

Anna ARENDARCZYK, Aleksandra ZGÓRSKA, Elżbieta GRABIŃSKA-SOTA

Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej

ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice

e-mail: anna.arendarczyk@polsl.pl; aleksandra.zgorska@polsl.pl; elzbieta.g.sota@polsl.pl

Toksyczność chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego względem wybranych organizmów wodnych

Dokonano oceny potencjału toksykologicznego imidazoliowej cieczy jonowej o nazwie chlorek 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy (CHM). Zakres badań ekotoksykologicznych obejmował przeprowadzenie testu toksyczności ostrej z wykorzystaniem skorupiaków słodkowodnych (*Thamnocephalus platyurus*) i testu toksyczności chronicznej z wykorzystaniem bakterii morskich (*Vibrio fischeri*). Wartości wskaźników ekotoksykologicznych wyznaczone w poszczególnych testach wyniosły odpowiednio: EC_{50} 2,51 mg/dm³ (THAMNOTOXKIT FTM) i $EC_{50/5min}$ 15,30 mg/dm³ i $EC_{50/15min}$ 14,40 mg/dm³ (MICROTOX[®] Basic Test 81,9%). Na podstawie uzyskanych wyników związek sklasyfikowano jako toksyczny. W ramach badań dokonano również oceny wpływu korekty odczynu i napowietrzania na redukcję toksyczności roztworu CHM. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z metodyką US EPA/600/6-91/005F. Stwierdzono, że korekta odczynu roztworu CHM do poziomu 3 i 11, a także przeprowadzenie symultanicznego procesu korekty pH do 3 i napowietrzania wpływa na obniżenie toksyczności badanego związku.

Słowa kluczowe: imidazoliowe ciecze jonowe, toksyczność, biotesty

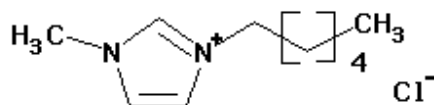
Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzmożone zainteresowanie tzw. „zieloną” chemią, czyli chemią przyjazną środowisku, co przyczynia się do wzrostu liczby badań nad nową grupą rozpuszczalników, które nie emitowałyby szkodliwych oparów do środowiska. W rezultacie powstała nowa klasa związków chemicznych, tzw. cieczy jonowych (ang. ionic liquid's - IL's), często określana mianem rozpuszczalników „projektowalnych”. Odpowiedni dobór grup strukturalnych cieczy jonowych na etapie ich syntetyzowania umożliwia wykorzystanie najbardziej optymalnych właściwości tych związków, z punktu widzenia ich przyszłego zastosowania, takich jak: hydrofobowość, polarność czy też rozpuszczalność. W konsekwencji IL's jako jedne z nielicznych substancji mogą być projektowane indywidualnie do wymogów konkretnych procesów technologicznych. Obecnie dzięki właściwościom zmiękczającym, antystatycznym, a także bakterio- i grzybobójczym stały się m.in. zamiennikami powszechnie stosowanych środków ochrony roślin (fungicydy, bakteriocydy), a także preparatów wykorzystywanych w procesach impregnacji drewna [1]. Dodatkowo niska prężność par, jak w przypadku imidazoliowych cieczy jonowych (IIL's), umożliwia ich wykorzysta-

tanie jako alternatywy dotychczas stosowanych rozpuszczalników organicznych. Jednak narastające zainteresowanie branży przemysłowej IL's, przekładające się bezpośrednio na wzrost ich produkcji, pociąga za sobą ryzyko przedostawania się tych substancji do środowiska. Niska prężność par IIL's często mylnie utożsamiana jest z brakiem toksycznych właściwości, podczas gdy w rzeczywistości wysoka rozpuszczalność oraz stabilność tych związków w roztworach wodnych determinuje potencjalne zagrożenie, jakie stwarzają IIL's dla środowiska wodnego [2]. Dlatego też konieczne jest prognozowanie i ocena negatywnego oddziaływania IIL's względem organizmów wodnych jako przedstawicieli ekosystemu szczególnie narażonego na skażenie tą grupą związków. Analiza ekotoksykologiczna jest jednym z niezbędnych elementów systemu oceny przydatności i ryzyka stosowania preparatów chemicznych. Dowodzi tego fakt, że coraz częściej dobór kationu i anionu, na etapie projektowania struktury IL's, dokonywany jest w oparciu zarówno o wymogi fizykochemiczne, jakim musi sprostać IL's, jak też z uwzględnieniem bezpieczeństwa środowiskowego [1, 2].

1. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano imidazoliową ciecz jonową chlorek 1-hekso-3-metyloimidazoliowy (CHM) o wzorze sumarycznym $C_{10}H_{19}N_2Cl$. Środek zakupiony został w firmie POCH oddz. Gliwice w grudniu 2010 roku. Według danych producenta, preparat stosowany jest jako katalizator w reakcjach syntezy. Wzór strukturalny związku przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Chlorek 1-hekso-3-metyloimidazoliowy - struktura molekularna

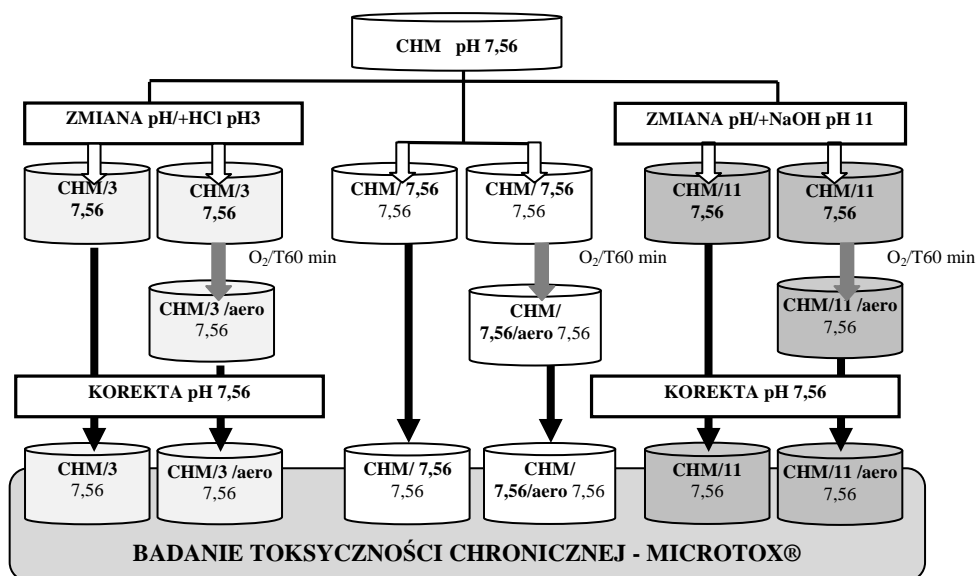
Gęstość związku wynosi $1,034 \text{ g/cm}^3$, masa molowa $202,72 \text{ g/mol}$. Czystość preparatu $\geq 98\%$. Preparat charakteryzował się temperaturą topnienia -85°C i odczynem pH 8. Zakupiony chlorek miał postać mazistą, o jasnożółtym zabarwieniu i wysokiej przezroczystości. Charakteryzował się niskim stopniem rozpuszczalności w wodzie i wysoką rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych (aceton, etanol, DMSO). Stężenie wyjściowe badanego preparatu uzyskano poprzez zastosowanie 48 h mieszania w temperaturze 35°C . Toksyczność badanego preparatu oceniono przy użyciu dwóch mikrobiotestów: THAMNOTOXKIT FTM i MICROTOX[®].

THAMNOTOXKIT FTM to 24-godzinny test toksyczności ostrej z zastosowaniem skorupiaków słodkowodnych *Thamnocephalus platyurus*. Istotą testu była ocena, po 24 godzinach ekspozycji, wpływu preparatu na przeżywalność skorupiaków narażonych na jego działanie. W ramach badań przeprowadzono dwa typy testów: wstępny i potwierdzający. Dla każdego wykonano trzy serie pomiarowe (powtórzenia). W teście wstępnym wykorzystano stężenia z zakresu

0,01÷100 mg/dm³. Na bazie uzyskanych wyników dobrano zakres stężeń do testu potwierdzającego: 1,0; 1,4; 2,8; 5,6; 10,0 mg/dm³. Na podstawie uzyskanych wyników metodą logarymiczno-probitową wyznaczono wskaźnik EC₅₀.

Test toksyczności chronicznej przeprowadzono z wykorzystaniem bakterii morskich *Vibrio fischeri*. System MICROTOX[®] umożliwił dokonanie pomiaru inhibicji bioluminescencji bakterii narażonych na działanie badanego preparatu. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą Basic Test 81,9% systemu MicrotoxOmni. Na podstawie wyników testu wyznaczono wartości EC_{50/5min} i EC_{50/15min}, czyli takie stężenia CHM, które powodują 50% inhibicję bioluminescencji odpowiednio po 5 i 15 minutach ekspozycji. Test prowadzono w dwóch seriach pomiarowych, po trzy powtórzenia dla każdego stosowanego stężenia i kontroli. Zakres stosowanych stężeń wyniósł: 1,0÷100,0 mg/dm³.

Oceniono także wpływ korekty pH i napowietrzania na toksyczność badanej cieczy jonowej względem bakterii bioluminescencyjnych *Vibrio fischeri*. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą US EPA/600/6-91/005F: Toxicity Identification Evaluation (TIE) [3]. Zakres pracy obejmował poddanie wyjściowego roztworu cieczy jonowej CHM o stężeniu 1000 mg/dm³ i odczynie równym pH 7,56 następującym modyfikacjom: napowietrzanie (2,5 mgO₂/dm³; czas aeracji T = 60 min); obniżenie pH do 3; obniżenie pH do 3 wraz z symultanicznym napowietrzaniem (2,5 mgO₂/dm³; czas aeracji T = 60 min); podwyższenie pH do 11; podwyższenie pH do 11 wraz z symultanicznym napowietrzaniem (2,5 mgO₂/dm³; czas aeracji T = 60 min). Po zakończeniu doświadczenia, przed wykonaniem testu toksykologicznego, we wszystkich próbkach odczyn skorygowano do poziomu wyjściowego (pH 7,56). Sposób wykonania doświadczenia przedstawiono schematycznie na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat przebiegu procesu korekty pH i napowietrzania próbek chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego wg procedury US EPA/600/6-91/005F [3]

Toksyczność mieszanin poreakcyjnych: CHM/aero (aeracja); CHM/3 (obniżenie pH do 3); CHM/3/aero (obniżenie pH do 3, aeracja); CHM/11 (podwyższenie pH do 11); CHM/11/aero (podwyższenie pH do 11, aeracja) wraz z próbą kontrolną (CHM bez zastosowania modyfikacji) oceniono przy użyciu testu MICROTOX[®] zgodnie z procedurą Basic Test 81,9% systemu MicrotoxOmni. Dla wyjściowych stężeń roztworu podstawowego CHM i mieszanin poreakcyjnych wykonano testy wstępne. Na podstawie wyników testów wstępnych dobrano zakresy stężeń do testów potwierdzających.

2. Wyniki badań

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono negatywny wpływ CHM w stosunku do wykorzystanych w testach organizmów wodnych. Wyniki testów toksykologicznych zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Klasyfikacja toksyczności chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego na podstawie wyników testów toksykologicznych z wykorzystaniem skorupiaków słodkowodnych *Thamnocephalus platyurus* i bakterii morskich *Vibrio fischeri*

Test	Organizm testowy	Efekt toksyczny	Klasa toksyczności	
		*EC ₅₀ , mg/dm ³		
THAMNOTOXKIT F TM	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	2,51	1 ÷ 10 mg/dm ³ toksyczny	R 51
MICROTOX [®] Basic Test 5 min	<i>Vibrio fischeri</i>	15,30	10 ÷ 100 mg/dm ³ szkodliwy	R 52
MICROTOX [®] Basic Test 15 min	<i>Vibrio fischeri</i>	14,40	10 ÷ 100 mg/dm ³ szkodliwy	R 52
*EC ₅₀ (ang. <i>Effect Concentration</i>) - stężenie wywołujące określony efekt u 50% populacji				

Badany związek (CHM) oddziaływał toksycznie względem skorupiaków *Thamnocephalus platyurus* w całym przedziale stosowanych stężeń. W teście potwierdzającym najniższe stężenie testowe 1,00 mg/dm³ wywołało efekt letalny na poziomie 6,68%, podczas gdy stężenie 5,60 mg/dm³ powodowało śmiertelność osobników rzędu 94,98%. Wartość EC₅₀ wyznaczona w teście THAMNOTOXKIT FTM wyniosła 2,51 mg/dm³. Badany preparat oddziaływał negatywnie również w stosunku do bakterii morskich *Vibrio fischeri*, wpływając na zaburzenie naturalnych procesów metabolicznych prowadzonych przez te mikroorganizmy. Odnotowany spadek intensywności bioluminescencji po 5 i 15 minutach ekspozycji pozwolił na wyznaczenie wskaźników toksykologicznych, które wyniosły odpowiednio: EC_{50/5min} 15,30 mg/dm³ i EC_{50/15min} 14,40 mg/dm³. Na podstawie wyników analizy toksykologicznej w odniesieniu do Dyrektywy Rady Wspólnoty Europejskiej [4] badany związek (chlerek 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy) sklasyfikowany został jako substancja toksyczna.

Wyniki doświadczenia wykonanego na podstawie procedury TIE wykazały, że o ile samo napowietrzanie roztworu CHM nie wpływa na siłę indukowanego efektu toksycznego, o tyle symultaniczne napowietrzanie i korekta pH roztworu wpływa na obniżenie jego toksycznych właściwości. Wartości wskaźników toksykologicznych dla roztworów CHM po zastosowaniu odpowiednich modyfikacji zestawiono w tabeli 2. Z przedstawionych danych wynika, że już samo obniżenie odczynu roztworu CHM do poziomu pH 3, a następnie korekta pH do poziomu pierwotnego powoduje spadek toksyczności o około 30% względem roztworu wyjściowego. Stwierdzono także, że zarówno podwyższenie odczynu do pH 11, jak i symultaniczne napowietrzanie próbki z korektą odczynu do pH 3 powoduje ponad 2-krotny wzrost wartości wskaźników toksykologicznych $EC_{50/5min}$ i $EC_{50/15min}$. Oznacza to, że potrzebne jest co najmniej dwukrotnie wyższe stężenie roztworów CHM/3/aero i CHM/11, aby wywołać efekt inhibicji bioluminescencji na poziomie indukowanym wyjściowym roztworem CHM. Dowiedziono także, że proces napowietrzania roztworu, w którym wstępnie obniżono odczyn do pH 3, wpływa na dodatkową redukcję toksyczności, nie powoduje jednak żadnych zmian we właściwościach toksycznych roztworu o pH podwyższonym do 11.

Tabela 2

Wpływ korekty pH i napowietrzania na toksyczność chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego (CHM)

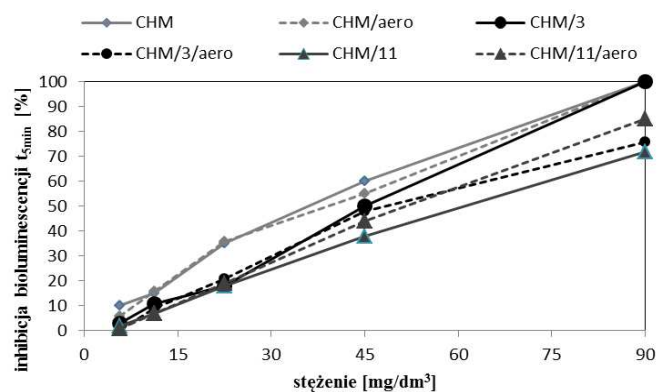
Modyfikacje roztworu CHM	MICROTOX® - Basic Test <i>Vibrio fischeri</i>	
	* $EC_{50/5min}$, mg/dm ³	* $EC_{50/15min}$, mg/dm ³
CHM	15,30	14,40
CHM/aero	15,75	13,50
CHM/3	20,70	24,30
CHM/3/aero	31,50	36,00
CHM/11	30,38	34,88
CHM/11/aero	27,00	29,25

* EC_{50} (ang. *Effect Concentration*) - stężenie wywołujące określony efekt u 50% populacji org. testowych odpowiednio w 5 i 15 min ekspozycji

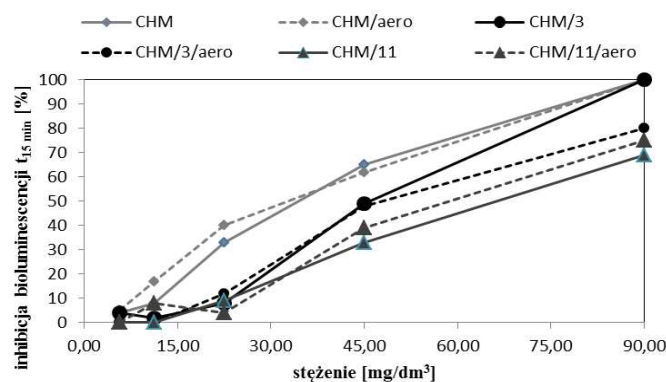
Wpływ modyfikacji zastosowanych względem wyjściowego roztworu CHM na toksyczność w stosunku do bakterii *Vibrio fischeri* przedstawiono na rysunkach 3 i 4. Zarówno po 5 (rys. 3), jak i 15 minutach ekspozycji (rys. 4) efekt toksyczny wyrażony jako inhibicja bioluminescencji uległ największej redukcji przy korekcie pH roztworu do 11.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż analizowana ciecz jonowa jest toksyczna w stosunku do mikroorganizmów morskich (*Vibrio fischeri*) i skorupiaków słodkowodnych (*Thamnocephalus platyurus*). Informacje te, z uwagi na ryzyko migracji imidazoliowych cieczy jonowych do środowiska, stanowią cenne uzupełnienie danych literaturowych potwierdzających negatywny wpływ tej grupy związków na organizmy reprezentujące różne poziomy troficzny

ne, tj.: glony (*Pseudokirchneriella subcapitata*) [5, 6], skorupiaki (*Daphnia magna*), mięczaki (*Dreissena polymorpha*) czy też ryby (*Danio rerio*) [7, 8].



Rys. 3. Wykres zależności inhibicji bioluminescencji od stężeń badanego medium po 5 min ekspozycji



Rys. 4. Wykres zależności inhibicji bioluminescencji od stężeń badanego medium po 15 min ekspozycji

Podsumowanie

Z uwagi na olbrzymie zainteresowanie i wzrost produkcji IIL's toksycność tych związków stała się przedmiotem wielu realizowanych prac i programów badawczych (m.in. *U.S. National Toxicology Program*, *Programy Badawcze EU*), których wspólnym celem jest prognozowanie i ocena skutków oddziaływania IL's w stosunku do organizmów zasiedlających poszczególne ekosystemy. Przeprowadzone badania potwierdzają skuteczność zastosowania analizy ekotoksykologicznej w ocenie oddziaływania IL's na organizmy żywe. Ponadto wskazują, iż stanowi ona niezastąpione i cenne źródło informacji o sposobie oddziaływania tych substancji na wybrane organizmy wodne. W celu zmniejszenia ryzyka środowiskowego dane uzyskane na podstawie badań ekotoksykologicznych powinny zostać uwzględnione już na etapie projektowania nowych związków.

Literatura

- [1] Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I., Anti-microbial activities of ionic liquid, *Green Chemistry* 2003, 5, 52-56.
- [2] Pham T., Cho Ch.W., Yun Y.S., Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Research* 2010, 44, 2, 352-372.
- [3] US EPA/600/6-91/005F, Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, 1992.
- [4] Dyrektywa Rady Wspólnoty Europejskiej 92/32/EEC (OJ L 154, 5.6.1992, p.1), 30 April 1992.
- [5] Stolte S., Matzke M., Arning J., Bösch A., Pitner W-R., Welz-Bierman U., Jastorff B., Ranke J., Effects of different head groups and functionalized side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids, *Green Chemistry* 2007, 9, 1170-1179.
- [6] Latała A., Nędzi M., Stepnowski P., Toxicity of imidazolium ionic liquids towards algae. Influence of salinity variations, *Green Chemistry* 2010, 12, 60-64.
- [7] Pretti C., Chiappe C., Baldetti I., Brunini S., Monni G., Intorre L., Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009, 72, 4, 1170-1176.
- [8] Latała A., Nędzi M., Stepnowski P., Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Bacillaria paxillifer* (a microphytobenthic diatom) and *Geitlerinema amphibium* (a microphytobenthic blue green alga), *Green Chemistry* 2009, 11, 1371-1376.

Toxicity of 1-Heksyl-3-Metylimidazolium Chloride according to Selected Marine and Freshwater Organisms

Ionic liquids (IL's) are defined as organic salts with low melting point. The reputation of those substances as green solvents (environmental friendly chemicals) is based primarily on their negligible vapor pressure. However, high solubility and stability of those substances in water can cause a serious concern about their toxic potential. Relatively little is still known about the toxicity of these substances as a class, especially when compared to conventional organic solvents. The aim of the study was to investigate the toxicity of imidazolium ionic liquid: 1-heksyl-3-metylimidazolium chloride (CHM) according to selected aquatic organisms: bioluminescent marine bacterium and crustacean. The results showed that CHM caused a harmful effect on tested organisms in the whole range of concentrations used in the tests. The estimated toxic index EC_{50} obtained 2.51 mg/dm³ according to *Thamnocephalus platyurus* and $EC_{50/5min}$ 15.30 mg/dm³, $EC_{50/15min}$ 14.40 mg/dm³ according to *Vibrio fischeri*. The CHM was classified as a toxic substance. Moreover, the toxicity of CHM samples with modified pH values and aeration has been measured. Modifications of CHM samples were based on U.S. EPA Protocol (Toxicity Identification Evaluation). Acute toxicity of each modification have been determined by using the MICROTOX[®] Basic Test 81.9% standard procedure. The results showed that upgrading pH value to 11 as well as diminishing samples pH to value 3 had an influence on samples' post-reaction toxicity. Both processes, pH correction and aeration, used individually caused a significant decrease of analyzed samples' toxicity expressed as toxic index's EC_{50} measured after 5 and 15 minutes of exposition. The toxic index values were increased from range 30% (pH 3) up to 100% (pH 11) according to non modified sample. The study showed that pH correction to value 3 connected with simultaneous aeration additionally decrease sample toxicity. The results of the present study has proved that 1-heksyl-3-metylimidazolium chloride could be toxic to aquatic organisms and it is necessary to carry out the ecotoxicological risk of ionic liquids by the use of bioassays.

Keywords: imidazolium, ionic liquid's, toxicity, bioassay