



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development

Dai, Y.

Citation

Dai, Y. (2013, September 24). *Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21787>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/21787>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21787> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dai, Yuntao

Title: Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development

Issue Date: 2013-09-24

Samenvatting

De afgelopen tien jaar hebben ionische vloeistoffen (ILs) en diep eutectische oplosmiddelen (DES) veel aandacht getrokken omdat ze milieuvriendelijk en onschadelijk zijn doordat ze een verwaarloosbare dampspanning hebben. Recent zijn in de internationale wetenschappelijke literatuur ILs en DES beschreven die gemaakt zijn met biologisch hernieuwbare natuurlijke producten als uitgangsmateriaal. Voor de productie werden verlaagde potentiële toxiciteit en productiekosten en de verhoogde biocompatibiliteit gerapporteerd. Met het oog op fysisch-chemische eigenschappen werden ook specifieke ILs of DES gemaakt met een lage viscositeit en smeltpunt, en een hoge thermische stabiliteit en selectiviteit voor gewenste chemicaliën. Ze werden succesvol gebruikt voor de extractie en scheiding van verschillende natuurlijke producten evenals enzymreacties. Hieruit bleek dat deze synthetische oplosmiddelen een betere oplos capaciteit hebben dan de klassieke organische oplosmiddelen. Dit geldt voor een groot aantal verbindingen, waaronder ook macromoleculen zoals lignine en cellulose. De belangrijkste drijvende krachten voor extractie zijn moleculaire interacties, bij voorbeeld waterstof bruggen, tussen het extractie medium en opgeloste verbindingen. Deze interacties worden sterk beïnvloed door de structuur van ILs maar ook door het watergehalte, de viscositeit, pH en uit-zout effecten. Uiteraard spelen deze factoren ook een belangrijke rol bij enzymreacties die plaatsvinden in ILs of DES. Na verdunning van het IL / DES extractie medium kunnen analytische en spectroscopische technieken gebruikt worden om de extracten te analyseren zoals HPLC, NMR, IR, UV, CD en SEM (scanning electron microscope). Bovendien kunnen de geëxtraheerde verbindingen worden geïsoleerd, waarna het IL / DES extractiemedium hergebruikt kan worden (**hoofdstuk 2**). Alle extractieprocessen met ILs of DES die worden beschreven in de internationale wetenschappelijke literatuur werden uitgevoerd met imidazolium gebaseerde ILs, deze zijn echter toxisch. Vanwege een hoge viscositeit of vaste toestand bij kamertemperatuur is het daarnaast voor de meeste van deze extracties noodzakelijk om ze te verwarmen tot hoge temperaturen of een verdunde waterige oplossing te gebruiken.

Om het bereik van ILs en DES uit te breiden, in het bijzonder om goedkope en onschadelijke groene oplosmiddelen te ontwikkelen met een lage viscositeit en de mogelijkheid om deze toe te passen voor gezondheid gerelateerde werkvelden, heeft onze groep natuurlijke diep eutectic solvents (NADES) voorgesteld. Deze term wordt voor zowel natuurlijke ILs als DES gebruikt. NADES zijn vloeibare supramoleculen die zijn samengesteld uit veel voorkomende primaire metaboliëten in een specifieke molaire verhouding en, in

sommige gevallen, water. Intermoleculaire interacties waaronder waterstofbruggen en ionische bindingen zijn karakteristiek voor NADES. Meer dan 100 NADES combinaties zijn gevonden en deze kunnen worden onderverdeeld in vijf groepen: ionische vloeistoffen gevormd uit een zuur en een base, op suiker gebaseerde NADES met ongeladen verbindingen, op suiker gebaseerde NADES met basen, op suiker gebaseerde NADES met zuren en op suiker gebaseerde NADES met aminozuren. Deze NADES zijn eenvoudig te bereiden door een mengsel van de verbindingen te roeren bij een temperatuur van 50 °C. Uit de fysische eigenschappen van typische NADES bleek dat NADES een dichtheid hebben die groter is dan water. Daarnaast beschikken ze over een hoge viscositeit, een lage glasovergangstemperatuur waardoor ze vloeibaar blijven tot onder 0 °C, een hoge thermische stabiliteit en een polariteits bereik hebben van meer polair dan water tot gelijk aan methanol. Qua toepassingen bleken NADES een uitstekend oplosmiddel voor een breed scala van natuurlijke producten met een lage tot gemiddelde polariteit die niet of slecht oplosbaar zijn in water. Macromoleculen zoals DNA, eiwitten en polysacchariden zijn ook oplosbaar in NADES (**hoofdstuk 3**). Door deze fysisch-chemische eigenschappen en een bijbehorend hoog oplossend vermogen zijn NADES zeer interessant voor toepassingen binnen de farmaceutische-, cosmetische- en voedingsindustrie.

Met als doel de toepassingen van NADES te vergemakkelijken en uit te breiden, werden de structuur en eigenschappen van mengsels van NADES en water onderzocht (**hoofdstuk 4**). Door met water te verdunnen, worden de waterstofbrug interacties tussen de componenten van NADES verzwakt en bij toevoeging van 50% water worden deze geheel gemaskeerd. Het watergehalte in NADES beïnvloedt niet alleen de structuur maar ook de fysisch-chemische eigenschappen. Door met water te verdunnen wordt de elektrische geleidbaarheid van NADES wel tot 100 maal groter. De wateractiviteit en dichtheid van NADES vertoonden een kwantitatieve relatie met het watergehalte in NADES. Verdunning van de NADES met een bepaalde hoeveelheid water verminderde de viscositeit van NADES sterk en veranderde de polariteit. Dit beïnvloedt ook de oplosbaarheid van sommige chemische verbindingen. Al deze effecten van water op de structuur en eigenschappen van NADES bieden een basis voor het moduleren van NADES voorspecifieke toepassingen.

Het stabiliserend vermogen is een belangrijk aspect voor het realiseren van toepassingen van NADES. Het instabiele pigment carthamin werd als model gebruikt om de stabiliteit van verbindingen in NADES te onderzoeken. In NADES die op suiker gebaseerd zijn werd een hogere stabiliteit van carthamin waargenomen dan in water of 40% ethanol oplossing. Dit geldt voor alle geteste omstandigheden zoals hoge temperatuur, blootstelling aan licht, en bewaartijd.

Zelfs in een ruw extract van carthamin, hydroxysafflor yellow A en cartormin in twee op suiker gebaseerde NADES werd een verbeterde stabiliteit waargenomen bij normale omgevingsomstandigheden en in het zonlicht. Het hoge stabiliserend vermogen van NADES wordt toegeschreven aan de waterstofbrug interacties tussen opgeloste stoffen en NADES moleculen. Hierdoor wordt de beweging van opgeloste stoffen beperkt waardoor contact met zuurstof uit de gasfase als interface met de lucht wordt beperkt. Daarnaast wordt de afbraaksnelheid van opgeloste stoffen gereduceerd door de lage oplosbaarheid van zuurstof in NADES. Dit stabiliserend vermogen van NADES wordt groter naarmate de viscositeit toeneemt en kleiner naarmate het watergehalte toeneemt (**hoofdstuk 5**). Op suiker gebaseerde NADES met een hoge viscositeit zijn bijzonder efficiënt voor het stabiliseren van fenolische verbindingen.

Voor de toepassing van NADES in de extractie van fenolische verbindingen werden anthocyanen gebruikt als model om het gebruik van NADES extractie in combinatie met met reversed phase HPLC te onderzoeken, waarbij ook de stabiliteit gemeten werd. Drie extractie methodes werden vergeleken: sonicatie bij kamertemperatuur, sonicatie bij 40 °C, en mechanisch roeren bij 40 °C. Mechanisch roeren bij 40 °C gedurende 1 uur bleek het meest effectief. De verenigbaarheid van NADES met reversed phase HPLC was goed en er werd geen effect van de NADES op het chromatografische gedrag van anthocyanen waargenomen. Echter, het vooraf verdunnen van het NADES extractiemedium met water is vereist om de viscositeit dusdanig te verlagen zodat injecteren van een monster mogelijk is. Stabiliteit experimenten toonden aan dat cyanidine stabiel is in sommige NADES dan in aangezuurd ethanol. Dit maakt de bereiding en het analyse proces van anthocyanine makkelijker. Met de bovengenoemde methode werden verschillende NADES gebruikt om anthocyanen te extraheren en werd voor de analyse van anthocyanen in bloembladeren van *Catharanthus roseus* op HPLC-UV gebaseerde metabolomics toegepast. Een multivariate analyse van de data toonde aan dat melkzuur:choline chloride:water en 1,2-propaandiol:choline chloride:water eenzelfde extraheerbaarheid van anthocyanen hebben als aangezuurde methanol (**hoofdstuk 6**). De extractie van fenolen met NADES werd vergeleken met conventionele oplosmiddelen. Saffloer werd geselecteerd vanwege de aromatische pigmenten die een breed scala van polariteiten vertonen, zoals de polaire fenolische verbindingen “hydroxysafflor yellow A” (HSYA) en cartormin en de minder polaire verbindingen carthamin en tri-p-coumaroyl spermidines. Met de hierboven vastgestelde werkwijzen werden extracten van acht NADES, water en ethanol geanalyseerd met HPLC-UV. Een multivariate analyse van de data toonde aan dat NADES een hogere opbrengst en breder spectrum van zowel polaire als minder polaire verbindingen gaf dan

conventionele oplosmiddelen. De extractie opbrengst van fenolische verbindingen werd sterk beïnvloed door het watergehalte in NADES. Onder geoptimaliseerde omstandigheden werden met sommige NADES hogere opbrengsten verkregen dan met water voor polaire verbindingen en hogere opbrengsten dan met ethanol voor minder polaire verbindingen. Met Diaion hars (HP-20) werden de meeste fenolische verbindingen terug gewonnen uit de NADES, met een rendement van 75% - 97% (**hoofdstuk 7**). Deze studie laat een groene, goedkope, en efficiënte aanpak zien voor de extractie en terugwinning van natuurstoffen uit biomassa. Deze kan worden toegepast voor de extractie en isolatie van natuurstoffen uit biomaterialen ten behoeve van de farmaceutische-, cosmetische- en voedingsmiddelenindustrie.

Het bestaan van NADES en hun mogelijke functies in planten werden onderzocht (**hoofdstuk 8**). Een relatief hogere hoeveelheid van de samenstellende ingrediënten van NADES werden waargenomen in droog mos in vergelijking met vers mos en in de episperm van gerst in vergelijking met het embryo. Een hoog gehalte aan suikers, polyolen of glycine betaïne domineert in planten excreties, zoals sap en nectar. NADES vertoonden naast een soortgelijke samenstelling dezelfde fysisch-chemische eigenschappen zoals die gevonden worden in het cytoplasma van planten. Dit vormt een mogelijk bewijs voor het bestaan van NADES in planten. NADES vertoonden daarnaast een vergelijkbare hygroscopiciteit als plantaardige materialen, wat een wateraanpassings rol van NADES in planten suggereert. Het mengen van NADES en water resulteerde in vloeistoffen met verschillende samenstellingen en eigenschappen, die goede oplosmiddelen zijn om metabolieten van diverse polariteiten te extraheren uit planten. Bovendien kunnen NADES zich rond membranen ophopen en ze daardoor stabiliseren, zoals blijkt uit experimenten met liposomen. Verdere studies naar de biologische rol van NADES in cellen en organismen zullen mogelijk ons beeld van de celfysiologie, evenals van de fysiologie van hele organismen veranderen. Bijvoorbeeld In planten is de resistentie tegen droogte en koude uitgebreid gerapporteerd. Hierbij zijn metabolieten betrokken die de bouwstenen van NADES vormen.