

Реакционные пути окислительной трансформации радиопротектора кверцетина

В.В. Оличева¹, А.Д. Титова², И.Р. Ильясов¹, В.Н. Фатеенков³, А.В. Браун³

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119048, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук», 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
e-mail: 27nc_1@mil.ru

Поступила 01.09.2023 г. Принята к публикации 27.09.2023 г.

Кверцетин является одним из наиболее перспективных природных полифенольных радиопротекторных соединений. Это свойство основано на его радикал-улавливающей активности и высокой антиоксидантной емкости, в проявлении которой значительную роль играют продукты окислительной деградации кверцетина. Образование специфических метаболитов в процессе окисления кверцетина может обуславливать не только его радиопротекторные свойства, но и токсические проявления. *Цель работы* – обобщение полученных ранее данных в отношении реакционных путей окислительной трансформации кверцетина. *Материалы и методы.* Использовали общедоступные научные публикации, посвященные изучению процессов трансформации кверцетина. Метод анализа – описательный. *Обсуждение результатов.* Представлен обзор научных работ, посвященных кислородному окислению, радикал-инициируемого окисления, электрохимического и ферментативного окислений, приведены возможные продукты трансформации кверцетина и механизмы их образования. Наиболее характерные пути окисления кверцетина обусловлены химической структурой колец, проявляющей специфическую реакционную способность. Выявлено влияние состава растворителей на продукты окисления при автоокислении кверцетина, в то время как радикальная и электрохимическая модели окисления отличаются наличием полимерных аддуктов. Попадая в живой организм, кверцетин может связывать свободные радикалы, предотвращая тем самым пагубное влияние радиации, то есть обладает свойствами радиопротектора. *Выводы.* Кверцетин можно рассматривать как потенциальный радиопротектор за счет способности связывать свободные радикалы, образующиеся в биологических жидкостях живых организмов, подвергшихся воздействию радиации.

Ключевые слова: антиоксидант; кверцетин; полифенольное соединение; радиация; радиопротектор; трансформация.

Для цитирования: Оличева В.В., Титова А.Д., Ильясов И.Р., Фатеенков В.Н., Браун А.В. Реакционные пути окислительной трансформации радиопротектора кверцетина. Вестник войск РХБ защиты. 2023;7(3):237–247. EDN: wdghbh.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-3-237-247>

Reaction Pathways of Oxidative Transformation of the Radioprotector Quercetin

V.V. Olicheva¹, A.D. Titova², I.R. Ilyasov¹, V.N. Fateenkov³, A.V. Braun³

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «I.M. Sechenov First Moscow State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Trubetskaya Str., 8-2, Moscow 119991, Russian Federation
e-mail: rectorat@staff.sechenov.ru

Federal State Budgetary Establishment «N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences», Leninsky Avenue, 47, Moscow 119991, Russian Federation
e-mail: secretary@ioc.ac.ru

³Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
e-mail: 27nc_1@mil.ru

Received September 1, 2023. Accepted September 27, 2023

Quercetin is one of the most promising natural polyphenolic radioprotective compounds. This property is based on its radical-scavenging activity and high antioxidant capacity, in the manifestation of which the products of oxidative degradation of quercetin play a significant role. The formation of specific metabolites during the oxidation of quercetin can determine not only its radioprotective properties, but also toxic manifestations. *The purpose of this article is to summarize previously obtained data regarding the reaction pathways of oxidative transformation of quercetin. Materials and methods.* We used publicly available scientific publications dedicated to the study of quercetin transformation processes. The method of analysis is descriptive. *The discussion of the results.* A review of scientific works dedicated to oxygen oxidation, radical-initiated oxidation, electrochemical and enzymatic oxidation is presented, possible transformation products of quercetin and the mechanisms of their formation are given. The most characteristic oxidation pathways of quercetin are determined by the chemical structure of the rings, which exhibit specific reactivity. The influence of the solvent composition on the oxidation products during the autoxidation of quercetin was revealed, while the radical and electrochemical models of oxidation differ in the presence of polymer adducts. Once in a living organism, quercetin can bind free radicals, thereby preventing the harmful effects of radiation, that is, it has the properties of a radioprotector. *Conclusions.* Quercetin can be considered as a potential radioprotector due to its ability to bind free radicals formed in the biological fluids of living organisms exposed to radiation.

Keywords: antioxidant; polyphenolic compound; quercetin; radiation; radioprotector; transformation.

For citation: Olicheva V.V., Titova A.D., Ilyasov I.R., Fateenkov V.N., Braun A.V. Reaction Pathways of Oxidative Transformation of the Radioprotector Quercetin. *Journal of NBC Protection Corps.* 2023;7(3):237–247. EDN:wdghbh. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-3-237-247>

Среди большого числа представителей флавоноидов кверцетин (рисунок 1) выступает как одно из наиболее перспективных соединений для радиопротекции благодаря его широкой распространенности и характерных видов биологической активности, включая антиоксидантную, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную, антирадикальную, гастропротекторную, иммуномодулирующую и другие [1]. Источники кверцетина разнообразны – овощи, фрукты, орехи, семена и другие [2]. Радиопротекторные свойства кверцетина основаны в первую очередь на его радикал-улавливающей активности

и высокой антиоксидантной емкости, в проявлении которой немалую роль играют продукты окислительной дегградации кверцетина [3, 4]. Их образование может лежать в основе молекулярного механизма положительных эффектов кверцетина с одной стороны и обуславливать токсикологические проявления с другой. Попытки изучения путей и продуктов его окисления начались более ста лет назад. Так, первая статья по его окислению воздухом датирована 1912 г. [5]. Некоторые исследования указывают, что антиоксидантная активность продуктов окисления даже выше, чем исходно у кверцетина. Смесь продуктов окисления

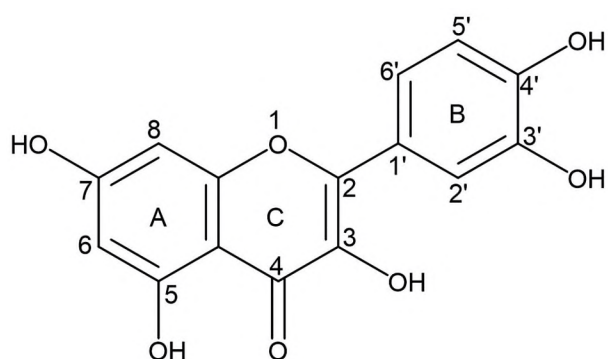


Рисунок 1 – Структурная формула кверцетина (2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4H-хромен-4-он) [6]

кверцетина в некоторых моделях демонстрирует в несколько раз большую активность, а некоторые индивидуально выделенные продукты окисления, например, 2,5,7,3',4'-пентагидрокси-3,4-флавандион или 2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидрокси-3(2H)-бензофуранон, существенно превосходят кверцетин по антиоксидантному эффекту [6].

Исследование и систематизация реакционных путей окислительной трансформации кверцетина – это необходимый этап на пути понимания молекулярных метаболических и токсикологических проявлений действия флавоноидов. К настоящему времени реакционные пути окислительной трансформации кверцетина изучались на разных моделях: автоокисления [7], электрохимического окисления в водных [8, 9] и неводных [10] растворах, биологического окисления под действием цитохрома С [11], в различных вариациях ферментативного окисления [12–15].

Цель работы – обобщение полученных ранее данных в отношении реакционных путей окислительной трансформации кверцетина.

Материалы и методы. Использовали общедоступные научные публикации, посвященные изучению процессов трансформации кверцетина. Метод анализа – описательный.

Кислородное окисление

Флавоноид кверцетин стабилен в кристаллической форме, однако в разбавленных водных растворах, особенно в щелочной среде, подвергается окислению кислородом воздуха, претерпевая автоокисление. Этот процесс протекает в сравнительно мягких условиях, в отсутствие радикальных инициаторов, комплексообразователей, ферментов или облучения. Модель автоокисления занимает важное место в изучении продуктов окисления кверцетина, так как, в частности, в работах И.Г. Зенкевича

и Т.И. Пушкаревой было показано, что общий контур хроматограмм продуктов автоокисления и свободнорадикального окисления кверцетина не совпадают, что указывает на различные пути превращений [16].

J.S. Barnes с соавт. изучали термически ускоренное окисление кверцетина в водном растворе при pH 5,9 и 7,4 с использованием оригинального устройства, обеспечивающего прямой ввод пробы во времяпролетный масс-спектрометр с электроспреей ионизацией и ионной ловушкой (ESI-IT-TOF-MS) без предварительного хроматографического разделения [17]. Динамику реакции контролировали в течение 20 минут с определенными временными интервалами. Дегградацию кверцетина ускоряли нагреванием до 65, 75 и 85 °С и повышением pH с 5,9 до 7,4 посредством добавления 150 мкМ раствора гидроксида натрия. Детектирование проводили в режиме регистрации отрицательных ионов методом tandemной масс-спектрометрии MS3 с активацией соударением и точностью по массе <5 ppm.

Обнаруженные 23 иона разделили на 4 группы: простые депротонированные кверцетин-подобные продукты одно- и двухэлектронного окисления, окисленные аддукты или аддукты с растворителем, продукты дегградации после раскрытия кольца С и соединения, полученные отщеплением небольших молекул.

Механизмы образования продуктов включали окисление, гидроксильное или расщепление колец в результате нуклеофильной атаки. При комнатной температуре основным пиком на спектре кверцетина является моноанион [Q-H]⁻ (*m/z* 301,0361); с повышением температуры и pH интенсивность этого пика снижается и появляются пики иных соединений.

В кислом небуферизованном водном растворе кверцетина при комнатной температуре помимо основного пика [Q-H]⁻ (*m/z* 301,0361) наблюдали следующие пики: кверцетина дианион [Q-2H]²⁻ (*m/z* 150,0148), *o*-хинона кверцетина моноанион [Q-H₂-H]⁻ (*m/z* 299,0207), кверцетина радикал-анион [Q-2H]⁻ (*m/z* 300,0262), 2,4,6-тригидроксифенилглиоксилат [Q-C₇H₅O]⁻ (*m/z* 197,0096), 2,3,4-халкантриона моноанион [Q+O-H]⁻ (*m/z* 317,0312), 2,3,4-халкантриона дианион [Q+O-2H]²⁻ (*m/z* 158,0118), 2,4,6-тригидроксифенилгликолят [Q-C₇H₃O]⁻ (*m/z* 199,0253). После нагревания интенсивность пиков [Q-H]⁻ и [Q-2H]²⁻ уменьшились, в то же время она увеличилась у пиков [Q-H₂-H]⁻, [Q+O-2H]²⁻, [Q+O-H]⁻, [Q-C₇H₅O]⁻, [Q-C₇H₃O]⁻, а также появился пик 3,4-дигидроксибензоата [Q-C₈H₅O₃]⁻ (*m/z* 153,0196).

В буферизованном водном растворе кверцетина (pH 7,4) при комнатной температуре

помимо пиков, обнаруженных при pH 5,9, наблюдали пики: дианиона *o*-хинона кверцетина $[Q-H_2-2H]^{2-}$ (m/z 149,0062), аддукта кверцетина моноаниона с натрием $[Q+Na-H]^-$ (m/z 323,0161), аддукта 2,3,4-халкантриона моноаниона с натрием $[Q+Na+O-H]^-$ (m/z 339,0128), 3,4-дигидроксибензоата $[Q-C_8H_5O_3]^-$ (m/z 153,0196), моноаниона *o*-хинона 2,3,4-халкантриона $[Q+O-H_2-H]^-$ (m/z 315,0460), 2,4,6-тригидроксибензоата $[Q-C_8H_5O_2]^-$ (m/z 169,0151). При нагревании появились пики 3,4-дигидроксибензилглиоксилата $[Q-C_7H_5O_2]^-$ (m/z 181,0149), 2-оксо-2-(3,4-хинон)ацетата $[Q-C_7H_7O_2]^-$ (m/z 178,9978), 4-формил-2-гидроксифенолята $[Q-C_8H_5O_4]^-$ (m/z 137,0242), 3,5-дигидроксифенолята $[Q-C_9H_5O_4]^-$ (m/z 125,0250), 3-гидроксифенолята $[Q-C_9H_5O_3]^-$ (m/z 109,0301).

Окисление с раскрытием кольца может происходить нуклеофильной атакой C2, C3 или C4 положения с отщеплением колец A или B.

Предпочтительным является путь окисления с последующей нуклеофильной атакой положения C2 растворителем, после чего происходит открытие цикла с формированием 2,3,4-халкантриона, который в свою очередь распадается с образованием 2-гидрокси-(2,4,6-тригидроксифенил)ацетат-иона $[Q-C_8H_5O_3]^-$ (m/z 199,0253) и 2-оксо-(2,4,6-тригидроксифенил)ацетат-иона $[Q-C_7H_5O]^-$ (m/z 197,0096), являющимися главными продуктами автоокисления кверцетина.

Во многом схожие продукты были получены в работе И.Г. Зенкевича и Т.И. Пушкаревой, в которой изучали окисление кверцетина при барботировании воздухом при pH 8–9 в течение 3 часов с последующим длительным выдерживанием на воздухе без перемешивания [16]. Таким образом получили несколько реакционных смесей с продуктами окисления разной степени стабильности. Перед анализом смеси обрабатывали муравьиной кислотой в итоговой концентрации 0,1 %. Смесь разделяли ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования и детектировали масс-спектрометрически с электроспрей-ионизацией и ионной ловушкой в режиме детектирования отрицательных ионов. На полученной хроматограмме зарегистрировали 57 продуктов окисления, однако идентифицировать получилось лишь часть из них. Для исключения изомерных структур продуктов окисления провели дополнительные исследования. Полученные данные совпадают с некоторыми продуктами окисления, описанными в работе J.S. Barnes с соавт. [17].

Подтвердилась структура следующих продуктов окисления: 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-оксоуксусной кислоты (m/z 181), 2-оксо-2-(2,4,6-тригидроксифенил)уксусной кислоты (m/z 197), 2,4,6-тригидроксибен-

зойной кислоты (m/z 169), 3,4-дигидроксибензойной кислоты (m/z 153), 1-(3,4-дигидроксифенил)-3-(2,4,6-тригидроксифенил)пропан-1,2,3-триона (m/z 317).

Обнаружены некоторые формы, существующие только в растворе: 2,2,5,7-тетрагидроксибензофуран-3(2H)-он (m/z 197), представляющий собой гидратную форму 2-оксо-2-(2,4,6-тригидроксифенил)уксусной кислоты, 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-2-карбоксифенилокси)гидроксиуксусная кислота, являющаяся полукеталем, образованным из 3,4-дигидроксибензойной кислоты, 2-(3,4-дигидроксифенил)-2,5,7-тригидроксихроман-3,4-дион, полукеталь 2,3,4-халкантриона, его таутомер и этиловый эфир, 2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидроксибензофуран-3(2H)-он, тривиальное название которого алфитонин, (Z)-3-(3,4-дигидроксифенил)проп-2-ен-1-он в виде енольной формы дикарбонильного соединения, изомер 2,3-дигидрокверцетина, этиловый эфир полукетала и его гидратная форма 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-этокси-5,7-дигидроксихроман-3,4-дион, полукеталь трикарбонильного соединения 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-этокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-2-этоксид-2-гидрокси-3-(2,4,6-тригидроксифенил)пропан-1,3-дион и 2-(3,4-дигидроксифенил)-3-этоксидхроман-3,5,7-триол.

Обнаружены продукты первичного взаимодействия кверцетина с кислородом: гидропероксиды и пероксиды (рисунок 2).

Влияние электроспрей-ионизации на образование димеров минимизировано условиями регистрации масс-спектров. Некоторые иденти-

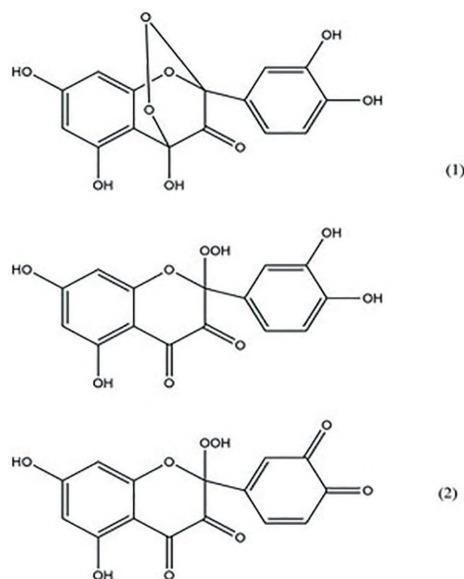


Рисунок 2 – Продукты первичного взаимодействия с кислородом – пероксиды и гидропероксиды [16]

фицированные продукты являются следствием взаимодействия других продуктов окисления, так, например, обнаруженный депсид 2-((3,4-дигидроксibenзоил)окси)-4,6-дигидроксibenзойная кислота образуется из 3,4-дигидрокси- и 2,4,6-тригидроксibenзойной кислот, а также 2-(5-((3,4-дигидроксibenзоил)окси)-2,4-дигидроксифенил)-2-оксоуксусной кислоты и ее таутомера.

Неустойчивые продукты окисления при выделении из раствора разлагаются, так один из часто упоминаемых в литературе продуктов окисления кверцетина – флороглюцин образуется из 2,4,6-тригидроксibenзойной кислоты и не был обнаружен в данном исследовании, однако указывается некоторыми авторами одним из основных продуктов окисления. Данные продукты были предположены на основе использованных инструментальных методов анализа, но выделение и идентификация не проводилась.

A. Zhou и O.A. Sadik [18] изучали окисление кверцетина в растворе этанол–PBS (pH 7,40), насыщенном кислородом воздуха. Реакцию окисления контролировали, отслеживая изменение УФ-спектра, что позволило предположить сильные структурные изменения, однако продукты идентифицировали с использованием ВЭЖХ-хроматографа с диодно-матричным детектором. Хроматограмма автоокисления продемонстрировала следующую совокупность продуктов: замещенный бензофуранон (1), его изомер (5) и этиловый эфир; хинон (2) (4 изомерных структуры), распадающийся на протокатеховую (3) кислоту и флороглюцинол карбоновую кислоту (4), изображенные на рисунке 3. Дальнейшее уточнение структуры произвели ГХ-МС анализом после дериватизации триметилсиланом и ЯМР ^1H . Обнаружили метиловые и этиловые сложные эфиры продуктов 3,4- и 2,4,6-тригидроксibenзолов (6), 2,4,6-тригидроксифенилглиоксалевою кислоту (7), депсид (8) и его этилированный аддукт.

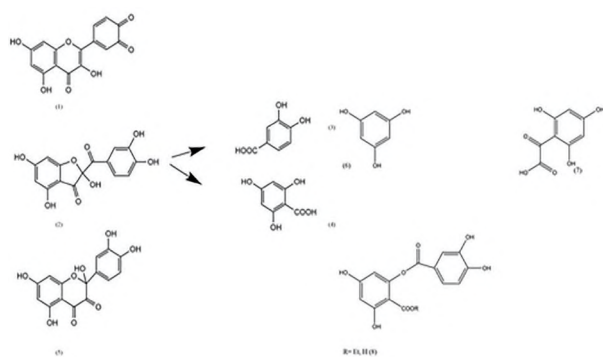


Рисунок 3 – Продукты окисления кверцетина [18]

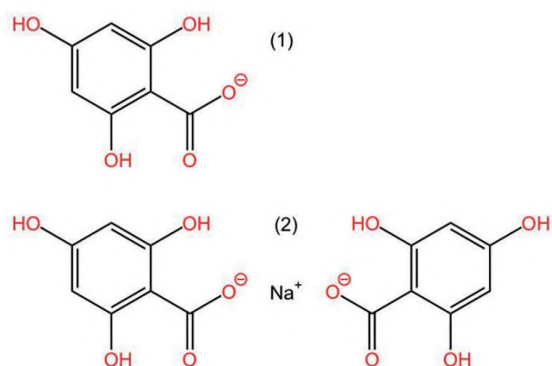


Рисунок 4 – Мажорные пики кислородного окисления водорода пероксида в водном растворе [19]

J.S. Barnes с соавт. [19] также изучили кислородное окисление кверцетина водорода пероксидом в водном растворе (pH 7,4). Структуры продуктов окисления были предложены по результатам анализа с помощью тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Инкубировали растворы кверцетина и водорода пероксида в соотношении 1:10. Хроматографическое разделение продуктов окисления не производили, пробу вводили с помощью шприца в оригинальное устройство, осуществляющее прямой ввод пробы во времяпролетный масс-спектрометр с электроспрей-ионизацией и ионной ловушкой, обеспечивающий точность по массе <math>< 5 \text{ ppm}</math>. Регистрировали мажорные пики $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$ (m/z 169,0140) (1), соответствующий структуре 2,4,6-тригидроксibenзоата, и $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_{10}\text{Na}$ (m/z 361,0168) (2), изображенные на рисунке 4. Последний идентифицировали как аддукт двух ионов 2,4,6-тригидроксibenзоата с ионом натрия. Сигналы обоих ионов имеют примерно равную высокую интенсивность относительно остальных сигналов спектра. Интересно, что некоторые ионы, обычно обнаруживаемые в водных растворах кверцетина, не были обнаружены при пероксид-индуцированном окислении – это $[\text{Q}-2\text{H}]^2-$, $[\text{2Q}-\text{H}]^-$, $[\text{Q}+2\text{H}+\text{Na}]^+$, что указывает на препятствие их образования под действием пероксида водорода.

Радикал-иницируемое окисление

В изученных моделях радикал-иницируемого окисления генератором свободных радикалов служил 2,2'-изобисизобутиронитрил (AIBN), который способен подвергаться термолизу с образованием алкилпероксидных радикалов (рисунок 5).

V. Krishnamachari с соавт. [20] изучали AIBN-индуцированное окисление кверцетина

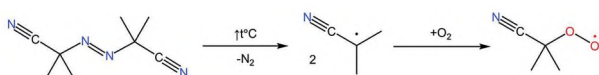


Рисунок 5 – Генерирование алкилпероксидных радикалов посредством термоллиза AIBN [20]

непосредственно в растворе ацетонитрила, а также при его подкислении и добавлении метанола. Все продукты были очищены и выделены ВЭЖХ и затем охарактеризованы ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопией в комбинации с ESI-IT-TOF-MS (рисунок 6). Получили 3 главных продукта окисления: 2-(3,4-дигидроксibenзол)-2,4,6-тригидрокси-3(2H)-бензофуранон (1); 1,3,11a-тригидрокси-9-(3,5,7-тригидрокси-4H-1-бензофуран-4-он-2-ил)-5a-(3,4-дигидроксифенил)-5,6,11-гексагидро-5,6,11-триоканафталин-12-он (2) и 2-(3,4-дигидроксибензоилокси)-4,6-дигидроксибензойная кислота (3), которые образовывались в разных соотношениях в различных условиях среды. Другой мажорный продукт 2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-2-метоксихроман-3,4-дион (4) или его аналог (5) обнаруживаются в кислом ацетонитриле с добавлением небольшого количества метанола или этанола соответственно. Оба продукта охарактеризованы с помощью ЖХ-МС. Продукта в среде метанола оказалось недостаточно для выделения с последующим анализом, в то же время аналог в необходимом количестве был успешно изучен посредством ЯМР ^1H и ^{13}C . Также изолирован и охарактеризован ЯМР-спектроскопией и ЖХ-МС один сопутствующий продукт окисления, в последствии идентифицированный как метил-3,4-дигидроксифенилглиоксилат (6).

А. Zhou и О.А. Sadik также изучали AIBN-индуцированное окисление кверцетина

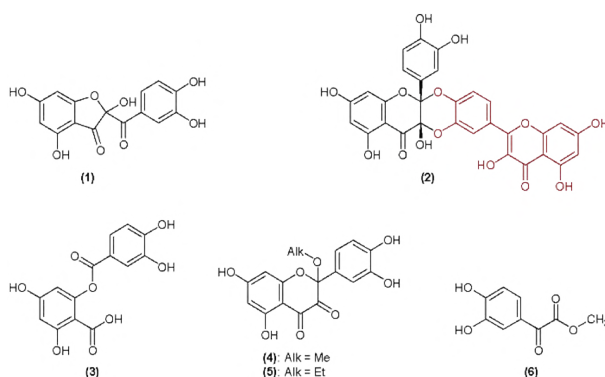


Рисунок 6 – Продукты AIBN-индуцированного радикального окисления [20]

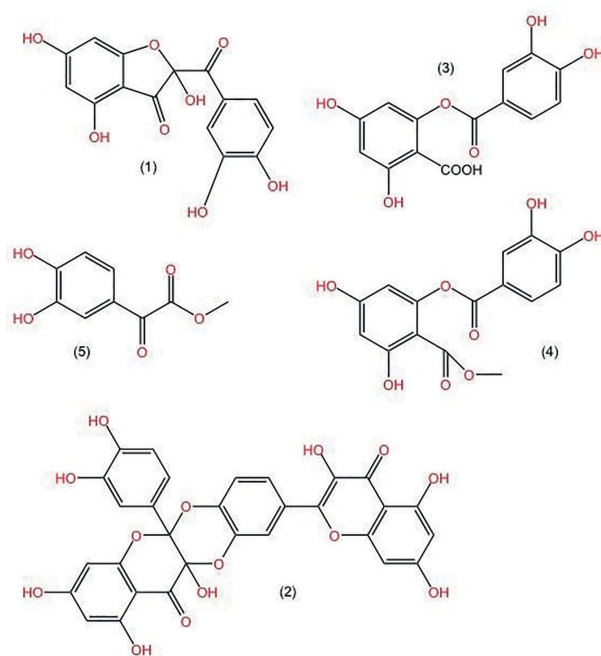


Рисунок 7 – Основные продукты AIBN-индуцированного окисления кверцетина [18]

под действием концентрированной соляной кислоты в ацетонитриле [18]. Реакцию проводили в течение 40 мин при температуре $60\text{ }^\circ\text{C}$ и постоянном спектрофотометрическом контроле в режиме реального времени. Затем в условиях пониженного давления удаляли ацетонитрил и остаток обрабатывали гексаном для освобождения смеси от остатков AIBN, которую после разделяли методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием, однако необходимое разделение пиков не было достигнуто. Данные ЖХ-МС, ГХ-МС и ЯМР ^1H , полученные после очистки колоночной хроматографией, напротив дают исчерпывающую информацию о продуктах окисления. Подтвердили структуры 4 соединений: 2-(3,4-дигидроксибензол)-2,4,6-тригидрокси-3(2H)-бензофуранона (1), димер (2), 2-(3,4-дигидроксибензоилокси)-4,6-дигидроксибензойной кислоты (3) и ее метилового сложного эфира (4), метил-3,4-дигидроксифенилглиоксилата (5) (рисунок 7).

Однако помимо перечисленных идентифицированы сопутствующие соединения: *o*-хинон кверцетина, 2,4,6-бензентриол, протокатеховая кислота и ее метиловый и этиловый эфиры, флороглюцинолкарбоновая кислота и ее метиловый и этиловый эфиры, 2,4,6-тригидроксифенилглиоксиловая кислота и ее метиловый эфир, метиленовый аддукт кверцетина, депсид и замещенный депсид, который в последствии гидролизуеться до ароматической кислоты и нестабильный *орто*-хинон.

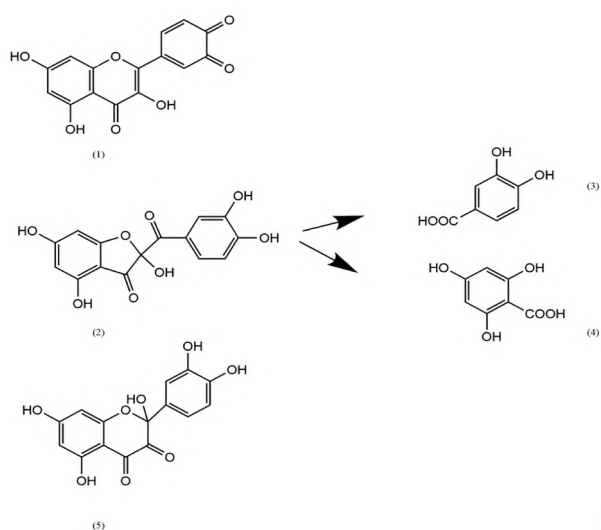


Рисунок 8 - Главные продукты электрохимического окисления [18]

Электрохимическое окисление

A. Zhou и O.A. Sadik осуществили электролиз при pH 7,4 в растворе этанол-PBS (1:1) [18]. В процессе окисления происходило изменение окраски раствора, для проверки образования промежуточных продуктов отбирали образцы через определенные интервалы времени и анализировали УФ-спектрометрией и ВЭЖХ с диодно-матричным детектором.

Данные приведенных методов исследования позволили предположить ряд продуктов окисления: замещенный бензофуранон (1) и его изомер (5); хинон (2) (4 изомерных структуры), распадающийся на протокатеховую (3) кислоту и флороглюцинол карбоновую (4) кислоту (рисунок 8). Для последних двух соединений с помощью высокочувствительной ГХ/МС обнаружены метиловые и этиловые сложные эфиры.

Дальнейшие исследования ЖХ-МС, ГХ-МС и ЯМР ^1H проводили после очистки колоночной хроматографией и уточняли структуры сопутствующих продуктов окисления: 2,4,6-тригидроксibenзол (1), 3,4-дигидрокси-

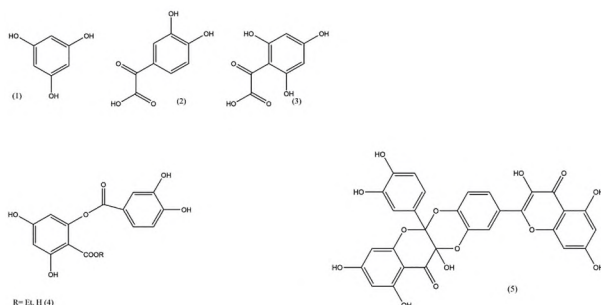


Рисунок 9 - Сопутствующие продукты электрохимического окисления [18]

фенилглиоксалева кислота (2), 2,4,6-тригидроксифенилглиоксалева кислота (3), депсид (4) и его этилированный аддукт, продукт полимеризации (5) (рисунок 9).

При изучении механизма электрохимического окисления в неводном растворе идентифицировали конечный продукт окисления с помощью ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием и ГХ-МС, им оказался 2-(3,4-дигидроксибензол)-2,4,6-тригидрокси-3(2H)-бензофуранон [10].

Ферментативное окисление

A. Zhou и O.A. Sadik смешивали кверцетин в среде ДМСО с натрий-фосфатным буфером и водой и добавлением натрий-фосфатного буферного раствора тирозиназы (2500 ЕД/мл), pH 6,8 [18]. Последующие 3 ч реакцию окисления контролировали спектрофотометрически. Появляющийся новый пик с максимумом при 335 нм и 2 изобестические точки при 281 и 345 нм. Параллельно каждые 30 мин отбирали пробу реакционной смеси. Реакцию останавливали добавлением 0,02 мл трифторуксусной кислоты (30 % в ацетонитриле) и отобранные ранее пробы исследовали ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием.

Электронные спектры тирозиназного и электрохимического окисления, а также автоокисления подобны, однако данные, полученные с помощью ВЭЖХ, демонстрируют различия продуктов окисления. Сравнивая результаты УФ-спектра, хроматограмм на 5, 30 и 180 минутах и данные ЯМР ^1H после очистки колоночной хроматографией можно обозначить следующие структуры продуктов окисления: быстро образующийся, но нестабильный хинон, нестабильный бензофуранон и его изомер, распадающийся на протокатеховую кислоту и флороглюцинол карбоновую кислоту.

S.B. Brown с соавт. провели ферментативное окисление кверцетина изотопом кислорода ^{18}O под действием фермента кверцетиназы с образованием депсида m/z 380 [21].

Таким образом, реакции окисления, индуцированные ферментами, селективны, а совокупность продуктов минимальна, относительно описанных моделей окисления – отсутствуют эфиры депсида, флороглюцинол карбоновой и протокатеховой кислот, 2,4,6-тригидроксифенилглиоксановая и 3,4-дигидроксифенилглиоксановая кислоты.

Основные продукты окислительной деградации кверцетина различными методами

Исходя из описанных моделей окисления кверцетина видно, что при различных путях окисления образуется схожий по химической

природе набор продуктов: неустойчивый орто-хинон, фурановое производное, депсид, флороглюцинолкарбоновая кислота и протокатеховая кислота.

Кольцо В кверцетина имеет пирокатехиновую природу, за счет чего очень легко подвергается окислению даже при кратковременном воздействии кислорода воздуха. Видимо поэтому, первый продукт окисления, обнаруженный во всех исследованиях – хинон, быстро появляющийся, но также быстро распадающийся на другие продукты окисления. А. Zhou и O.A. Sadik предположили, что далее из хинона, путем ряда превращений образуется халкантрион.

Кольцо С по химической структуре является γ -пироном (4Н-пирон-4) – псевдоароматической, относительно устойчивой структурой. При нуклеофильной атаке и окислении, например, при гидроксировании, может происходить раскрытие цикла и образование продуктов с отрывом колец А или В, или же с разрывом внутри кольца С. Кверцетин и продукты его окисления легко подвергаются щелочному гидролизу, что приводит к образованию гидрокси-замещенных ароматических кислот.

Наименьшее разнообразие продуктов наблюдается при ферментном окислении кверцетина, что, очевидно, обусловлено его высокой селективностью. Это проявляется в том числе тем, что образованные продукты окисления подвергаются меньшему количеству дальнейших превращений. В целом, совокупность продуктов окисления зависит от среды проведения реакции окисления и метода окисления и включает продукты деградации после раскрытия кольца С, продукты полимеризации, продукты с потерей молекул маленькой массы, гидроксированные и пероксированные продукты.

Для окисления в водных растворах характерно многообразие форм, относительно устойчивых только в водной среде. Как сам кверцетин, так и некоторые продукты его окисления, являющиеся поликарбонильными соединениями, могут существовать в растворе в виде гидратных форм и их производных. Среди обнаруженных продуктов автоокисления присутствуют гидратные формы, полукетали – алкилированные гидратные формы поликарбонильных соединений, енольные формы,

этиловые эфиры полукеталей и их гидратные формы [16]. Полукетали и эфиры образуются при использовании водно-этанольной смеси в качестве растворителя. Следовательно, при автоокислении в водно-этанольной среде более предпочтительно окислительное гидроксирование фрагмента 4Н-пирона с раскрытием кольца С и дальнейшим образованием фуранового производного или открытой формы и гидролиз по разным положениям. Разнообразие продуктов обусловлено низкой селективностью протекания реакции, так связи, подверженные щелочному гидролизу, разрушаются, а гидроксирование может протекать по различным центрам с образованием гидратных форм в растворе, енолизацией и алкилированием по гидроксильным группам. Таким образом, автоокисление в спиртовой среде дает меньший набор продуктов, так как исключено образование устойчивых гидратных форм и полукеталей [18].

Еще один возможный путь окисления – окислительная полимеризация. Механизм образования димеров, обнаруженных при радикальном и электрохимическом окислении вариативен [11, 22, 23]. Обнаруживали димеры различной структуры, однако данные ЖХ-МС для различных моделей сходятся между собой в проявлении пика молекулярного иона m/z 601.

Заключение

Таким образом, наиболее характерные пути окисления кверцетина обусловлены химической структурой колец, проявляющей специфическую реакционную способность. Стоит отметить легкость окисления кольца В и раскрытие цикла С посредством нуклеофильной атаки. Выявлено влияние состава растворителей на продукты окисления при автоокислении кверцетина, в то время как радикальная и электрохимическая модели окисления отличаются наличием полимерных аддуктов. Несмотря на различные механизмы образования, зависящие от условий окисления, описаны основные продукты, характерные для всех описанных моделей. На основании этих данных кверцетин можно рассматривать как потенциальный радиопротектор за счет способности связывать свободные радикалы, которые образуются в биологических жидкостях живых организмов, подвергшихся воздействию радиации.

Список источников/References

1. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev.* 2016;10(20):84–9. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
2. Oboh G, Odubanjo V, Bello F, Ademosun AO, Oyeleye SI, Nwanna Emem EE, Ademiluyi AO. Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities *in vitro*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(2):131–40. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0049>
3. Benković V, Knezević AH, Dikić D, Lisicić D, Orsolić N, Basić I, Kopjar N. Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60(2):129–38. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1908>
4. Patil SL, Mallaiiah SH, Patil RK. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J Med Phys.* 2013;38(2):87–92. <https://doi.org/10.4103/0971-6203.111321>
5. Nierenstein M, Whedale M Anthocyanin I. Anthocyanin-like Oxidation Products of Quercetin. *Ber Deut Chem Ges.* 1912;(44):3487–91.
6. Fuentes J, Atala E, Pastene E, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Quercetin Oxidation Paradoxically Enhances its Antioxidant and Cytoprotective Properties. *J Agric Food Chem.* 2017;65(50):11002–10. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05214>
7. Zenkevich IG, Eshchenko AY, Makarova SV, Vitenberg AG, Dobryakov YG, Utsal VA. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules.* 2007;12(3):654–72. <https://doi.org/10.3390/12030654>
8. Черников ДА, Пальшин ВА, Баженов БН, Сафронов АЮ, Кашевский АВ. Гидроксиацетофеноны – новые модели при изучении электроокисления кверцетина. *Известия ВУЗов. Химия и химическая технология.* 2012;55(8):43–7.
Chernikov DA, Palshin VA, Bazhenov BN, Safronov AY, Kashevsky AV. Hydroxyacetophenones are new models in the study of quercetin electrooxidation. *ChemChemTech [Izv Vyssh Uchebn Zaved Khim Khim Tekhnol].* 2012;55(8):43–7 (In Russian).
9. Makhotkina O, Kilmartin PA. Electrochemical Oxidation of Wine Polyphenols in the Presence of Sulfur Dioxide. *J Agric Food Chem.* 2013;61(23):5573–81. <https://doi.org/10.1021/jf400282z>
10. Sokolová R, Degano I, Ramešová S, Bulíčková J, Hromadová M, Gál M, et al. The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *Electrochimica Acta.* 2011;56(21):7421–7. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.04.121>
11. Cherviakovsky EM, Bolibrukh DA, Baranovsky AV, Vlasova TM, Kurchenko VP, Gilep AA, Usanov SA. Oxidative modification of quercetin by heme proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(2):459–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.001>
12. Takahama U, Hirota S, Nishioka T, Yoshitama K. Oxidation of Quercetin by Salivary Components II. Effects of Quercetin on Reactive Oxygen Metabolism by Salivary Polymorphonuclear Leukocytes. *Food Science and Technology Research.* 2002;8(3):276–80. <https://doi.org/10.3136/fstr.8.276>
13. Kubo I, Nihei K, Shimizu K. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorganic Medicinal Chemistry.* 2004;12(20):5343–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.050>
14. Momić T, Savić J, Vasić V. Oxidation of Quercetin by Myeloperoxidase. *Research Letters in Physical Chemistry.* 2009;2009:614362. <https://doi.org/10.1155/2009/614362>
15. Takahama U, Oniki T, Hirota S. Oxidation of Quercetin by Salivary Components. I. Salivary Peroxidase-Dependent Oxidation of Quercetin and Characterization of the Oxidation Products. *FSTR.* 2002;8(2):148–53. <https://doi.org/10.1021/jf011697q>
16. Zenkevich IG, Pushkareva TI. О моделировании механизма образования димерных продуктов окисления флавоноидов. *Химия растительного сырья.* 2018;(3):185–97. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033589>
Zenkevich IG, Pushkareva TI. On modeling the mechanism of formation of dimeric oxidation products of flavonoids. *Chemistry of plant raw materials.* 2018;(3):185–97 (In Russian). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033589>
17. Barnes JS., Schug KA. Oxidative Degradation of Quercetin with Hydrogen Peroxide Using Continuous-Flow Kinetic Electrospray-Ion Trap-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2014;62(19):4322–31. <https://doi.org/10.1021/jf500619x>

18. Zhou A, Sadik OA. Comparative Analysis of Quercetin Oxidation by Electrochemical, Enzymatic, Autoxidation, and Free Radical Generation Techniques: A Mechanistic Study. *J Agric Food Chem.* 2008;56(24):12081–91.

<https://doi.org/10.1021/jf802413v>

19. Barnes JS, Foss FW Jr, Schug KA. Thermally Accelerated Oxidative Degradation of Quercetin Using Continuous Flow Kinetic Electrospray-Ion Trap-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;24(10):1513–22.

<https://doi.org/10.1007/s13361-013-0698-6>

20. Krishnamachari V, Levine LH, Paré PW. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging. *J Agric Food Chem.* 2002;50(15):4357–63.

<https://doi.org/10.1021/jf020045e>

21. Brown SB, Rajananda V, Holroyd JA, Evans EG. A study of the mechanism of quercetin oxygenation by ¹⁸O labelling. A comparison of the mechanism with that of haem degradation. *Biochem J.* 1982;205(1):239–44.

<https://doi.org/10.1042/bj2050239>

22. Miller E, Schreier P. Studies on flavonol degradation by peroxidase (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 1–Kaempferol. *Food Chemistry.* 1985;17(@):143–54.

[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(85\)90111-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(85)90111-6)

23. Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tsuchiya K, Shibata H, et al. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J Agric Food Chem.* 2006;54(10):3551–7.

<https://doi.org/10.1021/jf060251c>

Вклад авторов / Authors Contribution:

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.Н. Фатеенков** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи; **И.Р. Ильясов** – коррекция текста рукописи, переработка текста; **А.В. Браун** – редактирование текста рукописи; **В.В. Оличева** – анализ данных научной литературы; **А.Д. Титова** – составление рисунков / All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.N. Fateenkov** – conceptualized the study, drafted the manuscript; **I.R. Ilyasov** – corrected and revised manuscript; **A.V. Braun** – edited the manuscript; **V.V. Olicheva** – analysed scientific literature; **A.D. Titova** – prepared the pictures.

Информация о конфликте интересов / Conflict of interest statement

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов. / The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been double-blind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Финансирование / Funding

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования / The authors state that there is no funding for the study.

Об авторах / Authors

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119048, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

Оличева Вера Владимировна. Студентка Института Фармации им. А.П. Нелюбина,

ORCID: 0009-0004-6866-218X

Ильясов Игорь Равилевич. Доцент кафедры химии Института Фармации им. А.П. Нелюбина, канд. фарм. наук, доцент.

ORCID: 0000-0001-9822-3322

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук», 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47.
Титова Александра Дмитриевна. Аспирантка.
ORCID: 0009-0003-3252-6322

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр им. академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, Проезд Энтузиастов, д. 19.

Фатеенков Владимир Николаевич. Начальник отдела, канд. воен. наук, доцент, профессор АВН.

Браун Аркадий Владимирович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук.

Контактная информация автора: Оличева Вера Владимировна; vera.olicheva@inbox.ru

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «I.M. Sechenov First Moscow State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Trubetskaya Str., 8-2, Moscow 119991, Russian.

Vera V. Olicheva. Student. Institute of Pharmacy named after A.P. Nelyubin, Sechenov University.

ORCID: 0009-0004-6866-218X

Igor R. Iyasov. Associate Professor. Department of Chemistry. Institute of Pharmacy named after A.P. Nelyubin, Sechenov University. Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor.

ORCID: 0000-0001-9822-3322

Federal State Budgetary Establishment «N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences», Leninsky Avenue, 47, Moscow 119991, Russian Federation.

Alexandra D. Titova. Postgraduate.

ORCID: 0009-0003-3252-6322

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Arkadii V. Braun. Research associate. Cand. Sci. (Chem.).

Vladimir N. Fateenkov. Head of Department. Cand. Sci. (Military), Associate Professor, Professor at the AMS.

Contact information for author: Vera Vladimirovna Olicheva; vera.olicheva@inbox.ru