

Paweł PISZCZ, Piotr JAGIEŁŁO, Bronisław K. GŁÓD*

Zakład Chemii Analitycznej i Nieorganicznej, Instytut Chemii,
Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

*Autor do korespondencji, e-mail: bkg@onet.eu

Możliwość zastosowania błękitu metylenowego jako sensora do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w odniesieniu do rodników hydroksylowych

Streszczenie: Celem pracy było wykonanie i porównanie widm UV-Vis błękitu metylenowego otrzymanego w różnych warunkach doświadczalnych, a także zbadanie możliwości jego zastosowania, jako potencjalnego sensora do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) metodą fotometryczną, w odniesieniu do rodników hydroksylowych generowanych w reakcji Fentona. W literaturze nie została opisana jeszcze metoda fotometryczna pomiaru CPA odnosząca się do mocnych rodników jak np. rodniki hydroksylowe, które reagują nie tylko z mocnymi antyoksydantami, ale także i ze słabymi. Roztwór błękitu metylenowego charakteryzuje się intensywną granatową barwą, który w wyniku reakcji z rodnikami hydroksylowymi ulega odbarwieniu. Obecność w mieszaninie reakcyjnej antyoksydantów powoduje zatrzymanie odbarwienia roztworu. Właściwość ta została wykorzystana do fotometrycznego oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego.

Słowa kluczowe: błękit metylenowy, antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny

Possibility of the using methylene blue as a sensor to determine the total antioxidant potential related to the hydroxyl radicals

Abstract: The aim of the paper was to compare the UV-Vis spectra of methylene blue obtained under different experimental conditions, and then to investigate the possibility of its use as a potential sensor for the determination of the total antioxidant potential (TAP) by photometric method, related to the hydroxyl radicals generated in the Fenton reaction. In the literature, the photometric method of measurement of TAP related to the strong radicals (such as hydroxyl radicals, which react not only with strong antioxidants, but also with the weak ones), has not been described yet. The methylene blue solution is characterized by an intense navy blue color which disappears after its reaction with hydroxyl radicals. Antioxidants retain the discoloration of the solution. This has been used for the photometric determination of the total antioxidant potential.

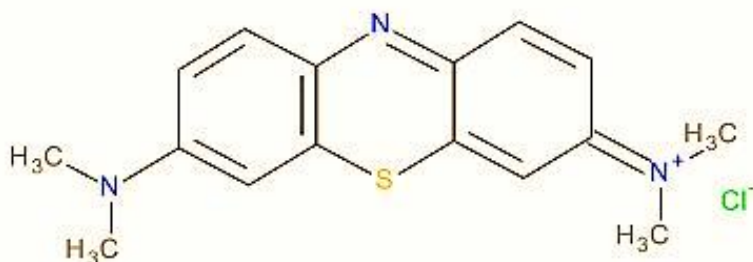
Keywords: methylene blue, antioxidants; total antioxidant potential

1. Wstęp (Introduction)

Rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywną formą tlenu i zarazem najmniej trwałą. Występuje w śladowych stężeniach w organizmach żywych. Trudność w oznaczeniu rodnika hydroksylowego polega na tym, że nie absorbuje światła ani nie fluoryzuje. Dlatego do oznaczenia rodnika, stosuje się tak zwaną pułapkę spinową. Przykładowo do układu biologicznego wprowadza się nietoksyczne lub w bardzo niewielkim stopniu toksyczne związki aromatyczne i oznacza się powstałe produkty ich reakcji z rodnikiem hydroksylowym. W pułapce spinowej stosuje się takie związki jak np. kwas tereftalowy, fenyloalaninę (naturalnie występującą) lub egzogenną aspirynę. Hydroksylowane produkty można rozdzielić chromatograficznie lub przez zastosowanie metody elektroforetycznej. Do oznaczenia produktów możemy stosować także metody elektrochemiczne, fluorescencyjne oraz fotometryczne [1].

Błękit metylenowy (BM) po raz pierwszy został otrzymany w roku 1876 przez Heinricha Caro w Badische Anilin & Soda Fabrik (BASF) w Ludwigshafen, jako barwnik anilinowy na potrzeby przemysłu tekstylnego. W dalszych badaniach zaobserwowano, że błękit metylenowy wykazuje właściwości wybarwiania i aktywowania różnych gatunków drobnoustrojów, co doprowadziło do testowania barwników anilinowych na choroby tropikalne. Pierwszym związkiem podawanym ludziom przeciw zimnicy (malarii) był błękit metylenowy. Stosowano go także, jako środek antyseptyczny w terapii klinicznej i był pierwszym barwnikiem do stosowania terapeutycznego. Przed pojawieniem się penicyliny i sulfonamidów w terapiach stosowano błękit metylenowy i jego pochodne [2, 3].

Błękit metylenowy to organiczny związek chemiczny, pochodna 1,4-tiazyny, barwnik tiazynowy. Występuje w postaci ciemnozielonego lub brunatnego, krystalicznego proszku o wzorze sumarycznym $C_{16}H_{18}ClN_3S$. W połączeniach z chloroformem, metanolem i wodą tworzy roztwory o intensywnie niebieskim zabarwieniu, w wodzie lub alkoholu, tworzy podwójne sole. Natomiast w rozpuszczalnikach niepolarnych jest nierozpuszczalny. Jego cząsteczki mają charakter soli, której organiczny szkielet obdarzony jest ładunkiem dodatnim, kompensowanym anionem chlorkowym (Rys. 1). Rozmiar cząsteczki wynosi 1.6×0.7 nm [4].



Rys. 1. Wzór strukturalny błękitu metylenowego.

Fig. 1. Structural formula of methylene blue.

Ostatnie badania donoszą, że błękit metylenowy może ulegać reakcji addycji cząsteczki wody, co daje nam różne krystaliczne hydraty. Ze względu na istniejące silne wiązanie wodorowe pomiędzy błękitem metylenowym i wodą, może łatwo tworzyć kilka stabilnych uwodnionych stanów krystalicznych za pomocą różnej zawartości wody w temperaturze pokojowej i różnej wilgotności. Badania wykazały, że różne krystaliczne formy leków mogą wpływać na stabilność, jednorodność, aktywność (składnik farmaceutyczny (API)) i w pewnym stopniu na bezpieczeństwo leków [3].

Błękit metylenowy, jako ważny barwnik i lek ma kilka różnych krystalicznych hydratów. Hydraty BM mogą przekształcać się z jednego w drugi przy różnych temperaturach lub wilgotnościach. Określenie tych hydratów stanowi spory problem dla tradycyjnych technologii spektroskopowych, takich jak spektroskopia w podczerwieni (IR) i spektroskopia Ramana ze względu na podobieństwo składowych i struktur tych hydratów. Błękit metylenowy może łączyć się ze sobą, tworząc różne mery. BM w roztworach wodnych przeważnie tworzy monomery oraz dimery [4].

Kilku badaczy zbadało w zakresie widzialnym widma BM w roztworze wodnym. Zaobserwowali odstępstwa od prawa Lamberta-Beera, które są wynikiem prawdopodobnego tworzenia się monomeru, dimeru i trimeru błękitu metylenowego. Chociaż było brak bezpośrednich dowodów dotyczących dokładnych struktur tworzących się agregatów. Badania polarograficzne prowadzone przez dwóch badaczy McKaya i Hillsona dostarczyły dowodów na istnienie trzech różnych form błękitu metylenowego w roztworze wodnym. Technika chemometryczna, została zastosowana w celu zbadania tworzenia kompleksów w roztworze wodnym. Wyodrębniono profile trzech gatunków BM i odkryto, że jego trimer zawiera jeden atom chloru [3, 4].

Jak już wspomniano wcześniej błękit metylenowy stosowano jako składnik kombinacji leków przeciwko malarii. Dane farmakologiczne donoszą, że BM, wykazuje stałe szybkości reakcji dla niekatalizowanej reakcji błękitu metylenowego przy $pH = 7,4$ z komórkowymi reduktorami, takimi jak $NAD(P)H$ ($k = 4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tioredoksyny ($k = 8,5 \text{ do } 26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), dihydrolipoamid ($k = 53 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i wolno reagującym glutationem. Ponieważ reduktazy disiarczkowe są znaczącymi celami, które atakuje BM, sporządzono testy optyczne dla enzymów redukujących błękit metylenowy kosztem $NAD(P)H$ w warunkach tlenowych. Produkt leucoMB jest automatycznie utleniony z powrotem do błękitu metylenowego przy $pH = 7$, ale może być stabilizowany przez enzymy o $pH = 5,0$, co czyni go interesującym związkiem nadającym się na lek. Stwierdzono, że BM jest inhibitorem i substratem cyklotoksycznego substratu reduktaz disiarczkowych ssaków i u pierwotniaka *Plasmodium falciparum*, przy wartościach k_{cat} w zakresie od $0,03 \text{ s}^{-1}$ do 10 s^{-1} w temperaturze 25°C . Spektroskopia kinetyczna mutagenizowanej reduktazy glutationowej wskazuje, że redukcja BM jest prowadzona przez zredukowaną flawinę połączoną z enzymem, a nie przez miejsce aktywne ditiolu Cys58/Cys63. Katalizowana enzymatycznie redukcja BM, a następnie automatyczne

utlenianie produktu leucoMB oznacza, że błękit metylenowy jest czynnikiem cyklicznym reakcji redoks, która wytwarza natlenek wodoru kosztem O_2 i NAD(P)H w każdym cyklu, zamieniając reduktazy disiarczku przeciwutleniającego w enzymy pro-utleniające [5].

Reduktaza disiarczku katalizuje redukcję BM przez NADPH. Otrzymany leucoMB, najbardziej wydajny auto-utleniacz, jest następnie utleniany przez O_2 . Z farmakologicznego punktu widzenia, każdy cykl reakcji, katalizowany przez zespół enzymów błękitu metylenowego, prowadzi do zużycia NADPH i O_2 oraz do produkcji RFT, głównie H_2O_2 [5].

Błękit metylenowy w skali laboratoryjnej otrzymuje się poprzez reakcje redukcji 4-nitrodymetyloaniliny. Barwnik ten łatwo ulega redukcji tworząc bezbarwny roztwór. Błękit metylenowy jest szeroko stosowany w chemii, biologii oraz w medycynie ze względu na właściwość wybiórczego wybarwienia niektórych komórek bakterii. Stosowany jest terapeutycznie przy różnego rodzaju nerwobólach, reumatyzmie, leczeniu infekcji dróg moczowych czy też methemoglobinemii [2]. Wykazuje działanie antyseptyczne oraz przeciwbakteryjne, a także stanowi odtrutkę przy zatruciach cyjankami oraz czadem. Wykorzystywany jest również, jako lek w antynowotworowej terapii fotodynamicznej. Błękit metylenowy stosowany jest także, jako wskaźnik redoks w systemach elektrokatalitycznych. Jego trwałe *zakotwiczenie* we wnętrzu matrycy znajduje zastosowanie w optycznych czujnikach wilgotności, a także urządzeniach mikroprocesorowych do magazynowania danych. W akwarystyce używany, jako lek na różne choroby ryb. Ostatnie badania sugerują, że błękit metylenowy może mieć korzystne działanie w leczeniu choroby Alzheimera i poprawy pamięci BM znajduje również, jako barwnik stosowanym do barwienia i drukowania bawełny, jedwabiu itp. [6].

Celem pracy było wykonanie i porównanie widm UV-Vis błękitu metylenowego w różnych warunkach doświadczalnych, a także zbadanie możliwości jego zastosowania, jako potencjalnego sensora do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) metodą fotometryczną w odniesieniu do rodników hydroksylowych generowanych w reakcji Fentona.

2. Część eksperymentalna (Experimental)

W badaniach użyto następujących odczynników chemicznych: diwodoroortofosforan sodu, wodoroortofosforan sodu, węglan sodu, chlorek potasu, siarczan żelaza (II), nadtlenuk wodoru, błękit metylenowy, kwas solny, kwas siarkowy, kwas galusowy – POCh, Gliwice, Polska; metanol (99,9% HPLC grade), etanol – Sigma - Aldrich, Steinheim, Niemcy woda trójкратно destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy).

Korzystano również z następującej aparatury: wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC) firmy Knauer (Berlin, Niemcy) (składający się z: interfejsu Smartline Manager 5000 z wbudowanym degazerem, dwutłokowej pompy Smartline 1000 o przepływie fazy ruchomej w granicach 0,001 – 50 ml/min, kolumny analitycznej Eurospher 5 C18, 4 x 150 mm, autosamplera Smartline 3800, detektora amperometrycznego EC3000 (układ trójelektrodowy: elektroda pracująca - węgiel szklisty, elektroda pomocnicza - Pt, elektroda odniesienia - Ag/AgCl), detektora Smartline PDA 2800 z matrycą diodową DAD (zakres pracy lampy 190-1020 nm), termostatu kolumn Smartline 4000 z zakresem temperatur 5 ÷ 85°C, komputera z oprogramowaniem do rejestracji i obróbki danych ClarityChrom).

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze mikroplótkowym Epoch™ (BioTek Instruments, Inc. USA) sterowanym za pomocą programu Gen5 (wszystkie pomiary zostały wykonane z wykorzystaniem plótk 96-dołkowych). Korzystano także z wirówki laboratoryjnej Centrifuge MPW - 251 (MPW Med. Instruments, Polska), wagi analitycznej (RADWAG, WAA 100/C/1, Radom, Polska) o dokładności 10^{-4} g, wagi analitycznej (Sartorius, Werke GmbH, Göttingen, Niemcy) o dokładności 10^{-6} g oraz łaźni ultradźwiękowej (Sonorex RK 250H, Bandelin, Niemcy).

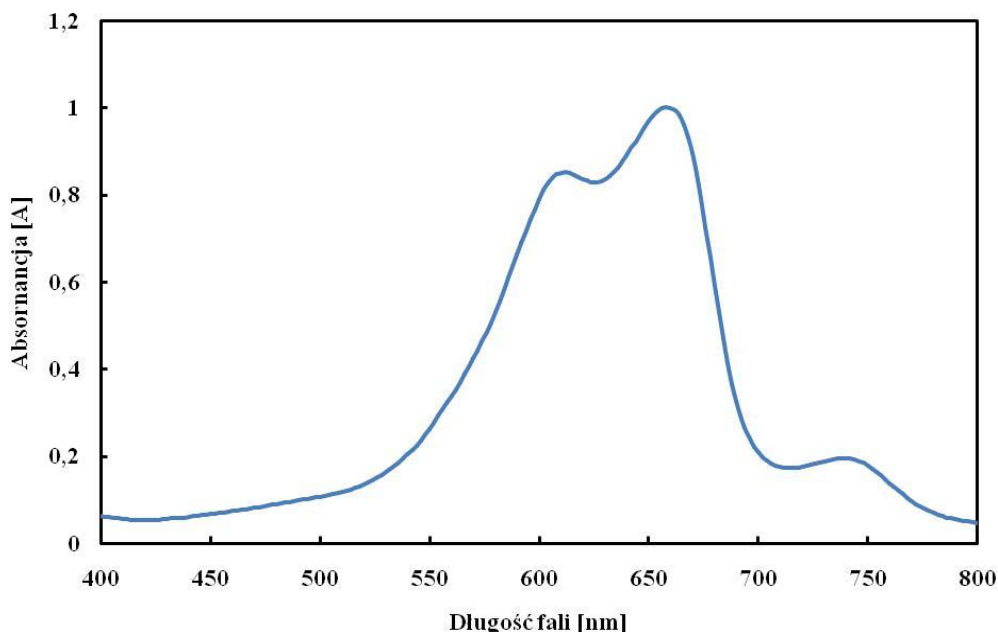
W celu wykonania widm UV-Vis w różnych rozpuszczalnikach do próbek typu Eppendorf odmierzone za pomocą mikropipety 25 μ l roztworu błękitu metylenowego (1 mM), a następnie do objętości 1 ml dodano odpowiednich roztworów: wody, kwasu siarkowego, buforów o pH 1, 2 i 7, a także alkoholi metylenowego i etylowego.

Reakcję Fentona przeprowadzono w próbkach typu Eppendorf, do której odmierzone za pomocą mikropipety 25 μ l błękitu metylenowego (1 mM), 750 μ l kwasu siarkowego VI (0,2 M), 200 μ l roztworu siarczanu żelaza II (0,2 M), 49,5 μ l wody destylowanej, a na samym końcu 0,5 μ l nadtlenuku wodoru (0,3%), tak aby objętość końcowa wynosiła 1 ml. Odczekano 5 minut. Dobierano odpowiednią ilość roztworu H_2O_2 , co odbywało się na zwiększeniu dodawanej objętości nadtlenuku wodoru o 0,5 μ l i na odjęciu takiej samej ilości wody destylowanej.

Reakcję Fentona w obecności kwasu galusowego przeprowadzono przez odmierzenie do próbek typu Eppendorf za pomocą mikropipety: 750 μ l kwasu siarkowego (0,2 M), 50 μ l roztworu żelaza II (0,2 M), 25 μ l błękitu metylenowego (1 mM) oraz do każdej próbki 5, 10, 20, 30 μ l kwasu galusowego (6 mM). Reakcję prowadzono przez 5 minut. Wszystkie widma spektrofotometryczne wykonano na mikroplótkach, przez umieszczenie w dołku plótki 300 μ l badanego roztworu.

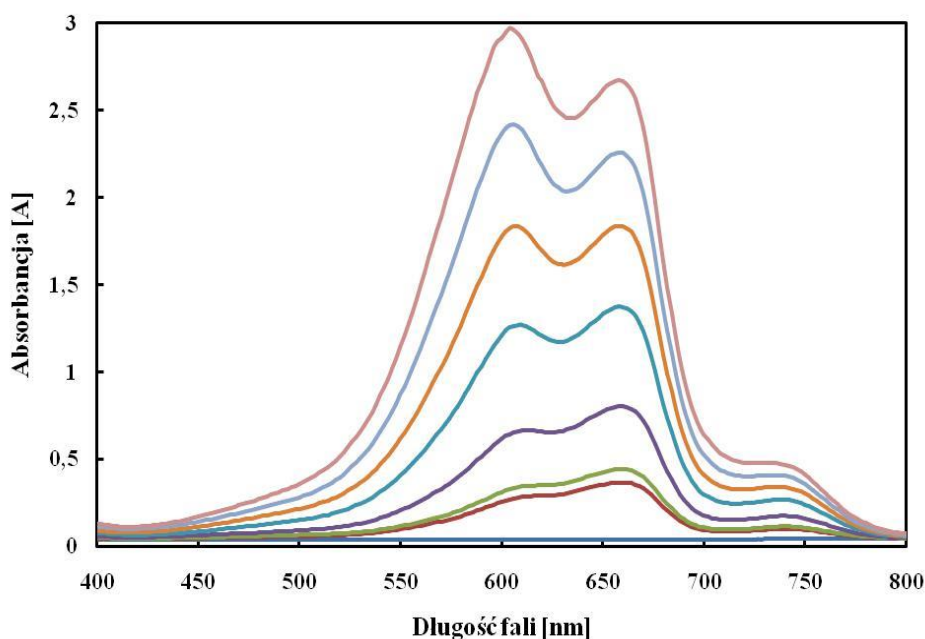
3. Wyniki i ich dyskusja (Results and discussion)

Widmo UV-Vis błękitu metylenowego w roztworze kwasu siarkowego VI o stężeniu 0,2 M przedstawiono na rysunku 2. Widmo to składa się z trzech charakterystycznych pasm w zakresie długości fali światła widzialnego (610 nm, 660 nm oraz 740 nm), z czego najbardziej charakterystyczne są pasma absorpcji przy długości fali wynoszącej 610 i 660 nm. Maksimum absorpcji wykazuje pasmo o długości fali wynoszącej 660 nm. Roztwór kwasu siarkowego (VI) pełnił rolę buforu.



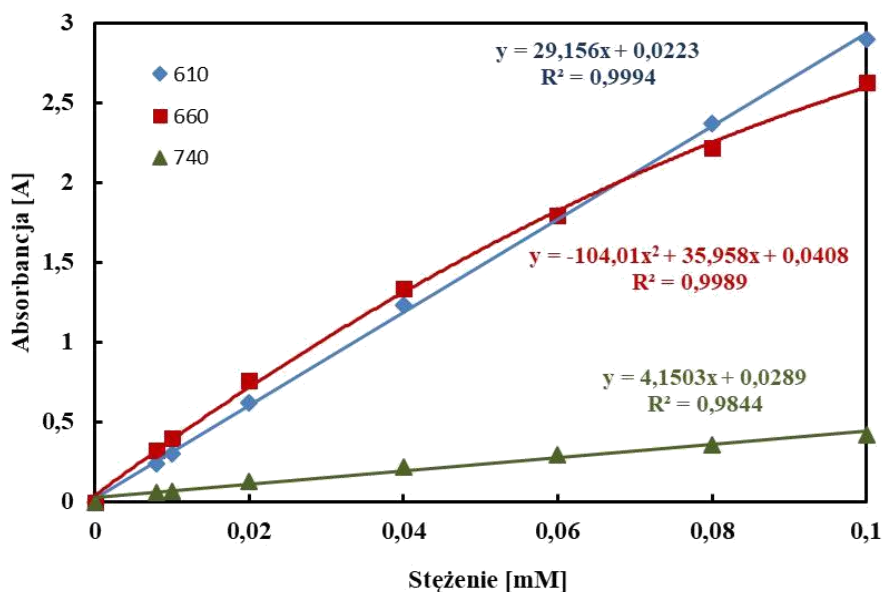
Rys. 2. Widmo UV-Vis błękitu metylenowego (0,025 mM) w roztworze kwasu siarkowego VI o stężeniu 0,2 M.
Fig. 2. UV-Vis spectrum of methylene blue (0.025 mM) in a solution of 0.2 M H_2SO_4 .

Wykonano również widma UV-Vis w roztworze kwasu siarkowego dla różnych stężeń BM (od 0,008 do 0,1 mM). Widma te przedstawiono na rysunku 3. Na tych widmach można zaobserwować zmianę maksimum pasma wraz ze wzrostem stężenia BM. Zależność stężenia BM od absorpcji, dla trzech różnych długości fal, przedstawiono na rysunku 4. W pełnym zakresie stężeń odpowiedź jest liniowa tylko dla pasm o maksimum absorpcji przy długości fal 610 i 740 nm. Z widm (Rys. 3.) i wykresu 4 wynika, że w zakresie stężeń BM od 0,008 do 0,06 mM maksimum absorpcji jest przy długości fali równej 660 nm, natomiast powyżej tego stężenia dominującym maksimum absorpcji jest pasmo przy długości fali 610 nm. Dla pasma przy długości fali równej 660 nm tylko w wąskim zakresie stężeń jest zachowane prawo Lamberta-Beera. Powyżej stężenia 0,06 mM BM prawo jest niespełnione. Powodem tego najprawdopodobniej jest reagowanie ze sobą dwóch lub większej ilości cząsteczek błękitu metylenowego, co powoduje tworzenie się przy większych stężeniach BM jego dimerów lub trimerów. Możemy również założyć, że cząsteczka błękitu metylenowego reaguje nam z rozpuszczalnikiem tworząc odpowiednie asocjaty, co by wytłumaczyło odchylenia od prawa Lamberta-Beera.



Rys. 3. Widma UV-Vis błękitu metylenowego w kwasie siarkowym VI o stężeniu 0,2 M (w zakresie stężeń BM: 0,008 ÷ 0,1 mM).

Fig. 3. UV-Vis spectra of methylene blue in H_2SO_4 at a concentration of 0.2 M (in the concentration range of MB: 0.008 ÷ 0.1 mM).

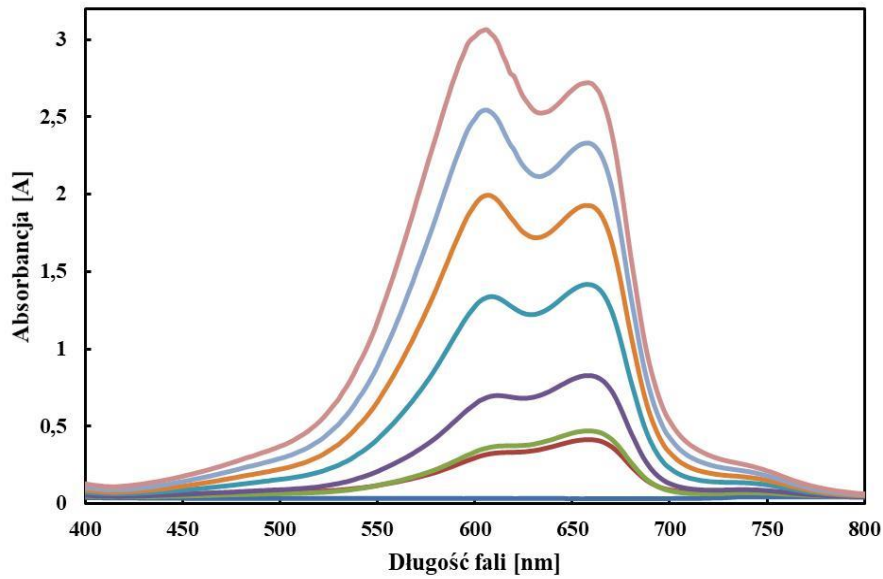


Rys. 4. Wpływ stężenia BM na wartość absorbancji przy długościach fal 610, 660, 740 nm.

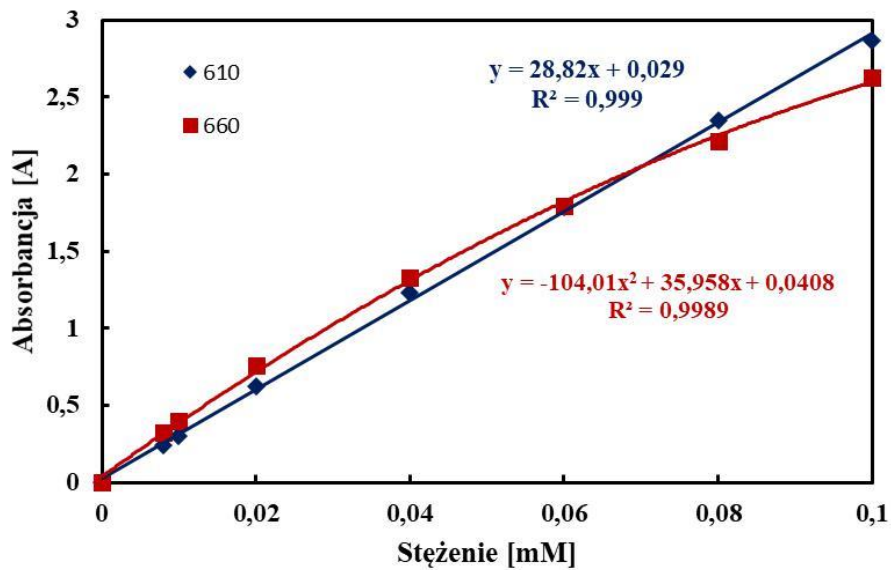
Fig. 4. The influence of MB concentration on absorbance value at 610, 660, 740 nm.

Widma UV-VIS błękitu metylenowego w buforach kwaśnych (KCl/HCl o pH = 1 oraz KCl/HCl o pH = 2), w buforze fosforanowym o pH = 7 i w wodzie destylowanej przedstawiono na rysunkach 5, 7, 9 i 11. Stężenie MB w przeprowadzonym eksperymencie było wszędzie takie samo i mieściło się w granicach od 0,008 do 0,1 mM. Każdy pomiar został przeprowadzony w takich samych warunkach (temperatura pokojowa, jednakowe objętości roztworów w dołkach płytki). Do każdego widma zostały sporządzone krzywe kalibracyjne (Rys. 6, 8, 10 i 12) obrazujące zależność zmian absorbancji, pasm przy długościach fal 610 nm i 660 nm, od stężenia BM. Z przedstawionych rysunków możemy wywnioskować, że maksimum absorpcji BM (dla większych stężeń) występuje przy długości fali 610 nm. Wyjątek stanowi roztwór błękitu metylenowego w wodzie, gdzie na widmie obserwujemy dwa charakterystyczne pasma przy długościach fal 610 i 660 nm, których absorbancja w wysokich stężeniach BM się zrównuje (Rys. 11). W roztworach tych zanika pasmo absorpcji BM przy długości fali wynoszącej 740 nm (charakterystyczne w roztworze kwasu siarkowego). Zauważalne jest ono nieznacznie także na widmie BM wykonanym w roztworze buforu KCl/HCl o pH = 1 (Rys. 5). Najprawdopodobniej występuje tylko w bardzo kwaśnych roztworach (niskie pH). Podobnie jak w roztworze kwasu siarkowego, dla pasma występującego przy długości fali równej 660 nm tylko w wąskim

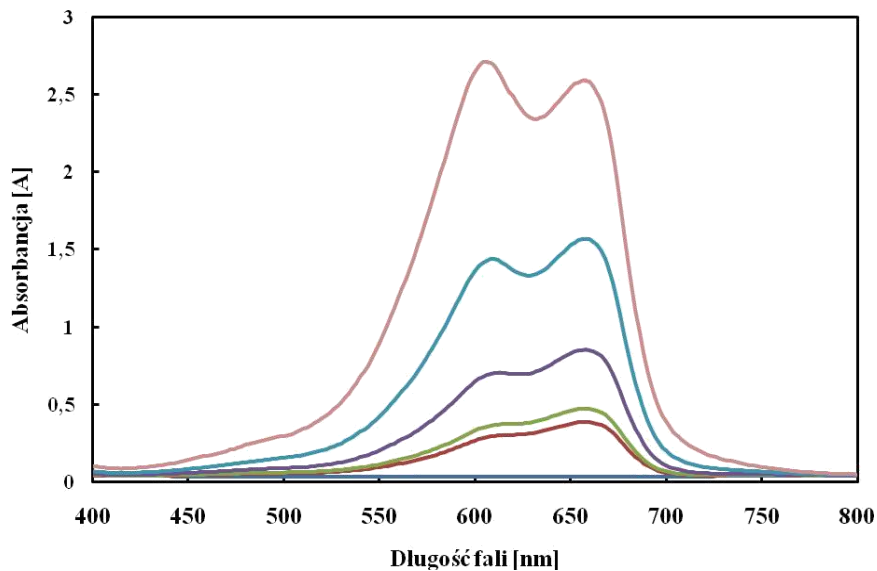
zakresie stężeń BM jest zachowane prawo Lamberta-Beera. W roztworach o pH obojętnym (bufor fosforanowy i woda) prawo Lamberta-Beera zachowane jest tylko w małych stężeniach BM dla obydwu charakterystycznych pasm absorpcji (Rys. 12).



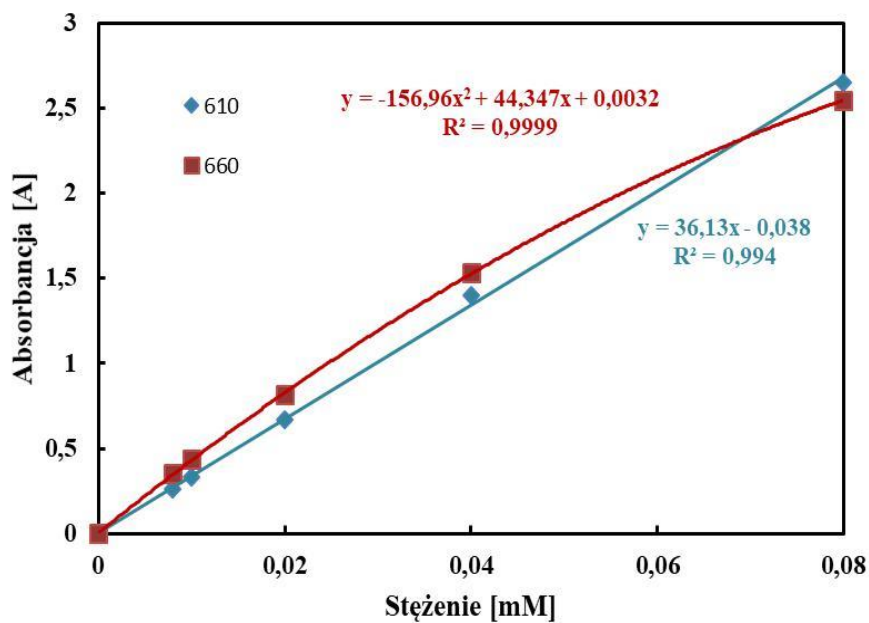
Rys. 5. Widma UV - Vis błękitu metylenowego w buforze KCl/HCl o pH = 1 (w zakresie stężeń BM 0,008 ÷ 0,1 mM).
 Fig. 5. UV-Vis spectra of methylene blue in KCl/HCl buffer at pH = 1 (in the concentration range MB 0.008 ÷ 0.1 mM).



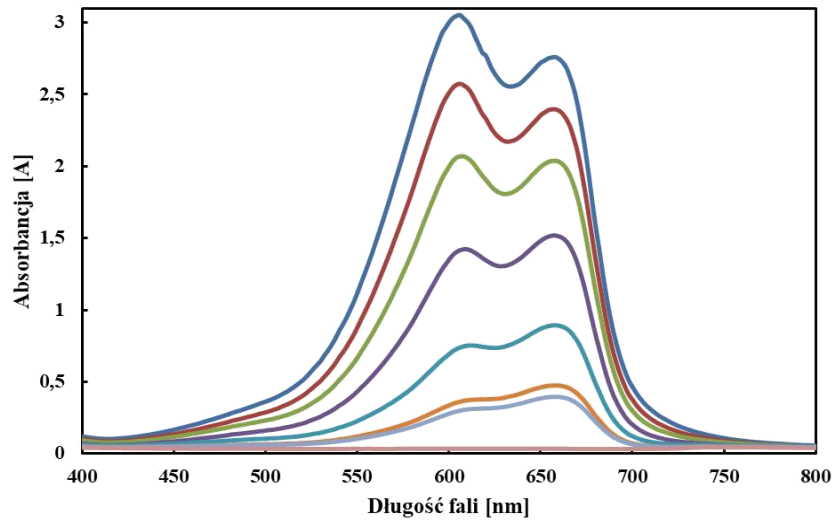
Rys. 6. Wpływ stężenia BM na wartość absorbancji przy długościach fal 610, 660 nm (BM w buforze KCl/HCl o pH = 1).
 Fig. 6. The influence of MB concentration on absorbance at 610, 660 nm (MB in KCl/HCl buffer at pH = 1).



Rys. 7. Widma UV - Vis błękitu metylenowego w buforze KCl/HCl o pH = 2 (w zakresie stężeń BM 0,008 ÷ 0,1 mM).
 Fig. 7. UV-Vis spectra of methylene blue in KCl/HCl buffer at pH = 2 (in the concentration range MB 0.008 ÷ 0.1 mM).

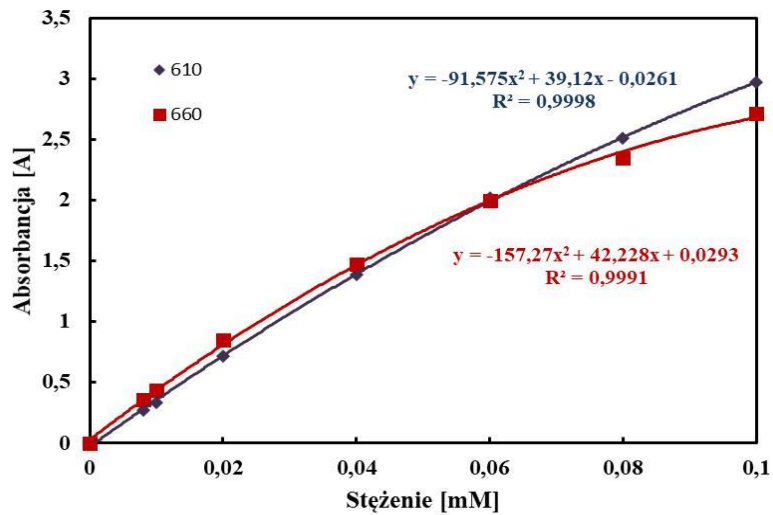


Rys. 8. Wpływ stężenia BM na wartość absorbancji przy długościach fal 610, 660 nm (BM w buforze KCl/HCl o pH = 2).
 Fig. 8. The influence of BM concentration on absorbance at 610, 660 nm (MB in KCl/HCl buffer at pH = 2).



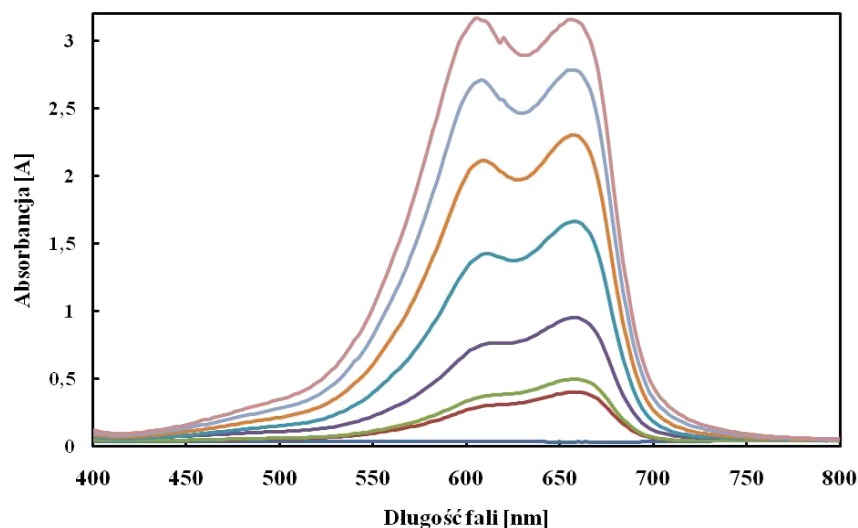
Rys. 9. Widma UV - Vis BM w buforze $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ o $\text{pH} = 7$ (w zakresie stężeń BM $0,008 \div 0,1$ mM).

Fig. 9. UV-Vis spectra of MB in $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer at $\text{pH} = 7$ (in the concentration range MB $0.008 \div 0.1$ mM).

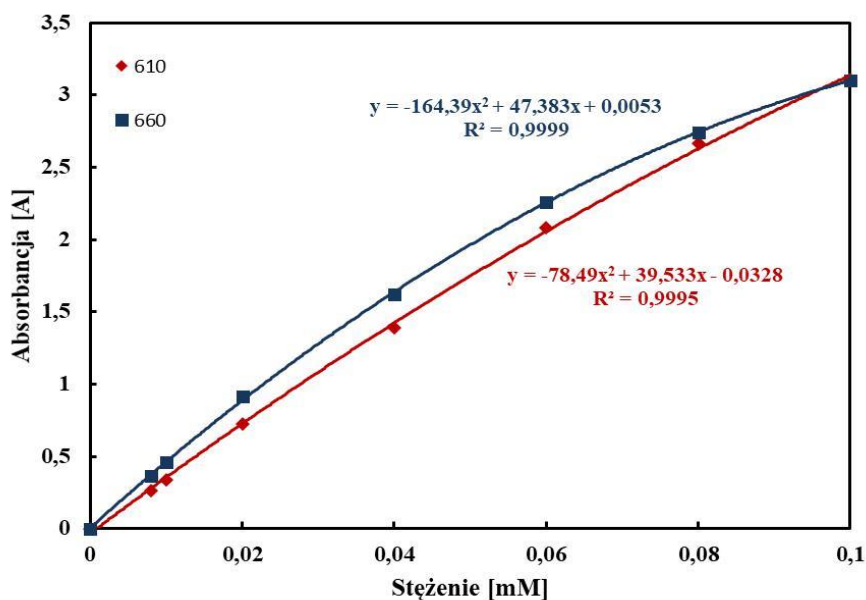


Rys. 10. Wpływ stężenia BM na wartość absorbancji przy długościach fal 610, 660 nm (BM w buforze $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ o $\text{pH} = 7$).

Fig. 10. The influence of MB concentration on absorbance at 610, 660 nm (MB in $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer at $\text{pH} = 7$).

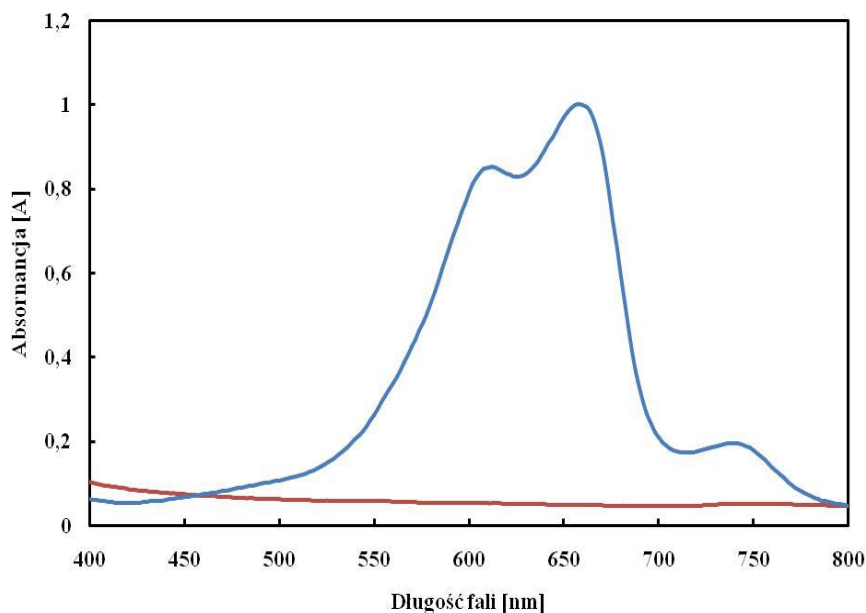


Rys. 11. Widma UV – Vis błękitu metylenowego w wodzie destylowanej (w zakresie stężeń BM $0,008 \div 0,1$ mM).
 Fig. 11. UV-Vis spectra of MB in water (in the concentration range MB $0.008 \div 0.1$ mM).

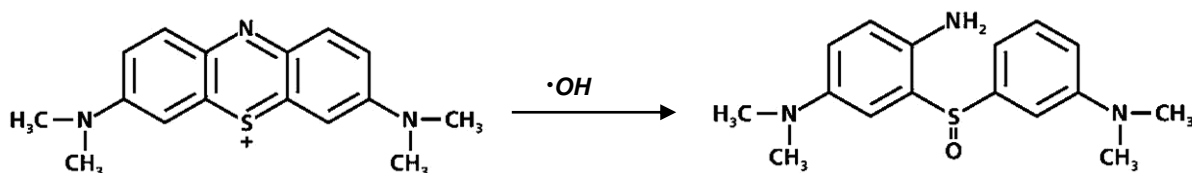


Rys. 12. Wpływ stężenia BM na wartość absorbancji przy długościach fal 610, 660 nm (BM w wodzie destylowanej).
 Fig. 12. The influence of MB concentration on absorbance at 610, 660 nm (MB in water).

W kolejnym etapie badań została przeprowadzona reakcja Fentona, celem generacji rodników hydroksylowych, w obecności błękitu metylenowego jako sensora. W wyniku przeprowadzonej reakcji zaobserwowano całkowite odbarwienie się roztworu błękitu metylenowego, co zostało zaprezentowane na rysunku 13. Z widma UV-Vis otrzymanego po przeprowadzonej reakcji, na tle widma błękitu metylenowego w kwasie siarkowym VI zauważamy, że zaszła całkowita degradacja błękitu metylenowego (brak charakterystycznych pasm absorpcji) w wyniku przeprowadzonej reakcji Fentona. Powodem tego odbarwienia jest najprawdopodobniej atak rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) na środkowy pierścień aromatyczny błękitu metylenowego, co powoduje jego otwarcie. Rodnik hydroksylowy jest reagentem, zdolnym do detoksykacji wielu organicznych substratów przez utlenianie [6] oraz zdolnym do atakowania dowolnej cząsteczki w ich pobliżu w celu zrównoważenia ich niesparowanej konfiguracji elektronowej. Rodniki hydroksylowe mogą rozerwać podwójne wiązania ($\text{C} = \text{C}$, $\text{N} = \text{N}$), degradować węglowodory, powodować epoksydację i aromatyczne otwarcie pierścienia, polimeryzację rodnikową, tworzenie drugorzędowych rodników i wiele innych typów reakcji [5, 6]. Na rysunku 14 przedstawiona została możliwa zachodząca reakcja między rodnikiem ($\cdot\text{OH}$), a błękitem metylenowym [5]. Prawdopodobnie reakcje z rodnikami hydroksylowymi będą dalej i prowadzą do dalszego rozrywania wiązań i tworzenia nowych produktów.

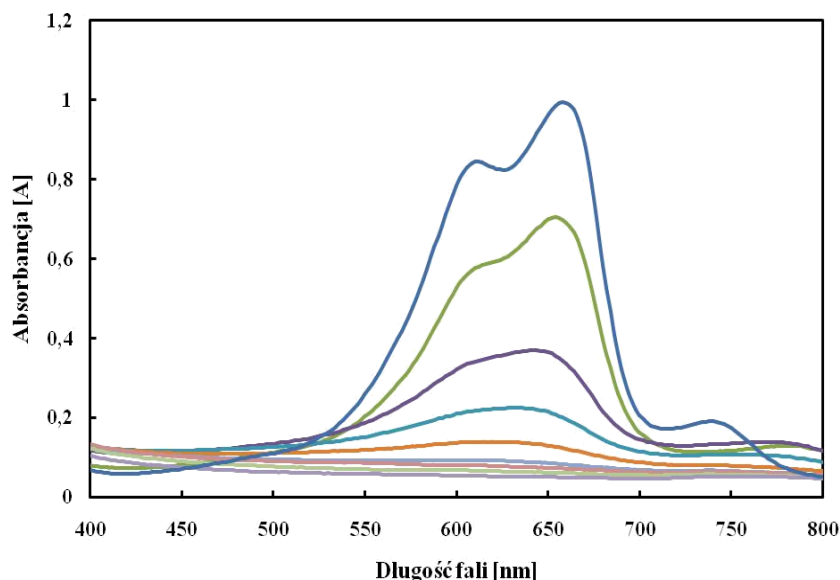


Rys. 13. Widma UV-Vis BM w kwasie siarkowym VI 0,2 M oraz BM (linia czerwona) po przeprowadzonej reakcji Fentona.
 Fig. 13. UV-Vis spectra of MB in H₂SO₄ 0.2 M and spectrum MB (red line) after the Fenton reaction.



Rys. 14. Reakcja błękitu metylenowego z rodnikiem hydroksylowym [5].
 Fig. 14. The reaction of methylene blue with a hydroxyl radical [5].

W dalszym etapie badań dobrano odpowiednie stężenie nadtlenku wodoru w przeprowadzanej reakcji Fentona. Jak wynika z rysunku 15 dodatek bardzo małej ilości nadtlenku wodoru (0,5 μl - linia zielona), powoduje znaczny spadek absorbancji oraz powoduje częściowy zanik pasma przy długości fali 610 nm i całkowity zanik pasma przy 740 nm, charakterystycznych dla błękitu metylenowego. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że dodatek maksymalnie 4 μl nadtlenku wodoru do mieszaniny reakcyjnej powoduje całkowite odbarwienie roztworu BM po upływie ok. 5 minut prowadzenia reakcji Fentona.

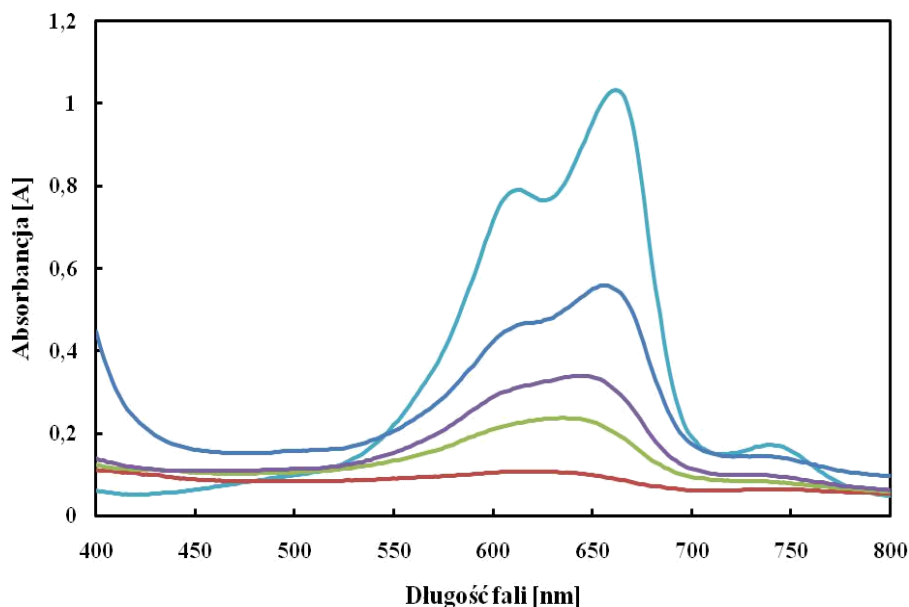


Rys. 15. Widma UV-Vis BM po reakcji z rodnikami hydroksylowymi. Różny dodatek 0,3% H₂O₂ do mieszaniny reakcyjnej (0,0 – 4,0 µl, co 0,5 µl).

Fig. 15. UV-Vis spectra of MB after reaction with hydroxyl radicals. Different addition of 0.3% H₂O₂ to the reaction mixture (0.0 - 4.0 µl, every 0.5 µl).

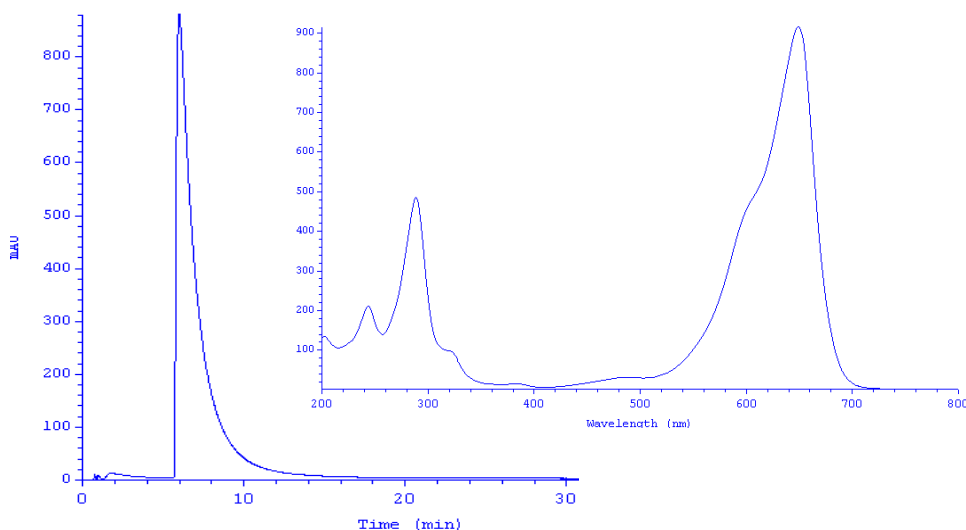
Dodatek do mieszaniny reakcyjnej kwasu galusowego (GA), zastosowanego jako przykładowego antyoksydanta, powoduje zatrzymanie (opóźnienie) odbarwienia się roztworu BM. Przedstawiono to na rysunku 16. Większe stężenie dodawanego kwasu galusowego powoduje, że rodniki hydroksylowe reagują w pierwszej kolejności z GA, a dopiero w dalszej kolejności z BM. Zaobserwowana właściwość może być podstawą do zastosowania BM jako sensora w oznaczaniu CPA metodą fotometryczną, zarówno czystych antyoksydantów, jak również próbek rzeczywistych wykazujących potencjalne właściwości antyoksydacyjne. Zmiany absorbancji możemy zaobserwować na trzech charakterystycznych pasmach występujących na widmie BM.

Wykonano również chromatogram BM w układzie RP-HPLC z detekcją fotometryczną na detektorze DAD. Z chromatogramu wygenerowano również widmo UV-Vis BM (Rys. 17). Daje to możliwość zastosowania BM jako sensora do oznaczania CPA w odniesieniu do rodników hydroksylowych również metodą chromatograficzną z detekcją fotometryczną. Będzie to przedmiotem dalszych naszych badań.



Rys. 16. Widma UV-Vis BM po reakcji z rodnikami hydroksylowymi wygenerowanymi w reakcji Fentona z dodatkiem kwasu galusowego jako antyoksydantu przy różnych stężeniach (linia czerwona – 0,03 mM, linia zielona – 0,06 mM, linia fioletowa – 0,12 mM, linia granatowa – 0,18 mM).

Fig. 16. UV-Vis spectra of MB after reaction with hydroxyl radicals generated in the Fenton reaction with the addition of gallic acid as antioxidant at various concentrations (red line - 0.03 mM, green line - 0.06 mM, violet line - 0.12 mM, navy blue line - 0.18 mM).



Rys. 17. Chromatogram oraz widmo UV-Vis BM. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher 5 C18, 4 x 150 mm, faza ruchoma - metanol/woda (90:10, v/v), detektor DAD, prędkość przepływu – 1 ml/min, temperatura - 20°C.

Fig. 17. Chromatogram and UV-Vis spectrum of MB. Chromatographic conditions: column - Eurospher 5 C18, 4 x 150 mm, mobile phase - methanol/water (90:10, v/v), DAD detector, flow rate - 1 ml/min, temperature - 20°C.

4. Wnioski (Conclusions)

W pracy zostały przeprowadzone badania prowadzące do możliwego zastosowania błękitu metylenowego w celu wykorzystania go, jako sensora w metodzie fotometrycznej do badania CPA. Wykonano szereg widm BM w różnych rozpuszczalnikach i różnym pH. Widmo BM składa się z trzech charakterystycznych pasm w zakresie długości fali światła widzialnego, z czego najbardziej charakterystyczne są pasma absorpcji przy długości fali wynoszącej 610 i 660 nm. Maksimum absorpcji, dla małych stężeń BM, wykazuje pasmo o długości fali wynoszącej 660 nm. Okazało się, że BM może zostać zastosowany, jako sensor do badania CPA metodą fotometryczną m.in. w roztworze kwasu siarkowego. Dobrano doświadczenie odpowiednio stężenie nadtlenu wodoru, jako inicjatora powstających w reakcji Fentona rodników hydroksylowych. Roztwór BM charakteryzuje się intensywną granatową barwą, który w wyniku reakcji z rodnikami hydroksylowymi (generowanymi w reakcji Fentona) ulega odbarwieniu. Obecność w mieszaninie reakcyjnej antyoksydantów (zastosowano kwas galusowy) powoduje zatrzymanie odbarwienia roztworu. Właściwość ta może zostać wykorzystana do fotometrycznego oznaczania CPA. Przedmiotem dalszych badań będzie zastosowanie HPLC w tego typu oznaczeniach.

5. Literatura (Literature)

1. G. Bartosz, *Druga twarz tlenu-wolne rodniki w przyrodzie*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2003.
2. B.C. Baguley, R.J. Biggar, F.A. Beland, E.J. Carcache de Blanco, J.M. Betz, M.L. Cunningham, J.K. Dunnick, D.W. Lachenmeier, L. Guo, R.M. Lunn, C.W. Jameson, M.M. Marques, M. Karagas, D.L. McCormick, T.L. Knight, S. Singh, *Methylene Blue, Some Drugs and Herbal Products*, 108, 155-179, 2016.
3. Z. Zhao, E.R. Malinowski, *Determination of the Hydration of Methylene Blue Aggregates and Their Dissociation Constants Using Visible Spectroscopy*, Appl. Spectrosc. 53, 1567-1573, 1999.
4. S. Yan, H. Zhang, Z. Yang, M. Tang, M. Zhang, C. Du, H.L. Cui, D. Wei, *Transformation and dehydration kinetics of methylene blue hydrates detected by terahertz time-domain spectroscopy*, RSC Adv. 41667-41672, 2017.
5. K. Buchholz, R.H. Schirmer, J.K. Eubel, M.B. Akoachere, T. Dandekar, K. Becker, S. Gromer, *Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and Their Orthologues from Plasmodium falciparum*, Antimicrob. Agents Ch. 62, 2007.
6. K. Dutta, S. Mukhopadhyay, S. Bhattacharjee, B. Chaudhuri, *Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction*, Elsevier, 2001.