej jest nadal niewyjaśnionym i ważnym problemem. Badania zależności między budową i działaniem mogą być z powodzeniem prowadzone metodami QSAR pod warunkiem stosowania właściwych deskryptorów, których wybór powinien być poprzedzony badaniami analitycznymi.

## MATERIAŁY I METODY

Galangina (3,5,7-trihydroksyflawon) pochodziła z firmy Aldrich. Czystość związku potwierdzono badaniami widm absorpcyjnych w zakresie UV/VIS i <sup>1</sup>H NMR w DMSO-d<sub>6</sub>, oraz pomiarem temperatury topnienia. Trwałość związku badano w roztworach nienasyconych, buforowych przygotowanych wg wzorców (10, 11) z odczynników pochodzących z Polskich Odczynników Chemicznych (Gliwice). Równowagi kwasowo-zasadowe badano klasyczną metodą spektrofotometryczną w roztworach buforowanych galanginy o stężeniu  $4 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> z zawartością ok. 10% v/v metanolu. Miareczkowanie potencjometryczne rozpoczynano od dodania wodorotlenku potasowego zapewniającego całkowite rozpuszczenie galanginy.

Do obliczenia wartości stałych dysocjacji stosowano wzory uproszczone (10, 11). Temperatura w czasie wszystkich pomiarów wynosiła ok.  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , utrzymywano stałą moc jonową ok. 0,1. Obliczenia parametrów fizykochemicznych były przeprowadzone po optymalizacji geometrycznej w algorytmie Polak-Ribiere za pomocą metod semi-empirycznych AM1 i PM3 oraz ab initio (basis set minimal STO-3G), w programie HyperChem ®7.0 (Hypercube, Inc), dokładność pomiarów energii ok. 0,001 kcal/mol (8, 9, 12). Program ACD/pKa DB V 8 wykorzystano do wyznaczenia log P. Wyniki opracowano statystycznie zgodnie z piśmiennictwem (13).

Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem następującej aparatury: spektrofotometr PYE-ATI UV-4, spektrometr magnetycznego rezonansu jądowego Tesla DM 567A, pehametr cyfrowy typ PHM 80 (Radiometer Copenhagen).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dotychczas nie wyznaczono stałych dysocjacji dla galanginy w rozworach wodnych. Badaniami równowag kwasowo-zasadowych klasyczną metodą spektrofotometryczną objęto roztwory galanginy w zakresie pH od 1,0 do 12,5; widma rejestrowano *ex-tempore* w zakresie długości fal od 200 do 500 nm. W zakresie pH 1–6 widma nie różnią się istotnie i są charakterystyczne dla formy obojętnej galanginy, wykazują pasma absorpcji z maximum przy dwóch długościach fal  $\lambda = 262,5$  nm ( $\epsilon_m = 19250$ ) i  $\lambda = 355$  nm ( $\epsilon_m = 11000$ ) oraz przebieg  $\lambda = 312,5$  nm.

Analiza widm zarejestrowanych w roztworach o zakresie pH od 6,271 do 8,803 wykazuje, że najsilniej wyrażone zmiany absorbancji obserwuje się w zakresie długości fal od 200 do 450 nm. Wraz ze wzrostem zasadowości roztworu do pH ok. 8,8 wyraźnie wzrasta absorbancja pomiędzy  $265 \text{ nm} < \lambda < 295 \text{ nm}$ , przy czym pasmo z maksimum przy  $\lambda = 262,5$  nm maleje, a powstaje nowe z maksimum przy  $\lambda = 275$  nm. Wraz ze zwiększaniem się pH roztworu obserwuje się wzrost absorbancji w zakresie 370–450 nm oraz obniżenie absorbancji w zakresie od 300 nm do 370 nm. Obecność pięciu punktów izobestycznych przy długościach fal:  $\lambda = 212$  nm ( $\epsilon_m^{212} = 18425$ ),  $\lambda = 248$  nm ( $\epsilon_m^{248} = 11775$ ),  $\lambda = 268$  nm ( $\epsilon_m^{268} = 18625$ ),  $\lambda = 300$  nm ( $\epsilon_m^{300} = 7500$ ),  $\lambda = 368$  nm ( $\epsilon_m^{368} = 9175$ ) świadczy o tym, że w tym zakresie pH występują w równowadze przynajmniej dwie formy galanginy.

Zmiany absorbancji przy długości fal 400 nm i 356 nm w funkcji pH posłużyły do wyznaczenia wartości  $\text{p}K_1 = 7,50 \pm 0,07$ .

Przy dalszym wzroście zasadowości roztworu od pH = 8,803 do pH = 10,545 obserwuje się wzrost absorbancji w zakresach długości fal:  $225 \text{ nm} < \lambda < 260 \text{ nm}$ ;  $280 \text{ nm} < \lambda < 330 \text{ nm}$ ;  $390 \text{ nm} < \lambda < 470 \text{ nm}$ .

Malejącą wraz ze wzrostem zasadowości absorbancję obserwuje się w zakresach długości fal:  $260 \text{ nm} < \lambda < 280 \text{ nm}$ ;  $330 \text{ nm} < \lambda < 390 \text{ nm}$ .

W efekcie tych zmian obserwujemy pasma absorpcji z dwoma maksimumami leżącymi przy długościach fal:  $\lambda = 275$  nm ( $\epsilon_m = 17500$ ) oraz przy  $\lambda = 412$  nm ( $\epsilon_m = 12500$ ) oraz cztery minima przy:  $\lambda = 210$  nm ( $\epsilon_m = 18750$ );  $\lambda = 250$  nm ( $\epsilon_m = 11875$ );  $\lambda = 315$  nm ( $\epsilon_m = 6000$ );  $\lambda = 360$  nm ( $\epsilon_m = 4250$ ).

Obok zmian absorbancji widocznych jest również wyraźnie pięć punktów izobestycznych przy długościach fal:  $\lambda = 224$  nm ( $\epsilon_m^{224} = 18425$ ),  $\lambda = 256$  nm ( $\epsilon_m^{256} =$

12300),  $\lambda = 280$  nm ( $\epsilon_m^{280} = 17625$ ),  $\lambda = 332$  nm ( $\epsilon_m^{332} = 7025$ ),  $\lambda = 388$  nm ( $\epsilon_m^{388} = 8975$ ). Ich obecność świadczy o tym, że w roztworze w równowadze istnieją przynajmniej dwie formy galanginy.

Zmiany absorbancji przy długościach fal  $\lambda = 376$  nm i  $\lambda = 412$  nm posłużyły do obliczenia kolejnej stałej dysocjacji  $pK_2 = 9,70 \pm 0,05$ . Przeprowadzone reakcje dysocjacji są odwracalne, a badana substancja w środowisku alkalicznym jest trwała, gdyż widmo alkalicznego roztworu galanginy (pH = 12,5) po zakwaszeniu roztworu do pH ok.1 nie różni się istotnie od widma formy obojętnej. Potwierdza to, iż widma dotyczą tylko równowag kwasowo-zasadowych galanginy.

Miareczkowania potencjometryczne przeprowadzono dla roztworu galanginy o stężeniu  $c = 4,55 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>. Galangina jest związkiem trudno rozpuszczalnym w wodzie dlatego w celu zwiększenia jej rozpuszczalności dodano ok. 9% v/v metanolu. Otrzymany roztwór wodno-alkoholowy miareczkowano mianowanym roztworem KOH o stężeniu  $c_{KOH} = 0,2288$  mol/dm<sup>3</sup>. Pomiaru potencjometryczne były możliwe dopiero od 200% zobojętnienia ze względu na niską rozpuszczalność galanginy.

Metodą potencjometryczną udało się wyznaczyć dwie ostatnie stałe dysocjacji:  $pK_2 = 9,58$ ;  $pK_3 = 10,30$ . Te wartości należy traktować jako przybliżone, ponieważ w badaniu nie uwzględniono hydrolizy utworzonych soli, ponadto stałe te są położone blisko siebie, na co wskazuje malejący trend obliczanej wartości  $pK_3$  wraz ze wzrostem zasadowości roztworu.

Wartości drugiej stałej dysocjacji niezależnie od stosowanych metod są zbliżone.

### Właściwości kwasowo-zasadowe galanginy

Analizę właściwości kwasowo-zasadowych galanginy przeprowadzono na podstawie wyznaczonych metodami obliczeniowymi parametrów fizykochemicznych.

Porównaniu i analizie poddane zostały również, uzyskane w wyniku optymalizacji geometrycznej, długości wiązań i ładunki cząstkowe na atomach.

Zgodnie z literaturą wybrano najbardziej prawdopodobną strukturę monoanionową, a dalej formę, która staje się wyjściową strukturą dla kolejnej formy dianionu (8, 9).

### Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych otrzymanych po optymalizacji metodą AM1

Celem pracy było poznanie kolejności w jakiej dysocjują kolejne protony grup hydroksylowych galanginy w oparciu o analizę takich parametrów fizykochemicznych jak: energii całkowitej, wiązania i orbitalnych, ciepła tworzenia dla wszystkich możliwych form anionowych i formy obojętnej galanginy. Przeanalizowano parametry najpierw dla monoanionów, a następnie dla dianionów.

Dla określania właściwości kwasowo-zasadowych największe znaczenie ma porównanie energii całkowitej i wiązania oraz ciepła tworzenia. Najtrwalsza termodynamicznie jest forma obojętne, najmniej trwałe jest trianion.

Śród trzech możliwych monoanionów najniższy poziom energetyczny wykazuje 7-monoanion (tab. I). Wartości energii wiązania, całkowitej i ciepła tworzenia dla dwóch pozostałych monoanionów są zbliżone.

Ponadto, 7-monoanion oznacza się najniższą wartością energii orbitalu LUMO (2,19 eV), co świadczy o tym, że najłatwiej oderwać od niego elektron. Jest za-

tem najsilniejszą wśród monoanionów zasadą, która najłatwiej traci elektron. Dla tej formy galanginy największa jest różnica energii orbitali HOMO i LUMO (6,55), co świadczy o tym, że wśród monoanionów to najbardziej prawdopodobna forma utworzona w procesie dysocjacji z formy obojętnej (14,15).

Najniższą energię HOMO wśród monoanionów wykazuje 7-monoanion co oznacza, że jest najsilniejszym kwasem od którego najłatwiej oderwać proton i utworzyć dianion. Pozostałe monoaniony mają zdolność do tworzenia wiązania wodorowego z atomem tlenu karbonylowego przy C-4, co dodatkowo potwierdza, że pierwszy proton jest usunięty z grupy hydroksylowej w pozycji C-7. Łatwość powstawania wiązania pomiędzy atomem wodoru z grupy hydroksylowej przy C-3 a atomem tlenu grupy karbonylowego przy C-4 potwierdzono przez analizę parametrów takich, jak i momentu dipolowego energii hydratacji. Najniższą wartość momentu dipolowego (6.52D) wykazuje 3-monoanion. Wartość energii hydratacji określa łatwość, z jaką dana forma jest zdolna tworzyć wiązanie wodorowe stabilizujące określoną strukturę (16). Najniższą wartość energii hydratacji, a więc i najwyższą zdolność do stabilizacji struktury wykazuje monoanion przy C-3.

Tabela I. Parametry otrzymane dla galanginy po optymalizacji geometrycznej metodą AM1

Table I. Parameters obtained for galangin after the geometric optimization with the AM1 method

Formy galanginy	Energia całkowita (kcal/mol)	Energia wiązania (kcal/mol)	Ciepło tworzenia (kcal/mol)	$E_{\text{HOMO}}$ (eV)	$E_{\text{LUMO}}$ (eV)	$\Delta [E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}]$ (eV)	Moment dipolowy (D)
obojętne	-84376,84	-3508,83	-126,66	-8,94	-1,01	7,93	3,39
3-monoanion	-84097,74	-3492,53	-162,47	-3,63	2,66	6,29	6,52
5-monoanion	-84097,14	-3491,94	-161,87	-4,14	2,35	6,49	11,90
7-monoanion	-84105,34	-3500,14	-170,08	-4,36	2,19	6,55	11,79
3,5-dianion	-83746,22	-3403,81	-125,85	-0,41	6,56	6,97	8,78
3,7-dianion	-83757,64	-3415,24	-137,28	-0,54	6,29	6,83	5,58
5,7-dianion	-83729,99	-3387,59	-109,63	0,12	4,87	4,75	21,85
3,5,7-trianion	-83316,34	-3236,74	-10,88	2,96	9,25	6,29	13,90

Przeprowadzono także analizę innych parametrów takich jak: długość wiązania OH i ładunków cząstkowych na atomach tlenu i wodoru określonych grup hydroksylowych, ale wynikające z nich wnioski są niespójne.

Długość wiązania między atomem wodoru, a atomem tlenu w grupie hydroksylowej jest odwrotnie proporcjonalna do trwałości tego wiązania. Najdłuższe wiązanie O-H występuje przy węglu C-3, więc na podstawie oceny tego parametru, najłatwiej będzie powstawał 3-monoanion. Analiza sumy ładunków na atomie tlenu i atomu wodoru w grupach hydroksylowych formy obojętnej ujawnia większą stabilność grup OH przy C-3 i C-5.

Dla monoanionów galanginy najniższy ładunek zgromadzony jest na atomie tlenu przy węglu C-5 (-0,244), najwyższy przy węglu C-7 (-0,236). Wartość ta dla atomu tlenu przy węglu C<sub>3</sub> wynosi -0,234. Wynika stąd, że najtrwalsze byłyby

5-monoanion i 3-monoanion, ale struktury te stabilizuje prawdopodobnie wiązanie wodorowe z tlenem karbonylowym przy C-4.

Analiza ładunków cząstkowych na monoanionach jest mało wiarygodna ze względu na łatwość przegrupowania grup występujących w procesie optymalizacji.

Analiza cząstkowego ładunku zgromadzonego na atomach tlenu dla formy trianionowej galanginy jest bardziej wiarygodna.

Wartość ta obliczona dla trianionu wskazuje, iż największy ładunek ujemny zgromadzony jest na atomie tlenu przy węglu C-7, a więc najłatwiej ulegać powinien protonowaniu.

Wśród dianionów najniższy poziom energii całkowitej i energii wiązania jest charakterystyczny dla 3,7-dianionu (tab. I), co pozwala sądzić, że jako drugi zostanie oderwany proton grupy hydroksylowej przy węglu C-3. Dla tej formy galanginy najniższa jest wartość momentu dipolowego. Nie potwierdza tej tezy jednak wartość różnicy energii orbitali HOMO i LUMO, która jest największa dla 3,5-dianionu (6,97) oraz energii hydratacji, która jest największa dla 5,7-dianionu (–11,12 kcal/mol).

#### Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych otrzymanych po optymalizacji metodą PM3

Przeprowadzono podobną analizę wartości wyznaczonych parametrów fizykochemicznych po optymalizacji geometrycznej metodą cząsteczki galanginy.

Wartości parametrów takich jak: energia całkowita, energia wiązania, energia orbitali atomowych, moment dipolowy świadczą, że obojętna forma galanginy jest najtrwalsza formą, podczas, gdy najmniej stabilną strukturą jest forma trianionowa (tab. II).

Tab e l a II. Parametry otrzymane dla galanginy po optymalizacji geometrycznej metodą PM3

Tab l e II. Parameters obtained for galangin after the geometric optimization using the PM3 method

Formy galanginy	Energia całkowita (kcal/mol)	Energia wiązania (kcal/mol)	Ciepło tworzenia (kcal/mol)	$E_{\text{HOMO}}$ (eV)	$E_{\text{LUMO}}$ (eV)	$\Delta [E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}]$ (eV)	Moment dipolowy (D)
obojętna	-78371,88	-3518,42	-136,25	-8,94	-1,07	7,87	3,29
3-monoanion	-78058,66	-3506,66	-176,60	-3,57	2,62	6,19	6,61
5-monoanion	-78054,41	-3502,41	-172,35	-4,09	2,27	6,36	11,56
7-monoanion	-78063,17	-3511,18	-181,12	-4,23	2,05	6,28	12,21
3,5-dianion	-77669,48	-3418,96	-141,00	-0,35	6,60	6,95	8,37
3,7-dianion	-77682,45	-3431,93	-153,97	-0,50	6,22	6,72	5,72
5,7-dianion	-77651,97	-3401,45	-123,49	0,16	4,78	4,62	21,62
3,5,7-trianion	-77203,58	-3254,54	-28,68	3,04	9,24	6,20	14,11

Porównując wartość energii całkowitej, wiązania, orbitali atomowych, ciepła tworzenia dla monoanionów można stwierdzić, że najbardziej stabilny jest 7-monoanion.

Analiza takich parametrów, jak: momentu dipolowego, długości wiązań, energii hydratacji mogą być wykonywane tylko w oparciu o dodatkowe dane związane z możliwością tworzenia wiązań wodorowych.

Pomimo, że wartość momentu dipolowego wskazywałaby na to, iż jako pierwszy zostanie oderwany atom wodoru grupy hydroksylowej przy węglu C-3:

- długość wiązania C-OH każe wnioskować, że najslabiej związany jest atom wodoru w grupie hydroksylowej przy węglu C-5, a najsilniej przy węglu C-7;
- wartość energii hydratacji jest najniższa dla 3-monoanionu (–18,10 kcal/mol).

Jednak najbardziej prawdopodobne jest powstanie w procesie dysocjacji w pierwszej kolejności 7-monoanionu galanginy, gdyż odległość między atomem tlenu karbonylowego przy C-4 i atomem wodoru grupy hydroksylowej C-3 oraz między atomem tlenu karbonylowego C-4 i atomem wodoru grupy hydroksylowej C-5 jest na tyle mała, że możliwe jest utworzenie stabilizującego strukturę wiązania wodorowego dla 3- oraz 5-monoanionów (odpowiednio: 1,78 Å oraz 1,80 Å). Ponadto najniższy ładunek elektryczny jest zgromadzony na atomie tlenu grupy hydroksylowej przy węglu C<sub>5</sub> (–0,252) wskazuje na silne wiązanie przy tym węglu.

Najbardziej stabilna wśród form dianionowych wydaje się być 3,7-dianion. Potwierdza to analiza wartości energii całkowitej, wiązania, ciepła tworzenia oraz momentu dipolowego.

Różnica wartości energii orbitali HOMO i LUMO jest jednak największa dla formy 3,5-dianionu. W przypadku 3,7-dianionu zmierzona odległość między atomami C<sub>4</sub>=O : HO-C<sub>5</sub> wynosi 1,78 Å i pozwala wnioskować o istnieniu stabilizujących tę formę galanginy wiązań wodorowych.

#### Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych otrzymanych po optymalizacji metodą ab initio

Analiza energii całkowitej, elektronowej, jądrowej, momentu dipolowego i energii hydratacji wskazuje, że najtrwalsza jest forma obojętna galanginy, a najmniej stabilna forma trianionu (tab. III).

Table III. Parametry fizykochemiczne dla galanginy otrzymane metodą ab initio

Table III. Physicochemical parameters for galangin obtained by the ab initio method

Formy galanginy	Energia całkowita (kcal/mol)	Energia elektronowa (kcal/mol)	Energia jądrowa (kcal/mol)	E <sub>HOMO</sub> (eV)	E <sub>LUMO</sub> (eV)	$\Delta [E_{HOMO} - E_{LUMO}]$ (eV)	Moment dipolowy (D)
obojętna	–587397,60	–150249,00	915101,60	4,57	–6,26	10,83	2,70
3-monoanion	–586957,80	–1488650,00	901692,10	9,08	0,91	8,17	475,50
5-monoanion	–586952,90	–1486050,00	899097,40	8,91	0,27	8,64	474,90
7-monoanion	–586962,00	–1490754,00	903792,40	8,52	0,12	8,40	475,50
3,5-dianion	–586421,90	–1474676,00	888253,60	14,83	3,90	10,93	482,10
3,7-dianion*	–586442,30	–1475324,00	888881,30	14,52	3,51	11,01	509,20
5,7-dianion*	–586384,40	–1471071,00	884686,50	12,50	5,11	7,39	499,10
3,5,7-trianion*	–585793,90	–1457579,00	871785,10	19,38	7,64	11,74	495,20

\* optymalizacja przeprowadzona z dokładnością ok. 4 kcal/(Å mol)

Wśród trzech możliwych monoanionów najbardziej termodynamicznie stabilny jest 7-monoanion, gdyż charakteryzuje się najniższą wartością energii całkowitej ( $-586962$  kcal/mol), elektronowej ( $-1490754$  kcal/mol) oraz orbitalu LUMO ( $0,12$  eV).

Odległość między atomami tlenu i wodoru każdej z grup hydroksylowych przy C-3 oraz przy C-5 z grupą karbonylową przy C-4 dla 7-monoanionu, wynosząca  $1,63$  Å sugeruje obecność wiązań wodorowych stabilizujących tę strukturę.

Najniższa wartość energii całkowitej, jądrowej, orbitalu LUMO dla form dianionowych charakteryzuje 3,7-dianion, co pozwala sądzić, że jako drugi oderwany zastranie proton grupy hydroksylowej przy węglu C-3. Dodatkowo odległość między atomami wodoru przy C-5 oraz tlenu przy C-4 wskazuje, iż ta struktura jest stabilizowana przez wiązania wodorowe.

### Właściwości kwasowo-zasadowe w oparciu o analizy energii HOMO i LUMO

Według teorii frontalnych orbitali molekularnych (FMO) wiele reakcji chemicznych zachodzi ze względu na przyciągania między donorami i akceptorami elektronów, także różnica energii pomiędzy poziomem i LUMO i HOMO decyduje o stabilności w układzie aromatycznym (14, 15, 17). Dlatego przeprowadzono analizę procesów dysocjacji protonowania dla galanginy w oparciu o zmiany tych energii orbitalnych.

Forma obojętna galanginy jest kwasem. Energia orbitalna LUMO jest parametrem opisującym zdolność do przyjęcia elektronu. Formy monoanionowe galanginy w stosunku do postaci obojętnej są zasadami i ich właściwości jako donorów elektronów są określone przez wartości energii orbitalnej HOMO. Jeśli dwa lub więcej dawców elektronów reagują z tym samym akceptorem, wtedy donor o większej wartości energii HOMO wykazuje wyższą reaktywność.

W przypadku reakcji dysocjacji, największa różnica pomiędzy wartościami LUMO i HOMO jest miarą stabilności utworzonego anionu. Największą różnicę między energią LUMO formy obojętnej galanginy a energią HOMO możliwych form monoanionowych wykazuje 7-monoanion, niezależnie od rodzaju stosowanej metody pół-empirycznej PM 1 czy PM 3 (tab. I–II). Dlatego należy przyjąć, że 7-monoanion jest najbardziej prawdopodobną formą, która powstaje po dysocjacji protonu od formy obojętnej. W dalszej kolejności traktując 7-monoanion jako kwas z którego utworzona jest forma dianionowa, przeprowadzono analizę różnicy między energią LUMO 7-monoanionu i energią HOMO możliwych form dianionowych utworzonych z 7-monoanionu. Największą różnicę między energią LUMO 7-monoanionu i energii HOMO możliwych form dianionu wykazuje 3,7-dianion w obu metodach półempirycznych (tab. I–III).

Analiza procesu dysocjacji oparta o analizy energii orbitalnych LUMO i HOMO uzyskanych metodami AM1 i PM3 wskazuje, że dla galanginy pierwsza stała dysocjacji związana jest z utratą protonu przy C-7, druga stała związana jest z utratą protonu przy C-3 trzecia stała dysocjacji wiąże się z utratą protonu przy C-5.

Metodą ab initio nie można tak szczegółowej analizy przeprowadzić, gdyż energie orbitalu HOMO form monoanionowych mało różnią się pomiędzy sobą i różnice te mieszczą się w granicach błędów doświadczalnych.

Analizę procesu protonowania przeprowadzono w oparciu o badanie różnic pomiędzy energią HOMO trianionu (zasada) a energiami LUMO możliwych form dia-



nionowych (kwas). W metodzie AM1 największa była ta różnica dla 3,5-dianionu galanginy, w metodzie PM3 dla 3,7-dianionu galanginy. W kolejnej analizie porównano różnice pomiędzy HOMO wybranego dianionu z energiami LUMO możliwego do utworzenia z nich odpowiedniego monoanionu. Okazało się, że największa była różnica dla 3-monoanionu galanginy w metodzie AM1, natomiast w przypadku metody PM3 dla 7-monoanionu. Metodą AM1 protonowanie zachodzi w następującej kolejności C-7 > C-5 > C-3. Metodą PM3 stwierdzono, że protonowanie jest możliwe kolejności C-5 > C-3 > C-7, co jest zgodne z wnioskami dotyczącymi kolejności w jakiej dysocjują protony hydroksylowe galanginy tzn: C -7 > C-3 > C-5 (tab. I i II).

### Współczynnik podziału logP

Podczas przeprowadzanych obliczeń teoretycznych wyznaczono kilkoma metodami wartość współczynnika podziału dla galanginy: log P = 0,85 (metodą AM 1, PM 3 i ab initio), log P = 2,83 ± 0,59 (metodą ACD/pKa).

Dla substancji o takich wartościach współczynnika podziału optymalną drogą podania jest droga doustna.

Zanalizowano sytuację, gdy galangina, ze względu na właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *Helicobacter pylori* byłaby podana doustnie. Jako stałą dysocjacji przyjmijmy wyznaczoną metodą spektrofotometryczną wartość  $pK_1 = 7,50$ . Odczyn soku żołądkowego wynosi ok. 2. Ze wzoru na stopień jonizacji kwasu w danym pH obliczono, że wynosi on w tym przypadku:  $\%_{\text{jonizacji}} = 3,16 \times 10^{-4} = 0,000316\%$ . Oznacza to, że w tym środowisku galangina jest zjonizowana w znikomym stopniu, co pozwala sądzić, że z żołądka będzie wchłaniana w dużym stopniu do krwiobiegu. Droga doustna jest zatem dogodnym sposobem podawania galanginy i pozwala na ewentualne stosowanie jako środka zapobiegającego/wspomagającego leczenie infekcji *H. pylori* (7).

### Dystrybucja galanginy w warunkach fizjologicznych a jej właściwości kwasowo-zasadowe

Analiza dystrybucji galanginy w warunkach fizjologicznych w oparciu o właściwości kwasowo-zasadowe pozwala określić możliwości chelatowania metali i przez to ich wpływ na enzymy ochronne (18).

Właściwości kwasowo-zasadowe galanginy są ważne w rozważaniu procesu jej wchłaniania z przewodu pokarmowego. Ponieważ błona komórkowa ze względu na swoją strukturę lipidowo-białkową jest lepiej przepuszczalna dla niezdysoncjowanych cząsteczek leku niż dla jonów, wobec tego dyfuzja leku przez błonę biologiczną będzie funkcją jego pK oraz pH środowiska, w którym się on znajduje.

Wyznaczone stałe dysocjacji pozwalają na przeprowadzenie analizy dystrybucji galanginy w organizmie z równania *Hendersona-Hasselbalcha* (7).

Zgodnie z kwasowo-zasadową teorią podziału najważniejszym rodzajem wchłaniania jest transport bierny obojętnych cząsteczek. Galangina jako słaby kwas  $pK_1 = 7,5$  występuje w żołądku (pH 1–3,5) w formie niezdysoncjowanej. Ponieważ przez błonę przechodzą głównie niezdysoncjowane cząsteczki, więc ich ruch w przypadku galanginy będzie odbywał się z miejsca, w którym znajdują się one w większym stężeniu tzn. przy pH = 1 do miejsca, w którym ich stężenie jest mniejsze (przy pH 7,4). Galangina wchłonięta do osocza (pH ok. 7,4) występuje w nim jako forma obojętna w ok. 50%

i monoanionowa w ok. 50%. W przełożeniu na warunki fizjologiczne oznacza to, że galangina dobrze wchłania się ze środowiska kwaśnego, czyli z żołądka.

W jelitach galangina występuje w ok. 24% jako forma obojętna, w ok. 74 % jako forma monoanionowa i w ok. 2% jako forma dianionowa. Z zależności pomiędzy stopniem dysocjacji galanginy,  $pK_2 = 9,5$  i  $pH = 7,4$  ( $pH$  osocza krwi) wynika, że dla  $pH = 8$  ( $pH$  w dolnych odcinkach jelita) stężenie galanginy w jelitach jest co najmniej dwukrotnie wyższe niż w osoczu. Wchłanianie w jelitach jest słabe, ale dzięki budowie substancja może względnie łatwo przeniknąć przez cienką warstwę śluzówki o grubości  $25 \mu m$  zwłaszcza, że szybkość krwi krążącej po jej przeciwnej stronie zapewnia wysoki gradient stężenia.

## WNIOSKI

Metodą spektrofotometryczną można wyznaczyć tylko dwie pierwsze stałe dysocjacji galanginy. Pierwsza stała leży w zakresie obojętnym/słabo alkalicznym ( $pK_1 = 7,50 \pm 0,07$ ). Druga stała leży w  $pH$  bardziej alkalicznym ( $pK_2 = 9,70 \pm 0,05$ ).

Metoda potencjometryczna potwierdza wartość drugiej stałej dysocjacji ( $pK_2 = 9,58$ ) i pozwala wyznaczyć trzecią stałą:  $pK_3 = 10,30$ .

Metodami chemii kwantowej (AM1, PM3, *Ab initio*) modelowano reakcje dysocjacji galanginy. W oparciu o analizę parametrów fizykochemicznych ustalano właściwości kwasowo-zasadowe grup hydroksylowych. Przeprowadzono analizę następujących parametrów: energii całkowitej, energii wiązania, ciepła tworzenia, energii orbitali HOMO i LUMO. Analizując zarówno procesy dysocjacji jak i analizy można stwierdzić, że najsilniej ulega dysocjacji proton przy C-7, w dalszej kolejności przy C-3, natomiast najłatwiej ulega protonowaniu trianion galanginy przy C-5.

Wstępna analiza wyznaczonych parametrów fizykochemicznych pozwala na wykorzystanie niektórych z nich, jak: stałych dysocjacji, współczynnika podziału, energii wiązania oraz energii orbitalnych HOMO i LUMO jako podstawowych deskryptorów w dalszych badaniach zależności pomiędzy aktywnością i działaniem w grupie związków flawonoidowych.

Wartość  $\log P$  oraz stopnia jonizacji (w środowisku soku żołądkowego) obliczone dla galanginy pozwalają sądzić, że w przyszłości możliwe będzie szersze zastosowanie tego flawonoidu w lecznictwie w formie preparatów doustnych, np.: jako środka o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych w przypadku infekcji *Helicobacter pylori*.

C. Mielczarek, D. Kusztal

## STUDIES ON ACIDO-ALKALINE PROPERTIES OF GALANGIN

### Summary

The dissociation constants were determined by analytical methods. AM1, PM3 and *ab initio* quantum chemical methods were used to model the reaction of dissociation of galangin. Analysis of the resultant physicochemical parameters was performed to determine acid-basic properties of flavone hydroxyl groups. The process of selecting descriptors essential for undertaking further studies on the relationship between the acidity of hydroxyl groups and their biological effects was analyzed.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Mielczarek C., Brzezińska E.*: Flawonoidy w kosmetyce i kosmetologii. Część 1. Właściwości biologiczne flawonoidów. *Pol. J Cosmet*, 2000; 3 (1): 11-21. – 2. *Mielczarek C., Brzezińska E.*: Flawonoidy w kosmetyce i kosmetologii. Część 2. Surowce flawonoidowe i ich praktyczne zastosowanie. *Pol. J Cosmet*, 2000; 3 (2): 74-87. – 3. *Inokuchi Y., Shimazawa M., Nakaijima Y., Seumori S., Mishima S., Hara H.*: Brazilian Green Propolis Protects against Retina Damage In Vitro and In Vivo, *Evid. Based Complement Alternat Med.*, 2006; 3(1): 71-77. – 4. *Shimazawa M., Satomi Nobutaka Ch., Satoshi M., Mishima, Nagai H., Hara H.*: Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage, *Evid. Based Complement Alternat Med.*, 2005; 2(2): 201-207. – 5. *Dambros M., de Jongh R., van Koevinge G. A., Bast A., Heijnen C.G., van Kerrebroeck P.E.*: Flavonoid galangin prevents smooth muscle fatigue of pig urinary bladder, *J Pharm Pharmacol.*, 2005; 57(5): 617-622. – 6. *Capasso R., Tavares I.A.*: Effect of the flavonoid galangin on urinary bladder rat contractility in-vitro, *J Pharm Pharmacol.*, 2002; 54(8): 1147-1150. – 7. *Hermann T.W.*: Farmacja fizyczna, PZWL, Warszawa, 1999. – 8. *Mielczarek C.*, Analiza właściwości kwasowo-zasadowych rutyny i kwercetyny, *Farm. Pol.*, 2003; 59: 11-19. – 9. *Mielczarek C.*: Acid-base properties of selected flavonoid glycosides, *Eur. J. Pharm.Sci.*, 2005; 25: 273-279. – 10. *Incedy J.*: Równowagi kompleksowania w chemii analitycznej, PWN, Warszawa, 1979.
11. *Albert A., Serjeant E.P.*: The determination of Ionization Constants, Chapman and Hall, London, 1971. – 12. *Mielczarek C.*: Methoxychalcones and methoxyflavanones in analytical studies, *Pharmazie*, 2002; 57: 614-618. – 13. *Stanisz A.*: Przystępny kurs statystyki, StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków, 2001. – 14. *Kolos W.*, Elementy chemii kwantowej sposobem niematematycznym wyłożone, PWN, Warszawa 1979. – 15. *Kolos W., Sadlej J.*: Atom i cząsteczka, WNT, Warszawa, 1998. – 16. *Sobczyk L.*: Wiązanie wodorowe, *Wiad. Chem.*, 2001; 55: 595-626. – 17. *Nalewajski R.F.*: Podstawy i metody chemii kwantowej, PWN, Warszawa, 2001. – 18. *Wybieralska K.*: Towaroznawcza ocena wpływu składników mineralnych zawartych w produktach rynkowych na wybrane właściwości flawonoidów, Akademia Ekonomiczna w Poznaniu, Poznań, 2008.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1