

ЗМІНА СТРУКТУРИ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ ЯК СПОСІБ РЕГУЛЮВАННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Єфімова І.В.¹, Смирнова О.В.¹, Бессарабов В.І.^{1,2}, Семенова Р.Г.¹

¹Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, відділ хімії вугілля, відділ хімії гетероциклічних сполук, м. Київ, Україна, e-mail: I.V.Efimova@nas.gov.ua

²Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: drvib500@gmail.com

У роботі визначено антиоксидантну активність гумінових кислот і продуктів їх хімічного модифікування в процесах радикально - ланцюгового окиснення в органічному середовищі. За модельну систему було обрано ініційоване азодіізобутіронітрілом рідинофазне окиснення кумолу в середовищі диметилсульфоксиду. Інгібуючу дію гумінових кислот різної структури вивчено у широкому діапазоні концентрацій. За кінетикою процесу окиснення стежили газоволюмометрично, вимірюючи кількість поглиненого кисню. Проведено реакцію ацилювання гумінових кислот хлористим бензоїлом в умовах інверсійного трансфазного каталізу. Методом потенціометричного титрування показано, що реакція взаємодії гумінових кислот з бензоїлхлоридом може протікати по гідроксильним (-ОН) та карбоксильним (-COOH) групам. Доведено зміну антиоксидантної активності ацильованих гумінових кислот в порівнянні з вихідними формами, що може бути пов'язано зі зменшенням кількості активних гідроксильних груп в структурі макромолекули за рахунок їх зв'язування в результаті хімічної модифікації. Зроблено висновок, що одним із способів регулювання окислювально-відновних властивостей гумінових речовин може бути їх спрямована хімічна модифікація, яка дозволяє шляхом зміни кількості та будови функціональних груп у складі макромолекули змінювати властивості природних субстратів.

Ключові слова: гумінові кислоти, окислювально-відновні властивості, антиоксидантна активність, радикально-ланцюгове окиснення, реакція ацилювання.

MODIFICATION OF THE HUMIC ACIDS STRUCTURE AS A METHOD OF ADJUSTING ANTIOXIDANT PROPERTIES

Efimova I.V.¹, Smirnova O.V.¹, Bessarabov V.I.^{1,2}, Semenova R.G.¹

¹L.M. Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of the NAS of Ukraine, Department of Coal Chemistry, Department of Chemistry of Heterocyclic Compounds, Kyiv, Ukraine, e-mail: I.V.Efimova@nas.gov.ua

²Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: drvib500@gmail.com

In this paper we determined the antioxidant activity of humic acid and their chemical modification products in the processes of radical chain oxidation in an organic medium. For the model system was chosen initiated by azodiisobutyronitrile liquid-phase oxidation of cumene in the environment of dimethyl sulfoxide. The inhibitory effect of humic acids of various structures has been studied over a wide range of concentrations. The kinetics of the oxidation process were monitored gasvolumometrically, measuring the amount of oxygen absorbed. Spent acylation reaction of humic acid with benzoyl chloride under the inversion interphase catalysis. Potentiometric titration showed that the reaction of humic acid with benzoyl chloride can take place at the hydroxyl (-OH) and carboxyl (-COOH) groups. Change proven antioxidant activity acylated humic acids from baseline forms that may be associated with a decrease in the number of active hydroxyl groups in the macromolecule structure by binding them by chemical modification. It is concluded that one of the ways of regulating the redox properties of humic substances can be their directed chemical modification, which allows by changing the number and structure of functional groups in the macromolecule composition to change the properties of natural substrates.

Keywords: humic acids, redox properties, antioxidant activity, radical-chain oxidation, acylation reaction.

Найбільш хімічно активною частиною бурого вугілля, торфу, ґрунтового гумусу є гумінові кислоти (ГК). Це робить їх унікальними об'єктами для вирішення важливих завдань різного плану. Висока реакційна здатність гумінових кислот обумовлена наявністю в складі їх макромолекул великої кількості функціональних груп, перш за все, карбоксильних і гідроксильних. Препарати ГК перспективні для застосування в сільському господарстві, ветеринарії, медицині та технічних напрямках [1-3]. У зв'язку з цим, отримання препаратів на основі гумінових кислот з заданими властивостями є актуальним завданням.

Для підвищення ефективності природних ГК перспективним є їх спрямована хімічна модифікація для введення нових функціональних груп або зміни кількості наявних груп в складі їх макромолекули. За допомогою

спрямованої хімічної модифікації стає можливим регулювання поверхнево-активних, комплексоутворюючих, окисно-відновних та інших фізико-хімічних властивостей гумінових кислот, а також їх біологічної активності [4-6]. Окислювально-відновні властивості ГК визначаються їх функціональним складом [7]. Можна вважати, що введення до складу ГК ацильної групи ($>C=O$) змінить функціональний склад макромолекули і вплине на окислювально-відновні властивості гумінових кислот.

Мета дослідження: визначення антиоксидантної активності ГК і продуктів їх хімічного модифікування.

Матеріали і методи дослідження.

Гумінові кислоти отримували з аналітичної проби бурого вугілля Олександрійського родовища (Україна) одноразової екстракцією розчином NaOH ($[NaOH]=0,1$ н.) При співвідношенні твердої і рідкої фаз 1:8 і температурі 293 К ($GK_{(вих)}$). Потім з «сирого» екстракту отримували нерозчинні в воді гумінові кислоти осадженням 5% розчином HCl, який додавали при постійному перемішуванні до pH 1-2. Випавший осад ГК відокремлювали від надосадової рідини центрифугуванням. Осад промивали дистильованою водою до нейтральної реакції середовища (pH 6-7). Промиті гумінові кислоти сушили в сушильній шафі при температурі 353 К до постійної маси. Середня молекулярна маса отриманих таким чином зразків ГК становить приблизно 20 000 [8]. Натрієві солі гумінових кислот отримували розчиненням ГК в 0,1 н розчині NaOH.

Хімічну модифікацію солей нативних гумінових кислот здійснювали при взаємодії їх з бензоїлхлоридом (БХ) в умовах трансфазного каталізу. Реакцію ацилювання проводили наступним чином: в трьохгорлу круглодонну колбу, забезпечену мішалкою, поміщали 0,3 г висушеної до постійної маси гуминової кислоти, додавали 30 мл 0,1 н. розчину NaOH і перемішували до повного розчинення. До отриманого розчину гумату натрію додавали 0,2 мл 0,029 моль/л розчину 4-діметіламінопіридин-N-оксиду (ДМАП-О), що використовується в якості каталізатора. Потім в реакційну суміш додавали розчин бензоїлхлориду

(0,10-0,35 г БХ в 30 мл дихлорметану). Реакційну суміш енергійно перемішували протягом 5 хв. Після закінчення перемішування, органічну і водну фази поділяли за допомогою ділильної лійки. Ацильовані гумінові кислоти ($\text{ГК}_{(\text{ацил})}$) виділяли з водної фази за методикою, наведеною вище.

При потенціометричному титруванні відбиралася аліквота 1% розчину гумата натрія об'ємом 5 мл, до якої додавали 20 мл 0,1 н NaOH і 25 мл дистильованої води. При цьому обсяг титрованого розчину становив 50 мл, а концентрація гумату натрію в титрованому розчині 0,1%. Титрування проводили 0,1 н розчином HCl до рН 2,0 при 293 К. Розчин 1,0% гумату натрію отримували розчиненням навішування сухих гумінових кислот в 0,1 н розчині NaOH. Після додавання кожної порції титранту систему перемішували на магнітній мішалці протягом 3 хв. Аналогічно було проведено титрування розчинів NaOH без гумінових речовин, що містять таку ж кількість лугу, як і в розчинах гумата натрія (холостий дослід). Значення рН розчинів вимірювали на прецизійному рН-метрі (Metrohm 744 рН Meter, Швейцарія). Точки еквівалентності визначали диференціальним методом, як максимуми на диференціальних кривих: $\Delta\text{pH}/\Delta V = f(V_{\text{HCl}})$ [9].

Окислювально-відновні властивості гумінових кислот було вивчено в процесах радикально-ланцюгового окиснення в органічному середовищі як препарати антиоксидантної дії. Вивчали ініційоване азодіізобутіронітрилом (АІБН) ріднофазне окиснення кумолу (ізопропилбензолу, ІПБ) в середовищі диметилсульфоксиду (ДМСО) в присутності вихідних ($\text{ГК}_{(\text{вих})}$) і ацильованих ($\text{ГК}_{(\text{ацил})}$) гумінових кислот в широкому діапазоні концентрацій 0-5,0 г/л. За кінетикою процесу окиснення стежили газоволюмометрично, вимірюючи кількість поглиненого кисню при постійній температурі 348 К і постійному парціальному тиску кисню 760 мм. рт. ст. на установці, описаній в [10]. Вивчення процесу проводилося в кінетичній області, де швидкість реакції не залежить від швидкості перемішування. Швидкість поглинання кисню окислювальною сумішшю розраховували як тангенс кута нахилу кінетичної кривої, отриманої

побудовою залежності кількості поглиненого кисню (V , мл) від часу (t , с). В роботі використовувалися АІБН, ДМСО, ІПБ, очищені за методиками, описаними в [11]. Концентрація ІПБ в досліджуваній системі становила 3,59 моль/л, АІБН – $2,00 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Результати дослідження.

Раніше нами було доведено [12], що ГК мають антиоксидантні властивості. Наявністю ГК обумовлено уповільнення ініційованого окиснення кумолу (ІПБ) молекулярним киснем в гомофазних умовах. Зі збільшенням концентрації ГК в досліджуваній системі спостерігається зменшення швидкості окислення суміші. З метою змінити антиоксидантну активність ГК було проведено їх хімічну модифікацію в умовах інверсійного трансфазного каталізу. Схема реакції ацилювання гумінових кислот по гідроксильних і карбоксильних груп хлорангідридом бензойної кислоти приведена на рисунку 1.

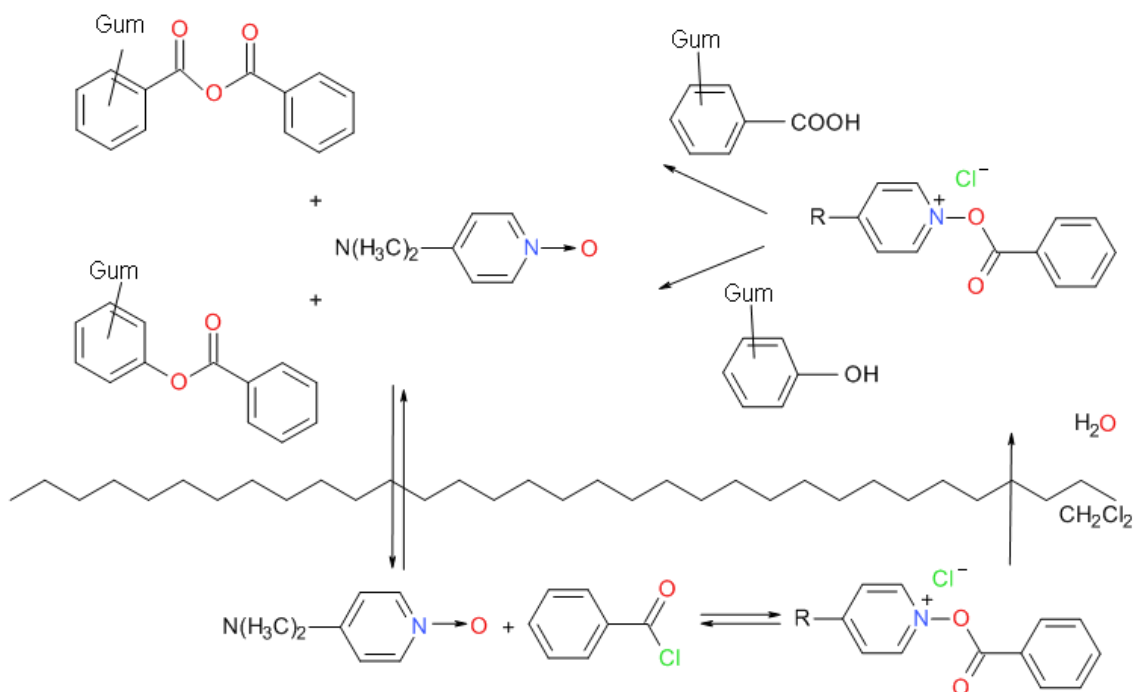


Рисунок 1. Схема реакції ацилювання гумінових кислот хлористим бензоїлом в двофазній системі вода-діхлорметан в присутності каталізатора 4-діметіламінопіридин-N-оксиду.

В якості каталізатора використовували 4-диметиламіно-піридин-N-оксид (ДМАП-О), висока ефективність якого доведена у ряді досліджень для реакцій ацилювання різних фенолів і карбонових кислот [13, 14]. Спеціально поставленими в ідентичних умовах дослідями було показано, що без каталізатора реакція ацилювання гуматов практично не протікає.

Реакція ацилювання гуматов натрію (рис. 2) включає в себе взаємодію бензоїлхлориду (1) з каталізатором ДМАП-О (2) в органічній фазі (дихлорметан):

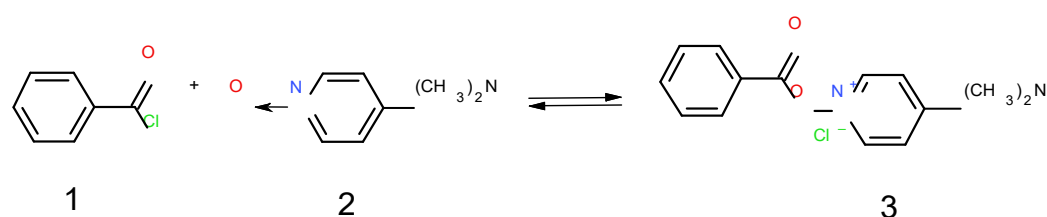


Рисунок 2. Схема реакції ацилювання гуматов натрію.

Утворений хлорид N-бензоїлоксипіридинія (3) переходить у водну фазу, оскільки його розчинність в воді вище, ніж в дихлорметані (константа розподілу для нього в системі $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ становить 96,1; виміряна при $T=293\text{ K}$), де і протікає реакція між цією сполукою і іонами гумату натрію.

За ходом реакції стежили за зменшенням концентрації БХ в дихлорметані. Після закінчення реакції і розшарування системи вода дихлорметан на дві фази, відбирали пробу з органічного шару, записували ІК спектр органічної фази і розраховували інтенсивність смуг поглинання карбонільної групи БХ при $\nu_{\text{C=O}} 1775$ і 1735 cm^{-1} .

В роботі вивчено кінетику взаємодії БХ з різними фракціями гумінових кислот $\text{ГК}_{(\text{вих})}$ в залежності від початкової концентрації БХ в досліджуваних системах. Визначення кінетичних закономірностей взаємодії БХ з гуміновими кислотами $\text{ГК}_{(\text{вих})}$ дає можливість оптимізувати процес ацилювання ГК.

В процесі ацилювання має відбуватися зменшення кількості -ОН і -СООН-груп і збільшення кількості >C=O груп в структурі макромолекул ГК. Для підтвердження цього факту в даній роботі проведено потенціометричні титрування нативних і ацильованої фракції ГК. Виходячи з отриманих даних потенціометричного титрування розраховано кількість функціональних груп -ОН та -СООН, що припадає на 1 г фракцій гумінових кислот (табл. 1). Наведені в таблиці 1 данні свідчать про те, що в продукті ацилювання кількість гідроксильних і карбоксильних груп менше, ніж у нативної форми ГК. Збільшення концентрації бензоїлхлориду в реакції ацилювання призводить до зниження вмісту ОН і СООН груп в структурі макромолекул ГК, доступних для титрування.

Таблиця 1. Кількість функціональних груп в початкових і ацильованих зразках фракцій ГК.

Зразок ГК	[БХ], моль/л	Кількість функціональних груп, ммоль/г	
		-СООН	-ОН
ГК _(вих)	-	3,50	4,50
ГК _(ацил)	0,052	1,70	3,10

Примітка: [БХ] - початкова концентрація бензоїлхлориду в системі ацилювання ГК, моль/л.

Зміна співвідношення -ОН, -СООН і >C=O груп в структурі макромолекули ГК повинна призводити до зміни її окислювально-відновних властивостей. Для оцінки окислювально-відновних властивостей ГК застосовували газоволюмометричний метод. Як модельну систему використовували реакцію ініційованого радикально-ланцюгового окиснення ізопропілбензолу.

Додавання нативних (ГК_(вих)) і ацильованих (ГК_(ацил)) гумінових кислот до суміші ІПБ-АІБН-ДМСО призводить до зниження кількості кисню, поглиненого

системою (рис. 2). При цьому, в присутності нативних ГК_(вих) спостерігається більше зменшення обсягу кисню, поглинутого системою, ніж в присутності ГК_(ацил). [АІБН]= $2,00 \cdot 10^{-2}$ моль/л, [ІПБ]=3,59 моль/л, 348 К.

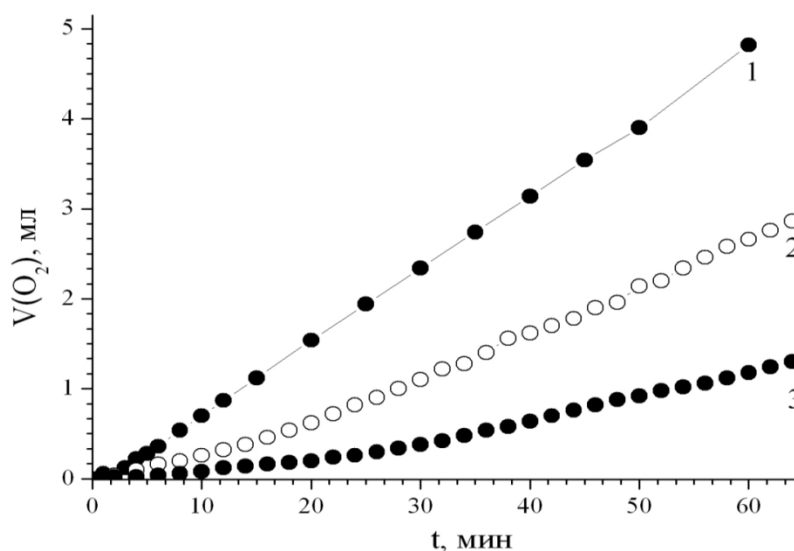


Рисунок 2. Кінетичні криві поглинання кисню системою ІПБ-ДМСО-АІБН в присутності гумінових кислот (2,0 г/л): 1 – без ГК, 2 – ГК_(ацил), 3 – ГК_(исх).

У таблиці 2 представлені значення швидкості поглинання кисню досліджуваної системою в залежності від концентрації ГК_(вих) і ГК_(ацил).

Таким чином, нативні ГК мають більш виражені антиоксидантні властивості в порівнянні з ацильованими.

Таблиця 2. Значення швидкості поглинання кисню (W) системою ПБ-ДМСО-АІБН-ГК залежно від концентрації (C) гумінових кислот.

C, г/л	W·10 ⁶ , моль/(л·с)	
	ГК(вих.)	ГК(ацил)
0	2,76	2,76
0,1	2,51	-
1,0	1,72	2,60
2,0	0,93	1,61
3,0	-	1,40
5,0	0,31	0,95

Примітка: [АІБН] = 2,00·10⁻² моль/л, [ПБ] = 3,59 моль/л, 348 К.

Висновки.

1. Порівняння даних потенціометричного титрування нативних і ацильованих гумінових кислот вказує на те, що реакція взаємодії ГК з бензоїлхлоридом протікає по гідроксильних (-ОН) і карбоксильних (-COOH) групам.

2. Газоволомометричним методом вивчено дію ГК_(вих) і ГК_(ацил) в процесі радикально-ланцюгового окислення кумолу.

3. Показано, що антиоксидантна активність ацильованої форми нижче, ніж у нативних гумінових кислот. Зменшення антиоксидантної активності і збільшення окислювальної здатності ацильованих форм ГК пов'язано зі зменшенням кількості ОН груп при їх взаємодії з бензоїлхлоридом.

4. Доведено, що одним із способів регулювання окислювально-відновних властивостей нативних гумінових кислот може бути їх спрямована хімічна модифікація, яка дозволяє шляхом зміни кількості функціональних груп у складі макромолекули за рахунок протікання реакції ацилювання, змінювати властивості природних субстратів.

Список літератури.

1. Pena-Mendes, E.M. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and bio-medicine / E.M. Pena-Mendes, J. Havel, J. Patoska // J. Appl. Biomed. – 2005. – No.3. – P. 13-24
2. Long-term kinetics study and quantitative characterization of the antioxidant capacities of humic and humic-like substances / O.I. Klein [et al.] // Journal of Soils and Sediments. – 2018. – No.4. – Vol.18. – P. 1355-1364.
3. Федько И.В., Гостищева М.В., Исмадова Р.Р. К вопросу об использовании биологически-активных гуминовых веществ в медицине // Химия растительного сырья. - 2005. - № 1. - С. 49-52.
4. Полуянова, И.Е. Биологическая активность гуминовых веществ, получаемых из торфа, и возможности их использования в лечебной практике / Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2017. – №4. – С. 114-122.
5. Хилько С.Л., Титов Е.В., Федосеева, А.А. Влияние сильных электролитов на водные растворы Na-солей нативных и сульфированных гуматов натрия // Коллоидный Журнал - 2001. – Т. 63. - № 5. – С. 706-710.
6. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins / M.V. Zyкова, I.A. Schepetkin, M.V. Belousov // Molecules. – 2018. – No.4. – Vol.23. – P. 1-15.
7. Китапова, Р.Р. Биологическая активность гуминовых веществ, получаемых из торфа и сапропеля / Р.Р. Китапова, А.У. Зиганшин // Казанский медицинский журнал. – 2015. – №1. – С. 84-89.
8. Ребачук М.Н., Степаненко Л.С., Максимов О.Б. О молекулярных весах гуминовых кислот // Химия твердого топлива. - 1972. - № 2. – С. 10-17.
9. Скут Д., Уэст Д. Основы аналитической химии. Т.1 - М.: Мир, 1979. - 453 с.
10. Эмануэль Н.М., Зайков Г.Е., Майзус З.К. Роль среды в радикально-цепных

реакциях окисления органических соединений. – М.: Наука, 1973. – 297 с.

11. Armarego W.L.F., Chai Ch.L.L. Purification Of Laboratory Chemicals. – Elsevier Science, 2003. – 608 p.
12. Ефимова И.В., Хилько С.Л., Смирнова О.В. Антиоксидантная активность гуминовых кислот в процессах радикально-цепного окисления // Журнал прикладной химии. - 2012. - Т. 85. - № 9. - С. 1436-1439.
13. Инверсионный межфазный катализ. 1. Изучение катализируемой п-оксидами пиридина реакции бензоилхлорида и 4-нитробензоат иона в двухфазной системе вода-дихлормета / В.И. Рыбаченко, А.Н. Редько, Г. Шредер, К.Ю. Чотий // Наукові праці Донецького національного технічного університету. - 2007. – Т. 119. - № 9. - С. 72-78.
14. Unconventional method used in synthesis of polyphosphoesters [Text] / S. Iliescu, A. Pascariu, N. Plesu [et al] // Polym. Bull. - 2009. -Vol. 63. - № 4. - P. 485-495.