

Właściwości antyoksydacyjne cieczy jonowych na bazie witaminy C

Kamil CZERNIAK* - Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Poznań

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2016, 70, 9, 521–526

Wstęp

Niesłabnące i trwające od kilku dekad zainteresowanie cieczami jonowymi wynika z ich ogromnego potencjału aplikacyjnego [1]. Termin ciecze jonowe (ILs) odnosi się do związków składających się z jonów oraz o temperaturze topnienia poniżej 100°C [2]. ILs składają się zwykle z kationu organicznego oraz anionów, zarówno organicznych, jak i nieorganicznych [3–7]. Ponadto ILs opisywane są jako związki projektowalne, ponieważ ich parametry fizykochemiczne mogą być kontrolowane przez dobór zarówno kationu, jak i anionu [8]. Głównie ze względu na swoje wyjątkowe właściwości ILs stosowane są jako przyjazne środowisku zamienniki konwencjonalnych, lotnych rozpuszczalników w syntezie organicznej [9]. Rodniki, to niestabilne cząsteczki posiadające niesparowany elektron na zewnętrznej orbicie. Najczęściej zalicza się do nich reaktywne formy tlenu, takie jak: rodniki ponadtlenkowe, hydroksylowe, peroksydowe, alkoksydowe oraz różne tlenki azotu [10]. Związki te pełnią podwójną rolę w systemach biologicznych, ponieważ mogą wykazywać zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na organizm. Ich działanie w komórkach obejmuje obronę przed czynnikami zakaźnymi oraz mogą pełnić funkcję układów sygnalizacyjnych [11]. Jednakże istnieje wiele dowodów, że rodniki powodują uszkodzenia biocząsteczek w wyniku utleniania, co wpływa na starzenie się oraz różne choroby organizmu, przede wszystkim choroby sercowo-naczyniowe, zaburzenia neurodegeneracyjne i raka [12, 13]. Antyoksydanty, to substancje, które znacznie zmniejszają negatywne oddziaływania rodników na funkcjonowanie ludzkiego ciała. Zalicza się do nich również związki będące chelatorami metali, inhibitorami enzymów utleniających oraz kofaktory enzymów antyoksydacyjnych [14]. Naturalne antyoksydanty występujące w owocach i warzywach dzielą się na trzy grupy: witaminy, fenole oraz karotenoidy [15]. Witamina C (kwas L-askorbinowy) jest rozpuszczalnym w wodzie antyoksydantem w postaci sześciowęglowego laktonu, powstającym z glukozy w wątrobie większości ssaków za wyjątkiem człowieka, małp oraz świnek morskich [16]. Bierze udział w tworzeniu hormonów steroidowych, syntezie kolagenu oraz wpływa na przepuszczalność naczyń. W medycynie znalazła zastosowanie do regulacji procesów koagulacji krwi, neogenezy komórek oraz absorpcji żelaza [17]. Witamina C jest szeroko stosowana jako naturalny antyoksydant, jednakże jej nadmiar może powodować biegunkę, podrażnienie żołądka oraz kamienie nerkowe [18].

Część eksperymentalna

Surowce

4-Metylomorfolina ($\geq 98\%$), 1-metylopiperydyna (99%), 2-dimetyloaminoetanol ($\geq 98\%$), 3-dimetylamino-1-propanol (99%), 1-bromobutan (99%), kwas L-askorbinowy (99%), L-askorbinian sodu (99%), 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (95%), 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) sól amonowa ($\geq 98\%$), nadsiarczan sodu ($\geq 98\%$) zostały dostarczone przez Sigma-Aldrich i stosowane bez oczyszczenia. Pozostałe odczynniki oraz rozpuszczalniki zostały zakupione w firmie Avantor Performance Materials Poland SA.

*Autor do korespondencji:

Mgr inż. Kamil CZERNIAK, e-mail: kamil.z.czeraniak@doctorate.put.poznan.pl

Analizy

Struktura otrzymanych związków została potwierdzona za pomocą widm protonowego węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) wykonanych za pomocą spektrometru Varian Mercury 300. Do pomiaru temperatury topnienia zastosowano MP90 Melting Point System pracujący z gradientem temperatury wynoszącym 5°C/min. Zawartość wody zmierzono za pomocą titratora Karla Fischera firmy Aquastar. Gęstość otrzymanych cieczy jonowych zbadano za pomocą gęstościomierza Density Meters firmy Rudolph Research Analytical. Współczynnik refrakcji oznaczono przy użyciu automatycznego refraktometru – Automatic Refractometer J357 firmy Rudolph Research Analytical. Badanie rozpuszczalności przeprowadzono preparatyki Vogela [19]. Stabilność termiczna oraz przemiany fazowe zostały zmierzone za pomocą techniki TGA oraz DSC urządzeniem Mettler Toledo Stare TGA/DSC I.

Synteza czwartorzędowych bromków

Do kolby reakcyjnej wprowadzono 0,1 mola bromobutanu oraz 50 cm³ acetonitrylu. Następnie dodano odpowiednią aminę w ilości 0,11 mola. Synteza była prowadzona w temp. 60°C przez 24 godziny, zaś po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano używając wyparki próżniowej. W celu wytrącenia produktu z mieszaniny poroakcyjnej dodano aceton. Produkt w postaci białego osadu wyodrębniono poprzez filtrację i suszono pod obniżonym ciśnieniem w temp. 60°C przez 24 godziny.

Synteza ILs

Odpowiedni bromek czwartorzędowy (0,05 mola) rozpuszczono w 150 cm³ metanolu, po czym dodano 60 cm³ żywicy jonowymiennej w postaci metanolowej zawiesiny. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie żywicę oddzielono od mieszaniny reakcyjnej przez filtrację i do przesącza dodano kwas L-askorbinowy (0,05 mola). Po 30 minutach reakcji rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując gotowy produkt. Związek był suszony pod zmniejszonym ciśnieniem 48 godzin w temperaturze pokojowej.

Metoda ABTS

Rodniki ABTS otrzymano poprzez zmieszanie roztworu 7 mM ABTS z 2,45 mM roztworem nadsiarczanu sodu. Po okresie 16 godzin otrzymaną mieszaninę rozcieńczono metanolem do absorbancji $0,70 \pm 0,03$ w 734 nm. Następnie 0,95 cm³ świeżo przygotowanego roztworu ABTS dodano do 0,05 cm³ wodnego roztworu badanego związku. Reakcja była prowadzona przez 6 minut w temperaturze pokojowej i absorbancję zmierzono w 734 nm. Aktywność antyoksydacyjną obliczono za pomocą równania:

$$\% \text{aktywność antyoksydacyjna ABTS} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie: A_1 oznacza absorbancję próbki bez dodatku badanego związku; A_2 absorbancja próbki z dodatkiem badanego związku. Wyniki wyrażone są w postaci wartości EC_{50} .

Metoda DPPH

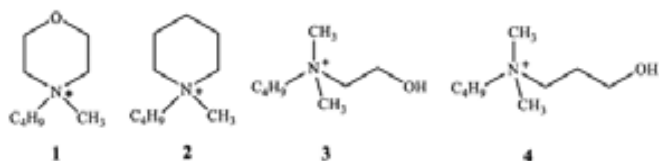
Na początku, 1,95 cm³ świeżo przygotowanego roztworu DPPH w metanolu o stężeniu 60 μM dodano do 0,05 cm³ wodnego roztworu badanego związku. Zmianę absorbancji w 515 nm mierzono po okresie 30 minut inkubacji bez dostępu światła i w temperaturze pokojowej. Aktywność antyoksydacyjną obliczono za pomocą równania:

$$\% \text{ aktywność antyoksydacyjna DPPH} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: A₁ oznacza absorbancję próbki bez dodatku badanego związku; A₂ absorbancja próbki z dodatkiem badanego związku. Wyniki wyrażone są w postaci wartości EC₅₀.

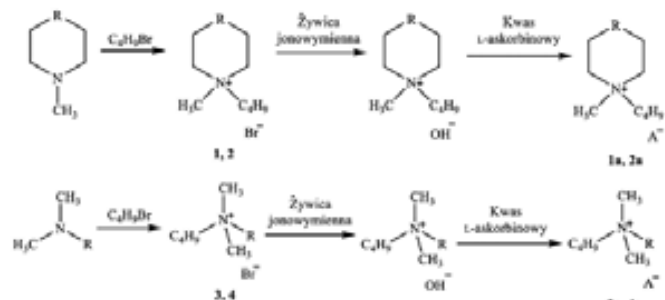
Omówienie wyników

Czwartorzędowe bromki (Rys. 1) będące źródłem kationów w syntezie ILs otrzymano w reakcji Menshutkina, zachodzącej pomiędzy trzeciorzędowymi aminami oraz czynnikiem czwartorzędującym (Rys. 2). Jego rolę pełnił we wszystkich przypadkach bromobutan.



Rys. 1. Struktura kationów otrzymanych ILs

Otrzymane prekursorzy były białymi i higroskopijnymi ciałami stałymi, charakteryzującymi się temperaturami topnienia (T_m) w zakresie od 131 do 241°C. Obecność grupy hydroksylowej oraz alifatycznego podstawnika powodowała znaczne obniżenie T_m. Najwyższe wartości zmierzono w przypadku soli 1 i 2.



Rys. 2. Otrzymywanie cieczy jonowych z anionem askorbinianowym

Do syntezy ILs wybrano reakcję zobojętniania zachodzącą pomiędzy czwartorzędowymi wodorotlenkami uzyskanymi z prekursorów oraz kwasem L-askorbinowym. Zastosowanie żywicy anionowej pozwoliło wyeliminować konieczność dalszego oczyszczania związków. ILs zostały otrzymane z wysoką wydajnością, przekraczającą we wszystkich przypadkach 98%. Po każdej syntezie związki suszono przez 48 godzin pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Wszystkie ILs z anionem askorbinianowym były pomarańczowymi cieczami wykazującymi bardzo wysoką lepkość. Do potwierdzenia czystości związków zastosowano analizę elementarną, zaś zawartość wody określono poprzez Karl-Fischer titrację i była mniejsza niż 1%.

Dla syntezowanych ILs określono podstawowe właściwości fizykochemiczne w temp. 20°C (Tab. 2). Najmniejszą gęstością charakteryzowały się sole z kationem morfoliniowym (1a) oraz piperydiniowym (2a), dla których pomiary wynosiły odpowiednio 1,22138 oraz 1,22993 g/cm³. Współczynnik refrakcji w nieznacznym stopniu zależy od rodzaju kationu występującego w strukturze ILs. Odwrotnie jak w przypadku gęstości, najwyższą wartością charakteryzują się związki 1a i 2a. Pozostałe amoniowe ILs wykazują porównywalne wyniki wynoszące ok. 1,53.

Tablica 1

Syntezone czwartorzędowe bromki oraz ILs

Sól	R	Wydajność %	Postać w 25 °C	Temp. topnienia °C
1	O	95	ciało stałe	216–218
2	CH ₂	92	ciało stałe	240–241
3	C ₂ H ₅ OH	93	ciało stałe	123–125
4	C ₃ H ₈ OH	94	ciało stałe	131–133
1a	O	99	ciecz	-
2a	CH ₂	98	ciecz	-
3a	C ₂ H ₅ OH	98	ciecz	-
4a	C ₃ H ₈ OH	99	ciecz	-

Otrzymane ILs wykazują niskie wartości temperatur zeszklenia (T_g) wynoszące od -5,54 do 12,21°C. Obecność atomu tlenu w strukturze kationu morfoliniowego powoduje znaczne obniżenie T_g w porównaniu do związku 2a z kationem piperydiniowym. W przypadku ILs 3a oraz 4a, wydłużenie podstawnika alkilowego zawierającego grupę hydroksylową wpływa na wzrost wartości T_g z 0,42 do 7,64°C. ILs z anionem askorbinianowym można zaliczyć do związków stabilnych termicznie. Początkowa temperatura rozkładu (T_{onset}) w najgorszym przypadku wynosiła 169°C dla soli 4a. Dla pozostałych związków wartość ta była większa niż 190°C. W przypadku parametru T_{onset50} obecność różnych kationów nie wpływa znacząco na stabilność.

Tablica 2

Właściwości fizykochemiczne otrzymanych ILs

Ciecz jonowa	T _g ^a °C	T _{onset} ^b °C	T _{onset50} ^c °C	n ^d	Gęstość ^d g/cm ³
1a	-5,54	205	231	1,53886	1,22138
2a	12,21	212	238	1,54196	1,22993
3a	0,42	194	225	1,52600	1,23483
4a	7,64	169	228	1,52585	1,26519

^atemperatura zeszklenia, ^btemperatura rozkładu, ^ctemperatura ubytku 50% masy, ^dw 20 °C

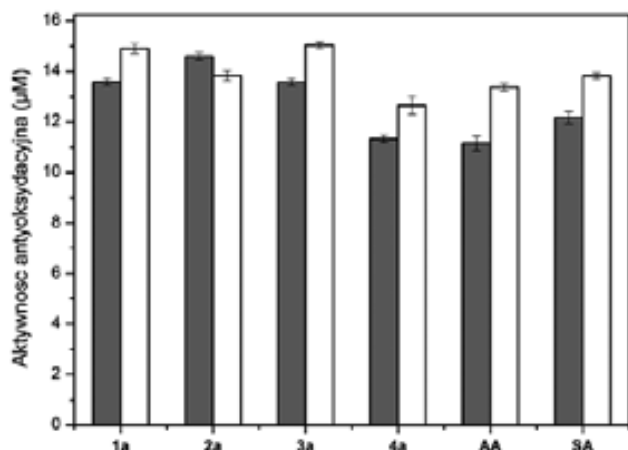
Tablica 3

Rozpuszczalność związków w 25°C^a

Rozpuszczalnik	Związek					
	1a	2a	3a	4a	AA ^a	SA ^b
woda	+	+	+	+	+	+
Metanol	+	+	+	+	-	-
DMSO	+	+	+	+	+	-
Acetonitryl	-	-	-	-	-	-
Aceton	-	-	-	-	-	-
Izopropanol	±	+	±	-	-	-
Octan etylu	-	-	-	-	-	-
Chloroform	-	-	-	-	-	-
Toluen	-	-	-	-	-	-
Heksan	-	-	-	-	-	-

^a+ dobrze rozpuszczalny, ± średnio rozpuszczalny, - nierozpuszczalny, ^bkwas L-askorbinowy, ^cL-askorbinian sodu

Rozpuszczalność ILS przedstawiona została w Tabelicy 3. Badane sole charakteryzowały się bardzo dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach polarnych, takich jak: woda, metanol oraz DMSO. Obecność w związku **2a** kationu piperydyniowym powodowała znaczny wzrost rozpuszczalności w izopropanolu. Wszystkie ILS były nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach o niskiej polarności, takich jak heksan i toluen, jak również w octanie etylu, chloroformie, acetonie i acetonitrylu. Kwas L-askorbinowy (AA) oraz L-askorbinian sodu (SA) posiadają podobne wyniki badań rozpuszczalności, zaś największa różnica dotyczyła niskiej rozpuszczalności w metanolu oraz w izopropanolu.



Rys. 3. Aktywność antyoksydacyjna (wartości EC₅₀) zmierzona za pomocą metody ABTS (szare kolumny) oraz DPPH (białe kolumny). Kwas L-askorbinowy (AA) oraz L-askorbinian sodu (SA) zastosowano jako związki referencyjne

Badane związki, w przypadku metody DPPH, wykazywały nieznacznie mniejszą aktywność antyoksydacyjną w stosunku do metody ABTS (Rys. 3). Wyjątek stanowił związek **2a**. Syntezowane ILS z anionem askorbinianowym charakteryzowały się zdolnością inhibicji rodników DPPH w zakresie wartości EC₅₀ wynoszącym od 12,65 ± 0,37 do 15,04 ± 0,13 µM. Dla badań stosujących ABTS zakres ten wahał się w przedziale od 11,34 ± 0,14 do 14,60 ± 0,15 µM. Jako związki odniesienia zastosowano kwas L-askorbinowy oraz jego sól sodową. Badania wykazały, że witamina C w postaci soli posiada nieznacznie mniejszą skuteczność zwalczania wolnych rodników. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku ILS. Najmniejszą aktywnością w stosunku do kwasu wykazały sole **1a** i **3a**. Jednakże zastosowanie kationu amoniowego z podstawnikiem hydroksypropylu pozwoliło uzyskać związek o większej skuteczności działania w przypadku metody DPPH lub porównywalnej dla metody ABTS.

Podsumowanie

Podsumowując, możliwe jest uzyskanie antyoksydacyjnych ILS zbudowanych z kationów zawierających krótki podstawnik alkilowy oraz anion pochodzący od naturalnej występującej witaminy C. W wyniku reakcji zobojętniania otrzymano związki charakteryzujące się wysoką czystością oraz aktywnością antyoksydacyjną. Wybór anionu wiązał się z jego powszechną dostępnością oraz dodatkowo niską ceną, w porównaniu do innych kwasów o działaniu antyoksydacyjnym. Otrzymane związki były lepkiemi cieczami w temperaturze pokojowej oraz charakteryzowały się wysoką stabilnością termiczną. Ponadto badania wykazały, że dobór kationu może wpływać na zdolność wyłapywania rodników. Zastosowanie tanich anionów w syntezie antyoksydacyjnych ILS stanowi kolejny etap w badaniach i pozwoli rozszerzyć ich potencjał aplikacyjny.

Praca została sfinansowana ze środków na działalność statutową nr 03/32/DSMK/0618

Literatura

- Maciejewski H., Szubert K., Fiedorow R., Giszter R., Niemczak M., Pernak J., Klimas W.: *Diallyldimethylammonium and trimethylvinylammonium ionic liquids – Synthesis and application to catalysis*. Appl. Catal. A 2013, **451**, 168–175.
- Rogers R.D., Seddon K.R.: *Ionic liquids – solvents of the future?* Science 2003, **31**, 792–793.
- Pernak J.: *Ciecze jonowe jako związki wielofunkcyjne*. Przem. Chem. 2010, **89**, 1499–1503.
- Pernak J., Syguda A., Janiszewska D., Materna K., Praczyk T.: *Ionic liquids with herbicidal anions*. Tetrahedron 2011, **67**, 4838–4844.
- Pernak J., Niemczak M., Chrzanowski Ł., Ławniczak Ł., Fochtmann P., Marcinkowska K., Praczyk T.: *Betaine and carnitine derivatives as herbicidal ionic liquids*. Chem. Eur. J. 2016, doi:10.1002/chem.201601952.
- Pernak J., Czerniak K., Biedziak A., Marcinkowska K., Praczyk T., Erfurt K., Chrobok A.: *Herbicidal ionic liquids derived from renewable sources*. RSC Adv. 2016, **6**(58), 52781–52789.
- Syguda A., Marcinkowska K., Materna K.: *Pyrrrolidinium herbicidal ionic liquids*. RSC Adv. 2016, **6**(68), 63136–63142.
- Hallett J.P., Welton T.: *Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis*. 2. Chem. Rev. 2011, **111**, 3508–3576.
- Weyershausen B., Lehmann K.: *Industrial application of ionic liquids as performance additives*. Green. Chem. 2005, **7**, 15–19.
- Fang Y.-Z., Yang S., Wu G.: *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition 2002, **18**, 872–879.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem. Biol. Interact. 2006, **160**, 1–40.
- Pyrzyńska K., Pękał A.: *Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples*. Anal. Methods 2013, **5**, 4288–4295.
- Niki E.: *Antioxidant capacity of foods for scavenging reactive oxidants and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants*. Food Funct. 2016, **7**, 2156–2168.
- Huang D., Boxin O.U., Prior R.L.: *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. J. Agric. Food Chem. 2005, **53**, 1841–1856.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D.: *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. J. Food. Compos. Anal. 2006, **19**, 669–675.
- Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.-H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M.: *Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention*. J. Am. Coll. Nutr. 2003, **22**, 18–35.
- Vlasova E.A., Hossenauer-Ilicheva N., Salnikov D.S., Kudrik E.V., Markarov S.V., Van Eldik R.: *Kinetics and mechanism of the Co(II)-assisted oxidation of L-ascorbic acid by dioxygen and nitrite in aqueous solution*. Dalton Trans. 2009, **47**, 10541–10549.
- Huang S., Zhu F., Xiao Q., Su W., Sheng J., Huang C., Hu B.: *A CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell QDs-based “OFF– ON” fluorescent biosensor for sensitive and specific determination of L-ascorbic acid*. RSC Adv. 2014, **4**, 46751–46761.
- Vogel A.I.: *Preparatyka organiczna*. Wydanie trzecie. WNT Warszawa 2006.

Mgr inż. Kamil CZERNIAK ukończył studia na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej (2013). Obecnie jest doktorantem Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Zainteresowania badawcze – technologia chemiczna oraz ciecze jonowe.

e-mail: kamil.z.czerniak@doctorate.put.poznan.pl, tel: +48 61 6653541