Određivanje pKa vrijednosti morina

Cepanec, Matija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:795094

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Matija Cepanec

Određivanje pK_a vrijednosti morina

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić
Komentor: doc.dr.sc. Željka Lončarić

Osijek, 2022.

SAŽETAK

Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroksiflavon, $C_{15}H_{10}O_7$) je bioflavonoid koji se može naći u brojim biljkama i biljnim prerađevinama. Smatra se fitokemikalijom te se ubraja u skupinu flavonola. Utvrđeno je da ima širok raspon farmakoloških djelovanja, uključujući protuupalno i antidijabetičko djelovanje, a njegova antikancerogena i antioksidacijska svojstva su predmet daljnjih istraživanja. Konstanta kisele disocijacije, pK_a (također poznata kao konstanta kiselosti ili konstanta kisele ionizacije) je kvantitativna mjera jačine kiseline u otopini. Vrijednost pK_a ovisi o strukturi spoja, a može se odrediti eksperimentalno i predvidjeti računalno. Međutim, pK_a za brojne spojeve nije eksperimentalno određena zbog kompleksnosti njihove strukture, pa računalni programi mogu imati veliki značaj u predviđanju vrijednosti ovog parametra. U ovom radu primjenom *ACD/pK$_a$* predviđene su pK_a vrijednosti za morin. Korištena su dva algoritma inkorporirana u *Perceptu.* Dobiveni rezultati ukazuju na redoslijed disocijacije funkcijskih skupina morina te samu pH pri kojoj se disocijacija odvija.

Ključne riječi: morin, pK_a, ACD

ABSTRACT

Morin (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone, $C_{15}H_{10}O_7$) is a bioflavonoid and can be found in many plants and plant products. It is a phytochemical and belongs to the group of flavonols. It shows a wide range of pharmacological effects, including anti-inflammatory and antidiabetic effect, and its anticancer and antioxidant properties are still being researched. The acid dissociation constant, pK_a (also known as the acidity constant or acid ionization constant) is a quantitative measure of the strength of an acid in a solution. The pK_a value depends on the structure of the compound and can be determined experimentally and computationally. For many compounds, pK_a has not been determined experimentally due to the complexity of their structure, so computer programs can be of great importance in predicting the value of this parameter. In this thesis, *ACD/pK$_a$* was used to predict pK_a values of morin. Two algorithms implemented in *Percepta* were used. Obtained results indicate order of dissociation of functional groups of morin and pH at which the dissociation occurs.

Key words: morin, pK_a, ACD

SADRŽAJ

1. Uvod ……... 1

2. Literaturni pregled …….. 2

2.1. Polifenoli …… 2

2.1.1. Flavonoidi ……. 3

2.1.2. Flavonoli ……... 5

2.1.3. Morin …… 6

2.2. Definicija i značaj pK_a ……... 8

2.2.1. Eksperimentalne metode određivanja pK_a ……..... 10

2.2.1.1. Potenciometrijska titracija ……. 11

2.2.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija …… 12

2.2.1.3. UV-VIS spektroskopija ……. 12

2.2.1.4. Elektroforeza ……. 13

2.2.1.5. Kapilarna elektroforeza ……. 14

2.2.2. Računalne metode određivanja pK_a …….. 15

2.2.2.1. *Epik* ……... 15

2.2.2.2. *ADME/ToxWEB* …… 16

2.2.2.3. *CSpKaPredictor* …… 17

2.2.2.4. *ACD/pK$_a$* …… 17

2.2.2.5. *Marvin* ……... 17

3. Materijali i metode ……. 19

4. Rezultati i rasprava ……. 20

5. Zaključak …… 50

6. Literaturna vrela ……. 51

1. Uvod

Polifenoli su velika skupina organskih spojeva koja je široko zastupljena u prirodi, a karakteriziraju ju višestruke fenolne jedinice. Ima ih u izobilju u biljkama i strukturno su raznoliki. Polifenoli se mogu podijeliti na nekoliko načina, a prema jednoj od podjela polifenoli uključuju flavonoide, taninsku kiselinu i elagitanine. Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka, koji se stoga često konzumiraju u prehrani. Osnovnu strukturu flavonoida čini kostura sastavljen od 15 atoma ugljika, koji se sastoji od dva fenilna prstena i heterocikličkog prstena. Ova struktura može se skraćeno prikazati C6–C3–C6 [1].

Morin je bioflavonoid koji je izvorno izoliran iz članova porodice dudova, Moraceae, ali je sastavni dio mnogih drugih biljaka a time i biljnih proizvoda. Dokazana je njegova bioaktivnost, posebice antioksidativni karakter. Posebno je zanimljiva njegova mogućnost vezanja za DNA te mnoga istraživanja pokušavaju iskoristiti to svojstvo za borbu protiv karcinoma [1].

Konstanta kisele disocijacije je kvantitativna mjera jačine kiseline u otopini, a poznata je kao konstanta disocijacije u kontekstu acidobaznih reakcija. Pomoću pK_a vrijednosti može se utvrditi struktura nekog spoja pri određenoj pH, a time i svojstva ili aktivnost tog spoja pri istoj pH. Vrijednost pK_a se može odrediti eksperimentalno i/ili računalno, pomoću raznih softvera. Cilj ovog rada bio je odrediti pK_a morina pomoću programa ACD/pK_a te usporediti dobivene rezultate s literaturno dostupnim.

U prvom dijelu rada dan je kratak osvrt na polifenole te su ukratko prikazane glavne karakteristike najvećih skupina polifenola. U radu je dan kratki pregled osnovnih značajki morina, definiran je pojam pK_a te je pojašnjena njegova važnost i uloga. Ukratko su prikazane odabrane eksperimentalne metode određivanja pK_a, kao i odabrani računalni programi.

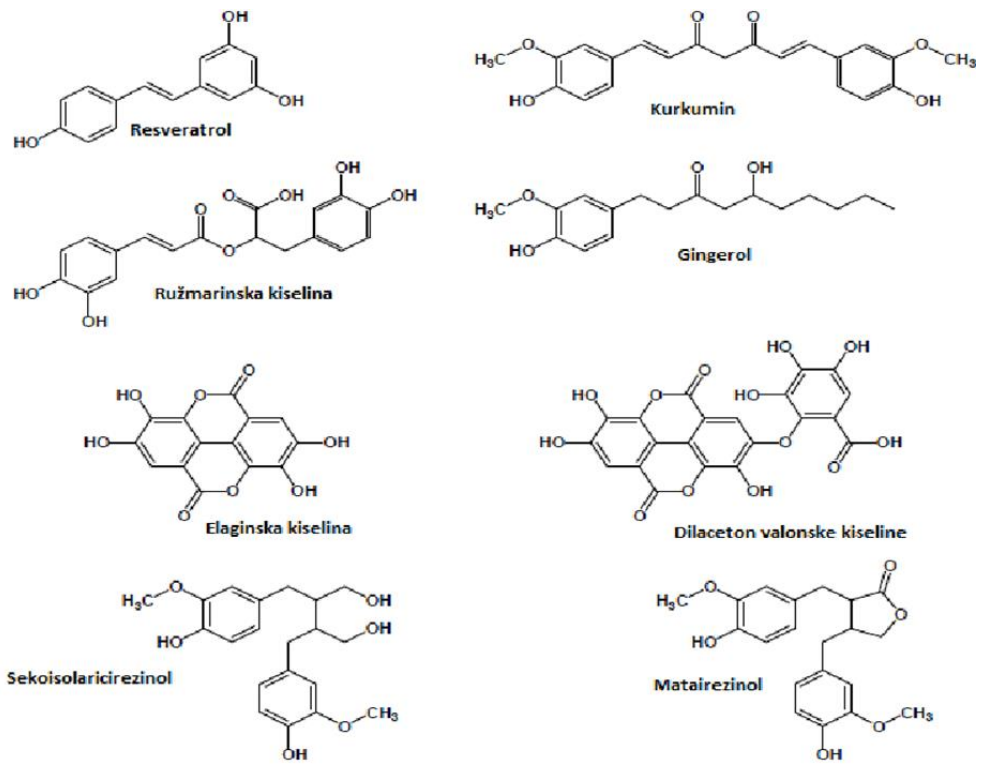
U drugom dijelu rada opisana je korištena metodologija. Dobiveni rezultati su prikazani adekvatno te su pojašnjeni i uspoređeni s literaturno dostupnim. Za izračune su korištena dva algoritma inkorporirana u *Perceptu.* Iz dobivenih rezultata može se predvidjeti redoslijed disocijacije funkcijskih skupina morina te pH pri kojoj se disocijacija tih skupina odvija. Temeljem dobivenih rezultata može se izračunati udio pojedinih čestica pri određenoj pH, na temelju čega se može predvidjeti ponašanje morina, odnosno njegova bioaktivnost pri danoj pH.

2. Literaturni pregled

2.1. Polifenoli

Polifenoli su velika skupina prirodnih organskih spojeva. Kako je osnovna građevna jedinica ovih spojeva fenolna jedinica, možemo reći da su to spojevi karakterizirani višestrukim fenolnim jedinicama. Polifenoli su jedna od najraznovrsnijih i najrasprostranjenijih skupina organskih spojeva u biljnom carstvu. Trenutno je identificirano preko 8000 fenolnih struktura, a među njima je identificirano preko 4000 flavonoida. Iako su polifenoli kemijski karakterizirani kao spojevi s fenolnim strukturnim značajkama, ova skupina prirodnih spojeva vrlo je raznolika i sadrži nekoliko podskupina. Voće, povrće, žitarice i razne vrste hrane i pića (kao što su čaj, čokolada i vino) bogati su izvori polifenola [1].

Strukturna raznolikost i široka rasprostranjenost polifenola doveli su do različitih načina kategoriziranja ovih prirodnih spojeva. Polifenoli se mogu klasificirati prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Također, većina je polifenola u biljkama prisutna kao glikozid, s različitim šećernim jedinicama i u obliku aciliranih šećera [2].



Slika 1. Primjeri spojeva s fenolnom strukturnom jedinicom [2].

Polifenoli se biosintetiziraju na dva načina, koji se mogu odvijati neovisno jedan o drugom ili zajedno. Jedan put biosinteze uključuje vezanje jedinica s dva ugljika, odnosno aktiviranih acetata, do formacije poliketida, koji se podvrgavaju naknadnoj ciklizaciji u polifenole. Drugi mehanizam je put cinamične kiseline, kojim se većina fenolnih spojeva biosintetizira. Ovim putem, ugljikohidratni prekursori glikoliznog puta i puta pentoza--fosfata prevode se u aromatske aminokiseline fenilalanin, tirozin i triptofan. Cijepanjem amonijaka pomoću enzima fenilalanin amonijak-liaze te daljnjim koracima nastaje cimetna kiselina, koja se potom prevodi u *p*-hidroksicimetne kiseline. Nakon toga slijedi uzastopno dodavanje hidroksilnih i metoksilnih skupina čime dolazi do stvaranja kavene i ferulične kiseline, koje su prekursori najveće skupine polifenola, odnosno flavonoida [3].

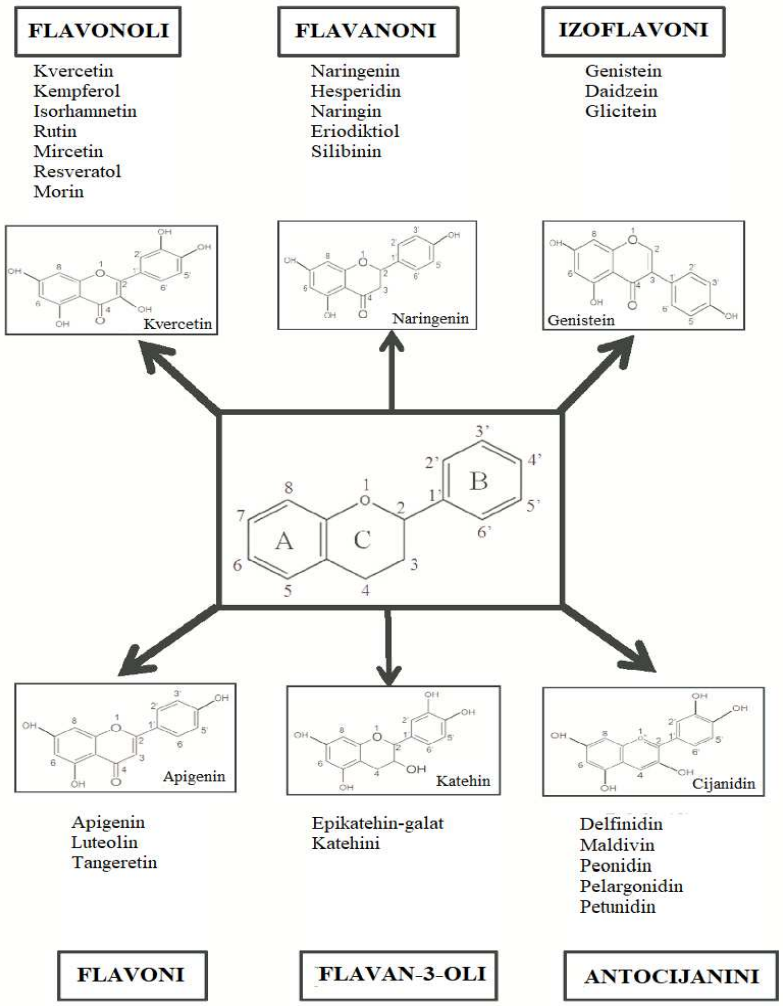
U biljkama se ovi spojevi obično sintetiziraju djelovanjem fizioloških i okolišnih stimulatora, ali imaju niz različitih uloga. Glavne klase polifenola su flavanoli (npr. katehini i tanini iz čaja), flavanoni (npr. hesperidin iz citrusa), flavonoli (npr. kvercetin iz čaja, jabuke i luka), hidroksicimetne kiseline (fenolne kiseline, nalaze se u kavi, voću i povrću) i antocijana (obojeni polifenoli u voću i povrću). Slika 1. prikazuje strukture nekih (poli)fenolnih spojeva, odnosno spojeva u čijoj se strukturi nalazi fenolna jedinica [3].

Učinak polifenola na zdravlje prvenstveno ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. Brzina apsorpcije u crijevima određena je njihovom strukturom i metabolizmom koji se odvija u tankom i debelom crijevu. Kao što je već spomenuto, polifenoli, posebno njihovi glikozidi, najvažniji su sekundarni metaboliti biljaka u ljudskoj prehrani koji imaju širok raspon zdravstvenih dobrobiti. Redovita konzumacija hrane bogate polifenolima može pomoći u smanjenju učestalosti kardiovaskularnih bolesti, raka debelog crijeva, bolesti jetre, pretilosti, dijabetesa, itd. Stoga se posljednjih godina polifenolima daje sve više pozornosti, pa se mnogi aspekti njihovih kemijskih i bioloških aktivnosti identificiraju i evaluiraju. Ovi prirodni spojevi našli su posebno mjesto u farmaceutskoj industriji i medicinskoj kemiji te se danas koriste za dizajn i razvoj novih lijekova [3].

2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su fenolni spojevi široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Sastoje se od flavanola (katehina, leukoantocijanidina), proantocijanida, antocijanidina, flavona i flavonola (u toj skupini se nalazi i morin), flavanona i čalkona, izoflavonoida te biflavonoida i neoflavanoida (Slika 2.). Razlike između ovih spojeva proizlaze iz broja i rasporeda hidroksilnih skupina kao i iz moguće alkilacije i/ili glikozilacije ovih skupina. U prirodi se

mogu naći u raznim dijelovima biljke, na primjer u kori, korijenu, stabljici, cvijetu, plodu i sjemenu. Neki flavonoidi su cvjetni pigmenti te se mogu naći u većini kritosjemenjača. Antocijanidini, koji daju plavu i crvenu boju bobičastom voću, kao i flavoni (koji daju žutu boju bilju) i flavonoli (morin je žuti prah) u biljkama su prisutni gotovo isključivo kao glikozidi [4].



Slika 2. Klasifikacija flavonoida [5].

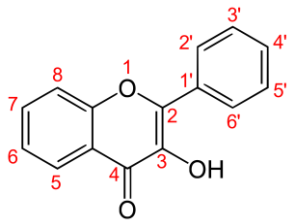
Ovi prirodni spojevi poznati su po svojim blagotvornim učincima na zdravlje pa se danas smatraju nezamjenjivom komponentom u raznim nutraceutskim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim preparatima. Biološka aktivnost koju ovi spojevi pokazuju uključuje antialergijsko, antivirusno, antioksidacijsko, antimutageno, antikancerogeno, protuupalno i vazodilatacijsko djelovanje. Osim toga, imaju sposobnost modulacije ključnih staničnih funkcija, a poznati su kao snažni inhibitori nekoliko enzima, kao npr. ksantin

oksidaza, ciklooksigenaza, lipoksigenaza i fosfoinozitid 3-kinaza. Neki flavonoidi imaju povoljne učinke na bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, raznih tipova raka, Alzheimera, ateroskleroze, i sl. Ipak, najveći interes današnjih istraživanja posvećen je antioksidacijskom djelovanju flavonoida koji je rezultat njihove sposobnosti redukcije stvaranja suvišnih slobodnih radikala i uklanjanja viška slobodnih radikala [4].

Mehanizam djelovanja flavonoida još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Trenutačni trendovi istraživanja flavonoida odnose se na izolaciju, identifikaciju, karakterizaciju, ispitivanje bioaktivnosti i konačno njihovu primjenu za zdravstvenu dobrobit [4].

2.1.2. Flavonoli

Flavonoli i njihovi derivati (galokatehini) su flavonoidi koje se često naziva proantocijanidinima, budući da kiselinom kataliziranim cijepanjem polimernog lanca flavonolnih molekula nastaju antocijanidini. Flavonoli se nalaze u raznom voću i povrću. Luk (*Allium cepa* L.), kelj (*Brassica oleracea* L. *ssp. bullata* DC.), zelena salata (*Lactuca sativa* L.), rajčica (*Solanum lycopersicum* L.), jabuka (*Malus domestica* Borkh.), grožđe (*Vitis vinifera* L.) i razne vrste bobičastog voća su bogati izvori flavonola. Osim voća i povrća, crni čaj i crno vino također su izvori flavonola. Najviše proučavani flavonoli su kaemferol, kvercetin, miricetin i fisetin, a početkom 21. stoljeća se javilo zanimanje znanstvenika i za morin [5].



Slika 3. Struktura flavonola s označenom numeracijom atoma [6].

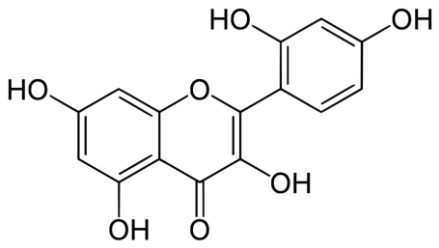
Utvrđeno je da flavonoli imaju širok raspon pozitivnih učinaka na zdravlje, potonja podrazumijevaju antioksidativni potencijal i smanjen rizik od kardiovaskularnih bolesti. U usporedbi s flavonima, flavonoli imaju hidroksilnu skupinu u položaju C3 (Slika 3.), koji također može biti glikoziliran. Kao flavoni, flavonoli su vrlo raznoliki u metilaciji i

hidroksilaciji, uzimajući u obzir različite obrasce, oni su možda najčešća i najveća podskupina flavonoida u voću i povrću [5].

2.1.3. Morin

Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroksiflavon) je bioflavonoid koji pripada klasi flavonola, što znači da je karakteriziran hidroksilnom skupinom na položaju C3. To je 7-hidroksi-flavonol koji sadrži tri dodatne hidroksilne skupine na pozicijama 2′, 4′ i 5 (Slika 4., a na Slici 3. je prikazana numeracija atoma) [6].

Morin je izoliran kao žuti pigment iz biljaka porodice Moraceae, ali se može naći u još nekoliko različitih vrsta voća i povrća, kao što su badem (*Prunus dulcis* Mill.), guava (*Psidium guajava* L.), malkura (*Malcura tinctoria* (L.) Steud.), gorka naranča (*Citrus aurauntium* L.) i dr., ali i u nekoliko vrsta pića kao što su čaj i crno vino. Osim toga, morin je jedan od čestih sastojaka tradicionalnih biljnih lijekova, a tradicionalna medicina ga preporučuje za liječe nekoliko bolesti. Morin je bioaktivan spoj koji pokazuje širok raspon farmakoloških aktivnosti i vrlo nisku citotoksičnost. Međutim, točni mehanizmi biološkog djelovanja morina još nisu u potpunosti razjašnjeni [7].



Slika 4. Struktura morina [7].

Jedna od osobitosti morina je snažan antioksidacijski i antiradikalski karakter. Za razliku od ostalih polifenola, koji mogu generirati reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) podvrgavanjem autooksidaciji, morin zadržava svoj antioksidacijski karakter čak i pri visokoj koncentraciji. Antioksidacijski potencijal morina rezultat je postojanja dvostruke veze između C2–C3 atoma i prisutnosti hidroksilne skupine (–OH), koja aktivira dvostruku vezu na poziciji C3. Nadalje, antioksidacijskom potencijalu morina pridonose i hidroksilne skupine na 2′ i 4' položaju drugog prstena (prsten B). U isto vrijeme, hidroksilna skupina na 4' poziciji prstena B je odgovorna za snažno antiradikalsko djelovanje

ne samo morina, već i kvercetina i miricetina. Dodatna hidroksilna skupina na poziciji 2′ prstena B daje morinu veću antiradikalsku moć u odnosu na spomenute spojeve. Naime, utvrđeno je da hidroksilna skupina na položaju 2' B prstena stvara intramolekularnu vodikovu vezu tvoreći tako stabilniju struktura čime se dodatno pospješuje antiradikalski potencijal morina [8].

Rak je jedan od glavnih zdravstvenih problema u svijetu. To je skupina bolesti uzrokovanih nepravilnim rastom stanica s invazivnim potencijali. Visok postotak prevalencije i smrti od raka diktirana je različitim genetskim i okolišnim čimbenicima kao što su nizak unos voća/povrća, visok indeks tjelesne mase, pušenje, nedostatak tjelesne aktivnosti, izloženost zračenju, itd. Upotreba preparata s bioaktivnim, prirodnim i sigurnim spojevima u svrhu terapije idealan je pristup liječenju raznih vrsta raka zbog njihovih selektivnih molekularnih ciljeva. Osim toga, oksidativni stres igra određenu ulogu u patofiziologiji različitih tipova raka, pa se u terapiji mogu koristiti prirodni antioksidansi što dovodi do sve brojnijih istraživanja ovih spojeva. Kao najbolji prirodni antioksidansi s intenzivnim djelovanjem protiv raka u *in vivo* i *in vitro* uvjetima i studijama pokazali su se upravo flavonoidi, u koje se ubraja i morin [8].

Mehanizam na kojem se temelji antikancerogeno djelovanje morina još nije u potpunosti razjašnjen. Isto je i s antioksidacijskim i antiradikalskim mehanizmom djelovanja morina, ali se morin primjenjuje u eksperimentalnim istraživanjima sa životinjama budući da nije toksičan u dozama do 300 mg i budući da je potvrđena njegova velika učinkovitost u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. ROS može modulirati funkciju nekoliko faktora transkripcije, utječući na ekspresiju gena uključenih u sintezu proupalnih citokina te može regulirati preživljavanje i proliferaciju stanica. Kronični oksidativni stres pridonosi nastanku dijabetesa, bolesti bubrega, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, ali i brojnih drugih, pa bi morin kao jak antioksidans mogao imati preventivni učinak i/ili prirodni lijek u liječenju ovih bolesti [8].

2.2. Definicija i značaj pK_a

Kiselina je „vrsta koja ima tendenciju gubitka protona“ (Bronsted, 1923.), dok je baza „vrsta koja ima tendenciju primanja protona“ (Bronsted, 1923). Stoga za svaku kiselinu, HA, postoji konjugirana baza, A^-, što je prikazano jednadžbom (1):

$$\mathrm{HA}\ (aq) \rightleftharpoons\ \mathrm{A}^-(aq) + \mathrm{H}^-(aq) \qquad (1)$$

Također, za svaku bazu, B, postoji konjugirana kiselina, BH^+, kao što je prikazano u jednadžbi (2):

$$\mathrm{BH}^+\ (aq) \rightleftharpoons\ \mathrm{H}^+(aq) + \mathrm{B}^-\ (aq) \qquad (2)$$

Ako HA (ili BH^+) ima tendenciju gubitka protona, slijedi da njegov konjugat, A^- (ili B), ima samo malu sklonost prihvaćanju protona. Drugim riječima, ako je HA (ili BH^+) jaka kiselina, A^- (ili B) je slaba baza, i obrnuto. U vodenoj otopini, kiseline reagiraju s vodom koja djeluje kao baza prema jednadžbi (3):

$$\mathrm{HA\ (aq)} + \mathrm{H_2O(aq)} \rightleftharpoons\ \mathrm{H_3O^+\ (aq)} + \mathrm{A^-\ (aq)} \qquad (3)$$

Baze reagiraju s vodom djelujući kao kiselina prema jednadžbi (4):

$$\mathrm{A}^-\ (aq) + \mathrm{H_2O}\ (aq) \rightleftharpoons\ \mathrm{HA}\ (aq) + \mathrm{OH}^-\ (aq) \qquad (4)$$

U slučaju poliprotonskih spojeva, dodavanje ili uklanjanje protona iz molekule može se pojaviti na različitim mjestima u molekuli. Svako nabijeno stanje, tzv. protomer ili makrostanje, ima eksperimentalno mjerljivu pK_a vrijednost (makroskopska konstanta) koja određuje mjeru deprotonacije molekule. Međutim, svako makrostanje može biti sastavljeno od različitih makroskopskih tautomernih stanja koja su definirana mikroskopskim pK_a vrijednostima koje opisuju ravnoteže između pojedinih tautomernih stanja različitih naboja. Pomoću spomenutih pK_a vrijednosti se određuje raspodjela tautomera unutar svakog nabijenog stanja [9].

Konstanta kisele disocijacije, pK_a, je kvantitativna mjera jačine kiseline u otopini. Za sustav se kaže da je u ravnoteži kada se koncentracije njegovih komponenata ne mijenjaju

tijekom vremena, jer se napredna i povratna reakcija odvijaju istom brzinom. Pri promjeni koncentracije reaktanata ili produkata dolazi i do promjene konstante ravnoteže. Spomenuta promjena koncentracije može biti uzrokovana promjenom pK_a vrijednosti te protonacijom reaktanata [10].

Vrijednost pK_a izravno je proporcionalna standardnoj promjeni Gibbsove slobodne energije za neku reakciju. Vrijednost pK_a mijenja se s temperaturom i može se kvalitativno razumjeti na temelju Le Châtelierova načela: kada je reakcija endotermna, pK_a raste, a pK_a opada s porastom temperature, suprotno vrijedi za egzotermne reakcije [11].

Kako se gotovo sva mjerenja izvode u razrijeđenoj vodenoj otopini, koncentracija vode ostaje konstantna i njezina aktivnost se može uzeti da je stalna. Neka H^+ predstavlja proton, prema formuli (1) imamo:

$$K_a = (H^+)\,{}^{(B)}\!/_{(A)} \qquad (1)$$

gdje je K_a kisela disocijacijska konstanta, a B i A predstavljaju bazne i kisele vrste. Ova se formula može napisati u obliku formule (2):

$$pK_a = pH + \log({}^{(A)}\!/_{(B)}) \qquad (2)$$

gdje je pK_a negativni logaritam K_a, i jednak je pH pri kojima su koncentracije A i B jednake. Formula (2) također izražava jakost konjugirane organske kiseline. Što je vrijednost pK_a veća, to je slabija tvar kao kiselina, i obrnuto. Za bilo koje otapalo, pK_a skala je pogodna za izražavanje jakosti kiselina i baza [11].

Utjecaj pK_a na bioaktivnost tvari je uvelike vidljiva. Kod masnih kiselina uočeno je da su molekule masnih kiselina najbliže zajedno kada je pH vrijednost otopine blizu pK_a masne kiseline. Kada pH je vrlo visok, ionsko odbijanje između karboksilatnih iona drži molekule razdvojenima. Kada je pH blizu pK_a, otprilike 50 % kiselinskih skupina su protonirane a drugih 50 % ostaju neprotonirane. Dolazi do izmjenične protonacije onih molekula koje su deprotonirane, te deprotonacije protoniranih molekula. Dodatne ion-dipol interakcije između ionizirane i neionizirane kiselinske skupine nema kada su sve kiselinske skupine protonirane (tj. kad je pH vrlo nizak, sve molekule su protonirane) [11].

Utjecaj pK_a na bioaktivnost je osobito vidljiv kod organskih molekula. Veliki broj organskih spojeva, prirodnih i sintetskih, sadrže kisele i bazične skupine koje upravljaju

mnogim njihovim kemijskim, fizikalnim i biološkim svojstvima. Za takve spojeve, omjer vrsta (neutralna molekula, anioni, kationi) koje su prisutne pri određenom pH određuju se uz pomoć pK_a vrijednosti. pK_a kontrolira mnoge aspekte metabolizma lijekova, uključujući transport kroz membrane koje su često propusne samo za određenu vrstu čestica. Sami učinci tvari (poznatog pK_a) mogu se razmotriti poznavanjem omjera svih vrsta čestica prisutnih pri određenom pH [11].

2.2.1. Eksperimentalne metode određivanja pK_a

Unatoč tome što se naziva konstantom, konstanta disocijacije pK_a zapravo nije doista konstanta, pogotovo ne kod eksperimentalnih mjerenja. Naime, nema eksperimentalnog mjerenja koje je izvršeno pod idealnim uvjetima, pritom pazeći i na posebne uvjetuje koje diktira spoj koji analiziramo, tako da uvijek dolazi do određenih oscilacija u pK_a vrijednosti. Uz to, vrijednost pK_a ovisi o: temperaturi (T), ionskoj jakosti (I), i dielektričnoj konstanti otapala (ε). Temperaturna ovisnost pK_a vrijednosti opisana je jednadžbom (5) van't Hoffovog tipa:

$$d \ln {}^{K_a}/_{dT} = {}^{\Delta H}/_{RT^2} \qquad (5)$$

gdje je ΔH promjena entalpije disocijacije, a R je opća plinska konstanta. Vrijednost ΔH često je negativan. U slučaju kada je ΔH neovisan o temperaturi, pK_a u odnosu na 1/T pokazuje linearnu ovisnost. Ovo se obično koristi za interpolaciju na druge temperature. Ekstrapolacija eksperimentalnih podataka se, naravno, ne savjetuje. To proizlazi iz shvaćanja da se ΔH može napisati jednadžbom (6):

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \qquad (6)$$

gdje je ΔG Gibbsova slobodna promjena energije i ΔS je promjena entropije. Spomenuta linearna relacija vrijedi samo ako je ΔH >> TΔS. Štoviše, u nekim slučajevima ΔS također ovisi o temperaturi, što rezultira nelinearnoj ovisnosti pK_a o 1/T. pK_a također ovisi o ionskoj jakosti otopine koja se ispituje. Ionska jakost se definira kao zbroj koncentracija (c) svih ionskih vrsta, ispravljene za njihov broj naboja (z), prikazano jednadžbom (7):

$$I = {}^{1}/_{2} \sum z^2 c \qquad (7)$$

Ovisno o uzorku i matrici koja se istražuje, izbor metode može biti složen, čak i za slučaj jednovalentnih iona. Za polivalentne ione, stvari su kompliciranije. Do danas je razvijeno nekoliko eksperimentalnih metoda određivanja pK_a, i to su: potenciometrija, NMR spektroskopija, kapilarna elektroforeza, tekuća kromatografija visokog učinka, Rayleighovo raspršenje, kalorimetrija, UV spektroskopija, spektroskopija toplinskim lećama, površinska napetost i međupovršinska napetost, voltametrija, fluorometrijska metoda, metoda fluorescentne polarizacije, masena spektroskopija, rezonancija površinske plazme i dr. [12, 13].

2.2.1.1. Potenciometrijska titracija

Potenciometrijska titracija je najkorištenija metoda analize i određivanja pK_a zbog jednostavnosti izvedbe te mogućnosti analiziranja spoja niske koncentracije do 10^{-4} M. U potenciometrijskim titracijama, uzorak se titrira kiselinom ili bazom te se uz pomoć pH elektroda, od kojih je jedna referentna a druga indikatorska (ili u slučaju kombinirane pH elektrode, obje elektrode su spojene u jednu), prati promjena pH, shodno tome i pK_a. pKa vrijednost se izračunava iz promjene oblika titracijske krivulje u usporedbi s onom slijepe probe. Odnosno, pK_a izračunavamo iz jednakosti pH = pK_a i to kada je reakcija poluneutralizirana. Točku ekvivalencije možemo odrediti iz krivulje titracije i to kada vidimo nagli skok u promjeni pH u odnosu na malu promjenu volumena. Zaključak je da je promjena elektrodnog potencijala proporcionalna promjeni pH tijekom izvođenja titracije [12, 13].

Prednosti potenciometrije su jednostavna izvedba, mogućnost titriranja otopina raznih obojenja, aparatura je lako dostupna i niske cijene te je sama metode vrlo pouzdana i daje vrlo točne rezultate. Ipak, ova metoda ima i neke mane, kao npr. korištenje velike količine uzorka te korištenje vrlo čistih spojeva i pufera. Još jedan problem koji se javlja pri određivanju pK_a potenciometrijskom titracijom je slaba topljivost analita u vodi. Problem se može riješiti miješanjem analita s različitim otapalima, ali u tom slučaju rezultati nisu posve točni [12, 13].

2.2.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), je relativno nedavno dobila ulogu u određivanju pK_a. Grunwald i sur. (1957) su određivali pK_a vrijednosti primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina. Poznavajući kemijski pomak metilnih skupina ($–CH_3$) unutar amina, utvrdili su povezanost kemijskog pomaka s promjenom pH vrijednosti. Sukladno tomu, utvrdili su ovisnost dvaju spomenutih faktora. Rezultat toga je sigmoidalna krivulja iz koje se izračuna pK_a vrijednost za određeni amin [12, 13].

Za određivanje pK_a vrijednosti šećera koriste se ^{13}C i ^{1}H NMR te je moguće odrediti pK_a neovisno o anomernom stanju određenog šećera, drugim riječima, nije potreba izolacija svakog anomera. Sukladno tome, promjena unutarnje strukture nema utjecaja na konačnu vrijednost pK_a. Kod određivanja vrijednosti proteina problem uzrokuje dušik koji se nalazi u peptidnoj vezi te se pK_a proteina određuje ^{15}N NMR-om jer dodatkom slobodnog izotopa dušika dolazi do izmjene između dušika u proteinu te izotopa dušika. Ovom metodom moguće je odrediti i pK_a složenijih molekula koje sadrže dušik [12, 13].

Prednost NMR je mogućnost određivanja pK_a i u slučaju nečistog uzorka jer ova metoda u obzir ne uzima ukupnu koncentraciju, već se prati kemijski pomak određene skupine. Sukladno tome i mjerenje pK_a ovisi o kemijskom pomaku samo promatrane skupine, a ne o koncentraciji tj. čistoći uzorka [12, 13].

Mane vezane uz mjerenje vrijednosti pK_a NMR metodom nisu povezane uz metodiku izvođenja NMR-a, već uz uvjete pri kojima se NMR izvodi. Promjenom temperature prilikom izvođenja eksperimentalnog mjerenja dolazi i do vibracijskih promjena unutar molekule, koje ako se ne uzmu u obzir prilikom računanja, dovode do pogreške u vrijednosti pK_a. Uz to, aparatura i samo izvođenje eksperimenta je skupo, te je isplativo samo za složenije molekule u kojima dolazi do izmjenične protonacije i deprotonacije [12, 13].

2.2.1.3. UV-VIS spektroskopija

Glavna prednost spektrofotometrijskih metoda je veća osjetljivost na male koncentracije analita. Analiti koji imaju povoljne vrijednosti molarnih koeficijenata apsorpcije su povoljni i za spektrofotometrijske analize, ali spojevi moraju sadržavati UV aktivni kromofor dovoljno blizu mjesta kiselo-bazne funkcijske skupine molekule. Dobiveni podaci se kontinuirano bilježe tijekom titracija, spektrometrom s nizom dioda. Molarni apsorpcijski koeficijenti uzoraka se mijenjaju tijekom titracija te dolazi do promjene

koncentracija neutralnih i ioniziranih prisutnih jedinki. Upravo se te promjene promatraju pri izračunima pK_a vrijednosti. Najveća promjena u apsorbanciji promatranih uzoraka se događa pri pH vrijednosti koja odgovara pK_a vrijednosti. Promjene apsorbancije se obično iščitavaju iz prve nagle promjene kroz vremenski period ili iz dijagrama preklapanja različitih spektara. Određivanje pK_a vrijednosti pomoću UV-VIS metoda se izvodi uz pretpostavku da je analit visoke čistoće ili da prisutne nečistoće ne apsorbiraju u navedenom području. Spektrofotometrijske analize nude visoku preciznost, ali zahtijevaju poznavanje spektara različitih vrsta i visoku čistoću reagenasa [12, 13].

Princip UV-VIS spektroskopije je apsorpcija elektromagnetskog zračenja 200-800 nm i, posljedično, emisija elektrona u viša energijska stanja. UV-VIS spektroskopijom se proučavaju spojevi niske topljivosti u vodi i niskih koncentracija. Aromatski spojevi se, zbog svoje karakteristične strukture, lako određuju UV-VIS spektroskopijom. Postoje različite UV-VIS spektroskopske metode, kao što su metoda simultane jednadžbe, ortogonalna metoda, metoda molarnog omjera, metoda druge derivacije, itd. [12].

Podaci dobiveni za određenu valnu duljinu se dobivaju analizom uzoraka puferske otopine poznate pH vrijednosti iz koje se može odrediti pK_a vrijednost. Pri korištenju spomenute metode je vrlo važno poznavanje molarnih apsorpcijskih koeficijenata protoniranih i deprotoniranih oblika analita. Uz to, konstanta disocijacije kiseline se može utvrditi razvijenim spektrometrijskim pristupom na više valnih duljina [12, 13].

2.2.1.4. Elektroforeza

Elektroforeza je metoda odvajanja čestica u kojoj se nabijene čestice nalaze pod utjecajem električnog polja određene jakosti. Kretanjem kroz električno polje, nabijene se čestice gibaju brzinom koja je proporcionalna omjeru brzine čestice (vi) i jakosti električnog polja (E) u kojemu se ona giba. Određivanje pK_a vrijednosti metodom elektroforeze ovisi o pokretljivosti protoniranih i neprotoniranih oblika analita. Kada su oblici u ravnoteži, neto mobilnost se može povezati sa stupnjem disocijacije analita, što je prikazano jednadžbom (8):

$$m_{meff} = (1 - \alpha) \cdot m_0 + \alpha \cdot m_d \qquad (8)$$

gdje m_{eff} predstavlja efektivnu mobilnost, m_d mobilnost deprotoniranog oblika, a m_0 mobilnost protoniranog oblika analita. Obzirom na preciznost, metoda elektroforeze je

bliska potenciometrijskim titracijama. Važno je spomenuti da je za analizu elektroforezom potrebna mala količina uzorka. Uz to, elektroforeza ne treba analite savršene čistoće jer se komponente uzorka razdvajaju. Elektroforeza je brza metoda koja se izvodi pomoću praktične i lako dostupne aparature. S druge strane, ne treba zaboraviti da elektroforeza zahtijeva pripremu puferskih otopina točno određene pH vrijednosti. Također, potrebno je paziti da analit i puferske otopine ne stupaju u reakciju [12, 13].

2.2.1.5. Kapilarna elektroforeza

U slučaju kapilarne elektroforeze, određivanje pK_a vrijednosti se temelji na pokretljivosti ioniziranog oblika analita u nizu otopina koje imaju jednaku ionsku jakost ali različite pH vrijednosti. Kada je komponenta deionizirana, tj. nenabijena, tada ona ima nultu mobilnosti. S druge strane, ionizirano stanje ima maksimalnu mobilnost zbog interakcija električnog polja i naboja [12, 13].

Srednja mobilnost jednovalentne slabe kiseline se prikazuje jednadžbom (9):

$$\mu_{eff} = x_i \cdot \mu_{epi} \qquad (9)$$

gdje je μ_{eff} srednja mobilnost. X_i anionski molarni udio jednovalentne slabe kiseline, μ_{epi} elektroforetska anionska mobilnost. Kako nije postavljeno ograničenje u brojnosti iona koji su uključeni u ravnotežu, efektivna mobilnost se može prikazati jednadžbom (10):

$$\mu_{eff} = \sum_i x_i \cdot \mu_{epi} \qquad (10)$$

Vrijednosti pK_a se mogu odrediti aproksimacijom efektivne mobilnosti kao funkcije pH za odgovarajuću skupinu. Efektivna mobilnost slabih kiselina i baza je pod utjecajem čimbenika koji inače utječu na konstantu ravnoteže ili na pokretljivost [12, 13].

Pri određivanju pK_a vrijednosti kapilarnom elektroforezom, moraju se koristiti otopine elektrolita različitih pH vrijednosti koje imaju nisku i konstantnu ionsku jakost. Korišteni puferi moraju biti analitički čisti, dobro topljivi u vodi i imati apsorbanciju na niskim valnim duljinama. Uz to, puferske otopine moraju imati razuman rok trajanja i analitičku čistoću [12, 13].

2.2.2. Računalne metode određivanja pK_a

Kako se računalna kemija, razvojem softvera za izračun molekulskih orbitala i razvojem prvog softvera za izračuna molekularne mehanike, počela intenzivnije oblikovati 1970.-ih, razvijeno je mnogo različitih metoda za računalnu procjenu svojstava molekula. Neke od njih imaju ulogu procjene iznosa pK_a vrijednosti. Najprecizniji dostupni rezultati su, općenito, dobiveni *ab initio* izračunima, što znači da imaju tendenciju konvergiranja u točno matematičko rješenje. Međutim, kako su korištene jednadžbe za opis sustava u potpunosti izvedene iz teorijskih načela, svaki nedostatak modela će proizvesti rezultat koji može odstupati od njegove prave vrijednosti. Primjerice, značajne poteškoće se javljaju pri izračunima pK_a vrijednosti u vodenoj fazi jer u obzir treba uzeti i interakcije otapala i analita [14].

Poluempirijske kvantno-mehaničke (engl. *quantum-mechanical*, QM) metode se temelje na istim principima kao i spomenuti *ab initio* izračuni, ali koriste aproksimacije i mnoge parametre dobivene iz eksperimentalnih podataka. Metoda uključuje uzimanje informacija iz velike baze podataka poznatih molekula, koje se potom koriste u kvantno--mehaničkim izračunima. Dok su ove metode mnogo brže od *ab initio* izračuna, rezultati su pouzdani samo kao je molekula koja se promatra dovoljno slična onima pohranjenima u bazi podataka [14].

Intenzivniji razvoj tehnologije doveo je i do razvoja metoda tj. modela za ispitivanje kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure–Activity Relationship*, QSAR). Spomenuti modeli se smatraju razvijenijom verzijom poluempirijskih metoda. Izbor parametara i startne pretpostavke mogu dramatično utjecati na ishode izračuna, što ove metode smješta na malo drugačiji položaj od prethodnih. Osim toga, promatrajući eksperimentalno dobivene rezultate se često javljaju znatna odstupanja od literaturnih vrijednosti ovisno o metodi pomoću koje su te vrijednosti generirane [14].

2.2.2.1. *Epik*

Epik je računalni program za predviđanje pK_a vrijednosti za lijekove. *Epik* može koristiti tehnologiju za tautomerizaciju te prilagoditi strukturu molekula sličnih onoj molekuli koju analiziramo te automatski generirati jedan ili više najvjerojatnijih oblika za korištenje u daljnjim studijama molekularnog modeliranja [15].

Epik koristi metodologiju eksperimentalnog procesa visoke propusnosti (engl. *high--throughput experimental process*, HT) koju organski kemičari uspješno koriste za procjenu pK_a vrijednosti malih aromatskih odnosno alifatskih molekula. Za procjenu pK_a ovaj program koristi jednadžbu (11)

$$pK_{a_i} = pK_{a_i}{}^0 + s_i - \rho_i \sum_j \sigma_j \qquad (11)$$

Svaki tip supstituenta, ima dva parametra: početnu pK_a vrijednost, pK_a^0, i parametar odgovora, ρ, koji pokazuje kako pK_a utječe na osjetljivost skupine atoma (supstituenta) vezanih za njega. pK_a^0, ρ i r parametri gotovo uvijek odgovaraju eksperimentalnim pK_a podacima [15].

Epik koristi SMARTS (engl. *SMILES arbitrary target specification*, SMARTS) za podudaranje. Korištenjem SMARTS-a mogu se napraviti fleksibilne i učinkovite specifikacije podstrukture. Ovdje se javlja problem, a to je da postoji više od jednog načina predstavljanja različitih supstituenata koji mogu uvelike proširiti broj SMARTS uzoraka koji onda trebaju biti dodatno kodirani. Još jedan izazov predstavljaju mezomeri. U tom slučaju problem je taj što mezomeri imaju umjetne lokalizacije formalnog naboja, a temeljeći izračun na prirodi jednog mezomernog prikaza može dati netočne rezultate [15].

2.2.2.2. *ADME/ToxWEB*

ADME/ToxWEB konzultira ADME i on-line sustave predviđanja Pharma Algorithms kompanije. *ADME/ToxWEB* je verzija *ADME Box* i *Tox Box* dizajnirana da se uklopi u mreže ustanove u kojoj se koristi. *ADME/ToxWEB* ima fleksibilnu modularnu arhitekturu ADME i Tox Boxes, a istovremeno nudi mogućnosti prilagodbe sučelja i izravan programski pristup modulima. Ovim sustavom predviđanja korisnici mogu istražiti: toksičnost, akutnu toksičnost (miš i štakor). genotoksičnost, zdravstvene učinke (krv, jetra, pluća), ukupnu oralnu bioraspoloživost, pKa, log D, specifičnosti supstrata i inhibitora, topljivost u čistoj vodi i u puferu, svojstva aktivnog transporta, apsorpciju, fizikalno-kemijska svojstva, itd. [16].

2.2.2.3. *CSpKaPredictor*

Program *CSpKaPredictor* odabire deskriptore i traži optimalan odnos između eksperimentalnih pK_a i računalno predviđenih pK_a. Program koristi 519 topoloških i „*E-state*“ deskriptora koji određuju dostupnost elektrona za nekovalentne, inertne molekularne interakcije u svakom atomu. 158 od 519 deskriptora novi su molekularni deskriptori razvijeni pomoću softvera *ChemSilico*. Kako bi se potvrdili rezultati predviđanja, unakrsne provjere između eksperimentalno dobivenih pK_a vrijednosti i vrijednosti predviđenih pomoću *CSpKaPredictor*-a automatski se provjeravaju u samom programu, jer se eksperimentalne vrijednosti mogu upisati prije početka same analize u programu [16].

2.2.2.4. ACD/pK_a

ACD/pK_a je program koji brzo i točno predviđa pK_a širokog spektra organskih spojeva. Koristi Hammettove jednadžbe izvedene iz baze podataka odabranih spojeva za predviđanje pK_a vrijednosti. Osim toga, dostupne su dvije referentne baze podataka koje nude brzi pregledi izračune: jedna sadrži više od 31000 eksperimentalnih pK_a vrijednosti za približno 16000 spojeva u vodenim otopinama. Druga pruža eksperimentalne podatke za više od 2000 molekula u drugim otapalima. Ovaj softver koristi većina farmaceutskih tvrtki diljem svijeta i testiran je na velikom broju kemijskih spojeva [16].

Uz to, *ACD/pK_a* koristi se za:

- izračunavanje pK_a za organske spojeve, pod standardnim uvjetima,
- vizualiziranje ionizirajućih centara,
- crtanje distribucije svih ioniziranih mikrovrsta kao funkcije pH,
- ocjenjivanje pouzdanosti predviđene pK_a vrijednosti [16].

2.2.2.5. *Marvin*

Marvin (*ChemAxon*) je računalni program koji u obzir uzima empirijski izračunate fizikalno-kemijske parametre (Mullikenove parcijalne naboje) koji se uzimaju iz regresijskih jednadžbi specifičnih za mjesto ionizacije. Za izračune pK_a molekule se koriste tri vrste

parametara: intermolekulske interakcije, parcijalni naboji i polarizibilnost, prema jednadžbi (12):

$$pK_a = a + Q + b \cdot P + c \cdot S + d \cdot S + d \qquad (12)$$

Q i P predstavljaju djelomičan naboj i rast polarizabilnosti, S je zbroj porasta koji su specifični za strukturu, a, b, c i d su specifični regresijski koeficijenti za mjesto ionizacije. Potom se izračunava omjer mikrovrsta kako bi se izračunala vrijednost pK_a svakom atomu. Važno je izračunati i makro-pK_a vrijednosti jer se one dobiju iz teoretskog omjera makro- i mikrovrijednosti pK_a. Konstantu disocijacije mikrokiselina možemo dobiti iz ravnotežnog omjera konjugiranih parova kiselina i baza, dok konstantu disocijacije makrokiselina dobijemo iz zakona o očuvanju mase i naboja [17-19].

*

3. Materijali i metode

U radu su primjenom programa *ACD/Labs Percepta 14.51.0* predviđene pK_a vrijednosti morina. Ovaj program je platforma softvera za *in silico* ispitivanja koja se bave predviđanjem molekularnih svojstava različitih kemijskih spojeva. Tako na primjer, *ACD/pK$_a$* može predvidjeti konstante kisele disocijacije na temelju strukture spoja. Izračuni se odnose na standardne uvjete u vodenom mediju, a osim izračuna pK_a, program omogućuje utvrđivanje svih centara ionizacije spoja, utvrđivanje distribucije svih ioniziranih mikrovrsta spoja i sl. [20].

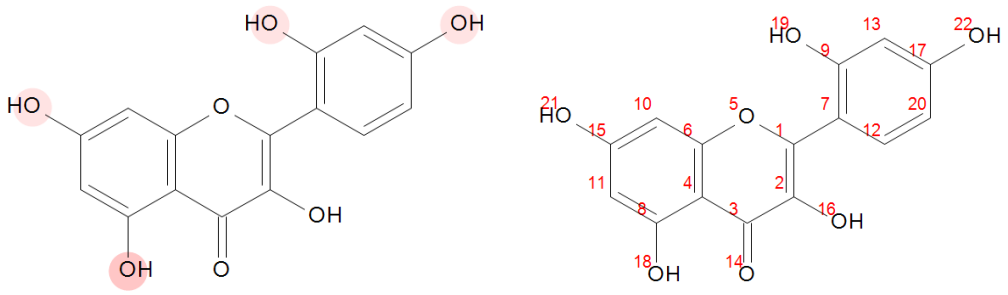
Program radi na temelju baze podatka koja sadrži informacije za preko 20 000 spojeva te na temelju dva algoritma – ACD/pK_a Classic (tzv. *default calculator*) i GALAS (*Global, Adjusted Locally According to Similarity*). ACD/pK_a Classic algoritam se temelji na bazi podataka s preko 17 000 spojeva i preko 32 000 pK_a vrijednosti. Komponente na kojima se temelji ovaj algoritam su jednadžbe Hammettovog tipa za glavne ionizabilne funkcijske skupine i konstante supstituenta (parametar σ). Tautomerna ravnoteža, utjecaj vode kao otapala, rezonancijski učinci te α- i β-nezasićeni sustavi se također uzimaju u obzir prilikom izračuna pK_a [21].

GALAS algoritam se temelji na bazi podataka sačinjenoj od 17 500 spojeva s više od 20 000 centara ionizacije. Baza podataka se koristi za simulaciju svih protoniranih stanja molekule i njihove distribucije pri različitim pH vrijednostima. Informacije koje se dobiju primjenom ovog algoritma su sumarni molekularni naboj, distribucija protoniranih stanja i prosječni naboj ionizacijskih centara molekule kao funkcije pH [21].

Pregledom znanstvene literature, za morin pronađene su računalno i eksperimentalno određene pK_a vrijednosti. Međutim, radova o ovoj tematici nema puno budući da se radi o složenom problemu, a eksperimentalne i računalne metode koje se koriste danas ipak imaju određene nedostatke. Računalno predviđene pK_a koje se mogu naći u literaturi su utvrđene upotrebom drugih softvera (npr. *ChemAxon*).

4. Rezultati i rasprava

Predviđene vrijednosti za pK_a i ionizacijske frakcije morina dobivene upotrebom Classic algoritma prikazane su u nastavku teksta. Prikazan je računalni protokol na kojem se temelje rezultati dobiveni ovim algoritmom. Strukture koje su korištene u ovim izračunima prikazane su u nastavku teksta (Slika 5. i kasnije slike molekularnih fragmenata koje su korištene u izračunima).



Slika 5. Struktura morina s označenim najkiselijim dijelovima molekule i numeracijom atoma koji su korišteni u izračunima s Classic algoritmom.

Najjači pKa(kiseli): 6,3 ± 0,4

Nema bazične pKa.

6,3 ± 0,4 (Atom br.: 18)

7,2 ± 0,4 (Atom br.: 18)

8,4 ± 0,4 (Atom br.: 21)

10,2 ± 0,4 (Atom br.: 19)

11,2 ± 0,3 (Atom br.: 22)

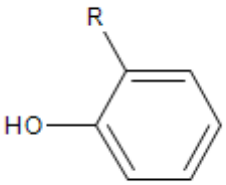
Računalni protokol

Disocijacijski stupanj 1

$pKa_{calc} = pKa_0 + \Delta(pKa)$

Izračun pKa_0:

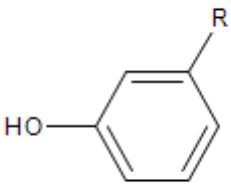
Posebni protokol za cijepanje prstena je primijenjen u izračunu pKa_0. Korišteni su sljedeći fragmenti:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 10.235-4.743\times\sigma_{Ind}-1.723\times\sigma_{Res(-)}$

n=24, r=0.9618, StD=0.3000



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480

Krajnja vrijednost pKa_0:

$pKa_0 = 6.573$

Izračun Δ(pKa):

$\Delta(pKa)_1 = -0.184$ na temelju:

Za supstituent u ovakvom prstenastom sustavu, napravljena je jednadžba (modificirana Hammettova jednadžba):

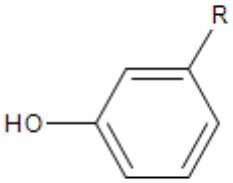
$\Delta(pKa) = - 0.8 \times \rho \times \sigma_{meta,para,ortho}$

gdje:

$\rho = 2.4^{2-i} \times 0.8^{n}$

i – broj atoma kojima je ionizabilni vodik odvojen prstenastog sustava

n – broj atoma između supstitena i najbližeg centra ionizacije na prstenu



Krajnja jednadžba za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta}$

Supstituent ima:

(exp) $\sigma_{meta} = 0.12$

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_1$:

$\Delta(pKa)_1 = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta} = -0.184$

$\Delta(pKa)_2 = -0.093$ iz:

Za supstituciju u nearomatskom prstenastom sustavu, napravljena je jednadžba

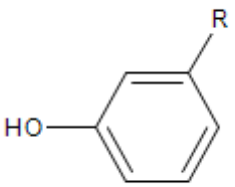
$\Delta(pKa) = - \rho \times \sigma_{Ind}$

gdje:

$\rho = \rho^0 \times 0.4^n$

ρ^0 – vrijednost bez konduktivnosti prstena

n – izračun na temelju Exner-Fiedler metode za konduktivnost prstenastog sustava



Krajnja jednadžba za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = 13.89 \times 0.4^{3.11} \times \sigma_{Ind}$

Supstituent ima:

(calc) $\sigma_{Ind} = 0.16$

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_2$:

$\Delta(pKa)_2 = 13.89 \times 0.4^{3.11} \times \sigma_{Ind} = -0.093$

Ukupna suma za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = \Sigma\Delta(pKa)_i = -0.184-0.093 = -0.277$

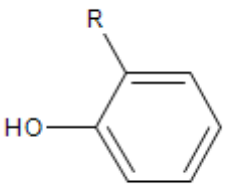
pKa_{calc} = 6.573-0.277 = 6.296

Disocijacijski stupanj 2

$pKa_{calc} = pKa_0 + \Delta(pKa)$

Izračun za pKa_0:

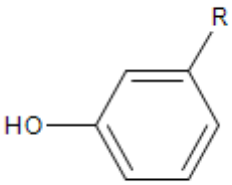
Poseban protokol za cijepanje prstenastog sustava je primijenjen u izračunu pKa_0. Korišten je sljedeći fragment:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 10.235-4.743\times\sigma_{Ind}-1.723\times\sigma_{Res(-)}$

n=24, r=0.9618, StD=0.3000



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480

Krajnja vrijednost za pKa_0:

$pKa_0 = 6.573$

Izračun Δ(pKa):

$\Delta(pKa)_1 = 0.722$ iz:

Za supstituent u ovakvom prstenastom sustavu korištena napravljena je jednadžba (modificirana Hammettova jednadžba)

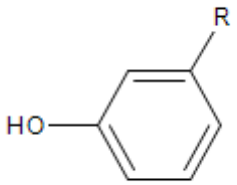
$\Delta(pKa) = - 0.8 \times \rho \times \sigma_{meta,para,ortho}$,

gdje:

$\rho = 2.4^{2-i} \times 0.8^{n}$

i – broj atoma kojima je ionizabilni vodik odvojen od prstenastog sustava

n – broj atoma između supstitena i najbližeg centra ionizacije na prstenu



Krajnja jednadžba za Δ(pKa): →

$\Delta(pKa) = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta}$

Supstituent ima:

(exp) $\sigma_{meta} = -0.47$

Krajnja vrijednost za $\Delta(pKa)_1$:

$\Delta(pKa)_1 = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta} = 0.722$

$\Delta(pKa)_2 = -0.093$ iz:

Za supstituciju u nearomatskom prstenastom sustavu dana je sljedeća jednadžba

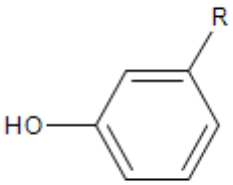
$\Delta(pKa) = - \rho \times \sigma_{Ind}$

gdje

$\rho = \rho^0 \times 0.4^n$

ρ^0 – vrijednost bez provodljivosti prstena

n – izračunato Exner-Fiedler metodom za provodljivost prstena



Krajnja vrijednost za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = 13.89 \times 0.4^{3.11} \times \sigma_{Ind}$

Supstituent ima:

(calc) $\sigma_{Ind} = 0.16$

Krajnja vrijednost za $\Delta(pKa)_2$:

$\Delta(pKa)_2 = 13.89 \times 0.4^{3.11} \times \sigma_{Ind} = -0.093$

Ukupna suma za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = \Sigma\Delta(pKa)_i = 0.722-0.093 = 0.629$

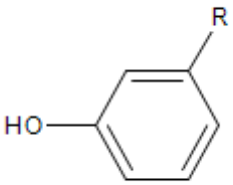
pKa_{calc} = 6.573+0.629 = 7.202

Disocijacijski stupanj 3

$pKa_{calc} = pKa_0 + \Delta(pKa)$

Izračun za pKa_0:

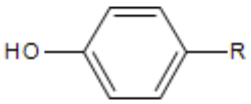
Poseban protokol za cijepanje prstenastog sustava je primijenjen u izračunu pKa_0. Korišten je sljedeći fragment:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.889-2.673\times\sigma_{Ind}-2.507\times\sigma_{Res(-)}$

n=21, r=0.9921, StD=0.1500

Krajnja vrijednost za pKa_0:

$pKa_0 = 7.783$

Vrijednost za Δ(pKa):

$\Delta(pKa)_1 = 0.722$ iz:

Za supstituciju u nearomatskom prstenastom sustavu dana je sljedeća jednadžba

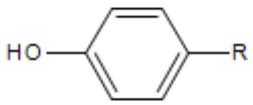
$\Delta(pKa) = - 0.8 \times \rho \times \sigma_{meta,para,ortho}$

gdje je

$\rho = 2.4^{2-i} \times 0.8^{n}$ (modificirana Hammett jednadžba)

i – broj atoma kojima je ionizabilni vodik odvojen od prstenastog sustava

n – broj atoma između supstituenta i najbližeg centra ionizacije na prstenu



Krajnja vrijednost za Δ(pKa):

$\Delta(pKa) = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta}$

Supstituent ima:

(exp) $\sigma_{meta} = -0.47$

Krajnja vrijednost za $\Delta(pKa)_1$:

$\Delta(pKa)_1 = -0.8 \times 2.4^{1} \times 0.8 \times \sigma_{meta} = 0.722$

$\Delta(pKa)_2 = -0.069$ iz:

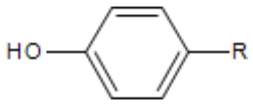
Za supstituciju u nearomatskom prstenastom sustavu dana je sljedeća jednadžba

$\Delta(pKa) = - \rho \times \sigma_{Ind}$

gdje $\rho = \rho^0 \times 0.4^n$

ρ^0 – vrijednost bez provodljivosti prstena

n – izračunato Exner-Fiedler metodom za provodljivost prstena



Krajnja vrijednost za $\Delta(pKa)$:

$\Delta(pKa) = 13.89 \times 0.4^{3.40} \times \sigma_{Ind}$

Supstituent ima:

(calc) $\sigma_{Ind} = 0.16$

Krajnja vrijednost za $\Delta(pKa)_2$:

$\Delta(pKa)_2 = 13.89 \times 0.4^{3.40} \times \sigma_{Ind} = -0.069$

Ukupna suma za $\Delta(pKa)$:

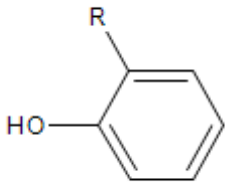
$\Delta(pKa) = \Sigma\Delta(pKa)_i = 0.722-0.069 = 0.653$

pKa_{calc} = 7.783+0.653 = 8.436

Disocijacijsko stanje 4

$pKa_{calc} = pKa_0 + \Delta(pKa)$

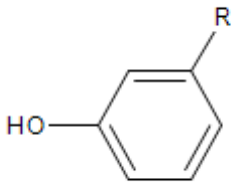
Vrijednost za pKa_0:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 10.14-4.7\times\sigma_{Ind}-1.508\times\sigma_{Res}$

n=25, r=0.9491, StD=0.3500



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480

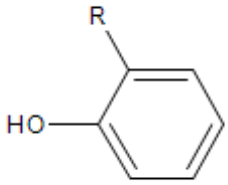
Krajnja vrijednost za pKa_0:

$pKa_0 = \Sigma pKa_{0i} / n = (10.140+9.958) / 2 = 10.049$

Vrijednost za Δ(pKa):

$\Delta(pKa)_1 = 0.362$ iz:

Jednadžba za reakcijski centar:



$pKa = 10.14-4.7\times\sigma_{Ind}-1.508\times\sigma_{Res}$

n=25, r=0.9491, StD=0.3500

Supstituent ima:

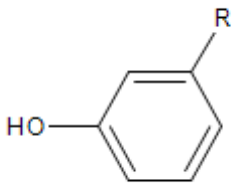
(calc) $\sigma_{Ind} = -0.01$; $\sigma_{Res} = -0.20$

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_1$:

$\Delta(pKa)_1 = -4.7\times\sigma_{Ind}-1.508\times\sigma_{Res} = 0.362$

$\Delta(pKa)_2 = -0.210$ iz:

Jednadžba za reakcijski centar:



$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480

Supstituent ima:

(exp) $\sigma_{Ind} = 0.24$; $\sigma_{Res} = -0.62$

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_2$:

$\Delta(pKa)_2 = -2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res} = -0.210$

Ukupna suma za $\Delta(pKa)$:

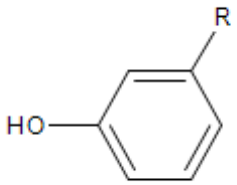
$\Delta(pKa) = \Sigma\Delta(pKa)_i = 0.362-0.210 = 0.152$

pKa_{calc} = 10.049+0.152 = 10.201

Disocijacijsko stanje 5

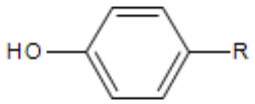
$pKa_{calc} = pKa_0 + \Delta(pKa)$

Vrijednost za pKa_0:



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$
n=15, r=0.9970, StD=0.0480



Fragment je pronađen u bazi podataka s eksperimentalnom jednadžbom

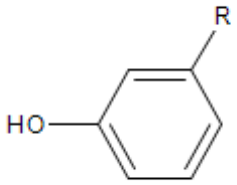
$pKa = 9.889-2.673\times\sigma_{Ind}-2.507\times\sigma_{Res}$
StD=0.3000

Krajnja vrijednost za pKa_0:
$pKa_0 = \Sigma pKa_{0i} / n = (9.958+9.889) / 2 = 9.924$

Izračun za Δ(pKa):

$\Delta(pKa)_1 = 0.704$ iz:

Jednadžba za reakcijski centar:



$pKa = 9.958-2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res}$

n=15, r=0.9970, StD=0.0480

Supstituent ima:

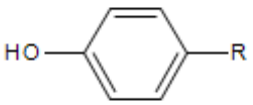
(exp) $\sigma_{Ind} = -0.14$; $\sigma_{Res} = -0.68$

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_1$:

$\Delta(pKa)_1 = -2.343\times\sigma_{Ind}-0.568\times\sigma_{Res} = 0.704$

$\Delta(pKa)_2 = 0.535$ iz:

Krajnja jednadžba za reakcijski centar :



$pKa = 9.889-2.673\times\sigma_{Ind}-2.507\times\sigma_{Res}$

StD=0.3000

Supstituent ima:

(calc) σ_{Ind} = -0.01; σ_{Res} = -0.20

Krajnja jednadžba za $\Delta(pKa)_2$:

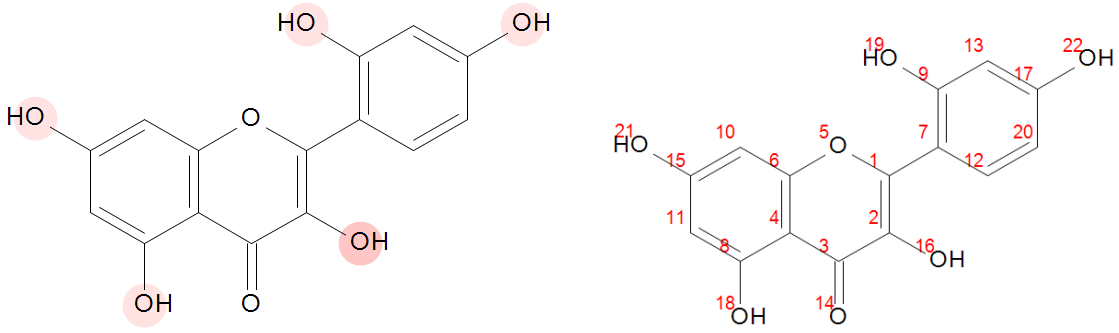
$\Delta(pKa)_2 = -2.673\times\sigma_{Ind}-2.507\times\sigma_{Res} = 0.535$

Ukupna suma za $\Delta(pKa)$:

$\Delta(pKa) = \Sigma\Delta(pKa)_i = 0.704+0.535 = 1.239$

pKa_{calc} = 9.924+1.239 = 11.162

Predviđene vrijednosti za pKa i ionizacijske frakcije morina dobivene upotrebom GALAS algoritma prikazane su u nastavku teksta. Slika 6. prikazuje numeraciju atoma i funkcijske skupine na kojima je bio naglasak prilikom izračuna upotrebom ovog algoritma.



Slika 6. Struktura morina s označenim najkiselijim dijelovima molekule i numeracijom atoma koji su korišteni u izračunima GALAS algoritmom.

Najjača pKa(kiselina): 7,4 ± 0,7

Nema bazične pKa.

7,4 ± 0,7 (Atom br.: 16, 22, 21, 19), 50% MS1, 30% MS2, 18% MS3, 2% MS4

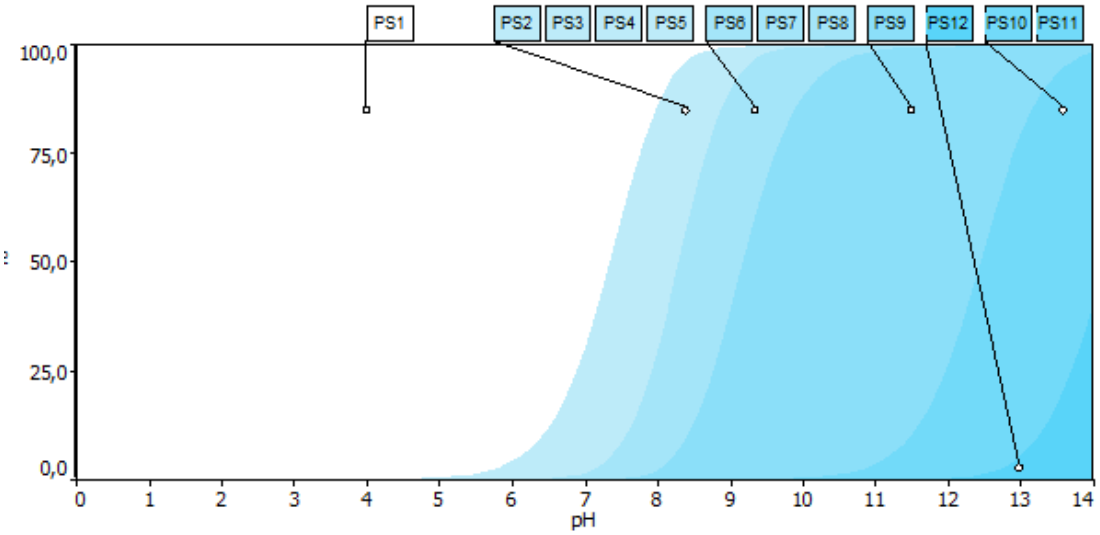
8,3 ± 0,8 (Atom br.: 22, 21, 21, 16, 21, 21, 22, 22, 16), 18% MS5, 17% MS6, 14% MS7, 11% MS8, 10% MS9, 9% MS10, 6% MS11, 6% MS12, 5% MS13

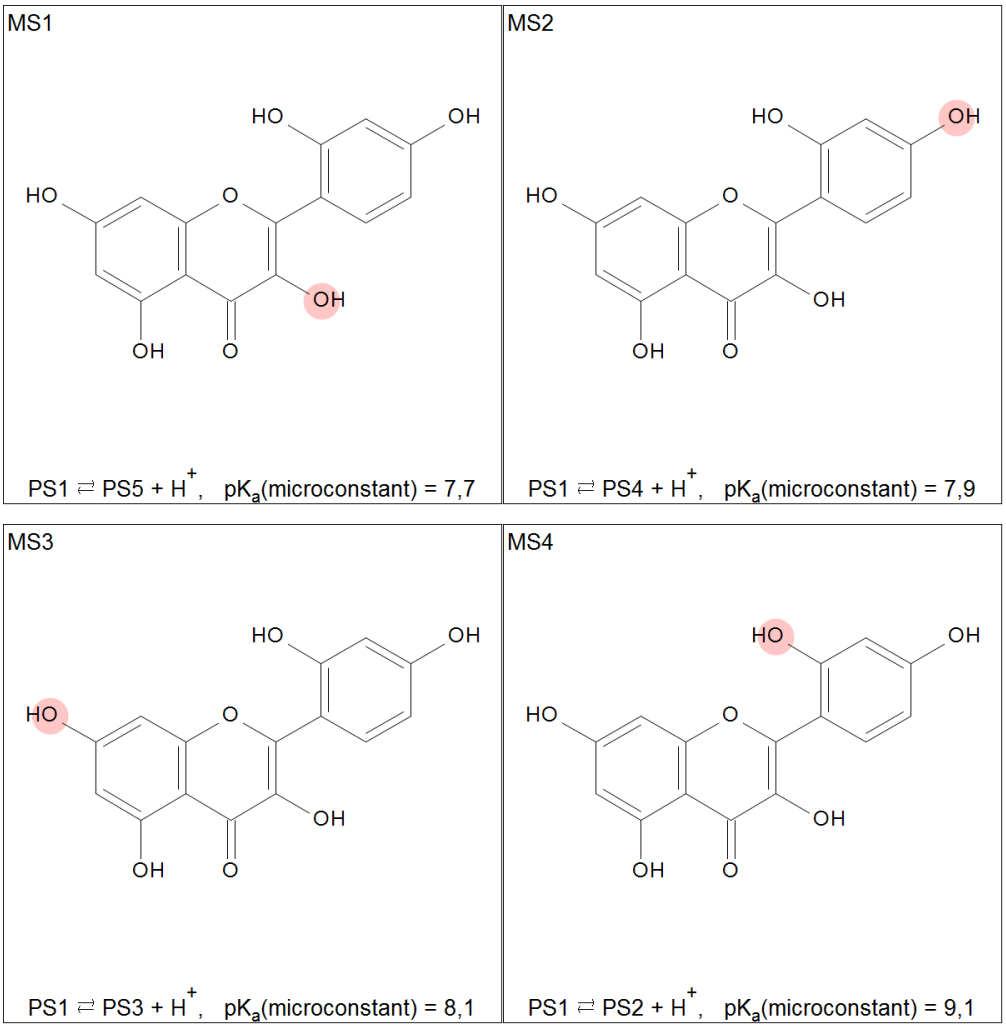
9,1 ± 0,7 (Atom br.: 21, 16, 22, 16), 35% MS14, 33% MS15, 28% MS16, 1% MS17

12,4 ± 1,0 (Atom br.: 19, 18), 94% MS18, 5% MS19

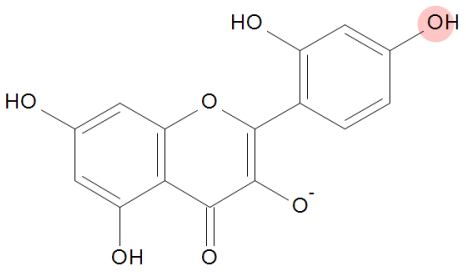
14,2 ± 1,0 (Atom br.: 18, 19), 95% MS20, 5% MS21

Neto naboj *vs* pH



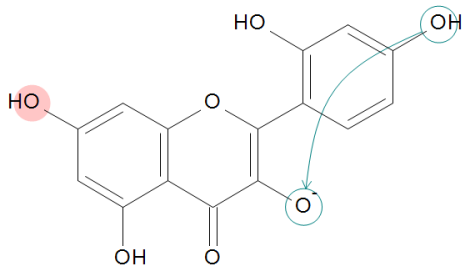


MS5



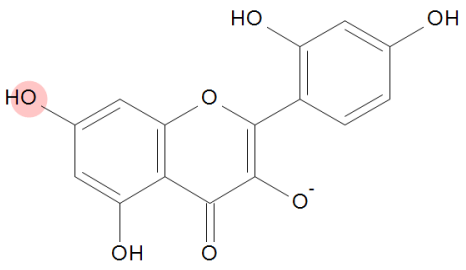
PS5 ⇄ PS8 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,5

MS6



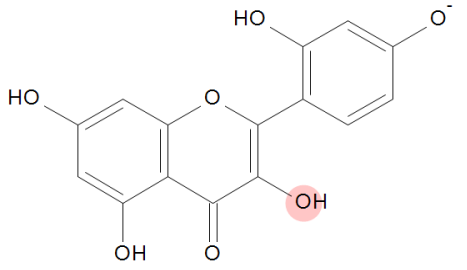
PS5 ⇄ PS6 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,5

MS7



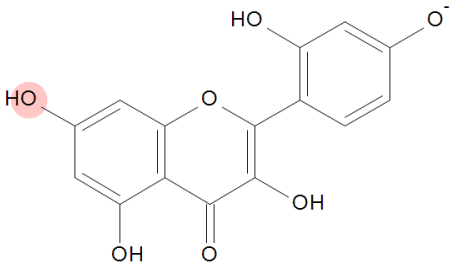
PS5 ⇄ PS7 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,5

MS8



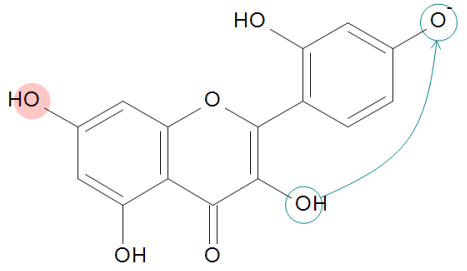
PS4 ⇄ PS8 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,2

MS9



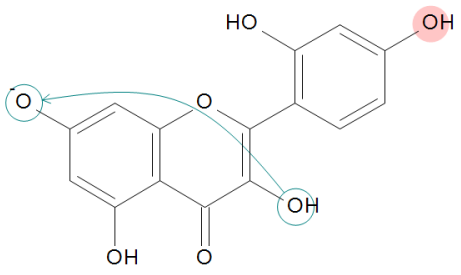
PS4 ⇄ PS6 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,3

MS10



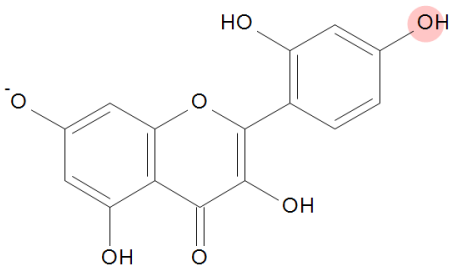
PS4 ⇄ PS7 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,3

MS11



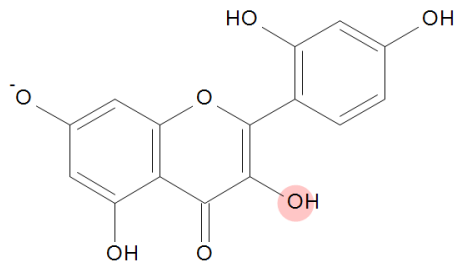
PS3 ⇄ PS8 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,0

MS12



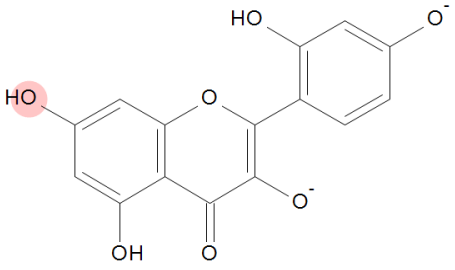
PS3 ⇄ PS6 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,0

MS13



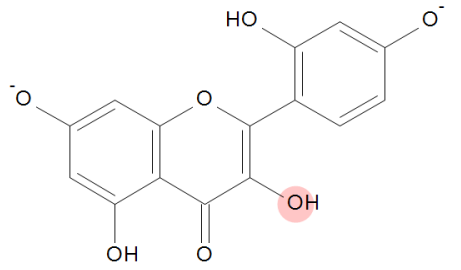
PS3 ⇄ PS7 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,1

MS14



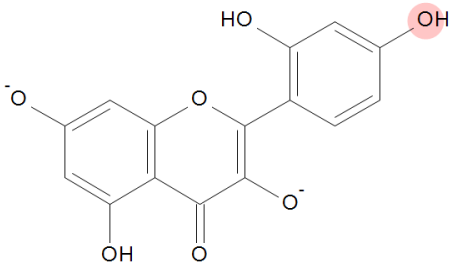
PS8 ⇄ PS9 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,7

MS15



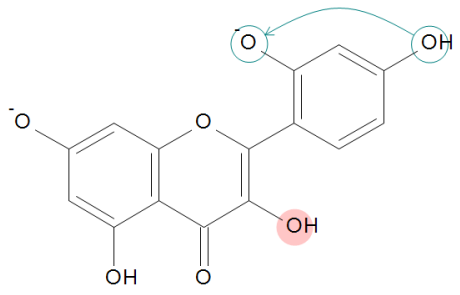
PS6 ⇄ PS9 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,7

MS16



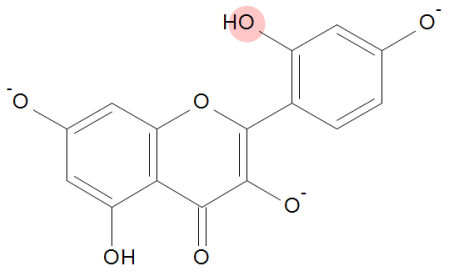
PS7 ⇄ PS9 + H^+, pK_a(microconstant) = 8,6

MS17



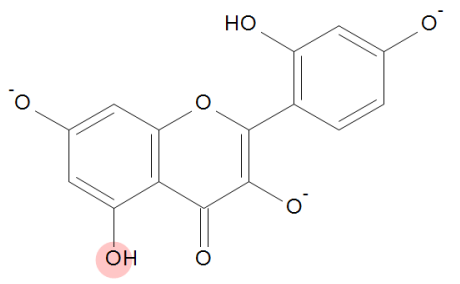
PS-- ⇄ PS9 + H^+, pK_a(microconstant) = 7,3

MS18



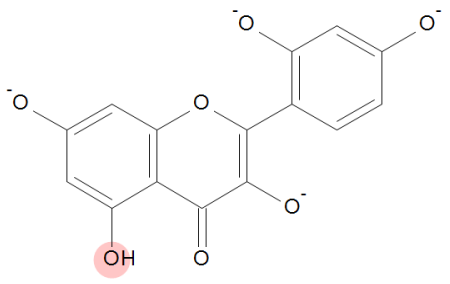
PS9 ⇄ PS10 + H^+, pK_a(microconstant) = 12,5

MS19



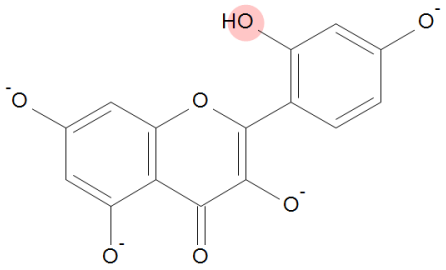
PS9 ⇄ PS11 + H^+, pK_a(microconstant) = 13,7

MS20



PS10 ⇄ PS12 + H^+, pK_a(microconstant) = 14,1

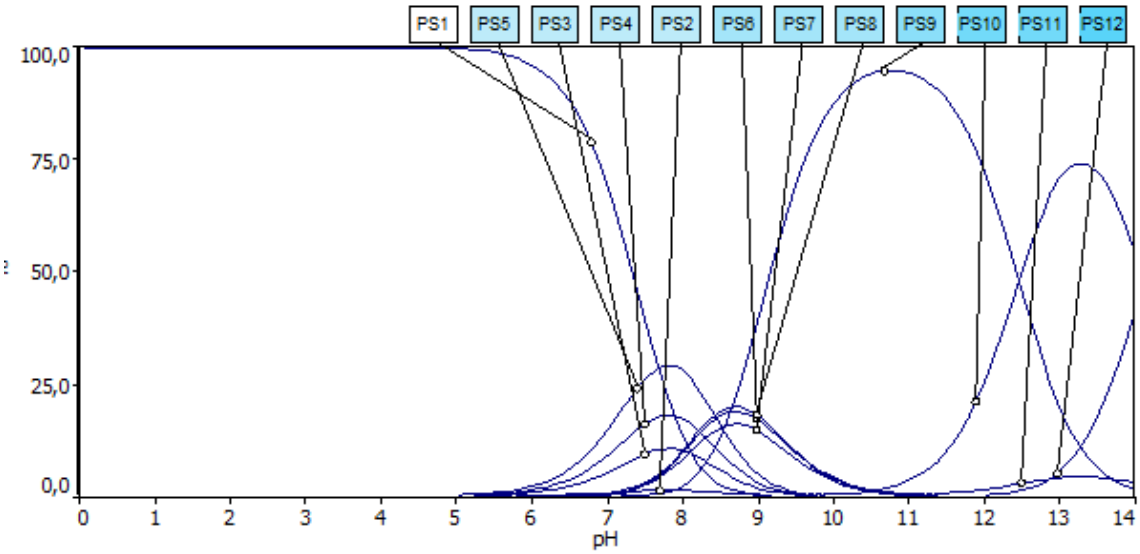
MS21

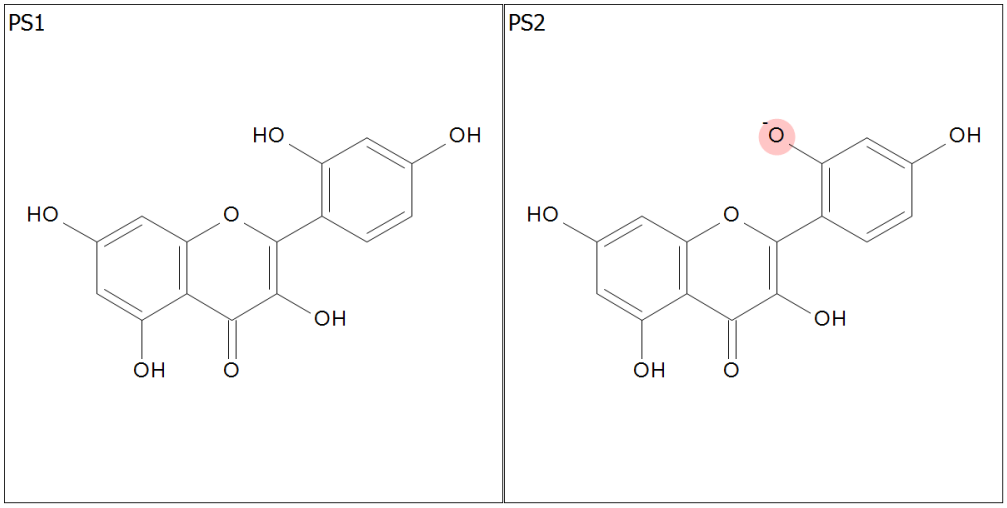


PS11 ⇄ PS12 + H^+, pK_a(microconstant) = 12,9

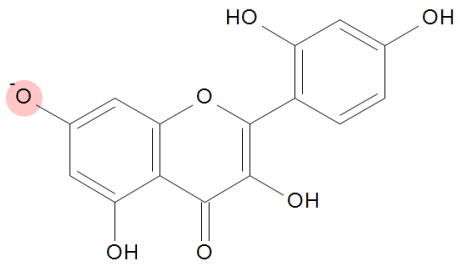
	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
q = -5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
q = -4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
q = -3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,39	0,88	0,95
q = -2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	0,28	0,51	0,12	0,01
q = -1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12	0,29	0,48	0,56	0,10	0,00	0,00
q = 0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,88	0,70	0,46	0,14	0,00	0,00	0,00

Protonacijsko stanje *vs* pH

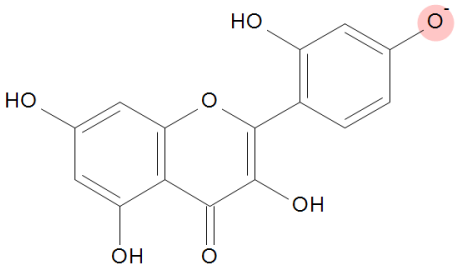




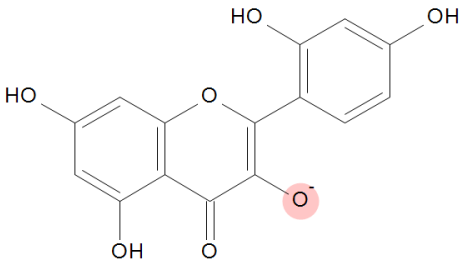
PS3



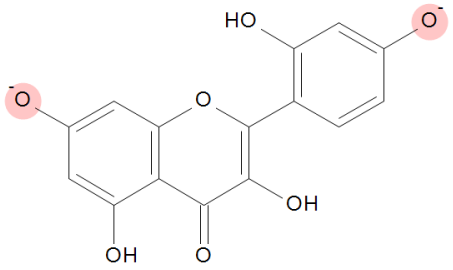
PS4



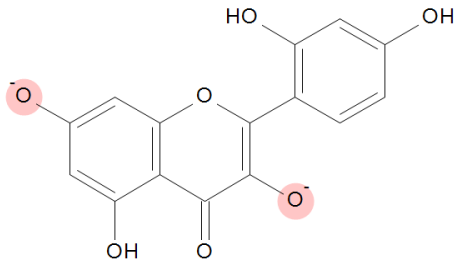
PS5



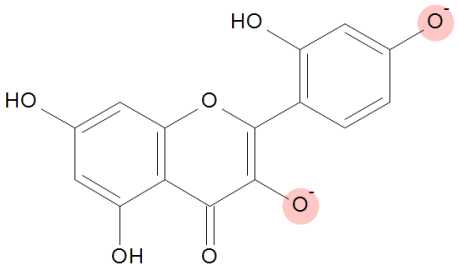
PS6

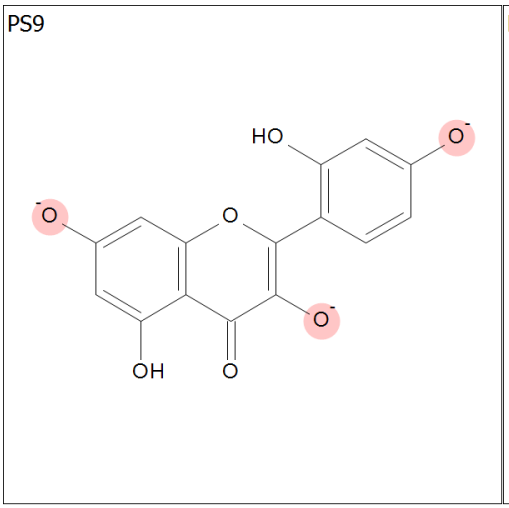


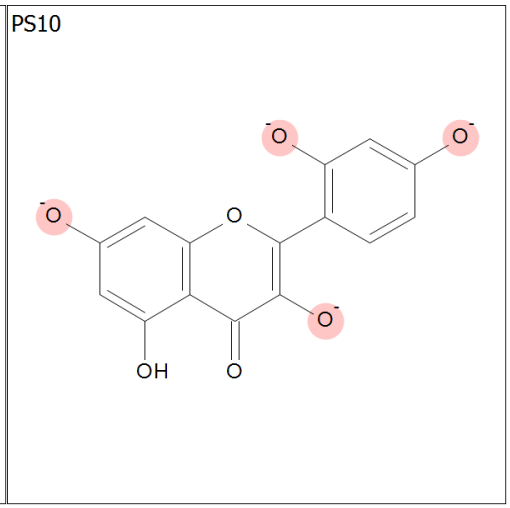
PS7

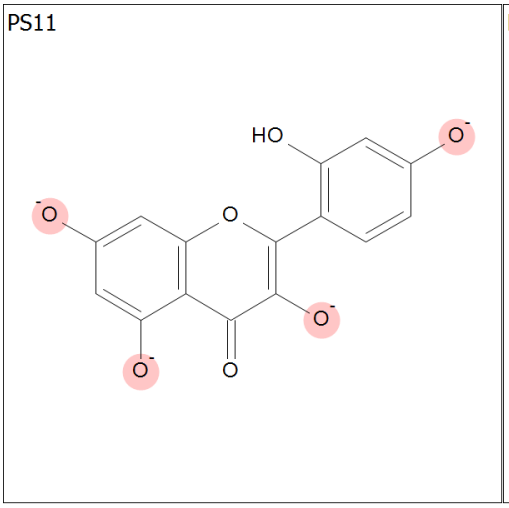


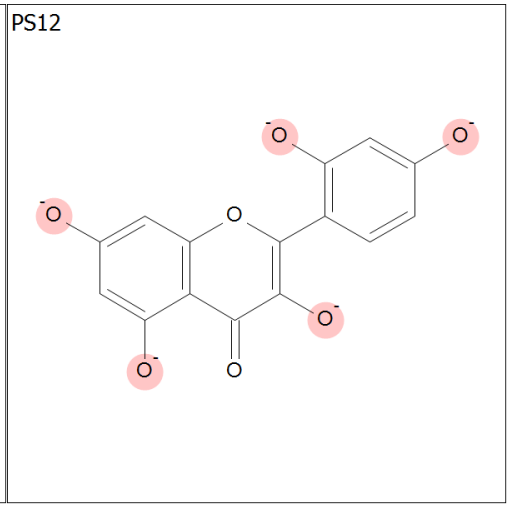
PS8







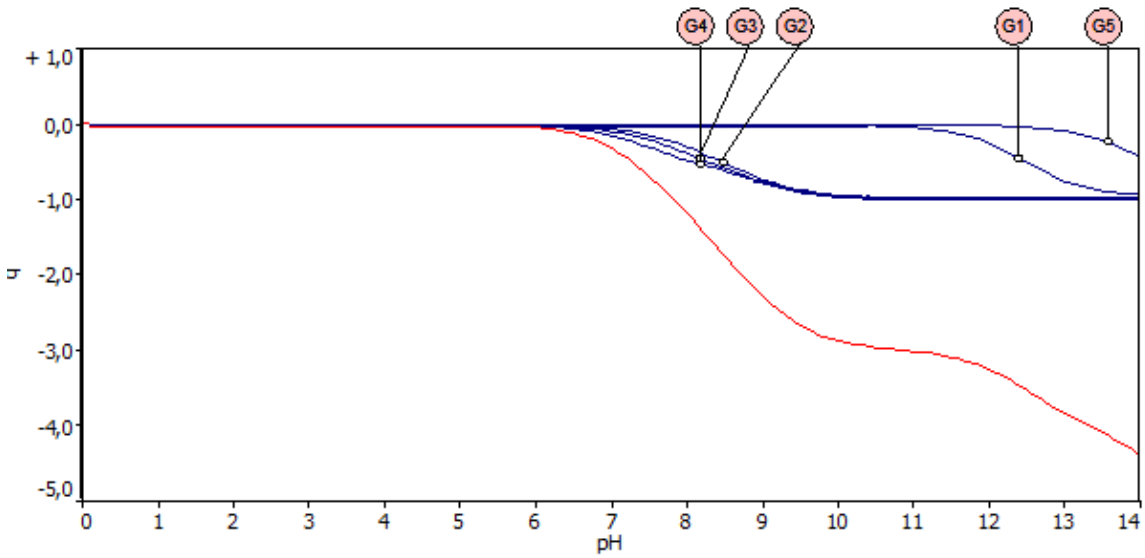


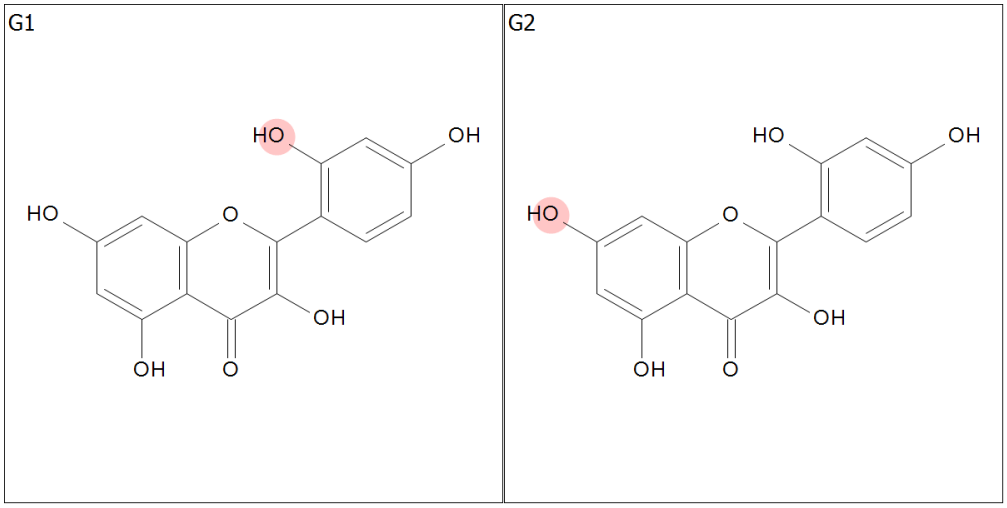


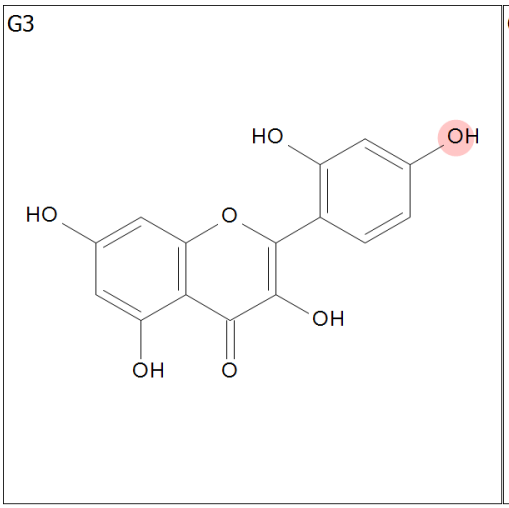
	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
PS1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96	0,88	0,70	0,46	0,14	0,00	0,00	0,00
PS2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
PS3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,05	0,09	0,10	0,02	0,00	0,00
PS4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,09	0,15	0,17	0,03	0,00	0,00
PS5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,14	0,24	0,28	0,05	0,00	0,00
PS6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,09	0,17	0,04	0,00
PS7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,08	0,15	0,03	0,00
PS8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,10	0,18	0,04	0,00
PS9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,38	0,87	0,94

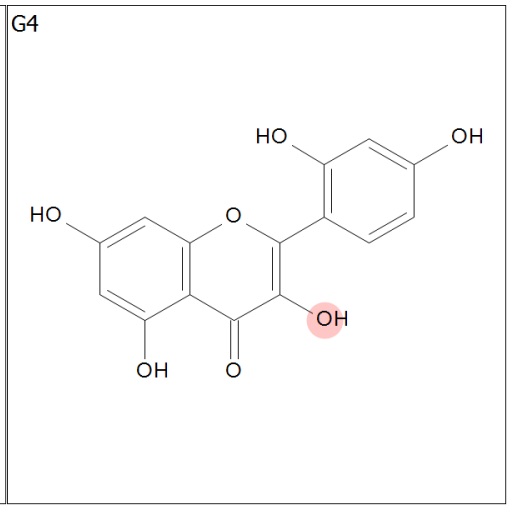
PS10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
PS11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

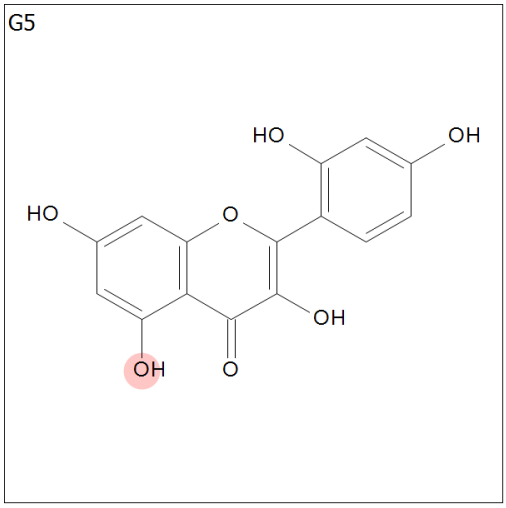
Stanja ionogenih skupina *vs* pH











-	1,7	2	3	4	4,6	5	6	6,5	7	7,4	8	9	10	11
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01	-0,04
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,02	-0,06	-0,13	-0,30	-0,73	-0,96	-0,99
G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,04	-0,10	-0,19	-0,39	-0,77	-0,96	-0,99
G4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,02	-0,06	-0,15	-0,28	-0,48	-0,76	-0,96	-0,99
G5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,04	-0,12	-0,32	-0,60	-1,19	-2,28	-2,88	-3,02

Pregledom literature, pronađene su računalno predviđene vrijednosti pK_a morina. Tako je prema *ChemAxon* pK_a morina (najjača kiselina) = 6,43 i pK_a (najjača baza) = -4,1 [22-24]. Osim računalno predviđenih, mogu se pronaći eksperimentalno utvrđene vrijednosti. Nekoliko se radova bavi ovom problematikom, bilo s eksperimentalnim ili s računalnim pristupom. Međutim, bitno je naglasiti da oba pristupa (eksperimentalni i računalni pristup) imaju i prednosti i nedostatke koji neminovno dovode do neslaganja u rezultatima. Ipak, u nekim slučajevima dolazi koliko-toliko do preklapanja objavljenih vrijednosti.

U radu Herrero-Martinez i sur. (2005) kapilarnom zonskom elektroforezom su određene ionizacijske konstante za neke flavanole, pa i za morin. Dobivene pK_a vrijednosti su uspoređene s izračunatima primjenom SPARC programa. Ovaj program predviđa mikroskopske i makroskopske pK_a vrijednosti prema redoslijedu deprotonacije na različitim –OH skupinama. Utvrdili su da se u slučaju flavonola, prva deprotonacija odvija u prstenu A a druga u prstenu B. Utvrdili su da morin ima kiselije pK_a vrijednosti u odnosu na ostale flavonoide, vjerojatno zbog izraženije konjugacije u molekuli morina u odnosu n ostale spojeve [25].

U radu su dane eksperimentalno utvrđene (makroskopske) pK_a za morin dobivene kapilarnom elektroforezom (CE), te one iznose 4.97 ± 0.03 (pK_{a1}), 8.37 ± 0.08 (pK_{a2}), 10.18 ± 0.12 (pK_{a3}). Računalno utvrđene (makroskopske) pK_a su 6,93 (pK_{a1}), 8,32 (pK_{a2}), 9,98 (pK_{a3}) i 11,98 (pK_{a4}). pK_a dobivene kapilarnom zonskom elektroforezom (CZE) iznose 5,06 (pK_{a1}), 8,64 (pK_{a2}) i 10,62 (pK_{a3}, pK_{a4} nije određena jer ova metoda određuje pK_a do pH = = 12, a pK_{a4} je iznad te vrijednosti). Usporedbom dobivenih rezultata može se vidjeti da dolazi do određenih odudaranja, npr. u slučaju pK_{a1} [25].

Eksperimentalne CE vrijednosti za pK_{a1} su niže od onih dobivenih računalno ili pomoću CZE. Spektrofotometrijska vrijednost za pK_{a1} morina također je niža [26]. pK_{a2} i pK_{a3} u slučaju CE su malo više od onih predviđenih SPARC-om [25].

Kao najkiselija pokazala se –OH skupina označena u 2 prstenu slovom A (prema numeraciji u ovom radu, to je atom br. 21, Slika 5.). Prsten je konjugiran, pa se negativan naboj nastao deprotonacijom –OH skupine A može lakše stabilizirati, što objašnjava nižu vrijednost pK_{a1} [25].

Druga –OH grupa koja deprotonira je označena kao grupa E u prstenu 1 (prema numeraciji korištenoj ovdje, to je atom br. 22, Slika 5.) [25]. ^{13}C-NMR studije [27] predložile su redoslijed deprotonacije flavonola: A, E, B, C. Ovaj redoslijed je u skladu s onim koji daje SPARC. Međutim, u slučaju morina, –OH skupina u poziciji F (prema ovdje korištenoj

numeraciji, to je atom br. 19, Slika 5.) se pokazala kiselijom od one u poziciji E. Jača kiselost skupine F potvrđena je i ^{13}C-NMR-om [25, 27].

Arriagada i sur. (2016) ističu da je pri pH = 7 i pH = 9 morin ioniziran i formira fenolatni ion. Ionizacija funkcijskih skupina morina ovisi o njihovom položaju i o pH medija, ali pri pH = 7 samo –OH skupina na poziciji 2' prstena B je ionizirana (prema ovdje korištenoj numeraciji, to je atom br.19, Slika 5.). To je najkiselija skupina morina, a pK_a = = 5,2 [28, 29].

U radu Jangid i sur. (2018) spomenute su dvije pKa vrijednosti, pK_{a1} = 3,46 i pK_{a2} = 8,1. pK_{a1} je niža od one karakteristične za bioflavonoide, a smatra se da je posljedica prisutnosti tri –OH skupine u B i C prstenu. Ove *para* pozicionirane –OH skupine pokazuju izraženu konjugaciju s B i C prstenom. Stoga, u bazičnom mediju lakše dolazi do disocijacije nego što je to slučaj kada se promatra –OH skupina prstena A. U drugih bioflavonoida, intramolekulska vodikova veza između *m*- i *p*- pozicioniranih –OH skupina onemogućava disocijaciju protona s –OH skupina, što rezultira višim pK_a vrijednostima. Međutim, kod morina, *p*- pozicionirana –OH skupina ne može sudjelovati u intramolekulskim vodikovim vezama, zbog čega je pK_a snižen [30].

5. Zaključak

Morin pripada klasi organskih spojeva poznatih kao flavonoli. Flavonoli su spojevi koji sadrže flavonsku (2-fenil-1-benzopiran-4-on) okosnicu koja nosi hidroksilnu skupinu na poziciji 3. Stoga se morin smatra flavonoidom. Morin je spoj gorkog okusa te se može pronaći u raznom voću i povrću, što bi morin moglo učiniti potencijalnim biomarkerom za konzumaciju ove hrane [31].

Iako je danas dostupno nekoliko eksperimentalnih metoda određivanja pK_a, koje su se pokazale više-manje uspješnima, za neke je spojeve još uvijek teško uspješno odrediti pK_a. Problem su primjerice izuzetno slabe ili jake kiseline, kao i intermedijarni spojevi kratkog životnog vijeka. Zbog toga se veliki napor ulaže u razvoj teorijskih modela predviđanja ovog parametra i u povećavanje točnosti ovih metoda. Teorijske metode se temelje na strukturi spoja, ali su još uvijek prilično ograničene i daleko od idealnih rezultata. Stoga se danas smatra prihvatljivim odstupanje do 2 jedinice pK_a [32].

Rezultati prokazani u radu dobiveni su pomoću programa *ACD/pKa Percepta*. Prema rezultatima, primjenom Classic algoritma dobiveno je da je najkiseliji pK_a pri 6,3 ±0,4., što se ne slaže s prethodno objavljenim studijama. Kod drugog disocijacijskog stupnja vrijednost najvišeg pK_a za morin iznosi 7,22, kod trećeg disocijacijskog stupnja pK_a iznosi 8,436, kod četvrtog stupnja 10,201, a kod petog stupnja 11,162. Brojčane vrijednosti se koliko-toliko preklapaju s prethodno objavljenima. Obzirom na redoslijed deprotonacije, može se uočiti odstupanje u odnosu na prethodno objavljene rezultate. Rezultati dobiveni primjenom GALAS algoritma daju malo drugačiju sliku, ali su odstupanja u odnosu na prethodno objavljene studije i dalje prisutna.

6. Literaturna vrela

[1] A. Scalbert, I. T. Johnson, M. Saltmarsh, *Am. J. Clin. Nutr*. **81** (2005), 215S-217S.

[2] R. Tsao, *Nutrients*. **2** (2010), 1231-1246.

[3] M. Abbas, F. Saeed, M. F. Anjum, M. Afzaal, T. Tufail, M. S. Bashir, A. Ishtiaq, S. Hussain, H. A. R. Suleria, *Int. J. Food Prop*. **1** (2016), 1532-2386.

[4] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, *Cambridge University Press*, **5** (2016), 1--15.

[5] M. K. Hossain, A. A. Dayem, J. Han, Y. Yin, K. Kim, S. K. Saha, G. M. Yang, H. Y. Choi, S. G. Cho, *Int. J. Mol. Sci,* **17** (2016), 569.

[6] R. Cermak, S. Wolffram, *Curr. Drug Metab,* **7** (2012), 729-744.

[7] A. Caselli, P. Cirri, A. Santi, P. Paoli, *Curr Med Chem*, **8** (2016), 774-791.

[8] M. Tan, J. Zhu, Y. Pan, Z. Chen, H. Liang, H. Liu, H. Wang, *Bioinorg. Chem. App*. **2009** (2009), 347872.

[9] S. A. Rajput, X. Q. Wang, H. C. Yan, *Biomed Pharmacother*, **138** (2021), 373-382.

[10] H. S. Lee, K. H. Jung, S. W. Hong, I. S. Park, C. Lee, H. K. Han, D. H. Lee, S. S. Hong, *Arch Pharm Res*, **31** (2008), 1160-1165.

[11] J. C. Kromann, F. Larsen, H. Moustafa, J. H. Jensen, *PeerJ*, **4** (2016), e2335.

[12] A. Albishri, J. M. Cabot, E. Fuguet, M. Rosés, *J. Chromatogr. A*. **1665** (2022), 1231-1246.

[13] A. C, Lee, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Model.* **9** (2009), 2013-2033.

[14] B. Pathare, V. Tambe, V. Patil, *Int. J. Pharm. Pharm.* **6** (2014), 26-34.

[15] S. Babić, A. J. M. Horvat, D. Mutavdžić-Pavlović, M. Kaštelan-Macan, *Trends in Analytical Chemistry*. **26** (2007), 1043-1061.

[16] J. Reijenga, A. van Hoof, A. van Loon, B. Teunissen, *Anal. Chem. Insights*. **8** (2013), 53-71.

[17] J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye, J. R. Greenwood, M. R. Timlin, M. Uchimaya, *J. Comput. Aided Mol. Des*. **12** (2007), 681-691.

[18] S. Špirtović-Halilović, D. Završnik, *J. Serb. Chem. Soc.* **2** (2010), 243-248.

[19] M. Tutone, A. Lauria, A. M. Almerica, *Interdiscip Sci Comput Life Sci* **8** (2015), 177--185.

[20] https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/physchem-suite/pka/ (27. 9. 2022.)

[21] https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/physchem-suite/pka/#pka_calculations (27. 9. 2022.)

[22] https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0030796 (28. 9. 2022.)

[23] https://foodb.ca/compounds/FDB002736 (28. 9. 2022.)

[24] https://go.drugbank.com/drugs/DB16770 (28. 9. 2022.)

[25] J. M. Herrero-Martinez, M. Sanmartin, M. Roses, E. Bosch, C. Rafols, *Electrophoresis* **26** (2005), 1886-1895.

[26] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994), 4846-4851.

[27] P. K. Agrawal, H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **24** (1983), 177-180.

[28] F. Arriagada, O. Correa, G. Gunther, S. Nonell, F. Mura, C. Olea-Azar, J. Morales, *PLoS ONE* **11** (2016), e0164507.

[29] M. Musialik, R. Kuzmicz, T. S. Pawłowski, G. Litwinienko, *J. Org. Chem.* **74** (2009), 2699-709.

[30] A. K. Jangid, D. Pooja, H. Kulhari, *RSC Adv.* **8** (2018), 28836.

[31] https://foodb.ca/compounds/FDB002736 (28. 9. 2022.)

[32] A. Galano, A. Perez-Gonzalez, R. Castañeda-Arriaga, L. Muñoz-Rugeles, G. Mendoza-Sarmiento, A. Romero-Silva, A. Ibarra-Escutia, A. M. Rebollar-Zepeda, J. R. Leon-Carmona, M. A. Hernandez-Olivares, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Chem. Inf. Model.* **56** (2016), 1714-1724.