

# WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

Dz. 3



2003

(57)

3-4

(669-670)

# **CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

Publikacja dotowana przez KBN

## **RADA REDAKCYJNA**

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, RYSZARD BODALSKI,  
JACEK GAWROŃSKI, ZBIGNIEW HUBICKI, JERZY KONARSKI,  
TADEUSZ M. KRYGOWSKI, JANUSZ LIPKOWSKI, JACEK MŁOCHOWSKI,  
PIOTR PANETH, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, ZOFIA STASICKA

## **Z REDAKCJĄ STAŁE WSPÓŁPRACUJĄ**

HENRYK GALINA (Rzeszów), MAREK K. KALINOWSKI (Warszawa),  
BENIAMIN LENARCIK (Bydgoszcz), ZOFIA LIBUŚ (Gdańsk), JAN MAŁYSZKO (Kielce),  
BOGDAN MARCINIEC (Poznań), ZOFIA MICHALSKA (Łódź),  
ROMAN MIERZECKI (Warszawa), WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI (Lublin),  
ZOFIA STASICKA (Kraków), JAN SZYMANOWSKI (Poznań), JÓZEF ŚLIWIOK (Katowice)

## **KOMITET REDAKCYJNY**

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEFSKI, ADOLF KISZA,  
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,  
IGNACY Z. SIEMION, MIROSŁAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

## **REDAKTOR NACZELNY**

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

## **SEKRETARZ REDAKCJI**

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
tel. 375 73 89, tel./fax 322 14 06

INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2002

ISSN 0043-5104

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w marcu 2003

Przygotowanie do druku i druk: Firma Wydawnicza K-2, ul. Konopnickiej 6, 00-491 Warszawa, tel./fax: (22) 628-97-66

# TEORETYCZNE ASPEKTY ZJAWISKA ADHEZJI

## THEORETICAL ASPECTS OF ADHESION PHENOMENA

**Marta Krasowska, Bronisław Jańczuk,  
Wiesław Wójcik\***

*Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin  
Wiesiek@hermes.umcs.lublin.pl*

---

Abstract

Wstęp

1. Teoretyczne modele adhezji: krótki rys historyczny
2. Teoria Hertza
3. Teoria Johnsona, Kendalla, Robertsa
  - 3.1. Analiza przybliżona
  - 3.2. Analiza szczegółowa
4. Teoria Derjaguina, Mullera, Toporowa
  - 4.1. Określenie kształtu zdeformowanej części powierzchni sprężystej kuli
  - 4.2. Wpływ sprężystych deformacji na adhezję
5. Granice stosowalności teorii JKR i DMT
6. Teoria Maugisa – Dugdale’a
  - 6.1. Uwagi o założeniach teorii JKR i DMT
  - 6.2. Wykorzystanie modelu Dugdale’a
    - 6.2.1. Przełomy i sprężyste deformacje przy stałym obciążeniu
    - 6.2.2. Szybkość uwalniania energii sprężystej
7. Zakresy stosowalności poszczególnych teorii

Piśmiennictwo cytowane

---

**Marta Krasowska** – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Pracę magisterską obroniła w Zakładzie Zjawisk Międzyfazowych UMCS. Obecnie doktorantka w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie.



**Bronisław Jańczuk** ukończył studia chemiczne w 1967 r. na UMCS w Lublinie. Doktorat – 1973 r., dr hab. – 1985. W 1991 r. – profesor nadzwyczajny, w 1995 – profesor zwyczajny w Zakładzie Zjawisk Międzyfazowych w Katedrze Chemii Fizycznej UMCS.

Jego zainteresowania badawcze: zjawiska międzyfazowe procesów zwilżania, adhezji i adsorpcji, a ostatnio – głównie układy zawierające substancje powierzchniowo czynne. Autor ponad 200 prac oryginalnych.



**Wiesław Wójcik** ukończył w 1963 r. studia chemiczne na UMCS w Lublinie. Doktorat – 1971, praca habilitacyjna w 1983 r. W 1991 r. – profesor nadzwyczajny, a od 1998 jest profesorem zwyczajnym i kierownikiem Zakładu Zjawisk Międzyfazowych w Katedrze Chemii Fizycznej UMCS.

Jego badania naukowe: fizykochemia powierzchni i zjawisk międzyfazowych, ściśle związane z flotacją rud i minerałów. Autor ponad 150 prac oryginalnych.

---

**ABSTRACT**

This paper reviews the most important problems of interparticle interactions, which determine effectiveness of many technologies (such as: painting, printing, xerographing) and physical phenomena (for example: flocculation, aggregation, agglomeration, coagulation and wetting). This paper presents an evolution of theoretical models of adhesion phenomena.

Hertz at the end of XIX century investigated creation of the contact between two particles. He based his conclusion on mechanical side of phenomena only. This observation gave beginning for Griffith's testing, which elaborated theory of brittle fracture (1920). In this theory he coupled surface energy  $\gamma$  and elasticity.

At the thirties Bradley and Derjaguin presented independently adhesion induced deformation. Bradley based his investigation on exponential relationship interaction between two molecules. Derjaguin interpreted these phenomena with the aid of geometrical and thermodynamical analysis.

The fifties there was a great development of tribology and fracture mechanics. Irwin introduced new technical term of strain energy  $G$  released when the crack area varied by  $dS$ . After that Krupp generalized Derjaguin model and added influence of plastic deformation.

At the early seventies two theories were created. First theory created by Johnson, Kendall and Roberts (called JKR), and second one by Derjaguin, Muller, Toporow (called DMT theory). These two models were and still are base to interpreting interparticle interactions.

The next model is Dugdale model developed for crack tip plasticity and is quite simple: the stresses in the cohesive zone are constant and equal to the yield stress of the testing material.

In 1983 Muller assuming a Hertzian profile, compared his earlier thermodynamic method, in which the force of attraction decreases from  $2\pi W_A$  to  $\pi W_A$ , for more correct value by summing up the interactions in the Hertzian fixed gap.

In this publication range of application each of these theories are introduced.

---

---

## SYMBOLE

|                           |  |
|---------------------------|--|
| $A$                       | – stała Hamakera   |
| $A$                       | – bezwymiarowy parametr (rów. (62))  |
| $a$                       | – promień płaszczyzny kontaktu   |
| $a_0$                     | – promień płaszczyzny kontaktu przy zerowym obciążeniu   |
| $c$                       | – całkowity promień płaszczyzny kontaktu   |
| $d$                       | – strefa kohezji ( $c - a$ )   |
| $E$                       | – moduł Younga,  |
| $F_s$                     | – siła wynikająca ze zmian swobodnej energii powierzchniowej   |
| $G$                       | – prędkość uwalniania energii sprężystej   |
| $K$                       | – współczynnik intensywności naprężeń  |
| $K_m$                     | – współczynnik intensywności naprężeń wynikający z oddziaływań międzymolekularnych   |
| $K_1$                     | – współczynnik intensywności naprężeń wynikający z obciążenia zewnętrznego   |
| $k_1, k_2$                | – współczynniki sprężystości kul 1 i 2   |
| $P$                       | – obciążenie wynikające z oddziaływań międzyfazowych   |
| $P$                       | – bezwymiarowy parametr (rów. (63))  |
| $P_0$                     | – obciążenie mechaniczne   |
| $P_z$                     | – siła sprężystości  |
| $P_z(\rho)$               | – rozkład ciśnienia normalnego do płaszczyzny kontaktu   |
| $R$                       | – promień kuli   |
| $R'$                      | – odległość punktu przy którym rozważne jest odkształcenie do środka płaszczyzny kontaktu  |
| $r$                       | – odległość punktu od osi rzędnych   |
| $S$                       | – powierzchnia   |
| $U_E$                     | – energia sprężystości   |
| $U_M$                     | – energia potencjalna wynikająca z obciążenia mechanicznego  |
| $U_S$                     | – energia powierzchniowa   |
| $U_T$                     | – całkowita energia układu   |
| $W_A$                     | – praca adhezji  |
| $w$                       | – powierzchnia zdeformowanej części kuli   |
| $x$                       | – wielkość przemieszczenia się ciał, równe jest w przybliżeniu wartości $\delta$   |
| $z$                       | – odległość punktu od osi odciętych  |
| $z_0$                     | – najmniejsza odległość, na jaką mogą zbliżyć się do siebie dwa krystaliczne ciała (wg. Dierjagnina dla kryształów $z_0 = 4 \text{ \AA}$ ) |
| $\Delta$                  | – bezwymiarowy parametr (rów. (64))  |
| $\delta$                  | – głębokość sprężystego lub plastycznego odkształcenia   |
| $\delta_i$                | – odkształcenie postępującego przełomu dla $r = c$   |
| $\varepsilon\varepsilon'$ | – funkcja głównych promieni krzywizny ciał w punkcie ich największego zbliżenia  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| $\varphi(h)$            | – energia oddziaływań pomiędzy dwoma ciałami w funkcji odległości ( $h$ ) |
| $\gamma$                | – swobodna energia międzyfazowa   |
| $\eta$                  | – arbitralnie wybrany ułamek (0,05)                                       |
| $\eta_1$                | – arbitralnie wybrana wielkość (20)                                       |
| $\overline{\eta\omega}$ | – stała Lifshitz’a – van der Waalsa                                       |
| $\lambda$               | – bezwymiarowy parametr (rów. (65))                                       |
| $\mu$                   | – bezwymiarowy współczynnik (rów. (44))                                   |
| $\mu_y$                 | – kształt przełomu  |
| $\nu$                   | – liczba Poissona   |
| $\rho$                  | – odległość rozważanego punktu od środka powierzchni płaszczyzny kontaktu |
| $\sigma$                | – rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu                                |
| $\sigma_n$              | – rozkład naprężeń na granicy płaszczyzny kontaktu                        |
| $\xi$                   | – arbitralnie wybrany ułamek (0,05)                                       |
| $\xi$                   | – arbitralnie wybrany ułamek (0,05)                                       |

## WSTĘP

Adhezja jest zjawiskiem makroskopowym polegającym na połączeniu się ze sobą powierzchniowych warstw różnych ciał lub faz (stałych lub ciekłych), zachodzącym w wyniku działania sił międzymolekularnych. Mechanizmy powstawania takich połączeń są dość złożone a badania zjawiska adhezji prowadzone są bądź od strony chemii powierzchni, bądź od strony mechaniki powstawania pęknięć lub przełomów. W pierwszym przypadku próbuje się połączyć siły adhezyjne z oddziaływaniami van der Waalsa lub z termodynamiczną pracą adhezji. W przypadku badań prowadzonych w zakresie mechaniki powstawania pęknięć lub kruchych przełomów, analizuje się je na podstawie wielkości i rozkładu naprężeń dookoła już istniejącego pęknięcia.

Obie metody stosowane są w celu bliższego poznania i zrozumienia roli adhezji oraz jej znaczenia w wielu procesach, takich jak: tarcie, smarowanie, klejenie, aglomeracja czy agregacja, rozdrabnianie i wiele innych. Stąd określenie wielkości i rodzaju oddziaływań adhezyjnych przyczynia się do usprawnienia technologii np.: farbowania tkanin, malowania, drukowania, kserowania, a także w lecznictwie, zarówno przy produkcji leków jak i podczas ich późniejszego stosowania.

W czasie zbliżania do siebie dwóch ciał o doskonale gładkich powierzchniach, w wyniku zmniejszenia odległości rosną siły międzymolekularne, które prowadzą do utworzenia trwałego atomowego kontaktu. Dla ponownego rozdzielenia tych ciał należy wykonać określoną pracę, którą nazywamy pracą adhezji. Utworzenie kontaktu pomiędzy dwoma ciałami, zachodzące w wyniku działania sił międzyfazowych (sił wewnętrznych) lub zewnętrznego obciążenia mechanicznego (sił zewnętrznych), prowadzi do deformacji powierzchni ciała charakteryzującego się właściwościami sprężystymi lub lepko-plastycznymi, czyli ciała o niższym module sprę-

żystości. Wielkości sprężystych odkształceń są małe dla ciał o wysokich modułach sprężystości i znaczne, a tym samym mierzalne, dla ciał o niskich modułach. Wszystkie te czynniki muszą być brane pod uwagę przy badaniu i opisie zjawiska adhezji.

Przegląd głównych teoretycznych rozwiązań opisujących proces adhezji oraz omówienie zakresów stosowalności jest celem tej pracy.

## 1. TEORETYCZNE MODELE ADHEZJI: KRÓTKI RYS HISTORYCZNY

Adhezja cząstek na powierzchni jest procesem bardzo złożonym. Zależy w głównej mierze od wielkości mechanicznego obciążenia (siły przyciskającej), powierzchni kontaktu między nimi, właściwości mechanicznych kontaktujących się ciał oraz swobodnej energii międzyfazowej, a w przypadku zetknięcia dwóch ziaren również od ich rozmiarów.

Pierwsze badania procesu adhezji prowadzone były już w XIX wieku [1, 2] a utworzenie trwałego kontaktu było rozpatrywane od strony mechaniki zjawiska. W 1882 r. Hertz [1] zakładając eliptyczny rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu między dwoma gładkimi i sprężystymi ciałami opracował podstawy teorii procesu adhezji. Stwierdził, że zarówno wielkość, kształt jak i trwałość utworzonego kontaktu związane są z odkształceniem się ciała bardziej sprężystego. Deformacje te są powodowane sprężystym oddziaływaniem materiałów wywołanym działaniem siły zewnętrznej, tzw. obciążenia mechanicznego, lub własnymi siłami przyciągającymi.

Problem ten był również przedmiotem badań prowadzonych przez Boussinesca [2], który wykazał, że w czasie beztarciowego wciskania sztywnego węgelnika, o wypukłej powierzchni do sprężystej półprzestrzeni drugiego ciała, powierzchnia kontaktu na ogół nie jest znana. Zagadnienie to można rozwiązać zakładając, że w momencie zetknięcia tych ciał składowa normalna naprężenia wynosi zero, co było przez wiele lat powszechnie akceptowane.

W roku 1920 Griffith [3] opracował podstawy teorii powstawania tzw. kruchych przełomów (pęknięcie ciała kruchego). Wykazał on, że siły powierzchniowe deformują rozwijanie przełomu powodując zwiększanie energii sprężystości i w ten sposób modyfikują równowagę energetyczną. W wyniku powstawania kruchego przełomu następuje powiększenie powierzchni o  $dS$  w wyniku wykonania pracy  $\gamma dS$  ( $S$  – powierzchnia,  $\gamma$  – swobodna energia międzyfazowa).

W latach trzydziestych Bradley [4, 5], wykorzystując wykładniczą funkcję opisującą zmianę oddziaływań pomiędzy cząsteczkami (lub atomami) z odległością, wprowadził równanie wiążące siłę oddziaływań ( $P$ ) pomiędzy dwoma kontaktującymi się kulami o promieniach  $R_1$  i  $R_2$  z pracą adhezji,  $W_A$ , a pośrednio z swobodną energią międzyfazową ponieważ  $W_A = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12}$  (indeksy 1 i 2 odnoszą się do granicy faz ciało stałe–gaz, a 12 do granicy faz ciało stałe–ciało stałe). Równanie to ma postać:



$$P = 4\pi W_A \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad (1)$$

W dotychczasowych rozważaniach [1–5] zjawiska adhezji pomiędzy dwoma ciałami stałymi nie brano pod uwagę faktu, że w czasie utworzenia trwałego kontaktu ulegają one większym lub mniejszym odkształceniom sprężystym. Pierwszym, który uwzględnił odkształcenia tego typu był Derjaguin [6]. Na podstawie geometrycznej i termodynamicznej analizy utworzonego kontaktu pomiędzy kulą i płaską powierzchnią wyprowadził następujące równanie:

$$P = -\frac{2\pi}{\sqrt{\epsilon\epsilon'}} \varphi(h) \quad (2)$$

gdzie  $-\varphi(h)$  jest to energia oddziaływań pomiędzy dwoma równoległymi płaszczyznami w funkcji odległości ( $h$ ) i  $\epsilon\epsilon'$  jest funkcją głównych promieni krzywizny kontaktujących się ciał w punkcie ich największego zbliżenia. W przypadku kontaktu dwu kul będących w stanie równowagi równanie (2) przyjmuje postać równania (1) wyprowadzonego przez Bradleya [4, 5]. Derjaguin [6] wyprowadził również równanie wiążące promień płaszczyzny kontaktu ( $a$ ) pomiędzy sztywną kulą a płaską, sprężystą powierzchnią ciała stałego, które przy założeniu, że oddziałują one zgodnie z teorią Hertza, ma postać:

$$a^3 = \frac{3}{4} P_0 \left( \frac{1-\nu^2}{E} \right) R \quad (3)$$

gdzie  $P_0$  jest to siła obciążenia mechanicznego,  $E$  jest to moduł Younga,  $\nu$  jest to liczba Poissona i  $R$  jest to promień kuli. W przypadku, kiedy oddziaływania międzymolekularne wynikają wyłącznie z oddziaływań van der Waalsa [7], wówczas siła oddziaływania międzyfazowego ( $P$ ), zgodnie z badaniami Kruppa [8], wynosi:

$$P = \frac{\overline{\eta\omega}}{8\pi z_0^2} R \quad (4)$$

gdzie  $\overline{\eta\omega}$  jest to stała Lifshitzza-van der Waalsa i  $z_0$  jest to najmniejsza odległość na jaką mogą zbliżyć się dwa krystaliczne ciała (wg. Derjaguina  $z_0 = 4 \text{ \AA}$ ), a

$$R = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$

Dalsze badania nad mechaniką kruchych pęknięć i trybologią doprowadziły Irwina [7, 8] do stwierdzenia, że kiedy powierzchnia w wyniku kruchego przełomu zmienia się o  $dS$ , to zgodnie z kryterium Griffitha [3], po osiągnięciu stanu równowagi, prędkość uwalniania energii sprężystej ( $G$ ) jest równa energii kohezji ( $G = W_{\text{Koh}}$ ). Pękanie materiału kruchego wg Irwina [9, 10] zachodzi w trzech etapach: w pierwszym następuje rozluźnienie wiązań, w drugim przesuwanie się względem siebie stykających się warstw i w trzecim dochodzi do rozdzielenia kontaktujących się powierzchni.

Dokładną analizę tego problemu przeprowadził Johnson [11] przyjmując, że wielkość płaszczyzny kontaktu pomiędzy dwoma kulami, utworzonej w wyniku działania obciążenia mechanicznego ( $P_0$ ) określa teoria Hertza. Zmniejszenie lub zanik działania tej siły powoduje natychmiastowy wzrost naprężeń rozciągających po obwodzie płaszczyzny kontaktu a w granicznym przypadku prowadzi do przerwania kontaktu [9–12]. Stąd wynika wniosek, że promień płaszczyzny kontaktu nie może być większy od promienia określonego na podstawie teorii Hertza [1].

Krupp [8] postulował, że naprężenia wynikające z sił powierzchniowych mogą być wyższe niż graniczna sprężystość jednego z materiałów. Na tej podstawie próbował uogólnić model Derjaguina [6] włączając do swoich rozważań przepływ plastyczny. Założył on [8], że płaszczyznę kontaktu można podzielić na dwa różne obszary:

- 1) strefę wewnętrzną o promieniu  $a$ , na którą działają wyższe naprężenia powodujące odkształcenia plastyczne oraz
- 2) zewnętrzną pierścien, na który działają niższe naprężenia powodujące odkształcenia sprężyste, co prowadzi do zwiększenia płaszczyzny kontaktu od  $a$  do  $c$ .

Przeprowadzone przez Kruppa [8] badania wykazały, że promienie płaszczyzny kontaktu  $a$  i  $c$  zależą od twardości materiału, która jest funkcją czasu działania danego obciążenia mechanicznego.

## 2. TEORIA HERTZA

Hertz [1] analizując utworzenie kontaktu pomiędzy dwoma sprężystymi ciałami pod działaniem określonego obciążenia mechanicznego ( $P_0$ ) (Rys.1) założył eliptyczny rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu, które prowadzą do niewielkich sprężystych odkształceń. Dla dwu kul o promieniach  $R_1$  i  $R_2$  poddanych działaniu określonego obciążenia mechanicznego  $P_0$ , promień utworzonej płaszczyzny kontaktu,  $a$ , wynosi:

$$a^3 = \frac{3}{4} \pi (k_1 + k_2) \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} P_0 \quad (5)$$

gdzie  $k_1$  i  $k_2$  są to współczynniki sprężystości badanych kul, które można obliczyć z równań:

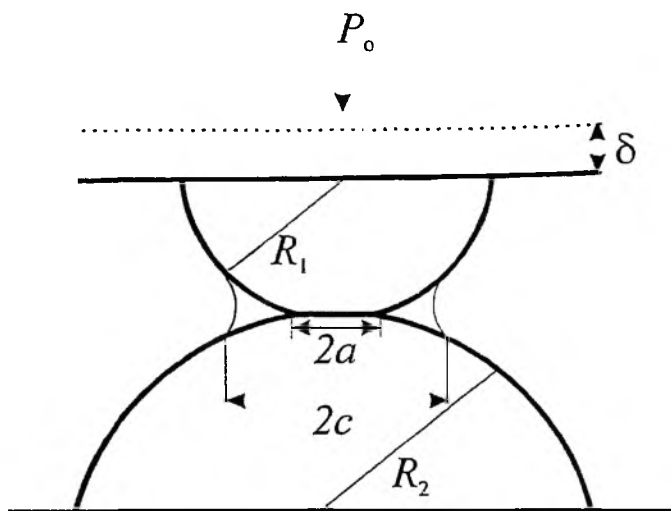
$$k_1 = \frac{1 - \nu_1^2}{\pi E_1} \quad (6a)$$

$$k_2 = \frac{1 - \nu_2^2}{\pi E_2} \quad (6b)$$

W wyniku działania obciążenia mechanicznego głębokość sprężystego czy plastycznego odkształcenia kul ( $\delta$ ) wynosi (Rys. 1):

$$\delta^3 = \frac{9}{16} \pi^2 (k_1 + k_2)^2 \frac{R_1 + R_2}{R_1 R_2} P_o^2 \quad (7)$$

Te teoretyczne rozwiązania Hertza [1] zostały potwierdzone doświadczalnie przez mikroskopowe pomiary promienia płaszczyzny kontaktu utworzonego pomiędzy gumową i szklaną kulą.



Rysunek 1. Schemat kontaktu dwóch kul.  $P_o$  – obciążenie mechaniczne,  $\delta$  – sprężyste odkształcenie,  $a$  – promień płaszczyzny kontaktu,  $c$  – promień płaszczyzny kontaktu ze strefą kohezijną,  $R_1, R_2$  – promienie kontaktujących się kul

Teoria Hertza była i jest ciągle przedmiotem badań [3–22], które wykazały m.in., że płaszczyzna kontaktu utworzona pomiędzy np. szklaną kulą i elastomerem jest większa, niż wynikało z tej teorii. Johnson, Kendal i Roberts [12] wykazali, że przy niewielkich obciążeniach mechanicznych płaszczyzna kontaktu jest większa

od tej wynikającej z teorii Hertza [1]. Przy zerowym obciążeniu mechanicznym promień płaszczyzny kontaktu ma ciągle określoną stałą wartość  $a$  w przypadku czystych i suchych powierzchni stwierdzono znaczną adhezję [3, 12, 14, 15]. Dla dużych obciążeń mechanicznych wyniki doświadczalne spełniają teorię Hertza [1].

### 3. TEORIA JOHNSONA, KENDALLA I ROBERTSA

Z badań prowadzonych przez Bradleya [4, 5], Derjaguina [6, 14, 15] i innych [3, 8, 11, 17] wynika, że swobodna energia powierzchniowa odgrywa istotną rolę w utworzeniu trwałego kontaktu pomiędzy dwoma ciałami. Rozwiązanie tego problemu przedstawione jest w pracy Johnsona i współpracowników [12], które w skrócie przedstawiono poniżej.

#### 3.1. ANALIZA PODSTAWOWA

Johnson, Kendall i Roberts [12] (stąd powszechnie używany termin „teoria JKR”), analizując utworzenie kontaktu pomiędzy dwoma sprężystymi kulami wykazali, że przy zerowym obciążeniu mechanicznym, teoria Hertza zawodzi a przyczyną znacznej adhezji pomiędzy tymi kulami są przyciągające oddziaływania międzycząsteczkowe. W stanie równowagi przyrost energii sprężystości jest równy stratom swobodnej energii powierzchniowej,  $U_s$ . Wielkość tych strat określa zależność:

$$U_s = -\pi a^2 W_A \quad (8)$$

a siła ( $F_s$ ) wynikająca ze zmian energii wynosi:

$$F_s = -\frac{dU_s}{dx} \quad (9)$$

gdzie:  $x$  jest to głębokość sprężystego odkształcenia ciała, równa w przybliżeniu wartości  $\delta$  określonej równaniem (7) (Rys. 1) z teorii Hertza [1].

Dokładna wartość  $x$  nie może być wyznaczona z tego równania, ponieważ przyciągające siły powierzchniowe zakłócają rozkład naprężeń w ciałach. W przybliżeniu można napisać, że:

$$x \approx a^2 \frac{(R_1 + R_2)}{R_1 R_2} \quad (10)$$

I stąd:

$$F_S \approx \frac{\pi R_1 R_2 W_A}{(R_1 + R_2)} \quad (11)$$

Ta dodatkowa siła zwiększa zewnętrzną siłę, wynikającą z obciążenia mechanicznego, prowadząc do zmiany geometrii układu i energii kontaktujących się powierzchni i w konsekwencji ta siła powierzchniowa będzie zmieniać znacznie wielkość płaszczyzny kontaktu, a jej wielkość wynosi:

$$P_0 \approx \frac{\pi R_1 R_2 W_A}{(R_1 + R_2)} \quad (12)$$

Nieoczekiwanie, jak to widać z równania (11), siła adhezji ( $F_S$ ) pomiędzy dwoma wypukłymi powierzchniami nie zależy od modułów Younga kontaktowanych materiałów. Moduł Younga wpływa na promień płaszczyzny kontaktu, jednakże jak widać z równania (8) i (10) zarówno energia powierzchniowa jak i energia sprężystości zmienia się z  $a^2$ , tym samym siła adhezji nie zależy od  $a$  i stąd od modułu Younga.

### 3.2. ANALIZA SZCZEGÓŁOWA

Dokładne określenie warunków równowagi pomiędzy zetkniętymi, sprężystymi kulami wyznaczono obliczając całkowitą energię układu ( $U_T$ ) w zależności od promienia płaszczyzny kontaktu [12]. W stanie równowagi możemy zapisać:

$$\frac{dU_T}{da} = 0 \quad (13)$$

W przypadku, gdy zaniedbuje się siłę wynikającą ze zmian energii powierzchniowej, równanie (13) przyjmuje postać równań (5) i (7). Uwzględnienie działania sił powierzchniowych powoduje zwiększenie promienia płaszczyzny kontaktu od  $a$  do  $c$  [8] a obciążenie mechaniczne zgodnie z teorią Hertza [1] oznaczone jako  $P_0$ , wynosi  $P_1$  powodując utworzenie płaszczyzny kontaktu o promieniu  $c$ , który można zdefiniować równaniem:

$$c^3 = \frac{RP_1}{K} \quad (14)$$

gdzie:

$$K = \frac{4}{3\pi(k_1 + k_2)} \quad (15)$$

a  $k_1$  i  $k_2$  są współczynnikami sprężystości danymi równaniami (6a) i (6b).

Całkowita energia układu ( $U_T$ ) jest sumą trzech składowych: zakumulowanej energii sprężystości ( $U_E$ ), energii potencjalnej wynikającej z obciążenia mechanicznego ( $U_M$ ) i energii powierzchniowej ( $U_S$ ). W utworzeniu płaszczyzny kontaktu o promieniu  $c$  odgrywają rolę zarówno jednostkowe naprężenia ściskające, jak i naprężenia rozciągające. Wówczas zakumulowaną energię sprężystości opisuje równanie:

$$U_E = -\frac{1}{2} \frac{1}{K^3 R^2} \left( \frac{1}{15} P_1^5 + \frac{1}{3} P_o^2 P_1^{-3} \right) \quad (16)$$

Mechaniczna potencjalna energia wynikająca z zastosowanego obciążenia wynosi:

$$U_M = -P\delta = -\frac{P}{2} \frac{1}{K^3 R^3} \left( \frac{1}{3} P_1^3 + \frac{2}{3} P_o P_1^{-3} \right) \quad (17)$$

Powierzchniowa swobodna energia określona jest równaniem:

$$U_S = -W_A \pi a_1^2 = -\pi W_A \left( \frac{R P_1}{K} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (18)$$

Stan równowagi opisuje równanie (13), które dla  $a = c_1$  jest równoznaczne z:

$$\frac{dU_T}{dP_1} = 0 \quad (19)$$

Rozwiązanie równania (19), po uwzględnieniu równań (17, 18, 19) dla stanu stabilnej równowagi, daje wartość obciążenia mechanicznego, które jest równo:

$$P_1 = P_o + 3\pi R W_A + \sqrt{6\pi R P_o W_A + (3\pi R W_A)^2} \quad (20)$$

Z równania tego widać, że całkowite obciążenie mechaniczne  $P_1$  działające pomiędzy dwoma sprężystymi ciałami, których praca adhezji wynosi  $W_A$  jest większa od obciążenia mechanicznego oznaczanego przez Hertza jako  $P_0$ .

Promień płaszczyzny kontaktu opisuje równanie:

$$c^3 = \frac{R}{K} \left[ P_0 + 3\pi R W_A + \sqrt{6\pi R P_0 + (3\pi R W_A)^2} \right] \quad (21)$$

Dla przypadku, kiedy  $W_A = 0$  równanie (21) redukuje się do równania (5), a przy zerowym obciążeniu promień płaszczyzny kontaktu jest określony równaniem:

$$a^3 = P \frac{(6W_A \pi R)}{K} \quad (22)$$

gdzie  $P$  jest to siła wynikająca z oddziaływań międzymolekularnych.

W przypadku odrywania kuli od podłoża promień płaszczyzny kontaktu zmniejsza się i dla takiego układu z równania (21) otrzymamy:

$$P \geq -\frac{3}{2} W_A \pi R \quad (23)$$

a oderwanie kuli od podłoża zachodzi, kiedy:

$$P = -\frac{3}{2} W_A \pi R \quad (24)$$

Z równania (24) widać, że siła potrzebna do oderwania kuli od podłoża nie zależy od modułu Younga. Można to uzasadnić analizując tzw. sprężyste odbicie, kiedy to energia zużyta na sprężyste odkształcenie materiału w czasie zderzenia kuli z płaską, sztywną powierzchnią jest uwalniana po usunięciu kuli z powierzchni [9, 10]. Rozumowanie to nie zawsze jest poprawne a przyczyny tego są związane z trudnościami dokładnego określenia równowagi termodynamicznej układu.

#### 4. TEORIA DERJAGUINA, MULLERA I TOPOROWA

##### 4.1. OKREŚLENIE KSZTAŁTU ZDEFORMOWANEJ CZĘŚCI POWIERZCHNI SPRĘŻYSTEJ KULI

Derjaguin [6], jak wcześniej wspomniano, założył, że w czasie kontaktu pomiędzy dwoma kulami lub kulą i płaską powierzchnią dochodzi do sprężystego odkształcenia powierzchni kontaktujących się materiałów. Analiza geometryczna dla przypadku kontaktu dwu sprężystych kul jest dość złożona [14, 15]. Z tego też powodu taka analiza została ograniczona do kontaktu sprężystej kuli z płaską powierzchnią drugiego ciała o doskonałej twardości. Moduły sprężystości rozważanych składników układu muszą spełniać warunek:

$$\frac{E_{\text{kuli}}}{E_{\text{pow. płaskiej}}} \ll 1 \quad [14, 15, 23-25].$$

Ponadto moduł sprężystości kuli nie powinien być zbyt mały, aby przyciągające siły międzymolekularne nie zmieniały wyraźnie powierzchni kontaktu. Derjaguin i wsp. [14, 15, 23-25] założyli, że zgodnie z teorią Hertza [1] rozkład ciśnienia normalnego,  $P_{z(\rho)}$ , do całej powierzchni kontaktu (o kolistym kształcie) spowodowany zewnętrznym obciążeniem mechanicznym opisuje równanie:

$$P_{z(\rho)} = \frac{3P_0}{2\pi a^2} \left(1 - \frac{\rho^2}{a^2}\right)^{3/2} \quad (25)$$

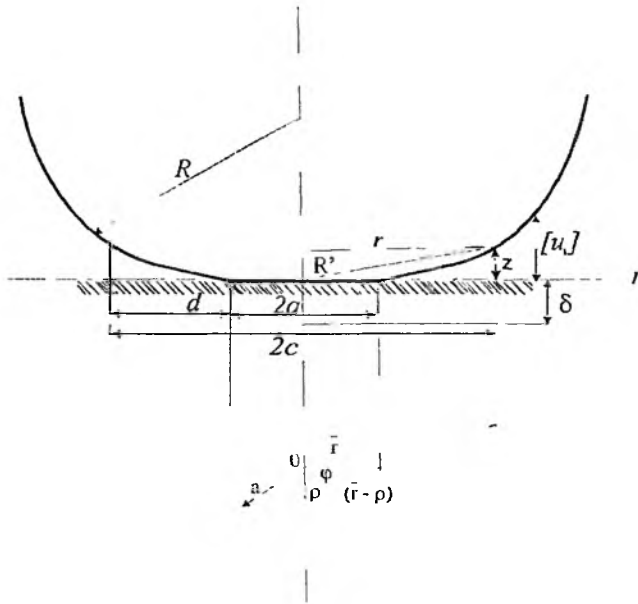
gdzie  $\rho$  jest to odległość od środka płaszczyzny kontaktu do rozważanego punktu.

Normalnie skoncentrowane obciążenie mechaniczne,  $P_z \cdot dw$ , powoduje deformację powierzchni kuli, której normalny element jest równy:

$$dw(R') = \frac{1-v^2}{\pi E} \frac{P_z dw}{R'} \quad (26)$$

gdzie  $R' = r^2 - 2r\rho\cos\varphi + \rho^2 + z^2$  (Rys. 2),  $r$  i  $z$  są to współrzędne rozpatrywanego punktu i  $\varphi$  jest to kąt pomiędzy współrzędnymi  $\vec{r}$  i  $\rho$  (Rys. 2).





Rysunek 2. Schemat kontaktu sprężystej kuli o promieniu  $R$  ze sztywną płaską powierzchnią,  $a$  – promień płaszczyzny kontaktu,  $c$  – promień płaszczyzny kontaktu ze strefą kohezyjną,  $d$  – strefa kohezyjna,  $\delta$  – głębokość sprężystego odkształcenia,  $r$  i  $\varphi$  – współrzędne punktu i  $\varphi$  – kąt pomiędzy współrzędnymi

Wstawiając do równania (26)  $P_z$  z równania (25), a następnie całkując otrzymane równanie po całej powierzchni kontaktu, można wyznaczyć całkowitą rzeczywistą deformację powierzchni kuli ( $w$ ). Dla dowolnego punktu na powierzchni kuli o współrzędnych  $r$  i  $z$ , normalny składnik deformacji opisuje równanie:

$$w(R') = \frac{1-\nu^2}{\pi E} \int_0^a \int_0^{2\pi} \frac{P_z(\rho)}{r} \rho \cdot d\rho \cdot d\varphi \quad (27)$$

Rozwiązanie równania (25) przy znacznej deformacji kuli prowadzi do:

$$w(R') \approx \frac{3}{2} \frac{1-\nu^2}{\pi E} \frac{P_0}{a^2} \int_0^a \int_0^{2\pi} \frac{(1-\nu^2/a^2)^{1/2}}{r} \rho \cdot d\rho \cdot d\varphi = \frac{1-\nu^2}{\pi E} \frac{P_0}{r} \quad (28)$$

Dla przypadku, kiedy  $z = 0$ , deformację powierzchni kuli opisuje równanie:

$$w(r) = \frac{3}{8} \frac{1-\nu^2}{\pi E} \frac{P_0}{a^3} \left[ 2a(r^2 - a^2)^{1/2} + (r^2 - a^2) \cdot \arccos\left(1 - 2 \frac{a^2}{r^2}\right) \right] \quad (29)$$

Równanie (29) opisuje deformację w kierunku osi  $z$  poza płaszczyzną kontaktu, tj. dla  $r \geq z$ . Dla punktów leżących na powierzchni kuli, dla których  $r = a$  zniekształcenie jej powierzchni opisuje zależność:

$$w_{(r=a)} = w(a) = \frac{3}{8} \frac{1-\nu^2}{E} \frac{P_0}{a} \quad (30)$$

Natomiast dla przypadku, kiedy współrzędne punktu  $r = z = 0$  (początek układu współrzędnych), deformację powierzchni opisuje równanie (27), którego rozwiązanie prowadzi do:

$$w_{(r=0)} = \frac{1-\nu^2}{\pi E} \frac{3\pi}{4} \frac{P_0}{a} = \frac{3}{4} \frac{1-\nu^2}{E} \frac{P_0}{a} = 2w(a) \quad (31)$$

Dla dowolnego punktu znajdującego się na zniekształconej powierzchni możemy napisać, że:

$$z = z_0 + w - \delta \quad (32)$$

a w rozważanym przypadku:

$$z_0 = \frac{r^2}{2R} \quad (33)$$

Okazało się, że dla punktu znajdującego się na początku układu współrzędnych:  $z = z_0 = 0$  i  $w(0) = \delta$ , wielkość głębokości sprężystego odkształcenia wynosi:

$$\delta = \frac{3}{4} \cdot \frac{1-\nu^2}{E} \cdot \frac{P_0}{a} \quad (34)$$

a dla punktów na obwodzie płaszczyzny kontaktu:  $r = a, z = 0$  i

$$z_0 = \frac{a^2}{2R}$$

Biorąc pod uwagę równanie (31) można napisać, że  $w(a) = \delta/2$ . W takim przypadku z równania (32) otrzymamy:

$$\delta = \frac{a^2}{R} \quad (35)$$

Uwzględniając, że:

$$\frac{3}{4} \cdot \frac{1-v^2}{\pi E} \cdot \frac{P_0}{a^3} = \frac{1}{\pi R} \quad (36)$$

z równania (31) wynika:

$$w(r) = \frac{1}{2\pi R} \left[ 2a(r^2 - a^2)^{\frac{1}{2}} + (2a^2 - r^2) \cdot \arccos \left( 1 - \frac{2a^2}{r^2} \right) \right] \quad (37)$$

Wstawiając do równania (32) równania (33), (35) i (37) otrzymamy:

$$z = \frac{1}{\pi R} \left[ a(r^2 - a^2)^{\frac{1}{2}} + (2a^2 - r^2) \cdot \arctan \left( \frac{r^2}{a^2} - 1 \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (38)$$

Równanie (38) w połączeniu z równaniami (34) i (35) opisuje kształt zdeformowanej powierzchni kuli w zależności od wielkości  $\delta$  (albo od wartości siły sprężystości), natomiast samo równanie (38) określa odległość pomiędzy przeciwległymi punktami znajdującymi się na kuli i na płaskiej powierzchni. Zwykle nie dochodzi do bezpośredniego atomowego kontaktu pomiędzy kulą i płaską powierzchnią a najmniejsza odległość, na jaką mogą obie powierzchnie zbliżyć się do siebie, według Derjaguina i współ. [14, 15] wynosi ok. 4 Å. W takim przypadku do równania (38) należy wprowadzić odpowiednią poprawkę.

#### 4.2. WPŁYW SPRĘŻYSTYCH DEFORMACJI NA ADHEZJĘ

Według Derjaguina i wsp. [14, 15], utworzenie kontaktu pomiędzy sprężystą kulą a płaską sztywną powierzchnią, zachodzące pod wpływem obciążenia mechanicznego  $P_0$ , powoduje deformację powierzchni kuli, co przejawia się zmianą odległości środka kuli od płaskiej powierzchni ( $\delta$ ). Energia układu składa się z objętościowej energii sprężystych deformacji  $U_E$  oraz energii powierzchniowej  $U_s$ , zależnej od oddziaływań międzymolekularnych [14, 15, 23].

Zmiana energii sprężystości jest równa:

$$U_E = \int_0^{\delta} P_z(\delta) d\delta \quad (39)$$

gdzie  $P_z$  jest to siła sprężystości, a zmiany energii powierzchniowej opisuje równanie:

$$U_s = \int_0^l \varphi(h) 2\pi r dr \quad (40)$$

Z termodynamicznej analizy badanego układu i na podstawie równań (39), (40) oraz wykorzystując zależności wyprowadzone z analizy geometrycznej układu (równania 34–38) Derjaguin i wsp. [14, 15] wyprowadzili równania:

$$P_e = \frac{4R^2 E}{3(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (41a)$$

$$P_{(\delta=0)} = P = 2\pi R \varphi(z_0) \quad (41b)$$

które określają wielkość siły sprężystego odpychania (równanie 41a) oraz siłę wynikającą z oddziaływań międzymolekularnych (równanie 41b), konieczną do utworzenia punktowego kontaktu ( $\delta = 0$ ) kuli z płaską powierzchnią.

Dla  $\delta \gg z_0$  siła

$$P_e \rightarrow \frac{P_0}{2},$$

natomiast dla równowagowej wartości  $\delta$  siła  $P$  wynikająca z oddziaływań międzymolekularnych:

$$P_e = \frac{P_0}{2},$$

i jak widać jest równa sile sprężystości  $P_e$  wynikającej z obciążenia mechanicznego. Równowagowa wartość głębokości sprężystego odkształcenia kuli  $\delta$  jest osiągnięta, gdy  $P_e = P$ ; wynika z tego, że:

$$\delta^3 = \frac{9}{4} \frac{\pi^2 W_A^2 R (1-\nu^2)^2}{E^2} \quad (42)$$

Wykorzystując zależność  $\delta$  od  $a$  [x] możemy wyznaczyć promień płaszczyzny kontaktu ( $a$ ) pomiędzy dwoma kulami o jednakowych  $R$  z równania:

$$a^3 = \frac{3}{2} \frac{\pi R^2 (1-\nu^2) W_A}{E} \quad (43)$$

Z przeprowadzonej w pracach [24, 25] analizy wynika, że siły przyciągania wynikające z oddziaływań międzymolekularnych powodują utworzenie kontaktu

o określonej powierzchni, a siła konieczna do przerwania tego kontaktu jest równa sile przyciągania, obliczonej dla punktowego kontaktu, gdzie nie obserwuje się deformacji powierzchni (rów. 41b).

## 5. ZAKRESY STOSOWALNOŚCI TEORII JKR I DMT

Oba teoretyczne rozwiązania, JKR [12] i DMT [14–16] były i są wykorzystywane w badaniach problemów, w których dochodzi do sprężystych deformacji w czasie atomowego kontaktu skondensowanych faz. W jednych przypadkach wyniki doświadczalne potwierdzają teorię JKR [20, 22, 26–32] a w innych przypadkach teorię DMT [14, 15, 23–26, 31–34].

Początkowo uważano obie teorie jako konkurencyjne, co doprowadziło do gorącej naukowej dyskusji pomiędzy zwolennikami poszczególnych teorii [35–40]. Dyskusja ta została zapoczątkowana artykułem Tabora [35]. W pracy tej wykazano, wielkość adhezji pomiędzy sprężystą kulą a sztywną powierzchnią zależy nie tylko od swobodnej energii powierzchniowej, ale również od chropowatości powierzchni. Wykazano ponadto [35], że oba teoretyczne modele [12, 14–16] milcząco zakładają, że dielektryczne właściwości powierzchni kontaktujących się materiałów są stałe i równe właściwościom objętościowym. W przypadku atomowego kontaktu (atom–atom) oddziaływania przyciągające lub odpychające, a wynikające z rozdrobienia, mogą być znaczne. Przy małych odległościach siły krótkiego zasięgu, wynikające z podwójnych warstw elektrycznych, nakładają się na rozpatrywane oddziaływania międzymolekularne powodując odpowiednie zmiany stanu równowagi; np. w przypadku metali udział sił van der Waalsa w swobodnej energii powierzchniowej stanowi tylko 0,1 oddziaływań wynikających z wiązania metalicznego [35].

Na podstawie przeprowadzonej matematycznej i termodynamicznej analizy powstawania powierzchniowych deformacji w czasie kontaktu skondensowanych faz oraz wyników doświadczalnych, Tabor [35] wykazał, że obie teorie opisują dwa krańcowe przypadki zjawiska adhezji. Problemy związane z teoretycznym opisem adhezji pomiędzy sprężystymi ciałami można tylko rozwiązać wiążąc siły wynikające z oddziaływań międzymolekularnych z podstawami mechaniki powstawania adhezyjnego kontaktu.

Problem ten został rozwiązany przez Mullera i współpracowników [24, 33] dla zjawiska adhezji pomiędzy sprężystą kulą i płaską powierzchnią ciała doskonale sztywnego. Autorzy tych prac [24, 33] wykazali, że sprzeczności pomiędzy teoriami JKR i DMT wynikają z różnych założeń odnośnie umiejscowienia działania sił międzyczłonowych odpowiedzialnych za utworzenie kontaktu. Johnson i współpracownicy [12] założyli, że siły determinujące adhezję i wielkość sprężystych odkształceń działają tylko w płaszczyźnie kontaktu, natomiast wg Derjaguina [14, 15] siły te działają również na zewnątrz perymetru płaszczyzny kontaktu. Z obu teoretycznych modeli wynika, że siły zlepiania sprężystej kuli z płaską powierzchnią nie

zależą od współczynnika sprężystości kuli (modułu Younga) a równania opisujące tę zależność, (24) i (41b), różnią się tylko współczynnikami.

Szczegółowa interpretacja tych sprzeczności przedstawiona jest w pracach [24, 33] w których przyjęto, że oddziaływania pomiędzy atomami sprężystej kuli i sztywnej, płaskiej powierzchni determinuje potencjał Lennarda-Jonsona. Przy tym założeniu rozwiązano numerycznie podstawowe równanie teorii sprężystości (równanie 2 w pracy [24]). W ten sposób określone zostały następujące parametry: rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu i po obwodzie płaszczyzny kontaktu, profil kuli w pobliżu kontaktu, siły oddziaływań kuli z płaską powierzchnią w zależności od odległości przed i po utworzeniu kontaktu. Na tej podstawie wyprowadzono [24] zależność siły odrywu w funkcji bezwymiarowego parametru  $\mu$ , określonego równaniem:

$$\mu = \frac{8}{3\pi^2} \left[ \frac{A^2 R (1 - \nu^2)^2}{2z_0^3 E^2} \right]^{1/3} \quad (44)$$

Z przeprowadzonej w pracach [24, 33] analizy, oraz na podstawie intensywnych badań [25, 31, 34, 41–45] tego problemu udowodniono, że teoria DMT stosuje się do przypadków, kiedy bezwymiarowy współczynnik  $\mu < 1$ , tj. dla kul o małych średnicach, dużych współczynnikach sprężystości i niskiej energii powierzchniowej. Dla przypadków, kiedy bezwymiarowy współczynnik  $\mu > 1$ , dla kul o większych średnicach, małych współczynnikach sprężystości i wysokiej energii powierzchniowej, stosuje się teoria JKR, natomiast dla  $\mu \gg 1$  wartość współczynnika w równaniu (41b) wynosi  $3/4$ . Z przedstawionych wyżej faktów wynika, że obie teorie opisują rzeczywiste układy, ale dla różnych zakresów.

## 6. TEORIA MAUGISA-DUGDALE'A

Muller [24, 33], wprowadzając bezwymiarowy współczynnik  $\mu$  wykazał, że konkurujące ze sobą dwie teorie, JKR [12] i DMT [14, 15] opisują krańcowe przypadki kontaktu sprężystej kuli ze sztywną, płaską powierzchnią. Bardziej uzasadniony matematycznie i termodynamicznie opis stanu pośredniego przedstawił Maugis [41] analizując utworzenie kontaktu jako pęknięcie materiału zmniejszającego (ściskanie) lub zwiększającego (odrywanie) powierzchnię kontaktu, zachodzące zgodnie z jego liniowym mechanizmem [46].)

### 6.1. Uwagi o założeniach teorii JKR i DMT

Maugis [41], wykorzystując rozwiązania Sneddon [46] dotyczące beztarcio-  
wego odkształcenia sprężystej półprzestrzeni przez sztywny wgłębnik o profilu określonym przez

$$f\left(\frac{r}{a}\right)$$

wykazał, że szybkość uwalniania energii sprężystości dla układów spełniających teorię JKR wynosi:

$$G = \frac{(P_1 - P_0)^2}{6\pi a^3 K} \quad (45)$$

Zgodnie z założeniem Johnsona i współ. [12] energia adhezji na zewnątrz krawędzi pęknięcia jest równa zero a zewnętrzne siły ściskające deformują krawędź pęknięcia pod wpływem jednostkowych naprężeń, których współczynnik intensywności wynosi:

$$K_1 = \frac{\left(\frac{a^3 K}{R} - P_0\right)}{2a \sqrt{\pi a}} \quad (46)$$

Na podstawie równania (45), (46) oraz analizy matematycznej beztraciowych deformacji sprężystej półprzestrzeni przez wgłębnik, Maugis [41] wyprowadził równania opisujące rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu, wielkość zagłębienia szczytowego wgłębника oraz deformację powierzchni zagłębionej płaszczyzny. Pozwoliło to na analityczne wyprowadzenie równania (21) i wykazanie, że teoria JKR [12] rzeczywiście zawiera podstawy teorii sprężystości, natomiast nie udało się udowodnić założenia o zerowych naprężeniach na krawędzi kontaktu.

Teoria DMT [14, 15], w przeciwieństwie do JKR [12], uwzględnia oddziaływania poza krawędzią kontaktu lub przełomu, natomiast kształt kontaktu opisuje teoria Hertza [1], tzn. siły adhezji nie deformują sprężystej półprzestrzeni, co jest sprzeczne z podstawowymi założeniami teorii [6, 14, 15]. Jednym z pozytywnych elementów teorii DMT jest wykazanie, że siła odrywu dla zerowego promienia płaszczyzny kontaktu wynosi  $2\pi W_A R$  a dla zerowego obciążenia mechanicznego promień płaszczyzny kontaktu jest równy:

$$a_0^3 = \frac{2\pi W_A R}{K} \quad (47)$$

Przyciągające siły poza płaszczyzną kontaktu [14, 15] wprowadzają dodatkowe obciążenie, które maleje od  $2\pi W_A R$  do  $\pi W_A R$  w miarę zbliżenia się obiektów, natomiast Pashley [47] wykazał, że to „wymagowane” obciążenie nieznacznie różniąc począwszy od wartości  $2\pi W_A R$ . Należy podkreślić, że jeżeli to „wymagowane” obciążenie pozostaje stałe i równe  $2\pi W_A R$  to wówczas:

$$\frac{a^3 K}{R} = P_0 + 2\pi W_A R \quad (48a)$$

a szybkość uwalniania energii sprężystej wynosi:

$$G = \frac{P_1 - P_0}{2\pi R} \quad (48a)$$

Równania (48a) i (48b) dają poprawną siłę odrywu dla zerowej płaszczyzny kontaktu oraz wielkość promienia płaszczyzny kontaktu dla zerowego obciążenia.

## 6.2. WYKORZYSTANIE MODELU DUGDALE'A

### 6.2.1. Przelomy i sprężyste odkształcenia przy stałym obciążeniu

Maugis [41], opierając się na pracy Lowengrubu i Sneddona [48]], przeprowadził analizę przelomów o zewnętrznej symetrii osiowej w nieskończonej objętości ciała stałego przy równowagowym i nierównowagowym obciążeniu, i na tej podstawie wyprowadził szereg równań opisujących między innymi rozkład naprężeń w płaszczyźnie kontaktu ( $\sigma$ ), głębokość sprężystego odkształcenia ( $\delta$ ) dla określonego wgłębnika oraz całkowitą deformację powierzchni wgłębionej płaszczyzny ( $u_y$ ).

Według Barenblatta [49] naprężenia na szczycie krawędzi przelomu osiągają teoretyczną wartość wytrzymałości materiału, która w tzw. kohezynnej strefie  $d$  ( $d = c - a$ ) (Rys. 2) zmniejsza się do zera. Wówczas współczynnik intensywności naprężeń ( $K_I$ ) wynikający z obciążenia zewnętrznego jest zredukowany do zera przez współczynnik intensywności naprężeń ( $K_m$ ), wynikający z dodatkowego obciążenia wewnętrznego pochodzącego z oddziaływań międzycząsteczkowych. W rezultacie znoszenia się tych współczynników ( $K_I = -K_m$ ) jednostkowe naprężenia znikają a przemieszczający się przelom ma ostrą krawędź. Wg mechanizmu liniowych sprężystych przelomów przybliżone rozwiązanie można stosować, kiedy kohezynna strefa ( $d$ ) jest mała w porównaniu z charakterystyczną długością przelomu. Tak wyrażony problem nie ma rozwiązania, ponieważ rozkład naprężeń ( $\sigma$ ) w strefie przelomu zależy od kształtu przelomu ( $u_y$ ), który z kolei zależy od rozkładu naprężeń ( $\sigma$ ). Problem ten omija się przyjmując model Dugdale'a [50], który zakłada stałość naprężeń ( $\sigma_0$ ) ponad strefą kohezynną ( $d$ ) (Rys.2) (wg Dugdale'a  $\sigma_0$  jest granicą plastyczności materiału). Zakładając, że naprężenie wewnętrzne przelomu równa się  $\sigma_0$  to odległość w której zanika stałość naprężeń jest określana poprzez redukcję współczynników intensywności, a mianowicie:

$$K_I = -K_m = \frac{\sigma_0}{\sqrt{\pi a}} \left( \sqrt{c^2 - a^2} + \frac{c^2}{a} \cos^{-1} \frac{a}{c} \right) \quad (49)$$



Równanie to przedstawia  $\frac{c}{a}$  w funkcji właściwości materiału ( $\sigma_0$ ) i współczynnika intensywności naprężeń wynikającego z zewnętrznego obciążenia mechanicznego  $K_1$  [ $K_1$  jest funkcją  $a$  i  $P_0$  rów. (46)].

Rozkład naprężeń po obwodzie płaszczyzny kontaktu redukuje się więc do:

$$\sigma_y(r,0) = -\frac{3K}{2\pi R} \sqrt{a^2 - r^2} + \frac{\sigma_0}{\pi} \operatorname{tg}^{-1} \sqrt{\frac{c^2 - a^2}{a^2 - r^2}} \quad (50)$$

Dla  $\frac{c}{a} \rightarrow 1$  z zależności (49) wynika [41], że:

$$\sqrt{c^2 - a^2} \cong \frac{K_1 \sqrt{\pi a}}{2\sigma_0} \quad (51)$$

i wówczas rozkład naprężeń wynosi:

$$\sigma_y(r,0) \cong -\frac{3K}{2\pi R} \sqrt{a^2 - r^2} + \frac{K_1}{\sqrt{\pi a}} \frac{a}{\sqrt{a^2 - r^2}} \quad (52)$$

które przedstawia rozkład naprężeń ( $\sigma_y$ ) wynikający z teorii JKR [12].

Natomiast dla  $\frac{c}{a} \rightarrow \infty$  z równania (49) wynika, że

$$\frac{K_1}{\sigma_0 \sqrt{\pi a}} \approx \frac{c^2}{2a^2} \rightarrow \infty,$$

a rozkład naprężeń jest równy:

$$\sigma_y(r,0) \cong -\left(\frac{3K}{2\pi R} + \frac{2\sigma_0}{\pi c}\right) \sqrt{a^2 - r^2} + \sigma_0 \quad (53)$$

Kiedy  $\sigma_0 \rightarrow 0$  to równanie (53) jest granicznym rozkładem naprężeń wynikającym z teorii Hertza [1] i jest przyjętym przez Derjaguina i współ. założeniem ich teorii [14, 15].

Przerwa wypełniona powietrzem, powstała w wyniku przełomu, jest wg teorii JKR [12] zmniejszona przez oddziaływania międzycząsteczkowe. Zamieniając ciśnienie  $p$  na  $-\sigma_0$ , wykorzystując odpowiednie zależności [41] oraz przyjmując, że  $K_1 + K_m = 0$ , otrzymamy równanie:

$$u_y = \frac{r^2 - 2a^2}{\pi R} \cos^{-1} \frac{a}{r} + \frac{a}{\pi R} \sqrt{r^2 - a^2} + \frac{4(1-\nu^2)}{E} \cdot \frac{\sigma_0}{\pi a} \left[ ac^2 \int_a^{\min(r,c)} \frac{\sqrt{r^2 - t^2}}{t^2 \sqrt{c^2 - t^2}} dt - \sqrt{c^2 - a^2} \left( \sqrt{r^2 - a^2} - a \cos^{-1} \frac{a}{r} \right) \right], \quad (54)$$

które opisuje profil przełomu badanego materiału ( $t = 1/x$ ).

Kiedy  $c \rightarrow \infty$  równanie (54) redukuje się do :

$$u_y = \frac{r^2 - 2a^2}{\pi R} \cos^{-1} \frac{a}{r} + \frac{a}{\pi R} \sqrt{r^2 - a^2} \quad (55)$$

Równanie (55) opisuje profil przełomu wynikający z teorii Hertza. Gdy  $c \rightarrow a$  to równanie (54) w granicznym przypadku opisuje profil przełomu wynikający z teorii JKR [12]. Głębokość sprężystego odkształcenia, będąca sumą odkształcenia wynikającego z teorii JKR i oddziaływań międzymolekularnych, wynosi:

$$\delta = \frac{a^2}{3R} + \frac{2P}{3aK} + \frac{1-\nu^2}{E} \sigma_0 a \left( \frac{c^2}{a^2} \cos^{-1} \frac{a}{c} \sqrt{\frac{c^2}{a^2} - 1} \right) \quad (56)$$

Wstawiając równanie (56) do równania (49) widzimy, że warunek znoszenia się jednostkowych naprężeń redukuje się do warunku, kiedy głębokość sprężystego odkształcenia równa się:

$$\delta = \frac{a^2}{R} - \frac{8\sigma_0}{3K} \sqrt{c^2 - a^2} \quad (57)$$

Na tym etapie stosunek  $\frac{c}{a}$  określony jest funkcjami  $P$  i  $a$  albo  $\delta$  i  $a$ , jednakże równowagowych zależności  $\delta f(a)$ ,  $af(P)$  i  $Pf(\delta)$  nie można wykreślić, ponieważ nie ma równań wiążących  $c$  z  $\sigma_0$ , a wielkość  $a$  nie jest znana.

### 6.2.2. Szybkość uwalniania energii sprężystej

Problem ten można rozwiązać przyjmując założenie Griffitha [3], że w stanie równowagi  $G = W_A$ . Szybkość uwalniania energii sprężystej wg Dugdale'a [50] wynosi:

$$G = \sigma_0 \delta_t \quad (58)$$

gdzie:  $\delta_1$  jest to odkształcenie postępującego przełomu (koniec kohezynnej strefy, gdy  $r = c$ ). Oznaczając  $r = c$  i  $m = \frac{c}{a}$  oraz biorąc pod uwagę równania (49) i (46) wówczas otrzymamy:

$$G = \frac{P_1 - P_0}{2\pi R} \left( 1 - \frac{2tg^{-1} \sqrt{m^2 - 1}}{m^2 - 1 + m^2 tg^{-1} \sqrt{m^2 - 1}} \right) + \frac{4(1 - v^2)}{E} K_1^2 \frac{\sqrt{m^2 - 1} tg^{-1} \sqrt{m^2 - 1} - m + 1}{(m^2 - 1 + m^2 tg^{-1} \sqrt{m^2 - 1})^2} \quad (59)$$

a Wyrażając szybkość uwalniania energii sprężystej dla  $m = 1 + \varepsilon$  gdy  $\frac{c}{a} \rightarrow 1$ ,

$$tg^{-1} \sqrt{m^2 - 1} = \sqrt{2\varepsilon} \left( 1 - \frac{5\varepsilon}{12} \right)$$

równanie (59) przyjmuje postać:

$$G \approx \frac{1}{2} \frac{1 - v^2}{E_1} K_1^2 \left( 1 - \frac{13\varepsilon}{6} \right) + \frac{P_1 - P_0}{2\pi R} \frac{4\varepsilon}{3} \quad (60)$$

Równanie (60) przedstawia przybliżone rozwiązanie wynikające z liniowej mechaniki sprężystych przełomów. Dla przypadku, kiedy  $\varepsilon \rightarrow 0$ , otrzymamy szybkość uwalniania energii sprężystości ( $G$ ) wynikającą z teorii JKR [12].

Dla dużych wartości  $m$  równanie (59) redukuje się do:

$$G \approx \frac{P_1 - P_0}{2\pi R} \left( 1 - \frac{2}{m^2} \right) + \frac{4(1 - v^2)}{E} K_1^2 \frac{2\pi - 4}{\pi^2 m^3} \quad (61)$$

Gdy szybkość uwalniania energii określa równanie (48b), które wynika wówczas z teorii DMT [14, 15].

W stanie równowagi szybkość uwalniania energii jest równa adhezji ( $G = W_A$ ). Maugis [41] wprowadził bezwymiarowe parametry ( $\bar{A}$ ,  $\bar{P}$ ,  $\Delta$  i  $\lambda$ ), określone równaniami:

$$\bar{A} = - \frac{a}{\left( \frac{\pi W_A R}{K} \right)^3} \quad (62)$$

$$\bar{P} = \frac{P_0}{\pi W_A R} \quad (63)$$

$$\Delta = \frac{\delta}{\left(\frac{\pi^2 W_A^2 R}{K^2}\right)^{\frac{1}{3}}} \quad (64)$$

$$\lambda = \frac{2\sigma_0}{\left(\frac{\pi W_A K^2}{R}\right)^{\frac{1}{3}}} \quad (65)$$

Biorąc pod uwagę te bezwymiarowe parametry, poszczególne teorie opisują równania:

$$\text{a) Hertza} \quad \bar{A}^3 = \bar{P} \quad (65a) \quad \text{i} \quad \Delta = \bar{A}^2 \quad (65b)$$

$$\text{b) DMT} \quad \bar{A}^3 = \bar{P} + 2 \quad (65c) \quad \text{i} \quad \Delta = \bar{A}^2 \quad (65d)$$

$$\text{c) JKR} \quad \bar{A}^3 = \bar{P} + A\sqrt{6A} \quad (65e) \quad \text{i} \quad \Delta = \bar{A}^2 - \frac{2}{3}\sqrt{6A} \quad (65f)$$

Dla  $G = W_A$  i na podstawie równań (48) i (59) możemy napisać:

$$\frac{\lambda \bar{A}^2}{2} \left[ \sqrt{m^2 - 1} + (m^2 - 2) \operatorname{tg}^{-1} \sqrt{m^2 - 1} \right] + \quad (66)$$

$$+ \frac{4\lambda^2 \bar{A}}{3} \left( \sqrt{m^2 - 1} \operatorname{tg}^{-1} \sqrt{m^2 - 1} - m + 1 \right) = 1,$$

$$\bar{P} = \bar{A}^3 - \lambda \bar{A}^2 \left( \sqrt{m^2 - 1} + m^2 \operatorname{tg}^{-1} \sqrt{m^2 - 1} \right) \quad (67)$$

a równanie (57) można zapisać w postaci:

$$\Delta = \bar{A}^2 - \frac{4}{3} A \lambda \sqrt{m^2 - 1} \quad (68)$$

które redukuje się do równania (65f) dla  $\lambda \rightarrow \infty$  i do równania (65b) dla  $\lambda \rightarrow 0$ . Należy podkreślić, że dla  $K_1 + K_m = 0$ , równania (67) lub (68) (dla  $G = W_A$ ) i (66) są dwoma niezależnymi równaniami, pod warunkiem, że naprężenia jednostkowe nie pojawiają się dla  $G \neq W_A$ . Dla przypadku kiedy  $a \rightarrow 0$  i  $m \rightarrow 0$ , równania (66), (67) i (68) odpowiednio redukują się.

Wykreślone przez Maugisa [41] zależności  $af(P)$ ,  $af(\delta)$ ,  $Pf(\sigma)$  na podstawie równań (66) i (67) dla różnych  $\lambda$  dobrze opisują zakresy stosowalności poszczególnych teorii i wypełniają luki istniejące pomiędzy nimi. Bezwymiarowy współczyn-

nik  $\lambda$ , wprowadzony przez Maugisa [41], wyznacza granice stosowalności poszczególnych teorii. Dla  $\lambda \rightarrow 0$  ( $\bar{P} \rightarrow -2$ ,  $\Delta \rightarrow 0$ ) stosuje się teoria DMT, dla  $\lambda \rightarrow \infty$  ( $\bar{P} \rightarrow 0$ ,  $\Delta \rightarrow 0$ ) stosuje się teoria JKR. Oznacza to, że kiedy  $\lambda$  rośnie od zera do nieskończoności otrzymujemy przejście od teorii DMT do JKR. Bezwymiarowy parametr  $\lambda$  jest podobny do parametru  $\mu$  wprowadzonego przez Mullera [23, 38] i jak wykazał Maugis [41] oba parametry związane są ze sobą zależnością:  $\lambda = 0,4\mu$ . Przeprowadzona przez Maugisa [41] analiza zarówno geometryczna jak i termodynamiczna kontaktu: kula–płaska powierzchnia, oparta została na modelu Dugdale’a [46], stąd w literaturze ten sposób opisanie zjawiska nazwany został teorią Maugisa-Dugdale’a (MD).

## 7. ZAKRESY STOSOWANIA TEORII

Johnson i Greenwood [43, 51] wykorzystując model Maugisa-Dugdale’a [41, 50] opracowali zakresy stosowalności poszczególnych teorii adhezji: kula–płaska powierzchnia. Zakresy te przedstawione są na rys. 3, na płaszczyźnie o współrzędnych

$$\bar{P} = \left( \frac{P_o + r}{\pi W_A R} \right)$$

Wielkość  $\bar{P}$  jest to stosunek sił wynikających z obciążenia mechanicznego do międzymolekularnych sił odpychających (równanie (67)), które przy dostatecznie dużych siłach przyciskających można zaniedbać; wówczas stosuje się teorię Herta [1], której zakres stosowalności określa stosunek

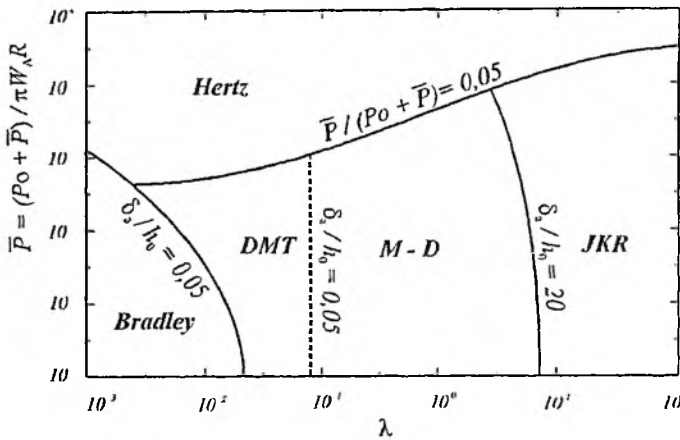
$$\left| \frac{\bar{P}}{P_o + \bar{P}} \right| < \xi,$$

gdzie  $\xi$  jest arbitralnie wybranym ułamkiem  $\ll 1$ . Zakres stosowalności teorii Herta został wykreślony dla  $\xi = 0,05$ . W tej strefie spełnione są zależności opisane równaniami (5) i (6).

Z analizy przeprowadzonej przez Maugisa [41] wynika, że teorię JKR stosuje się, kiedy sprężyste deformacje powierzchni wywołane siłami adhezji są duże w porównaniu z ich efektywnym zakresem działania  $h_0$  (tj., kiedy  $h_0 = 0,97 z_0$ ). Strefę stosowalności teorii JKR określa wielkość:

$$\left| \frac{\delta_a}{h_0} \right| > \eta_1 \quad (69)$$

gdzie odkształcenie sprężyste  $\delta_a$  jest określone równaniem (56), a arbitralnie wybrana wielkość  $\eta_1 \gg 1$ . Strefa stosowalności teorii JKR (Rys. 3) wykreślona została dla  $\eta_1 = 20$ . Dla tej strefy stosują się równania (65e) i (65f).



Rysunek 3 Zakresy stosowalności poszczególnych teorii

Zakres stosowalności teorii DMT stanowi część zakresu stosowalności teorii M-D [41], w której sprężyste deformacje spowodowane siłami powierzchniowymi są małe w porównaniu z ich zakresem. W tym przypadku spełniona musi być zależność:

$$\left| \frac{\delta_a}{h_0} \right| < \eta \quad (70)$$

gdzie arbitralnie wybrany ułamek  $\eta \ll 1$ .

Granica stosowalności teorii DMT (linia przerywana) została wykreślona dla  $\eta = 0,05$ .

W przypadku materiałów, dla których wielkość sprężystego odkształcenia, pod wpływem obciążenia mechanicznego jest mniejsza od zasięgu działania sił powierzchniowych określane są jako materiały sztywne. Dla takich materiałów, oprócz zależności (70) spełniony musi być również warunek:

$$\left| \frac{\delta_1}{h_0} \right| < \zeta \quad (71)$$

gdzie  $\delta_1$  jest określone równaniem (35), a arbitralnie wybrany ułamek  $\zeta \ll 1$ .

Dla tych materiałów zakres stosowalności określono dla  $\zeta = 0,05$ , do którego stosuje się teoria Bradleya [4, 5]. W takim przypadku powierzchnie ciał są dostatecznie oddalone od siebie, a zaniedbanie sprężystych deformacji redukuje równanie (67) do:

$$\frac{\delta_a}{h_0} = \frac{\bar{P}}{2} - 1 \quad (72)$$

W czasie kontaktu takich ciał nie obserwuje się sprężystych odkształceń i wówczas  $\delta = 0$ .

Z analizy przeprowadzonej przez Johnsona i Greenwooda [43, 51] wynika, że teoria M-D [41, 50] stosuje się w zakresie od  $10^{-3}$  do  $10^{-2} \lambda$ . Jednakże numeryczne obliczenia wykazały [43], że dla układów o bezwymiarowym parametrze  $\lambda > 6$  ( lub  $\mu > 15$  ) bardziej odpowiednia jest teoria JKR.

## PODSUMOWANIE

Ponieważ zrozumienie mechanizmu adhezji, która jest procesem bardzo złożonym, jest niezbędne dla usprawnienia wielu procesów chemicznych i technologii, to konieczna jest znajomość teorii w pełni charakteryzującej to zjawisko.

Trwające ponad 100 lat badania napotykały szereg problemów i długo nie dawały satysfakcjonujących rezultatów. Przyczyniły się jednak do dokładniejszego poznania mechanizmu oddziaływań międzycząsteczkowych, jak również umożliwiły wyliczenie wielkości promienia płaszczyzny kontaktu między dwiema kontaktującymi się kulami.

Stworzono dwa podstawowe teoretyczne modele opisujące sprężyste deformacje w trakcie atomowego kontaktu ciał stałych – model JKR i model DMT. Początkowo uważano obie te teorie za niezgodne i konkurencyjne, jednak na podstawie bardziej wnikliwej analizy problemu stwierdzono, że każda z nich ma swój obszar stosowalności i nie wykluczają się wzajemnie.

Większość zagadnień dotyczących oddziaływań międzycząsteczkowych rozwiązuje się właśnie wykorzystując obie teorie.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H. Hertz, J. Reine, Angew. Math., 1882, **92**, 156.
- [2] J. Boussinesq, Compt. Rend. Acad. Sci., Jan. 1883, **XCVI**, 245
- [3] A.A. Griffith, Philos. Trans. R. Soc., London A, 1920, **221**, 163.
- [4] R.S. Bradley, Philos. Mag., 1932, **13**, 853.
- [5] R.S. Bradley, Trans. Faraday Soc., 1936, **32**, 1088.
- [6] B.W. Derjaguin, Kołloid. Ż., 1934, **69**, 155.
- [7] R. Bowling, [w:] *Particles on Surfaces 1: Detection, Adhesion and Removal*, K. L. Mittal (Ed), Plenum press, New York, 1988, str. 129–142.

- [8] H. Krupp, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1967, **1**, 111.
- [9] G.R. Irwin, J.A. Kies, *Welding J.*, (Res. Suppl.), 1954, **33**, 193.
- [10] G.R. Irwin, *J. appl. Mech.*, 1957, **24**, 361.
- [11] K.L. Johnson, *Br. J. Appl. Phys.*, 1958, **9**, 199.
- [12] K.L. Johnson, K. Kendall, A.D. Roberts, *Proc. R. Soc. London A*, 1971, **324**, 301.
- [13] E.H. Lee, J.R.M. Radok, *Trans. ASME, Ser. E, J. Appl. Mech.*, 1960, **27**, 438.
- [14] B.W. Derjaguin, W.M. Muller, J.P. Toporow, *J. Colloid Interface Sci.*, 1975, **53**, 314.
- [15] B.W. Derjaguin, W.M. Muller, J.P. Toporow, *Kołod. Ż.*, 1975, **37**, 1066.
- [16] B.W. Derjaguin, W.M. Muller, J.P. Toporow, *Kołod. Ż.*, 1976, **38**, 51.
- [17] B. Danheke, *J. Colloid Interface Sci.*, 1972, **40**, 1.
- [18] R.G. Horn, J.N. Israelachvili, F. Pribac, *J. Colloid Interface Sci.*, 1987, **115**, 480.
- [19] Y. Tataru, *JSME Int. J.*, Ser. A, 1993, **36**, 109.
- [20] M. Visschers, J. Laven, R. van der Linde, *Progr. Org. Coat.*, 1997, **31**, 311.
- [21] W.M. Lu, K.L. Tung, S.M. Hung, J.S. Shiau, K.J. Hwang, *Powder Technol.*, 2001, **116**, 1.
- [22] James C.M. Li, *Materials Sci. Eng.*, 2001, **A317**, 197.
- [23] W.M. Muller, B.W. Derjaguin, J.P. Toporow, *Kołod. Ż.*, 1976, **38**, 51.
- [24] W.M. Muller, W.S. Juszczenko, B.W. Derjaguin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, **77**, 91.
- [25] W.M. Muller, W.S. Juszczenko, B.W. Derjaguin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1983, **92**, 92.
- [26] K.L. Johnson, H.M. Pollock, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1994, **8**, 1323.
- [27] C.Y. Hui, Y.Y. Lin, A. Jagoda, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 2000, **14**, 1297.
- [28] M. Deruelle, H. Hervet, G. Jandean, L. Leger, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1998, **12**, 225.
- [29] C.W. Hong, *J. European Ceramic Soc.*, 1998, **18**, 2159.
- [30] P. Mächtle, C.A. Helm, *Thin Solid Films*, 1998, **330**, 1.
- [31] D.S. Rimai, L.P. Demejo, R.C. Bowen, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1994, **8**, 1333.
- [32] D. Maugis, B. Gauthier-Manuel, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1994, **8**, 1311.
- [33] W.M. Muller, W.S. Juszczenko, *Kołod. Ż.*, 1980, **42**, 500.
- [34] W.M. Muller, W.S. Juszczenko, *Kołod. Ż.*, 1976, **44**, 918.
- [35] D. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.*, 1977, **58**, 2.
- [36] B.W. Derjaguin, W.M. Muller, J.P. Toporow, *J. Colloid Interface Sci.*, 1978, **67**, 378.
- [37] D. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.*, 1978, **67**, 380.
- [38] B.W. Derjaguin, W.M. Muller, J.P. Toporow, *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, **73**, 293.
- [39] D. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, **73**, 293.
- [40] J.N. Israelachvili, E. Perez, R.K. Tandon, *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, **78**, 260.
- [41] D. Maugis, *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, **150**, 243.
- [42] M. Soltani, G. Ahmadi, R.G. Bayer, M.A. Gaynes, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1995, **9**, 453.
- [43] K.L. Johnson, *Tribology International*, 1998, **31**, 413.
- [44] W.M. Muller, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1999, **13**, 999.
- [45] D.S. Rimai, D.J. Quesnel, A.A. Busnaina, *Colloids Surf. A*, 2000, **165**, 3.
- [46] I.N. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.*, 1965, **3**, 47.
- [47] M.D. Pashley, *Colloids Surf.*, 1984, **12**, 69.
- [48] M. Lowengrub, I.M. Sneddon, *Int. J. Eng. Sci.*, 1965, **3**, 45.
- [49] G.I. Barenblatt, *Adv. Appl. Mech.*, 1962, **7**, 55.
- [50] D.S. Dugdale, *J. Mech. Phys. Solids*, 1960, **8**, 100.
- [51] K.L. Johnson, J.A. Greenwood, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **192**, 326.
- [52] W. Wójcik, B. Jańczuk, R. Ogonowski, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 2000, **14**, 1021.
- [53] W. Wójcik, B. Jańczuk, R. Ogonowski, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 2000, **14**, 1665.



# MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA METOD OZNACZANIA LOTNYCH I ŚREDNIOLOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH W WODACH

## ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF METHODS FOR DETERMINATION OF VOLATILE AND SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN WATER SAMPLES

**Marta Staniszewska<sup>1</sup>, Lidia Wolska<sup>2</sup>,  
Jacek Namieśnik<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Zakład Hydrotechniki Morskiej, Instytut Morski,  
ul. Długi Targ 41/42, 80-830 Gdańsk, tel.: (048 058) 552-00-93*

<sup>2</sup> *Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,  
ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, Faks: (048 058) 347-26-94  
tel.: (048 058) 347-21-10, e-mail: Chemanal@.pg.gda.pl.*

---

### Summary

Wykaz akronimów

Wstęp

1. Problemy oznaczania lotnych i średniolotnych związków organicznych w próbkach wody
2. Technika bezpośredniego dozowania próbki wody do kapilarnej kolumny chromatograficznej
3. Techniki izolacji i/lub wzbogacania lotnych i średniolotnych związków organicznych z próbek wodnych
  - 3.1. Ekstrakcja do fazy ciekłej
  - 3.2. Techniki ekstrakcji membranowej
  - 3.3. Techniki izolacji i/lub wzbogacania analitów do fazy gazowej
    - 3.3.1. Technika wypłukiwania i jednoczesnego wychwytywania analitów na stałym sorbencie
  - 3.4. Techniki izolacji i/lub wzbogacania analitów do fazy stałej lub stacjonarnej
  - 3.5. Wykorzystanie procesu desorpcji termicznej do wprowadzania analitów do kolumny chromatograficznej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr inż. Marta Staniszevska** pracuje w Zakładzie Hydrotechniki Morskiej, Instytutu Morskiego w Gdańsku. Przedmiotem działalności autorki jest zmodyfikowanie i opracowanie nowych metodyk analitycznych, w celu rozszerzenia zakresu ich stosowalności do oznaczenia szerokiego spektrum związków organicznych (o różnych właściwościach chemicznych) w wodach („czystych” oraz z obecnością matrycy organicznej) w jednym cyklu analitycznym. Rezultatem tej działalności jest rozprawa doktorska (2000) pt.: „Opracowanie „bezzroczuszczalnikowych” metodyk jednoczesnego oznaczania szerokiej

gamy lotnych i średniolotnych związków organicznych w próbkach wody”, osiem publikacji oraz liczne komunikaty prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach. Powyższe badania zostały również wykorzystane do rutynowych analiz prowadzonych m.in. w ramach Międzynarodowego Projektu Odra poświęconym zanieczyszczeniom wód i gruntów w dorzeczu rzeki Odry.



**Dr Lidia Wolska** jest adiunktem w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Obszar zainteresowań to przede wszystkim techniki izolacji i oznaczania organicznych zanieczyszczeń środowiska, problemy oceny stopnia skażenia środowiska, biotesty.

Autorka lub współautorka ponad 50 publikacji, współautorka książki z zakresu analityki i monitoringu środowiskowego.



**Prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik** prof. zw. PG jest kierownikiem Katedry Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Autor lub współautor ponad 250 publikacji, 4 książek z zakresu analityki śladów oraz analityki i monitoringu środowiskowego.

---

## SUMMARY

This work presents different analytical techniques of isolation, preconcentration and determination of organic compounds in water samples.

One of unique analytical techniques which do not require any sample preparation before its injection into a chromatographic column is Direct Aqueous Injection (DAI). A classical DAI based procedure, described by K. Grob, for determination of halogenoorganic compounds in water using GC with electron capture detection (GC-ECD) is presented. Advantages and limitations of the technique are discussed. New areas of DAI application are suggested including analytical tasks (determination of organic substances in different aqueous samples) for which solvent and gas extraction techniques are not effective.

The techniques of isolation and preconcentration are used in many cases of determination of organic compounds in environmental samples.

The review is aimed at description of applicability of Liquid-Liquid Extraction, Membrane Extraction, Gas Extraction and Solid Phase Extraction to determine organic compounds of different chemical nature in water samples. The characteristics of techniques are discussed with respect to: detection limits, time and labor required, possibility of automation, analysis cost and possibility of elimination of solvents, which can be a source of environmental pollution. The studies on the techniques modification to extend their application ranges are discussed, too.

---

---

## WYKAZ AKRONIMÓW

|       |   |
|-------|---|
| CLLE  | – ( <i>Continuous Liquid–Liquid Extraction</i> ) – ekstrakcja ciągła w układzie ciecz–ciecz   |
| DAI   | – ( <i>Direct Aqueous Injection</i> ) – technika bezpośredniego dozowania próbki wody do kapilarnej kolumny chromatograficznej  |
| ECD   | – ( <i>Electrone Capture Detektor</i> ) – detektor wychwytu elektronów  |
| ELCD  | – ( <i>Electrolytic Conductivity Detektor</i> ) – detektor przewodnictwa elektrolitycznego  |
| FID   | – ( <i>Flame Ionization Detector</i> ) – detektor płomieniowo-jonizacyjny   |
| GC    | – ( <i>Gas Chromatography</i> ) – chromatografia gazowa   |
| HS    | – ( <i>Head Space</i> ) – analiza fazy nadpowierzchniowej w wersji statycznej   |
| LLE   | – ( <i>Liquid–Liquid Extraction</i> ) – ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz   |
| LVI   | – ( <i>Large Volume Injection</i> ) – technika wprowadzania dużych objętości próbek ciekłych do kolumny kapilarnej chromatografu gazowego                             |
| MESI  | – ( <i>Membrane Extraction with Sorbent Interface</i> ) – ekstrakcja z wykorzystaniem membran z dodatkowym wzbogaceniem analitów na stałym sorbencie                  |
| MIMS  | – ( <i>Membrane Inlet Mass Spectrometry</i> ) – bezpośrednie wprowadzanie analitów za pomocą interfejsu (na drodze permeacji) do komory jonizacyjnej spektrometru mas |
| MS    | – ( <i>Mass Spectrometer</i> ) – spektrometr mas  |
| MSE   | – ( <i>Microscale Solvent Extraction</i> ) – mikroekstrakcja za pomocą małej ilości rozpuszczalnika   |
| PID   | – ( <i>Photoionization Detektor</i> ) – detektor fotojonizacyjny  |
| PT    | – ( <i>Purge and Trap</i> ) – technika wypłukiwania i jednoczesnego wychwytywania analitów na stałym sorbencie  |
| SDE   | – ( <i>Single Drop Extraction</i> ) – ekstrakcja w pojedynczej kropli rozpuszczalnika   |
| SPE   | – ( <i>Solid Phase Extraction</i> ) – ekstrakcja do fazy stałej   |
| SPME  | – ( <i>Solid Phase Microextraction</i> ) – mikroekstrakcja do fazy stałej   |
| SSDLE | – ( <i>Simultaneous Steam Distillation Liquid Extraction</i> ) – połączenie ekstrakcji z jednoczesną destylacją z parą wodną  |
| TD    | – ( <i>Thermal Desorption</i> ) – desorpcja termiczna   |
| THM's | – trihalogenometany   |
| TLHS  | – ( <i>Thin Layer Head Space</i> ) – analiza fazy nadpowierzchniowej nad cienką warstwą cieczy z samoczynną generacją ciekłego sorbentu                               |

## WSTĘP

Rosnące wymagania w odniesieniu do jakości wody używanej przez człowieka (do picia i potrzeb gospodarczych, do celów rekreacyjnych, do celów technologicznych w przemyśle itp.) wymuszają konieczność opracowania standardów (norm), jakim powinna ona odpowiadać. Nakłada to na analityków obowiązek rutynowej kontroli zawartości wielu zanieczyszczeń w wodach śródlądowych, morskich, głębinowych, pitnych, produktach spożywczych i farmaceutycznych oraz w odprowadzanych do środowiska ściekach. Z kolei konieczność oznaczania coraz to nowych grup związków, na coraz to niższych poziomach stężeń (w chwili obecnej przynajmniej na poziomie ppt a nawet ppq), stawia nowe wyzwania przed analitykami. Przy wyborze odpowiedniej procedury analitycznej istotna jest nie tylko precyzja, dokładność, selektywność, wykrywalność, odtwarzalność, ale także ograniczenie praco- i czasochłonności postępowania analitycznego. Dąży się również do oznaczania w jednym cyklu analitycznym coraz większej liczby składników o różnych właściwościach występujących na poziomie śladów i ultraśladów. Dużo uwagi poświęca się zagadnieniom obniżenia kosztów eksploatacji aparatury analitycznej, automatyzacji procesów pomiarowych oraz możliwości oznaczeń polowych. Istotne jest ograniczenie zużycia rozpuszczalników w postępowaniu analitycznym i redukcja ilości wytwarzanych odpadów mogących stanowić poważne obciążenie dla środowiska. Jest to niezwykle ważne w przypadku, kiedy koniecznością jest wykonywanie dużej ilości analiz.

### 1. PROBLEMY OZNACZANIA LOTNYCH I ŚREDNIOLOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH W PRÓBKACH WODY

Próbki wody z którymi analityk ma doczynienia w laboratorium charakteryzują się:

- zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi występujących w nich związków. Związki występujące w wodach można podzielić na nieorganiczne i organiczne, o różnym stopniu lotności i polarności. Większość zagadnień związanych z oznaczaniem związków nieorganicznych w próbkach wodnych jest rozwiązana i znormalizowana. Obecnie głównym obszarem zainteresowań analityków stały się procedury oznaczania związków organicznych, szczególnie lotnych, co sprawia jeszcze wiele trudności. Duży problem stwarza izolacja i analiza związków polarnych i jonowych. Powszechnie stosowane techniki izolacji wręcz uniemożliwiają analizę takich związków np.: niepolarnie rozpuszczalniki stosowane w metodach klasycznej ekstrakcji cieczz-ciecz, nie zapewniają możliwości wyizolowania związków polarnych z matrycy wodnej.
- występowaniem oznaczanych związków na różnych poziomach stężeń, które wahają się od poziomu poniżej granicy oznaczalności dostępnych metod analitycznych do kilkuset  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

- zróżnicowanym składem matrycy. Pod tym względem można dokonać podziału na: wody czyste o małej zawartości materii organicznej (poniżej  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ): woda wodociągowa, wody mineralne, produkty farmaceutyczne, wody gruntowe, opadowe, pochodzące z procesów kondensacji (np.: deszcz, śnieg, rosa, mgła), wody roztopów wiosennych i topnienia lodowców, wody ze średnią zawartością materii organicznej ( $1\text{--}5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ): wody powierzchniowe (np.: rzeki, jeziora), morskie, z ujść rzek, wody z dużą zawartością materii organicznej ( $20\text{--}25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i powyżej): wszelkiego rodzaju ścieki, płyny fizjologiczne [1, 2].

Różnorodność składu próbek wody, rzutując na problemy związane z pobieraniem, przechowywaniem, izolacją i wzbogacaniem, a także oznaczaniem końcowym składników śladowych. Jako najważniejsze problemy należy wymienić:

- występowanie oznaczanych związków w pobieranych próbkach wody na zbyt niskich poziomach stężeń w porównaniu z granicą oznaczalności większości detektorów stosowanych w chromatografii gazowej [3].

- zachowanie reprezentatywności próbki na każdym etapie postępowania analitycznego (możliwość utraty analitów, bądź też wprowadzenie dodatkowych zanieczyszczeń) [4].

- zanieczyszczenia mechaniczne próbki tj.: substancje nieorganiczne, cząstki stałe (zawiesiny), substancje wysokocząsteczkowe obecne w próbkach środowiskowych w dużych ilościach mogą osadzać się na ściankach przedkolumny i kolumny właściwej wpływając niekorzystnie na układ analityczny, skracając czas jego użytkowania. Dodatkowym problemem jest wpływ składników matrycy na wyniki oznaczeń.

- niezgodność stanu skupienia matrycy ze stosowaną techniką chromatograficzną, co wyklucza możliwość bezpośredniego wprowadzenia próbki do kolumny chromatograficznej (woda prowadzi do zmian parametrów retencyjnych kolumny i zakłóca pracę większości detektorów) [3].

Bezpośrednie wprowadzanie próbek wodnych obciążonych matrycą organiczną (próbki wody powierzchniowej, ścieki) do kolumny chromatograficznej nie jest, więc korzystne. Rozwiązaniem tego problemu jest usunięcie substancji przeszkadzających i wymiana matrycy próbki tak, aby była ona zgodna ze stosowanym układem chromatograficznym. W wielu przypadkach należy również „podnieść” stężenie analitów w matrycy odbierającej do wartości powyżej granicy oznaczalności stosowanego przyrządu kontrolno-pomiarowego. Wprowadzenie dodatkowych etapów obróbki próbki wydłuża, komplikuje analizę, podraża postępowanie analityczne oraz stwarza możliwości dodatkowych strat analizowanych związków bądź staje się źródłem dodatkowych zanieczyszczeń. Jednakże w przypadku analizy próbek wód „czystych” – o małej zawartości materii organicznej (woda wodociągowa, wody mineralne, gruntowe, opadowe) możliwe jest postępowanie nie wymagające wstępnego przygotowania próbki do analizy. Jedną z nielicznych metod, która to umożliwia jest metoda bezpośredniego wprowadzenia próbki wody do kolumny chromatograficznej (ang. *Direct Aqueous Injection* – DAI).

## 2. TECHNIKA BEZPOŚREDNIEGO DOZOWANIA PRÓBKII WODY DO KAPILARNEJ KOLUMNY CHROMATOGRAFICZNEJ

Idea dozowania próbki na zimno bezpośrednio do kolumny została zaproponowana po raz pierwszy w 1962 roku [5, 6]. Niestety, ze względu na błędne zrozumienie zjawisk mających miejsce w kolumnie kapilarnej technika ta nie była poważnie traktowana przez następne 15 lat.

Istotnym przełomem było opatentowanie w 1978 roku dozownika służącego do bezpośredniego wprowadzania próbki wody do kapilarnej kolumny chromatograficznej (*on-column*) [7]. Szczególnie ważnym elementem jest tu mikrostrzykawka z odpowiednią igłą, której średnica zewnętrzna jest tak dobrana, że zapewnia szczelność układu podczas dozowania. Następnym krokiem było zastosowanie podczas dozowania oprócz układu ciągłego chłodzenia, również układ tzw. wtórnego chłodzenia (*cold on-column*). Wtórne chłodzenie jest włączane krótko przed dozowaniem i wyłączane po zakończeniu dozowania, co umożliwia rozpoczęcie odparowywania matrycy próbki dopiero po osadzeniu jej w postaci cienkiego filmu na możliwie krótkim, początkowym odcinku kolumny i usunięciu strzykawki. Takie postępowanie eliminuje niekorzystne zjawiska odparowywania lotnych składników próbki z igły w trakcie dozowania oraz rozcieńczania próbki przez strumień gazu nośnego [8–11].

Zaprojektowanie specjalnego dozownika oraz przezwyciężenie problemów związanych z właściwym dozowaniem, a także optymalizacja procesu rozdzielania składników próbki (przedstawiono je w Tabeli 1), umożliwiło zaproponowanie konkretnej techniki bezpośredniego dozowania próbki wody do kapilarnej kolumny chromatograficznej DAI przeznaczonej do oznaczania trihalogenometanów [6–17]. Podstawowe parametry tejże procedury przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 1. Podstawowe parametry wpływające na przebieg procesu dozowania próbki na kolumnę kapilarną [6–33]

| Parametr                     | Uwagi  |
|------------------------------|--|
| objętość dozowanej próbki    | Optymalna objętość próbki wprowadzanej na kolumnę wynosi 2 $\mu\text{l}$ . Przy większych objętościach próbki (powyżej 5 $\mu\text{l}$ ) problemem staje się szybkość przejścia składników próbki z fazy ciekłej do gazowej co wpływa na jakość rozdzielania analitów (powstanie szerokiego pasma) [7–9].  |
| temperatura dozowania próbki | Próbkę wprowadza się na kolumnę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika lub o kilka stopni wyższej, by w trakcie dozowania próbka rozłożyła się równomiernie na ściankach kolumny tworząc tzw. strefę zalania [10, 15].   |
| temperatura pracy kolumny    | K.Grob i współpracownicy uznali temperaturę 103÷105°C za optymalną dla procesu separacji na kolumnie z filmem fazy stacjonarnej o grubości powyżej 1,0 $\mu\text{m}$ . W niższej temperaturze może nastąpić rozmycie pasma wody, natomiast w wyższej może zachodzić tzw. rozszczepianie pików analizowanych substancji. Obecnie stosuje się programy temperaturowe, zwłaszcza przy analizie mieszanin cięższych węglowodorów w matrycy ciekłej [7, 9, 15]. |

Tabela 1. Ciąg dalszy

| Parametr   | Uwagi   |
|--|---|
| ogniskowanie pasma analitów  | W celu zogniskowanie pasma analitów na czole kolumny kapilarnej najczęściej stosuje się tzw.: pułapkę temperaturową. Dodatkowym sposobem zawężania pasma analitów, jest zastosowanie przed właściwą kolumną chromatograficzną tzw. przedkolumny (zazwyczaj w postaci odcinka pustej rurki kapilarnej o długości około 1÷1,5 m). Korzystne jest również stosowanie rozpuszczalnika różniącego się znacznie polarnością od analitów i fazy stacjonarnej. Dlatego też, technika bezpośredniego dozowania jest szczególnie przydatna do oznaczania niepolarnych związków organicznych w matrycy wodnej [7, 9, 15].  |
| oddzielenie wody od analizowanych związków                                       | W praktyce stosuje się następujące sposoby oddzielania wody w zależności od rodzaju fazy stacjonarnej pokrywającej ścianki kolumny:<br>– zastosowanie fazy o wysokiej polarności – wówczas woda jest silnie zatrzymywana przez fazę, a lotne, słabo polarne związki są wymywane z kolumny przed wodą. (Występuje jednak ryzyko, że któryś ze związków o temperaturze wrzenia wyższej od wody, lecz o mniejszej polarności, będzie eluował razem z wodą [31]).<br>– zastosowanie fazy niepolarniej, która wykazuje słabą retencję w stosunku do wody i silne powinowactwo w stosunku do lotnych związków. Ten sposób jest bardzo często opisywany w literaturze [7–9]. Trudności pojawiają się dopiero w przypadku analizy związków bardzo lotnych. Należy wtedy stosować film fazy stacjonarnej o dużej grubości (ok. 2÷5 $\mu\text{m}$ ) tak aby nawet bardzo lotne związki organiczne wykazały stosunkowo dużą retencję. Jest to jednak okupione niską sprawnością kolumny i poszerzeniem piku wody. W przypadku analizowania związków o wyższych temperaturach wrzenia, zaleca się stosowanie kolumn z cieńszym filmem niepolarniej fazy stacjonarnej [16] (np.: dla 1,4-dichlorobenzenu stosuje się film fazy stacjonarnej o grubości 0,8 $\mu\text{m}$ [8]). |
| odporność fazy stacjonarnej  | Woda wprowadzana do kolumny powoduje niszczenie lub zmianę właściwości fazy stacjonarnej oraz utratę jej obojętności i powolny wyciek złoża. Problem został przezwyciężony poprzez sieciowanie fazy stacjonarnej [9, 18–20, 32].  |
| wpływ składników matrycy wprowadzanych wraz z próbką wody na właściwości kolumny | Na skutek gromadzenia się zwłaszcza w początkowej części kolumny (20:30 mm od otworu wlotowego) nielotnych związków nieorganicznych i organicznych, następuje pogarszanie się pracy kolumny, co objawia się poszerzaniem piku wody, zniekształceniem chromatogramu oraz zmniejszeniem czułości detektora. Stosowanie przedkolumny nie tylko zabezpiecza właściwą kolumnę analityczną przed niekorzystnym wpływem nielotnych zanieczyszczeń, ale także pozwala na dozowanie stosunkowo dużych objętości próbek (np.: 8 $\mu\text{l}$ gdy stosuje się przedkolumnę o długości ok. 10 m). Przedkolumnę można łatwo wymienić, a ponadto jest ona wielokrotnie tańsza od właściwej kapilarnej kolumny chromatograficznej [7–9, 15].  |
| rodzaj detektora   | Wiele spośród znanych detektorów wykazuje niekompatybilność z próbkami wody np.: woda powoduje gaszenie płomienia w detektorze płomieniowo jonizacyjnym (FID) i termojonizacyjnym (NPD), natomiast detektor absorpcji promieniowania podczerwonego (IR) posiada celkę pomiarową najczęściej z kryształu KBr, który może ulegać rozpuszczeniu pod wpływem wody [18, 22, 23]. Te przykłady niedostosowania można wyeliminować np.: poprzez zapalenie palnika detektora FID dopiero po przejściu pasma wody przez detektor [22, 23] lub, bocznikowanie strumienia gazu nośnego w czasie elucji pasma wody z kolumny chromatograficznej [25]. Dużą odporność na działanie wody wykazuje detektor wychwytu elektronów (ECD) [5–9, 15, 16]. Granica oznaczalności i selektywność detektora ECD jest zależna od powinowactwa elektronowego analizowanych związków. W przypadku związków organicznych zależy ono od obecności grup funkcyjnych tj.: chlorowec, tlen [9]. Detektor ECD znalazł szczególnie zastosowanie do oznaczania lotnych związków fluorowcoorganicznych w próbkach wód „czystych” (wody pitne, gruntowe, opadowe [7–9, 26–30, 33]), ale może być również wykorzystany do oznaczania: pestycydów, PCB, ftalanów.                                       |



Tabela 2. Warunki oznaczania analitów przy zastosowaniu klasycznej techniki bezpośredniego dozowania próbki wody do kapilarnej kolumny chromatograficznej [6–30]

| Elementy układu pomiarowego | Technika DAI-GC-ECD   | Lit.         |
|-----------------------------|---|--------------|
| przedkolumna                | pusta zdezaktywowana rurka (2 m × 0,32 mm)  | [9–11, 25]   |
| kolumna                     | kapilarna (30 m × 0,32 mm, film niepolarny fazy stacjonarnej (PS 255) o grubości 5 μm.)   | [7–9, 11]    |
| system dozowania            | dozownik z wtórnym chłodzeniem próbki   | [8–11]       |
| detektor                    | detektor wychwytu elektronów – model ECD 40/400 (temperatura pracy detektora – 300–350°C) | [7–9, 26–29] |
| wielkość dozowanej próbki   | rzędu 2 μl  | [7–9]        |
| temperatura kolumny         | stała temperatura × 104°C.  | [7, 9, 15]   |

### Rodzaj analizowanych związków

Technika DAI, w klasycznej wersji z wykorzystaniem detektora wychwytu elektronów na etapie oznaczeń końcowych jest przydatna do oznaczania bardzo lotnych związków, szczególnie trihalogenometanów (THM's) w wodzie pitnej. Zastosowana kolumna zapewnia dostateczną retencję nawet bardzo lotnych związków oraz szybkie wymycie wody, jeszcze przed analizowanymi związkami [8]. Również dzięki dozowaniu próbki na zimno wyeliminowano niebezpieczeństwo rozkładu związków labilnych oraz zmniejszono prawdopodobieństwo straty związków bardzo lotnych. Ograniczeniem jest niemożliwość oznaczania składników wymywających się przed rozpuszczalnikiem (nie ulegają one ogniskowaniu).

Tabela 3. Warunki oznaczania lotnych związków fluorowcoorganicznych z wykorzystaniem techniki bezpośredniego dozowania próbki wody do kolumny chromatograficznej w połączeniu z oznaczaniem końcowym za pomocą detektora wychwytu elektronów (DAI-GC-ECD)

| Analit  | Ma-tryca              | Kolumna  | Dozownik (firma)  | Warunki analizy: natężenia przepływu strumienia gazów, gaz nośny, gaz pomocniczy, program temperaturowy   | Granica oznaczalności [μg dm <sup>-3</sup> ] / Objętość dozowanej próbki | Lit.   |
|---|-----------------------|--|---|---|--|--------|
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ,<br>CHCl <sub>3</sub> , CCl <sub>4</sub> ,<br>CH <sub>3</sub> CCl <sub>3</sub> ,<br>C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> | wody gruntowe         | SE-54<br>(3,3±5,0 μm)<br>26,5 ×<br>39 m ×<br>0,32 mm         | <i>on-column</i><br>(Carlo Erba<br>Strumentazione)      | gaz nośny: wodór:<br>0,25±0,30 m s <sup>-1</sup><br>gaz pomocniczy: azot:<br>50 ml min <sup>-1</sup><br>izoterma<br>– 100°C dla nastrzyku 1 μl<br>– 95°C dla nastrzyku 4 μl | 0,1±2<br>0,5±4 μl  | [6]    |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ,<br>CHCl <sub>3</sub> , CCl <sub>4</sub> ,<br>CH <sub>3</sub> CCl <sub>3</sub> ,<br>C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> | wody gruntowe i pitne | PS-255<br>(5,0 μm)<br>26 m ×<br>0,32 mm<br>30 m ×<br>0,32 mm | <i>cold on-column</i><br>(Carlo Erba<br>Strumentazione) | gaz nośny: azot:<br>0,2±0,4 m s <sup>-1</sup><br>gaz pomocniczy: azot:<br>50 ml min <sup>-1</sup><br>izoterma – 103±104°C   | 0,015±0,6<br>2 μl  | [7, 8] |

Tabela 3. Ciąg dalszy

| Analit  | Ma-tryca                                    | Kolumna  | Dozownik (firma)  | Warunki analizy:<br>nateżenia przepływu<br>strumienia gazów,<br>gaz nośny, gaz<br>pomocniczy, program<br>temperaturowy  | Granica<br>oznaczal-<br>ności<br>[ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]/<br>Objętość<br>dozowanej<br>próbki | Lit. |
|---|---|--|---|---|--|------|
| THM,<br>$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $\text{CCl}_4$ ,<br>$\text{CH}_3\text{CCl}_3$ ,<br>$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,<br>freony 11 i<br>113 | woda<br>pitna,<br>desz-<br>czowa,<br>ścieki | SE-54<br>(1,0 $\mu\text{m}$ )<br>50 m $\times$<br>0,31 mm  | <i>cold on-column</i>                                   | brak danych   | brak<br>danych   | [21] |
| THM   | woda<br>pitna                               | HP-1<br>(2,65 $\mu\text{m}$ )<br>30 m $\times$<br>0,53 mm  | <i>cold on-column</i>                                   | gaz nośny: wodór,<br>gaz pomocniczy: $\text{Ar}/\text{CH}_4$ :<br>60 ml $\text{min}^{-1}$<br>program temperaturowy:<br>50 do 150°C<br>(10°C na min.)  | 0,51 $\div$ 1<br>1 $\mu\text{l}$   | [24] |
| THM   | woda<br>pitna                               | DB-1<br>(5 $\mu\text{m}$ )<br>30 m $\times$<br>0,53 mm     | <i>cold on-column</i><br>(Carlo Erba<br>Strumentazione) | gaz nośny: $\text{hcl}$ :<br>1 $\div$ 2 ml $\text{min}^{-1}$ ,<br>gaz pomocniczy: $\text{Ar}/\text{CII}_4$ :<br>60 ml $\text{min}^{-1}$<br>izoterma - 104°C                                       | 0,1 $\div$ 0,5<br>1 $\mu\text{l}$  | [12] |
| THM   | woda<br>pitna                               | DB-624<br>(1,8 $\mu\text{m}$ )<br>30 m $\times$<br>0,32 mm | 1093 (SPI)  | gaz nośny: $\text{hcl}$ :<br>0,2 ml $\text{min}^{-1}$<br>gaz pomocniczy: azot:<br>25 $\div$ 50 ml $\text{min}^{-1}$<br>program temperaturowy:<br>104°C przez 3 min,<br>do 150°C<br>(10°C na min.) | 0,16 $\pm$ 0,060<br>1 $\mu\text{l}$  | [13] |
| THM, $\text{CCl}_4$   | woda<br>pitna                               | pakowana<br>1% SE-30<br>na<br>GDX-103<br>(1,8 m)           | brak danych   | gaz nośny: azot   | 0,4 $\div$ 2,6<br>0,4 $\div$ 1 $\mu\text{l}$   | [14] |
| THM, $\text{CCl}_4$ ,<br>$\text{C}_2\text{HCl}_3$   | woda<br>pitna                               | pakowana<br>Chro-<br>mosorb<br>101<br>6 $\times$ 2 mm      | brak danych   | gaz nośny: azot:<br>30 ml $\text{min}^{-1}$<br>program temperaturowy:<br>do 150°C<br>(20°C na min.),<br>do 200°C<br>(4°C na min.)   | < 1<br>9 $\mu\text{l}$   | [35] |

W literaturze opisane są przypadki oznaczania innych lotnych związków fluorowcoorganicznych w próbkach wód pitnych [8, 17, 30, 34–36, 39], gruntowych [17, 30–34], opadowych, powierzchniowych i morskich [17, 37–44, 48], w próbkach wód mineralnych i napojów gazowanych [45] oraz nawet ściekach [46]. Różne warianty zastosowania omawianej techniki przedstawiono w Tabeli 3.

Pomimo różnych rozwiązań metodycznych techniki DAI, nadal brak było możliwości oznaczania związków bardzo lotnych i mniej lotnych w jednym cyklu analitycznym. W 1994 roku po raz pierwszy opisano do rozdzielania szerokiej gamy,

aż 54 średniolotnych i mniej lotnych związków tj.: alifatyczne i aromatyczne związki fluorowcoorganiczne, węglowodory aromatyczne, naftalen, (które izolowano z wykorzystaniem techniki wyfukiwania za pomocą strumienia gazu i jednoczesnego wychwytywania analitów na złożu stałego sorbenta) wykorzystanie kolumny kapilarnej o długości 30 m, pokrytej filmem fazy stacjonarnej (żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylo-, metylo-, fenyłowymi) o grubości 2  $\mu\text{m}$  [47].

W 1998 roku [42, 48] opisano zastosowanie kolumny o podobnych parametrach (jak w cytowanej powyżej pracy [47]) do oznaczania związków o różnej lotności w jednym cyklu analitycznym z wykorzystaniem techniki bezpośredniego dozowania próbki wody na czoło kolumny kapilarnej (DAI-GC-ECD). Zmodyfikowano klasyczną wersję techniki DAI-GC-ECD poprzez zastąpienie tradycyjnej kolumny (PS 255) o długości 30 m z filmem fazy stacjonarnej o grubości 5  $\mu\text{m}$  kolumną (Rtx-624) o długości 60 m z filmem fazy stacjonarnej (polidimetylosiloksan modyfikowany grupami cyjanopropyłowymi (6%)) o grubości 1,8  $\mu\text{m}$ . Zastosowanie cieńszego filmu fazy stacjonarnej poprawiło sprawność kolumny, polepszyło jej rozdzielczość (podwojenie długości kolumny powoduje zwiększenie o 40% rozdzielczości kolumny) oraz umożliwiło separację mniej lotnych związków. Dzięki zastosowanemu rozwiązaniu stało się możliwe oznaczenie tak trudnołotnych związków jak trichlorobenzeny, heksachlorobutadien równoległe z bardzo lotnymi związkami (tj.: trihalogenometany) w jednym cyklu analitycznym. Podobne rozwiązanie opisano później również i w innych pracach [49].

## Matryca

Ograniczeniem zakresu stosowalności techniki DAI jest jej zastosowanie głównie do bezpośredniej analizy tzw. wód „czystych”. Substancje nieorganiczne i nie-lotne związki organiczne (zawiesina) obecne w próbkach środowiskowych w dużych ilościach mogą osadzać się na ściankach przedkolumny i kolumny właściwej wpływając niekorzystnie na układ analityczny, skracając czas jego użytkowania lub/ i wpływać na wyniki oznaczeń końcowych. Podstawowe problemy analityczne, które może powodować złożoność składu matrycy przedstawiono w Tabeli 4.

W literaturze brak jest jednoznacznych doniesień na temat wpływu matrycy na wyniki oznaczeń analitów z wykorzystaniem techniki DAI. Jednakże, jak wynika z niepublikowanych badań, dla trzech (trichlorometanu, trichloroetenu i 1,1,2,2-tetrachloroetanu) z siedmiu badanych związków fluorowcoorganicznych analiza statystyczna przy pomocy testu *t-Studenta* wykazała istotne różnice we współczynnikach kierunkowych krzywych kalibracji wykonanych dla próbek wody wolnej od zanieczyszczeń i próbek wody pobranych z rzeki Wisły o zawartość zawiesiny rzędu 10  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Wskazywało to na wpływ matrycy na wyniki analiz.

Tabela 4. Najważniejsze problemy, które mogą powodować złożoność składu matrycy przy oznaczaniu związków organicznych w próbkach wody

| Składowe matrycy próbek wody wprowadzanych do układu chromatograficznego | Uwagi  |
|--|--|
| substancje mineralne   | Obecność substancji mineralnych może w sposób istotny wpływać na odzysk analizowanych związków (zależność wartości współczynnika podziału od pH).  |
| cząstki stałe (zawiesina)  | <p>Zawiesina jest obecna w wodach powierzchniowych w bardzo szerokim zakresie stężeń. Ze względów użytkowych definiuje się ją jako cząstki zatrzymane przez filtr o średnicy porów 0,45 µm. Do zawiesiny należą cząstki organiczne (m.in.: bakterie, drobne organizmy lub ich fragmenty, cząstki torfu i roślinności bagiennej) i nieorganiczne tj.: (materiał ilasty i pylasty, cząstki piasku i skał oraz cząstki koloidalne różnych związków chemicznych) unoszące się w masie wody, podniesione z dna zbiornika lub zmyte z brzegów [50, 51].</p> <p>Zawiesina wprowadzona wraz z próbką do właściwego układu chromatograficznego może osadzać się na ściankach przedkolumny i kolumny właściwej, doprowadzając do uszkodzeń mechanicznych kolumny, jej zatykania, lub prowadzi do zmian własności sorpcyjnych fazy stacjonarnej. Ponadto cząstki stałe zawiesiny mogą zanieczyszczać dozownik i detektor skracając czas ich użytkowania.</p> <p>Ze względu na silne własności sorpcyjne, zawiesina charakteryzuje się zdolnością do gromadzenia hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych i śladowych ilości metali. Niekiedy osiąga się wartości współczynnika wzbogacania tych zanieczyszczeń rzędu kilku tysięcy lub więcej [50]. W przypadku analizy wody powierzchniowej należy sobie zdawać sprawę z możliwości adsorpcji zanieczyszczeń na cząstkach stałych zawiesiny, co może być przyczyną dodatkowych strat analitów i wpływać na odzyski analizowanych związków.</p>  |
| substancje wysokocząsteczkowe  | <p>Bardzo rozpowszechnionymi składnikami matrycy próbek wód powierzchniowych są substancje humusowe powstające w zbiornikach wodnych lub dostające się do wód z innych ekosystemów. Tworzą się one w wyniku nie do końca poznanych procesów biochemicznej polimeryzacji i polikondensacji ogromnej ilości różnorodnych związków pochodzących ze szczątków roślinnych i zwierzęcych oraz produktów metabolizmu mikroorganizmów. W wyniku tych procesów ilość możliwych kombinacji powstających związków jest wręcz astronomiczna. Struktura chemiczna tych związków nie została dotychczas jednoznacznie wyjaśniona, a podział na poszczególne grupy jest czysto operacyjny, wynikający z potrzeb badawczych [52–54].</p> <p>Substancje humusowe ze względu na swoje specyficzne właściwości, mogą wpływać na zmianę składu próbek wód naturalnych podczas ich transportu, przechowywania i końcowej analizy w wyniku takich procesów jak [52–57]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• adsorpcja,</li> <li>• wymiana jonowa (substancje humusowe posiadają zdolność wiązania kationów w postaci soli i chelatów) [56],</li> <li>• kompleksowanie i tworzenie trwałych połączeń z kationami metali, minerałami ilastymi oraz związkami organicznymi, w tym z substancjami toksycznymi jak pestycydy i insektycydy [56],</li> <li>• koagulacja i zwiększanie rozpuszczalności niektórych związków w wodzie np.: rozpuszczalność węglowodorów wzrasta dwa razy,</li> <li>• przyspieszanie degradacji pestycydów,</li> <li>• fałszowanie wyników końcowej analizy (zawyżanie) wtedy jeżeli zawierają struktury podobne do oznaczanych substancji np.: grupy zawierające chlorowec lub tlen na które jest czuły detektor wychwyty elektronów (ECD) stosowany przy analizie związków fluorowcoorganicznych.</li> </ul> |

Stwierdzono, że zastosowanie kolumny o cieńszym filmie fazy stacjonarnej oraz częsta wymiana przedkolumny sprawia, że dla analizowanych związków zawiesina (o zawartości 10–40 mg·dm<sup>-3</sup>) oraz kwasy humusowe (o zawartości 10 mg·dm<sup>-3</sup>), nie mają statystycznie istotnego wpływu na wyniki oznaczeń w przypadku korzystania ze zmodyfikowanej techniki DAI-GC-ECD [48, 58].

Ograniczenia związane z bardzo skomplikowaną matrycą i niskim poziomem stężeń analitów, można przewyciężyć również na drodze przeniesienia analitów do innej matrycy, którą stanowić może faza stała (SPE, SPME) [59], faza gazowa (PT, HS, TLHS) [30, 33, 45, 46, 60, 61], lub faza ciekła (LLE) [62], co jednak wydłuża i komplikuje proces analizy.

### Granica oznaczalności

Mała objętość próbki wprowadzanej do układu analitycznego sprawia, że granice oznaczalności osiągane w technice DAI są stosunkowo wysokie (rzędu µg·dm<sup>-3</sup>). W Tabeli 5 przedstawiono wartości granic oznaczalności w klasycznej wersji techniki DAI-GC-ECD oraz w zmodyfikowanej wersji tej techniki [17, 42, 48, 63, 64].

Tabela 5. Wartości granic oznaczalności analitów z grupy związków chloroorganicznych w przypadku stosowania techniki DAI-GC-ECD [8, 9, 40]

| Związek                 | Granica oznaczalności [µg dm <sup>-3</sup> ] |               |
|-------------------------|--|---------------|
|                         | zmodyfikowana DAI                            | klasyczna DAI |
| trichlorometan          | 0,04   | 0,02          |
| tetrachlorometan        | 0,02   | 0,015         |
| 1,2- dichloroetan       | 0,09   | –             |
| trichloroeten           | 0,02   | 0,03          |
| 1,1,2-trichloroetan     | 0,08   | –             |
| tetrachloroeten         | 0,02   | 0,025         |
| 1,1,2,2-tetrachloroetan | 0,08   | –             |
| 1,2-dichlorobenzen      | 0,59   | –             |
| 1,3,5-trichlorobenzen   | 0,21   | –             |
| 1,2,4-trichlorobenzen   | 0,24   | –             |
| 1,2,3-trichlorobenzen   | 0,09   | –             |
| heksachlorobutadien     | 0,25   | –             |

## Odzysk

Bezpośrednie wprowadzanie próbki do kolumny, w technice DAI eliminuje do minimum możliwość straty analitów oraz wprowadzania dodatkowych zanieczyszczeń do próbki np.: pochodzących z rozpuszczalnika, lub wypłukujących się ze złożów sorbentów lub obecnych w gazie używanym na etapie desorpcji termicznej.

## Czaso-, pracochłonność, możliwość automatyzacji procesu

Technika DAI charakteryzuje się prostotą i szybkością w wykonaniu poprzez eliminację z procedury analitycznej pracochłonnego etapu wstępnego przygotowania próbki do analizy chromatograficznej, co ułatwia również możliwość jej automatyzacji.

## Koszt

Koszt jednostkowy analizy przy wykorzystaniu techniki DAI jest bardzo niski.

## Aspekt środowiskowy

Bezpośrednie wprowadzenie próbki wody do kolumny chromatograficznej całkowicie eliminuje konieczność użycia rozpuszczalników w toku postępowania analitycznego.

## Inne rozwiązania metodyczne klasycznej techniki DAI

Od końca lat osiemdziesiątych obserwuje się coraz większe zainteresowanie techniką bezpośredniego dozowania próbki wody do kolumny kapilarnej. Zakres zastosowania techniki DAI nie musi być ograniczony tylko do oznaczania lotnych związków fluorowcoorganicznych. Wykorzystanie innych typów kolumn (inny typ fazy stacjonarnej, odpowiednia grubość filmu fazy stacjonarnej i długość kolumny) i odpowiednich detektorów umożliwia wykorzystanie tej techniki do oznaczania szerszego spektrum związków fluorowcoorganicznych (związki średniolotne i nie-lotne) oraz oznaczania związków tlenoorganicznych, także w bardziej skomplikowanych matrycach. Bardzo interesująca jest możliwość rozszerzenia zastosowania metody bezpośredniego dozowania do oznaczania bardziej polarnych i mniej lotnych związków organicznych, których izolacja z wody, zarówno z wykorzystaniem ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz jak i wypłukiwania za pomocą strumienia gazu (*purge*), jest utrudniona ze względu na duże powinowactwo tych związków do wody.

Tabela 6. Zakres zastosowania techniki bezpośredniego dozowania próbki wody do kolumny chromatograficznej (DAI)

| Analit  | Matryca                           | Kolumna  | Warunki analizy:<br>natężenia przepływu<br>strumienia gazów, gaz nośny,<br>gaz pomocniczy, program<br>temperaturowy  | Dete-<br>ktor | Granica<br>oznaczal-<br>ności / objętość<br>dozowanej<br>próbki | Lit. |
|---|-----------------------------------|--|--|---------------|---|------|
| niskocząs-<br>teczkowe<br>alkohole,<br>ketony,<br>estry,<br>nirytle<br>rozpusz-<br>czalne<br>w wodzie | wody<br>grun-<br>towe<br>i ścieki | 10µm Pora<br>Plot Q<br>(27,5 × 0,32<br>mm)   | gaz nośny: hel: 33 cm s <sup>-1</sup><br>program temperaturowy:<br>60°C przez 5 min,<br>do 200°C (10°C na min.),<br>200°C przez 8 min  | FT-IR         | 5÷100 ng<br>2 µl  | [68] |
|   |                                   | 0,5µm<br>PTE-5<br>(15 m × 0,53<br>mm)  | gaz nośny: hel: 30 cm s <sup>-1</sup><br>program temperaturowy:<br>60°C przez 4 min, 1<br>do 200°C (10°C na min.),<br>200°C przez 6 min  | MSD           | 8÷400 pg<br>2 µl  | [68] |
| fosforany<br>trimetylu<br>i trietylu  | wody<br>grun-<br>towe<br>i ścieki | 1,0 µm DB-5<br>(15 m × 0,53<br>mm) lub<br>1,0 µm<br>DB-WAX<br>(15 m × 0,53<br>mm)  | gaz nośny:<br>hel: 10÷12 ml min <sup>-1</sup> ,<br>wodór i powietrze:<br>32+330 ml min <sup>-1</sup><br>gaz pomocniczy:<br>azot: 25 ml min <sup>-1</sup><br>program temperaturowy:<br>90°C przez 1 min,<br>do 115°C (5°C na min.),<br>do 160°C (7°C na min.),<br>160°C przez 1 min | FID           | 1,5 mg dm <sup>-3</sup><br>1 µl                                 | [22] |
| lotne<br>kwasy<br>tuszczowe   | próbki<br>biolo-<br>giczne        | 1,0 µm<br>DB-WAX<br>(15 m × 0,53<br>mm)<br>i 1,0 µm<br>FFAP<br>(10 m × 0,53<br>mm) | gaz nośny: hel: 31 cm s <sup>-1</sup>  | FID           | nie podano<br>0,5 µl  | [23] |
| produkty<br>hydrolizy<br>eteru<br>bis(2-chlo-<br>roetylu)   | ścieki                            | 1,0 µm<br>DB-WAX<br>(30 m × 0,53<br>mm)  | gaz nośny: hel: 2,4 ml min <sup>-1</sup><br>program temperaturowy:<br>80°C do 220°C<br>(15°C na min),<br>220°C przez 10 min  | FT-IR         | 46÷120 ng<br>2 µl   | [21] |
| lotne,<br>polarne<br>rozpusz-<br>czalniki<br>(aceton,<br>MEK,<br>THF)                                 | woda<br>pitna                     | brak danych  | brak danych  | FID           | 5 µg dm <sup>-3</sup>   | [71] |
| morfolina,<br>cyklohe-<br>ksylo-<br>amina,  | woda<br>przemys-<br>lowa          | pakowana,<br>(4,8% glikol<br>polietyle-<br>nowy +                                  | gaz nośny:<br>hel: 15÷40 ml min <sup>-1</sup> ,<br>powietrze i wodór<br>program temperaturowy:   | FID           | 52÷55 ng<br>5 µl  | [72] |

Jak dotychczas wykorzystano tą metodę z powodzeniem do oznaczania słabo ekstrahujących się, polarnych rozpuszczalników [65] oraz fosforanów trimetylu i trytylu w próbkach wód gruntowych i ścieków [22], kwasu octowego w ściekach [66], lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach biologicznych [23], amin [67] oraz związków aminopochodnych w próbkach ścieków przemysłowych [68], siarkowodoru, merkaptanów i innych związków siarkoorganicznych w ściekach [69]. W Tabeli 6 przedstawiono nieliczne przypadki zastosowania techniki DAI do oznaczania związków organicznych z wykorzystaniem detektorów innych niż ECD. Rozwiązania te nie zostały jednak rozpowszechnione, być może z powodu osiąganych stosunkowo wysokich granic oznaczalności.

Szerokie studium literaturowe na temat bezpośredniego dozowania próbki do kolumny kapilarnej, problemów z tym związanych oraz trendy rozwojowe tejże techniki zostały szeroko przedstawione w publikacji pt.: *Direct Injection of Aqueous Samples into Gas Chromatographic Columns* opublikowanej w czasopiśmie „Chemia Analityczna” w 1997 roku [70].

### 3. TECHNIKI IZOLACJI I/LUB WZBOGACANIA LOTNYCH I ŚREDNILOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH Z PRÓBEK WODNYCH

Typowe próbki środowiskowe (wody powierzchniowe, ścieki) posiadają matrycę organiczną o bardzo skomplikowanym składzie, lub zawierają anality na bardzo niskim poziomie stężeń (o wiele niższym niż granice oznaczalności stosowanych detektorów) i wymagają zwykle specjalnego przygotowania, zanim można poddać je analizie chromatograficznej. W przypadku analizowania lotnych i średniolotnych związków organicznych najkorzystniejsze jest przeprowadzenie izolacji analitów z matrycy wodnej jak i ich wzbogacenie (podniesienie stężenia) w jednym etapie. W praktyce analitycznej najczęściej wykorzystuje się następujące techniki izolacji i/lub wzbogacania, które w różnym stopniu nadają się do analizy lotnych i średniolotnych związków [73, 74]:

- techniki izolacji i/lub wzbogacania do fazy ciekłej (LLE)
- techniki izolacji i/lub wzbogacania z wykorzystaniem membran półprzepuszczalnych
- techniki izolacji i/lub wzbogacania do fazy gazowej (HS, PT, TLHS, destylacja)
- techniki izolacji i/lub wzbogacania do fazy stałej lub stacjonarnej (SPE, SPME)



### 3.1. EKSTRAKCJA DO FAZY CIEKŁEJ

Ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz (ang. *Liquid–Liquid Extraction* – LLE) stanowi jedną z najstarszych, ale pomimo wielu wad, nadal powszechnie używaną technikę izolacji i/lub wzbogacania związków organicznych, zwłaszcza z próbek wodnych. Zasada izolacji w tym przypadku oparta jest na wykorzystaniu zjawiska podziału analizowanych związków pomiędzy organiczny, nie mieszający się z wodą, rozpuszczalnik, a fazę wodną [4, 73–78].

#### Rodzaj analizowanych związków i matryca

Ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz ma ograniczone zastosowanie do związków bardzo lotnych, natomiast z powodzeniem może być wykorzystana do związków średnio- i trudnoletnych, a poprzez dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, umożliwia ekstrakcję związków o szerokim spektrum polarności z bardzo różnych matryc [75].

#### Granica oznaczalności

Zazwyczaj do kolumny chromatograficznej wprowadza się kilka mikrolitrów otrzymanego ekstraktu ze względu na konieczność uzyskania wąskiego pasma chromatograficznego. Dlatego też, osiągane granice oznaczalności przy wykorzystaniu techniki LLE są stosunkowo wysokie (rzędu  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  lub nawet wyżej) (Tabela 7).

Tabela 7. Przykładowe wartości granic oznaczalności dla wybranych związków fluoroorganicznych wg normy ISO/FDIS 10301 dla techniki ekstrakcji ciecz–ciecz [63, 64]

| Związek                 | Granica oznaczalności [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ] |
|-------------------------|---|
| trichlorometan          | 0,05÷0,3  |
| tetrachlorometan        | 0,01÷0,1  |
| 1,2- dichloroetan       | 5÷10  |
| trichloroeten           | 0,05÷0,1  |
| tetrachloroeten         | 0,1   |
| 1,1,2,2-tetrachloroetan | 0,05÷0,1  |

W ostatnich latach rozwinęła się technika wprowadzania dużych objętości próbek ciekłych (ang. – *Large Volume Injection* – LVI) do kolumny kapilarnej chromatografu gazowego, co umożliwiło obniżenie granicy oznaczalności do poziomu stężeń rzędu  $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a nawet poniżej [79–90].

## **Czaso-, pracochłonność, możliwość automatyzacji procesu**

Pomimo prostoty wykonania (kilkakrotne mechaniczne lub ręczne wytrząsanie cieczy i ich rozdzielanie) klasyczna metoda LLE charakteryzuje się praco- i czasochłonnością postępowania, na które składają się takie problemy jak [76]:

- częsta konieczność dodatkowego wzbogacania (odparowania nadmiaru rozpuszczalnika) celem osiągnięcia żądanej wartości współczynnika wzbogacania, lub też zamiana rozpuszczalnika używanego w trakcie ekstrakcji na inny, bardziej właściwy z punktu widzenia stosowanej techniki oznaczeń końcowych,
- częsta konieczność stosowania dodatkowego etapu frakcjonowania i oczyszczania (usunięcie wody i interferentów) uzyskiwanych ekstraktów,
- niebezpieczeństwo powstawania stosunkowo trwałych emulsji trudnych do rozdzielania,
- trudności z obróbką próbek o dużej objętości.

W wielu przypadkach tak przygotowany ekstrakt można dopiero bezpośrednio wprowadzić do kolumny chromatograficznej [3, 81, 82, 91, 92].

Dodatkową wadą techniki LLE jest trudność w automatyzacji procesu.

### **Koszt**

Technika LLE charakteryzuje się niskim kosztem, dzięki zastosowaniu prostej i taniej aparatury (rozdzielacze). Jednakże konieczność używania dużej ilości (od kilkudziesięciu mililitrów do nawet kilku litrów) często bardzo drogich, o dużej czystości rozpuszczalników podraża koszt metody.

### **Aspekt środowiskowy**

Techniki LLE nie można zaliczyć do przyjaznych dla środowiska, ponieważ po ekstrakcji pozostają duże ilości zlewek w postaci toksycznych rozpuszczalników. Aby uniknąć zanieczyszczenia nimi środowiska konieczne jest prowadzenie utylizacji powstających odpadów, która dodatkowo wydłuża i podraża cały proces [76].

### **Modyfikacje klasycznej techniki ekstrakcji ciecz–ciecz**

Z myślą o wyeliminowaniu przynajmniej części niekorzystnych cech klasycznej techniki ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz, opracowano szereg jej modyfikacji. Można wymienić rozwiązania mające na celu:

- a. poprawienie skuteczności ekstrakcji i skrócenie czasu jej trwania (przy wykorzystaniu łąni ultradźwiękowej, lub promieniowania mikrofalowego) [76],

- b. zminimalizowanie użycia rozpuszczalnika w stosunku do objętości ekstrahowanej próbki dzięki odpowiedniej konstrukcji aparatury do prowadzenia ekstrakcji i modyfikacji procesu. Można tu wymienić następujące techniki:
- mikroekstrakcja za pomocą małej ilości rozpuszczalnika (ang. *Microscale Solvent Extraction* – MSE) [75, 93],
  - ekstrakcja w pojedynczej kropli rozpuszczalnika (ang. *Single Drop Extraction* – SDE) [94, 95],
  - ekstrakcja ciągła w układzie ciecz–ciecz (ang. *Continuous Liquid–Liquid Extraction* – CLLE) [95, 96],
  - połączenie ekstrakcji z jednoczesną destylacją z parą wodną (ang. *Simultaneous Steam Distillation Liquid Extraction* – SSDLE) [97].

### 3.2. TECHNIKI EKSTRAKЦИИ MEMBRANOWEJ

Techniki ekstrakcji membranowej są stosowane od niedawna, lecz ze względu na liczne zalety są coraz powszechniej wykorzystywane w analityce śladowej. W przypadku takich technik jak ultrafiltracja, odwrócona osmoza, dializa, mikro-dializa, elektrodializa próbka jest w bezpośrednim kontakcie z membraną wykonaną z półprzepuszczalnego materiału (teflonu, gumy silikonowej, celulozy, włókien szklanych), charakteryzującego się dużą przepuszczalnością w stosunku do analitów. Anality przechodzą selektywnie przez membranę i są usuwane z jej powierzchni za pomocą strumienia cieczy lub gazu płuczącego i mogą być bezpośrednio kierowane do urządzenia pomiarowego [73, 75], bądź też podlegać operacji dodatkowego wzbogacenia na stałym sorbencie (ang. *Membrane Extraction with Sorbent Interface* – MESI) [98–103].

Membrany bardzo często są stosowane jako integralna część układu (interfejs) do wprowadzania analitów na drodze permeacji bezpośrednio do komory jonizacyjnej spektrometru mas (ang. *Membrane Inlet Mass Spectrometry* – MIMS) [104–106].

#### Rodzaj analizowanych związków i matryca

Techniki ekstrakcji membranowej mają zastosowanie głównie dla oznaczania związków niepolarnych i o dużej lotności w próbkach wodnych o niewielkiej ilości zanieczyszczeń stałych (zanieczyszczenia stałe bardzo łatwo zatykają pory membrany i wydłużają czas analizy).

#### Granica oznaczalności

Techniki ekstrakcji membranowej umożliwiają uzyskiwanie bardzo niskich granic oznaczalności, nawet na poziomie ppq w przypadku bezpośredniego wpro-

wadzenia analitów do komory jonizacyjnej spektrometru mas (MIMS) [100–102]. Dodatkową zaletą technik membranowych jest uzyskiwanie ekstraktów o bardzo dużej czystości, co umożliwia osiągnięcie wysokiej skuteczności oddzielenia analitów od składników przeszkadzających obecnych w matrycy, oraz wyeliminowanie do minimum możliwości wprowadzania dodatkowych zanieczyszczeń w trakcie trwania procesu. Dzięki czemu nie jest konieczne wprowadzenie dodatkowych etapów oczyszczania próbki.

### **Czaso-, pracochłonność, możliwość automatyzacji procesu**

Techniki ekstrakcji membranowej charakteryzują się małą wydajnością i długim czasem trwania procesu w porównaniu z innymi technikami (SPE, LLE). Zaletą techniki jest łatwość automatyzacji procesu.

### **Koszt**

Konieczność stosowania specjalnego i kosztownego sprzętu powoduje, że techniki membranowe nie mogą znaleźć zastosowania w każdym laboratorium.

### **Aspekt ekologiczny**

Techniki ekstrakcji membranowej umożliwiają zminimalizowanie użycia rozpuszczalników i tym samym przeprowadzane analiz są mało uciążliwe dla środowiska.

## **3.3. TECHNIKI IZOLACJI I/LUB WZBOGACANIA ANALITÓW DO FAZY GAZOWEJ**

Techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (HS, PT, TLHS) oparte są na wykorzystaniu zjawiska podziału analitów pomiędzy fazę ciekłą i gazową. Analizie poddaje się fazę gazową (nadpowierzchniową) wraz z lotnymi związkami uwolnionymi z ciekłej próbki [73, 74, 107].

Izolacja z matrycy wodnej może być prowadzona w sposób periodyczny lub ciągły. Techniki periodyczne można ogólnie podzielić na: statyczne – gdy obie stykające się ze sobą fazy, tzn.: fazy wodna (próbka) i gazowa (matryca odbierająca), są nieruchome lub dynamiczne – gdy jedna z faz jest ruchoma. Techniki dynamiczne charakteryzują się niższą granicą oznaczalności w stosunku do metod statycznych. Dynamiczne wymywanie umożliwia uzyskanie dobrego rozwinięcia powierzchni międzyfazowej, dlatego też osiąga się wysoki stopień przeniesienia analitów do fazy gazowej i tym samym wysoki odzysk analitów [107, 108].

Natomiast w przypadku wariantów ciągłych technik analizy fazy nadpowierzchniowej występuje ruch obu faz: ciekłej (próbki) i gazowej we współprądzie lub przeciwprądzie [33, 39, 45, 46, 59, 60, 74, 109]. Anality przechodzą ze strumienia ciekłej próbki do strumienia fazy gazowej skąd można je np. wychwytywać w pułapce z sorbentem, a po uwolnieniu analizować z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej.

Innym ciekawym i ważnym rozwiązaniem technik izolacji i wzbogacania związków w układzie ciecz–gaz są techniki destylacyjne, które mogą służyć do izolacji związków bardziej polarnych. Podstawą rozdzielenia mieszaniny na składniki w procesie destylacji jest zróżnicowany podział poszczególnych składników między fazę ciekłą i pozostającą z nią w równowadze fazę gazową. Składniki bardziej lotne ulegają wzbogaceniu w fazie gazowej, która po wykropleniu stanowi koncentrat tych składników (destylat). Skuteczność separacji zależy od właściwości składników mieszaniny, stosowanej aparatury destylacyjnej oraz metody destylacji.

W przypadku analizowania mocno obciążonych próbek środowiskowych i biologicznych często stosowana jest destylacja z parą wodną [73, 107]. Wysoki stopień wzbogacenia uzyskuje się dla lotnych analitów o małych masach cząsteczkowych. W celu poprawienia wykrywalności (oznaczalności) możliwa jest również kombinacja destylacji z parą wodną z późniejszą analizą destylatu metodą statyczną analizy fazy nadpowierzchniowej lub ekstrakcją typu ciecz–ciecz.

### 3.3.1. Technika wypłukiwania i jednoczesnego wychwytywania analitów na stałym sorbencie

W praktyce analitycznej do analizowania lotnych i średniolotnych związków organicznych z próbek wodnych spośród technik izolacji i/lub wzbogacania analitów do fazy gazowej najczęściej wykorzystuje się technikę wypłukiwania i jednoczesnego wychwytywania analitów na złożu stałego sorbenta (ang. *Purge and Trap* – PT), która została po raz pierwszy zastosowana i opisana w 1974 roku [110].

W trakcie analizy próbki wody przy pomocy techniki PT realizowane są równocześnie dwie operacje [74, 108, 111–117]:

- operacja wypłukiwania (*purge*), polegająca na przepłukiwaniu próbki wody o objętości 5–25 cm<sup>3</sup> umieszczonej w płuczce o specjalnej konstrukcji, za pomocą strumienia czystego, obojętnego gazu, pobieranego z butli (przez okres kilku do kilkudziesięciu minut).
- operacja wychwytywania (*trap*), w trakcie której anality wymywane z wody są zatrzymywane w pułapce, a w następnej kolejności desorbowane termicznie na czoło kolumny chromatograficznej. Etap ten jest konieczny celem zawężenia „pasma” analitów, które w fazie gazowej zajmują znaczną objętość (od kilku do kilku tysięcy cm<sup>3</sup>), przed ich zadozowaniem na kolumnę chromatograficzną [76]. Dodatkowym problemem jest obecność dużych ilości pary wodnej obecnej w gazie po przejściu przez próbkę wodną wody. Dlatego też przed wprowadzeniem analitów

na kolumnę należy często przeprowadzić osuszenie strumienia gazu płuczącego [113–117].

### Rodzaj analizowanych związków

Technika wyfukiwania za pomocą strumienia gazu i jednoczesnego wychwytywania analitów na stałym sorbencie jest szeroko stosowana w praktyce laboratoryjnej na świecie i zalecana przez Amerykańską Agencję ds. Ochrony Środowiska (ang. *Environmental Protection Agency* – EPA) do oznaczania zwłaszcza związków niepolarnych i średniopólnych o znacznej prężności par w próbkach wody. Istnieje wiele doniesień literaturowych na temat jej zastosowania do oznaczania np.: węglowodorów alifatycznych, aromatycznych, związków fluorowcoorganicznych [39, 48, 74, 107, 117–127], siarkoorganicznych [128], polichlorowanych bifenyli [129], rozpuszczalników przemysłowych [130], lotnych związków w wodzie morskiej, ściekach, płynach fizjologicznych i produktach naturalnych [48, 131–142]. Różne przykłady zastosowania techniki PT przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Przykłady metod zaproponowanych przez agencję EPA do oznaczania lotnych związków fluorowcoorganicznych w próbkach wody [143–147]

| Metoda | Kolumna   | Matryca                         | Sposób wzbogacania próbki | Detektor             | Typ oznaczanych związków   | Ilość oznaczanych związków |
|--------|-----------|---------------------------------|---------------------------|----------------------|--|----------------------------|
| 502.2  | kapilarna | woda do picia                   | <i>purge and trap</i>     | PID połączony z ELCD | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne, oraz z podwójnym wiązaniem (dla PID)</li> <li>związki zawierające atomy halogenowe (dla ELCD)</li> </ul> | 60                         |
| 524.2  | kapilarna | woda do picia                   | <i>purge and trap</i>     | MS                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne oraz z podwójnym wiązaniem</li> <li>związki zawierające atomy halogenowe</li> </ul>                       | 60                         |
| 504    | kapilarna | woda do picia                   | mikroekstrakcja heksanem  | ECD                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>dibromoceten (EDB)</li> <li>dibromochloropropan (DBCP)</li> </ul>   | 2                          |
| 601    | pakowana  | ścieki                          | <i>purge and trap</i>     | ELCD                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki zawierające atomy halogenowe</li> </ul>   | 29                         |
| 602    | pakowana  | ścieki                          | <i>purge and trap</i>     | PID                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne</li> </ul>  | 7                          |
| 624    | kapilarna | woda do picia                   | <i>purge and trap</i>     | MS                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne</li> <li>związki zawierające atomy halogenowe</li> </ul>  | 26                         |
| 8010 B | pakowana  | odpady toksyczne, wody gruntowe | <i>purge and trap</i>     | ELCD                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki zawierające atomy halogenowe</li> </ul>   | 50                         |

Tabela 8. Ciąg dalszy

| Me-<br>toda | Kolumna   | Matryca                                       | Sposób<br>wzbo-<br>gania<br>próbki                    | Detektor                        | Typ oznaczanych związków   | Ilość<br>oznaczanych<br>związków |
|-------------|-----------|---|---|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 8011        | kapilarna | odpady<br>toksy-<br>czne,<br>wody<br>gruntowe | mikroeks-<br>trakcja<br>heksanem                      | ECD                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>dibromoeten (EDB)</li> <li>dibromochloropropan (DBCP)</li> </ul>  | 2                                |
| 8015 A      | pakowana  | odpady<br>toksy-<br>czne                      | <i>purge and<br/>trap</i>                             | FID                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>niehalogenowe lotne<br/>związki</li> </ul>  | 4                                |
| 8020 A      | pakowana  | odpady<br>toksy-<br>czne                      | <i>purge and<br/>trap</i>                             | PID                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne</li> </ul>  | 10                               |
| 8021 A      | kapilarna | odpady  | <i>purge and<br/>trap</i>                             | PID<br>Połą-<br>czony<br>z ELCD | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne, oraz<br/>z podwójnym wiązaniem<br/>(dla PID)</li> <li>związki zawierające atomy<br/>halogenowe (dla ELCD)</li> </ul> | 60                               |
| 8240 B      | pakowana  | odpady  | <i>purge and<br/>trap<br/>(ewentu-<br/>alnie DAI)</i> | MS                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne</li> <li>związki zawierające atomy<br/>halogenowe</li> </ul>  | 79                               |
| 8260 A      | kapilarna | odpady  | <i>purge and<br/>trap<br/>(ewentu-<br/>alnie DAI)</i> | MS                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>związki aromatyczne</li> <li>związki zawierające atomy<br/>halogenowe</li> </ul>  | 98                               |

PID (*Photoionization Detektor*) – Detektor Fotojonizacyjny

ELCD (*Electrolytic Conductivity Detektor*) – Detektor Przewodnictwa Elektrolitycznego

MS (*Mass Spectrometer*) – Spektrometr Mas

ECD (*Electrone Capture Detektor*) – Detektor Wychwytu Elektronów

FID (*Flame Ionization Detektor*) – Detektor Płomieniowo-Jonizacyjny

## Matryca

Technika PT może być wykorzystana do oznaczania analitów w próbkach o dużej zawartości związków nieorganicznych (woda powierzchniowa [48, 119, 120, 137], morska [131, 138–140], ścieki [46, 47, 132]), wysokocząsteczkowych związków organicznych (polimery, związki humusowe), mieszanin niehomogenicznych (płyny fizjologiczne [49, 134, 135, 141, 142]), które przy zastosowaniu innych technik izolacji wymagają skomplikowanych operacji oczyszczania i przygotowania próbek przed właściwą analizą chromatograficzną. Kłopotliwa może być analiza próbek łatwo picniących, co grozi zalaniem przewodów i zaworu w stosowanym urządzeniu. Rozwiązaniem tego problemu może być dodatek substancji zwiększającej napięcie powierzchniowe próbki (substancji antypięniących) [108] lub stosowanie tzw. filtrów piany.

### Granica oznaczalności

Technika wypłukiwania za pomocą strumienia gazu i jednoczesnego wychwytywania analitów na stałym sorbencie umożliwia oznaczania bardzo niskich stężeń analitów (od kilku do kilkuset ppt w połączeniu z detektorem MS), ponieważ związki wyekstrahowane do fazy gazowej, są w całości wprowadzane do kolumny chromatograficznej. Oszacowane wartości granic oznaczalności techniki PT-GC-MS z wykorzystaniem kolumny Rtx-624 przedstawiono w Tabeli 9 [48].

Tabela 9. Wartości granic oznaczalności analitów w przypadku stosowania techniki PT [48]

| Związek                 | Granica oznaczalności [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ] |
|-------------------------|---|
| dimetylosulfid          | 0,083   |
| tiofen                  | 1,221   |
| dietylosulfid           | 5,063   |
| benzen                  | 0,125   |
| toluen                  | 0,065   |
| etylobenzen             | 1,026   |
| 1,4-dimetylobenzen      | 0,181   |
| dekan                   | 0,918   |
| undekan                 | 0,737   |
| 1,2,3-trimetylobenzen   | 0,403   |
| 1,3,5-trimetylobenzen   | 0,438   |
| 1,2,4-trimetylobenzen   | 0,498   |
| chlorobenzen            | 0,565   |
| 1,2-dichloroetan        | 3,511   |
| trichloroeten           | 0,206   |
| 1,1,2-trichloroetan     | 6,162   |
| tetrachloroeten         | 0,244   |
| 1,1,2,2-tetrachloroetan | 0,240   |
| 1,2-dichlorobenzen      | 0,030   |
| 1,3,5-trichlorobenzen   | 0,027   |
| 1,2,4-trichlorobenzen   | 0,034   |
| 1,2,3-trichlorobenzen   | 0,033   |
| heksachlorobutadien     | 0,104   |



Dodatkową zaletą techniki PT jest możliwość analizowania próbek o stosunkowo dużych objętościach (5–10, a nawet 25 ml). Niedogodnością przy oznaczaniu tak niskich stężeń jest możliwość zanieczyszczenia próbki. Występujący tzw. „efekt pamięci” naczynka, można jednak wyeliminować przez silanizację ścianek naczynka i odpowiedni reżim pracy. Natomiast tło wnoszone przez strumień gazu płuczącego można zmniejszyć stosując efektywne sposoby oczyszczania strumienia gazu [108–120].

### Odzysk analitów

Odzysk analitu w przypadku stosowania techniki PT jest zależny od efektywności procesów: wypłukiwania analitów z próbki, zatrzymywania analitów w pułapce oraz ich uwolnienia z pułapki.

Na efektywność etapu wypłukiwania analitów bezpośrednio wpływać będą następujące parametry [108, 111–116, 120]:

1. rodzaj oznaczanych związków – w praktyce ilościowy odzysk można osiągnąć dla związków niepolarnych lub słabo polarnych o słabej rozpuszczalności w wodzie (< 2%), względnie lotnych (tw < 200°C) i stabilnych termicznie [148]. W przypadku związków o większej polarności wskazane jest podniesienie temperatury płuczki, ale nie zawsze daje to pożądany efekt [108].

2. objętość gazu płuczącego – wydajność etapu wypłukiwania będzie rosła gdy wzrastać będzie stosunek  $v_g/v_l$  (duża objętość gazu płuczącego i mała objętość próbki). Zwiększanie efektywności prowadzenia procesu wypłukiwania poprzez wzrost objętości gazu płuczącego (proporcjonalny do czasu płukania i natężenia przepływu strumienia gazu płuczącego) jest z kolei ograniczony możliwością przebicia pułapki sorpcyjnej i problemami technicznymi związanymi z dużymi ilościami wody unoszonej przez gaz wypłukujący [108, 116–121].

3. objętość próbki i związana z tym objętość naczynka – optymalna objętość próbki jaką poddaje się analizie wynosi 5–25 ml. Poddawanie analizie próbek o większych objętościach prowadzi oczywiście do obniżenia granicy oznaczalności, ale większe objętości próbek wymagają z kolei zastosowania większej objętości gazu płuczącego co może z kolei prowadzić do przebicia pułapki [116].

4. temperatura prowadzenia procesu wypłukiwania – ogólnie można stwierdzić, że wydajność etapu wypłukiwania będzie rosła gdy wzrastać będzie temperatura prowadzenia procesu płukania i stosunek  $v_g/v_l$  (duża objętość gazu płuczącego i mała objętość próbki). Można więc stwierdzić, że dłuższy okres przepłukiwania w niższej temperaturze daje te same efekty co krótszy etap ekstrakcji ale w wyższej temperaturze. Podnoszenie temperatury prowadzenia procesu wypłukiwania ma szczególnie duży wpływ na odzysk w przypadku oznaczania związków w próbkach silnie obciążonych matrycą organiczną np.: ścieki. Wzrost temperatury powoduje jednak zwiększanie ilości wody przedostającej się do gazu, co jest zjawiskiem niekorzystnym [108, 116–121].

5. pH wody oraz siła jonowa roztworu.

Na etapie doboru odpowiedniego sorbenta należy kierować się nie tylko wartością objętości przebiecia analitów, ale również możliwością ich ilościowej desorpcji. Najczęściej stosowany jest polimer Tenax GC lub Tenax TA [111, 116–121, 149] lub złoża mieszane typu: Tenax TA /SiO<sub>2</sub>/węgiel aktywny [150, 151] oraz Tenax TA /sito węglowe [122]. W przypadku analitów średniolotnych oprócz złoża polimeru Tenax TA konieczne jest stosowanie drugiej warstwy, zabezpieczającej złożo głównie przed przebieciem przez lotniejsze związki. Często do tego celu stosuje się złożo sita węglowego np.: Carbosieve III S [116]. Analiza związków o szerokim spektrum lotności wymaga jeszcze bardziej złożonych sorbentów lub zastosowania pułapki kriogenicznej [121, 123, 150–152].

### **Czaso-, pracochołność, możliwość automatyzacji procesu**

Technika PT charakteryzuje się prostotą i szybkością w wykonaniu oraz łatwością automatyzacji procesu. Przeniesienie analitów do fazy gazowej ułatwia zastosowanie połączeń różnych modułów do izolacji analitów bezpośrednio z chromatografem gazowym [153–156].

### **Koszt**

Koszt stosowanego sprzętu w analizach przy wykorzystaniu techniki PT jest stosunkowo wysoki. Możliwe jest jednak wykonanie wielu tysięcy analiz na jednym urządzeniu, co znacznie obniża koszt jednostkowy.

### **Aspekt środowiskowy**

Technika PT umożliwia zmniejszenie ilości stosowanych rozpuszczalników, bądź też całkowite ich wyeliminowanie z toku analizy (unika się konieczności uwzględniania ślepej wartości wnoszonej przez rozpuszczalnik oraz powstawania toksycznych odpadów).

### **Modyfikacje techniki PT**

Pomimo, że technika PT jest już dobrze rozwinięta i poznana, to wzrastające zapotrzebowanie na badania analityczne dużej ilości próbek wody celem oznaczenia coraz szerszej gamy związków, na coraz niższym poziomie stężeń, w różnych matrycach, wymusza dalsze prace badawcze nad modyfikacją istniejących już urządzeń i procedur analitycznych. Obejmują one działania na rzecz usprawnienia całej metodyki w celu zapewnienia ilościowego przebiegu procesów wypłukiwania i wy-

chwytywania analitów, minimalizacji tła i efektu pamięci, a także modyfikacji oznaczeń na etapie końcowym (dobranie kolumny o odpowiednich parametrach, programu temperaturowego oraz odpowiedniego detektora).

Jedną z takich modyfikacji opisaną w literaturze było zastosowanie kolumny Rtx-624 (60 m × 0,32 mm z filmem fazy stacjonarnej (polidimetylosiloksan modyfikowany grupami cyjanopropylowymi (6%)) o grubości 1,8 μm) [48, 119]. W stosunku do wcześniejszych prac [47] zastosowanie dłuższej kolumny z cieńszym filmem fazy stacjonarnej umożliwiło oznaczenie, a przede wszystkim rozdzielenie szerszej gamy związków – od bardzo lotnych jak np.: dimetylosulfid do mniej lotnych typu trichlorobenzenu czy heksachlorobutadienu – w jednym cyklu analitycznym. Kolumna Rtx-624, została również zaproponowana w projekcie normy ISO/CD 15680 do rutynowego oznaczania lotnych zanieczyszczeń (węglowodorów aromatycznych, naftalenu, związków chloroorganicznych) przy pomocy techniki PT [157].

#### 3.4. TECHNIKI IZOLACJI I/LUB WZBOGACANIA ANALITÓW DO FAZY STAŁEJ LUB STACJONARNEJ

W przypadku oznaczania zanieczyszczeń w próbkach wód bardzo „czystych” osiągnięta granica oznaczalności przy pomocy omówionych do tej pory technik, wydaje się być niewystarczająca. Możliwości oznaczania szerokiej gamy związków (o różnej lotności) na niższym poziomie stężeń w wodach bardzo „czystych” dają techniki izolacji i/lub wzbogacania analitów do fazy stałej lub stacjonarnej. Są one oparte na wykorzystaniu zjawiska adsorpcji, rozpuszczonych w wodzie analitów, na powierzchni złoża sorbentu (faza stała) głównie w wyniku działania sił Van der Waalsa, lub wiązań wodorowych. Może nastąpić również podział analitów pomiędzy ciekły sorbent (faza stacjonarna) naniesiony na nośniku, a wodną matrycę próbki [4, 73–76, 103, 158–170].

Szczególnym przypadkiem zastosowania ekstrakcji do fazy stałej jest wersja tej techniki, połączona z termiczną desorpcją i chromatografią gazową (ang. *Solid Phase Extraction Thermal Desorption* – SPE-TD), która została zaproponowana pod koniec lat siedemdziesiątych [160–162]. Proces izolacji i wzbogacania analitów jest realizowany w trakcie przepuszczania strumienia analizowanej próbki wody przez kolumnkę wypełnioną sorbentem. Anality wzbogacone na sorbencie stałym są następnie uwalniane w wyniku termicznej desorpcji na czoło kolumny chromatograficznej [48, 159, 160, 167, 169, 170]. Mimo, że technika ta posiada wiele zalet (wycelowanie z toku postępowania analitycznego użycia rozpuszczalnika, łatwość automatyzacji, możliwość jej zastosowania do szerokiej gamy związków), to początkowo nie wzbudziła ona większego zainteresowania. Ponownie zainteresowano się tą metodą na początku lat 90 [163–165]. Jednakże w dalszym ciągu ukazało się niewiele prac na ten temat.

## Rodzaj analizowanych związków

Przy pomocy techniki SPE-TD jest możliwa izolacja i wzbogacanie analitów o szerokim spektrum lotności i polarności (można uzyskać określoną selektywność poprzez dobór właściwego sorbentu). Umożliwia ona oznaczanie bardzo lotnych związków, których czasy retencji w przypadku np.: techniki LLE pokrywałyby się z czasem retencji rozpuszczalnika [159, 160, 164, 166–168]. Należy się jednak liczyć z możliwością strat lotnych analitów na etapie suszenia złoża.

## Matryca

Technika SPE-TD może z powodzeniem być wykorzystywana do oznaczania związków organicznych w próbkach wód „czystych” (bez zawiesiny) tj. w próbkach wody do picia, wody deszczowej, wody do produkcji środków farmaceutycznych (leki, płyny infuzyjne, kosmetyki) i innych. Nie nadaje się natomiast do wód zanieczyszczonych cząstkami stałymi, ponieważ istnieje niebezpieczeństwo osadzenia się zawiesiny na powierzchni sorbentu, blokowanie por sorbentu lub nawet zmiana jego własności chemicznych. Powoduje to szybsze i nieodwracalne zużycie złoża sorbentu.

## Granica oznaczalności

Zastosowanie procesu termicznej desorpcji, zamiast ekstrakcji rozpuszczalnikami w celu uwalniania związków ze złoża sorbentu umożliwia znaczące obniżenie granicy oznaczalności w analizach przy wykorzystaniu techniki SPE (do poziomu poniżej  $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) ponieważ związki desorbowane termicznie są w całości podawane na kolumnę chromatograficzną. W badaniach przeprowadzonych na Politechnice Gdańskiej oszacowana granica oznaczalności dla techniki SPE-TD-GC-MS (przy pracy detektora MS w systemie SCAN) kształtowała się na poziomie kilku  $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że w przypadku pracy detektora w systemie SIM wydaje się możliwe osiągnięcie granic oznaczalności na poziomie  $0,01 \text{ ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tak niska granica oznaczalności powoduje, że technika ta może być z powodzeniem stosowana do próbek wód, charakteryzujących się bardzo niskim poziomem zawartości zanieczyszczeń. W ramach prowadzonych badań wykorzystano technikę SPE-TD-GC-MS do kompleksowej analizy wód stosowanych w przemyśle farmaceutycznym [48, 169].

## Odzysk

Podczas analizy z wykorzystaniem techniki SPE-TD-GC-MS następują głównie straty lotnych analitów spowodowane etapem suszenia rurki sorpcyjnej. Propo-

nowany proces suszenia złoża w strumieniu przepływającego gazu (powietrza) o natężeniu  $60 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  w temperaturze  $80^\circ\text{C}$  przez 5 min, okazał się korzystny dla związków o temperaturach wrzenia powyżej  $100^\circ\text{C}$  [48, 169, 170]. Wysokie wartości odzysku (w granicach od 50% do 90%) otrzymano dla węglowodorów aromatycznych (benzen, toluen, ksyleny oraz związki aromatyczne podstawione chlorem) dla dibromochlorometanu (82%), 1,1,2,2-tetrachloroetanu (powyżej 74%), tetrachloroetenu (62%) i heksachlorobutadienu (80%). Natomiast związki takie jak: bromodichlorometan, bromochlorometan, bromotrichlorometan, 1,2-dichloroetan, *cis*-1,2-dichloroeten, *trans*-1,2-dichloroeten, 1,1-dichloroeten, trichloroeten oraz związków siarkoorganicznych (dimetylosulfid, dietylosulfid, tiofen) charakteryzowały się niskimi wartościami odzysku (poniżej 20%) [48, 169].

Technika SPE jest również ograniczana etapem desorpcji ze złoża sorbentu i okazała się szczególnie niekorzystna dla związków o temperaturach wrzenia powyżej  $260^\circ\text{C}$  takich jak: pentachlorobenzen i heksachlorobenzen. Prawdopodobną przyczyną są zimne miejsca w wykorzystywanym desorberze [48, 169].

### **Czaso-, pracochłonność, możliwość automatyzacji procesu**

Technika SPE-TD charakteryzuje się dużą praco- i czasochłonnością poszczególnych operacji. Jednakże na korzyść tej techniki przemawia wyeliminowanie problemów związanych z tworzeniem się emulsji w procesie ekstrakcji (ekstrakcja ciecz–ciecz), czy też picnienia się próbki (ekstrakcja ciecz–gaz) oraz łatwość usunięcia wody i związków nieorganicznych, które w przypadku sorbentów hydrofobowych tylko w małym stopniu wiążą się z powierzchnią sorbentu, co komplikuje analizę.

Dodatkowym atutem jest możliwość przechowywania analitów zatrzymanych na warstwie stałego sorbentu przez długi okres czasu i przeprowadzenie analizy w późniejszym czasie oraz łatwość automatyzacji procesu.

### **Koszt**

Koszt jednostkowy analizy przy wykorzystaniu techniki SPE-TD jest bardzo niski.

### **Aspekt środowiskowy**

Przeprowadzenie ekstrakcji przy pomocy techniki SPE jest możliwe jedynie za pomocą kilku mililitrów rozpuszczalnika, lub też całkowitej eliminacji rozpuszczalnika z toku postępowania analitycznego (uwalnianie zaadsorbowanych analitów na drodze desorpcji termicznej).

## Modyfikacje metody ekstrakcji do fazy stałej

Podstawowym problemem metody ekstrakcji do fazy stałej jest konieczność usuwania wody ze złoża stałego sorbentu po etapie izolacji, a przed wprowadzeniem analitów na czoło kolumny chromatograficznej (po termicznej desorpcji uprzednio zatrzymanych analitów). Najstarszym proponowanym rozwiązaniem jest umieszczenie rurki z zaadsorbowanymi analitami w eksykatorze wraz z środkiem suszącym takim jak:  $K_2CO_3$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $Mg(ClO_4)_2$ ,  $P_2O_5$  itp. [171–174]. Jednakże jest to proces długotrwały i może powodować straty zwłaszcza lotnych związków. Mniej czasochłonny sposób osuszania złoża opisany w literaturze polegał na dwustopniowym odwirowaniu rurki ze złożem sorbentu pod próżnią (2 razy po 20 minut) [175]. Natomiast suszenie rurki ze złożem sorbentu umieszczonej w termostатовanym piecu ( $70^\circ C$ ) za pomocą strumienia gazu obojętnego – azotu ( $170\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$ ) przez okres 30 min [160] okazało się procesem łatwym do automatyzacji, dlatego też stało się przedmiotem zainteresowania zespołu badawczego na Politechnice Gdańskiej [48, 131, 169, 170, 176].

Pomimo opracowania pewnych modyfikacji techniki SPE połączonej z termiczną desorpcją (zwłaszcza odnośnie etapu suszenia złoża), zakres dostępnych informacji na temat tej techniki jest nadal bardzo ograniczony.

### 3.5. WYKORZYSTANIE PROCESU DESORPCJI TERMICZNEJ DO WPROWADZANIA ANALITÓW DO KOLUMNY CHROMATOGRAFICZNEJ

Idea termicznej desorpcji (ang. *Thermal Desorption* – TD), w klasycznym, wąskim rozumieniu to jeden ze sposobów uwalniania analitów zatrzymanych na złożu stałego sorbentu, połączony najczęściej z ich dalszą separacją w układzie analitycznym chromatografu gazowego lub cieczowego. Idea ta pojawiła się pod koniec lat sześćdziesiątych [177] i znalazła początkowo zastosowanie przy analizie lotnych związków organicznych w powietrzu [178–180]. Lotne związki po zaadsorbowaniu na złożu sorbenta w rurce sorpcyjnej są wraz z rurką umieszczane w piecu desorbera. Wzrost temperatury pieca powoduje uwalnianie analitów do strumienia gazu obojętnego przepływającego przez złożo sorbenta, który przynosi je na czoło kolumny chromatograficznej.

Obecnie technika ta z prostego termicznego uwalniania analitów ze złoża stałego sorbentu rozwija się w kierunku budowy systemów izolacji analitów, łączonych bezpośrednio z chromatografem gazowym. Pomimo, że mamy tutaj do czynienia z różnorodnością rozwiązań technicznych i związaną z tym różnorodność w nazewnictwie to zasada każdej z tych technik oparta jest na następującej sekwencji operacji: izolacja (jedno lub wielostopniowa) analitów do fazy gazowej, zawężanie pasma analitów w mikropułapce (sorpcyjnej lub kriogenicznej), osuszania strumienia gazu (gdy istnieje taka konieczność), a następnie termiczne ich uwalnianie i wprowadzanie w strumieniu gazu nośnego do kolumny chromatograficznej. W tym szer-

szym ujęciu desorpcję termiczną można zdefiniować jako system wprowadzania analitów na kolumnę chromatograficzną (desorber pełni tu funkcję dozownika) [74, 108, 111, 117, 118, 121, 177–180].

O ogromnym wzroście zainteresowania możliwością wykorzystania techniki termicznej desorpcji w analityce substancji organicznych na poziomie śladów, świadczy rosnąca w ostatnich latach liczba publikacji oraz proponowanych rozwiązań konstrukcyjnych [111, 113, 116–121, 128, 179, 180].

### **Rodzaj analizowanych związków i matryca**

Termiczna desorpcja analitów do kolumny chromatograficznej umożliwia oznaczanie szerokiej grupy związków (o różnej lotności i polarności) z matryc o różnym, często bardzo skomplikowanym składzie (wykorzystanie sprzężonych z procesem termicznej desorpcji różnych technik izolacji i/lub wzbogacania). Istotnym ograniczeniem techniki termicznej desorpcji jest jej przydatność do bezpośredniego oznaczania jedynie związków stabilnych termicznie. Zakres jej praktycznego wykorzystania jest uwarunkowany własnościami sorpcyjnymi dostępnych sorbentów, które powinny charakteryzować się: dużą wytrzymałością termiczną (do temperatur rzędu 300–400°C), możliwością ilościowego i odwracalnego przebiegu etapu adsorpcji i desorpcji analizowanych związków, niskim tłem własnym oraz niskim powinowactwem do wody. Takie warunki spełnia polimer Tenax-GC otrzymany po raz pierwszy w laboratorium w 1970 roku [149] na bazie politlenku 2,6-difenylo-*p*-fenylowego. Znalazł on szerokie zastosowanie do izolacji i wzbogacania szerokiego spektrum związków z różnych matryc. Zastosowanie tego sorbenta w połączeniu z desorpcją termiczną umożliwia oznaczanie węglowodorów alifatycznych (od C<sub>6</sub>) i aromatycznych (jedno- i wielopierścieniowych), pestycydów, aldehydów, fenoli, amin, nitrozwiązków, związków chloro-, siarkoorganicznych i innych w próbkach wód różnego pochodzenia [46, 108, 111, 118, 177, 169].

### **Granica oznaczalności**

Technika TD umożliwia oznaczania związków na poziomie ppb, ppt, a nawet ppq (gdyż na kolumnę zostaje wprowadzona cała ilość uwalnianych związków).

### **Czaso-, pracochłonność, możliwość automatyzacji procesu**

Proces termicznej desorpcji, charakteryzuje się małą praco- i czasochłonnością operacji oraz łatwością automatyzacji.

## Koszt

Technika TD charakteryzuje się niskim kosztem jednostkowym analizy, pomimo wysokiej ceny aparatu do desorpcji termicznej (ten sam aparat umożliwia wykonanie wielu tysięcy analiz).

## Aspekt środowiskowy

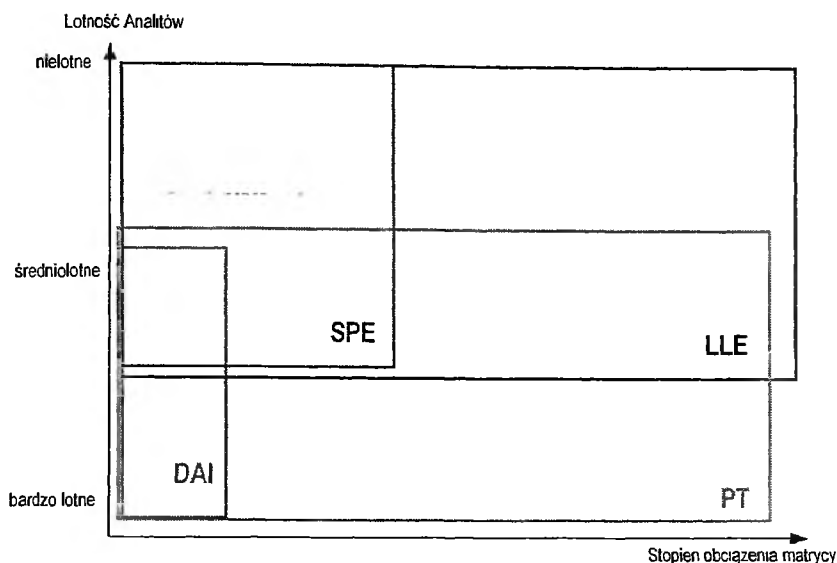
Technika TD umożliwia całkowite wyeliminowanie rozpuszczalników z toku procedury analitycznej

## PODSUMOWANIE

Dotychczas opracowano szeroki wachlarz technik izolacji, wzbogacania oraz oznaczania lotnych i średniolotnych związków z próbek wodnych, jednakże ciągle istnieje konieczność prowadzenia badań nad modyfikacją istniejących i opracowaniem zupełnie nowych rozwiązań. Wynika to przede wszystkim z ostrych wymagań stawianych metodom analitycznym tj.: automatyzacja procesu, zmniejszenie czaso- i pracochłonności, obniżenie kosztów, obniżenie granicy oznaczalności, a także wyeliminowanie lub zmniejszenie zużycia toksycznych i szkodliwych dla środowiska rozpuszczalników.

Spośród omówionych w niniejszej pracy technik izolacji/wzbogacania analitów szczególnie korzystnymi rozwiązaniami (spełniającymi wyżej wymienionych cechy) są techniki izolacji do fazy gazowej lub ekstrakcji do fazy stałej połączone z wymywaniem analitów niewielką ilością rozpuszczalnika, lub ich uwalnianiem termicznym. Natomiast szczególnie korzystną techniką, ze względu na brak etapu przygotowania próbki przed właściwą analizą chromatograficzną (co zmniejsza czaso- i pracochłonność postępowania analitycznego) jest technika bezpośredniego dozowania analitów do kolumny chromatograficznej (DAI). Głównym ograniczeniem limitującym zakres zastosowania tychże rozwiązań jest charakter oznaczanych analitów (ich lotność, polarność) oraz rodzaj matrycy (stopień jej obciążenia). Niekiedy prosta modyfikacja istniejącej techniki wystarcza, aby rozszerzyć jej zakres zastosowania. Wykorzystanie np.: innych typów kolumn (z odpowiednio dobraną fazą stacjonarną, grubością jej filmu, a także długością kolumny), detektorów powinno umożliwić analizę szerszego spektrum związków (nie tylko bardzo lotnych) z różnych matryc (nie tylko wód bardzo czystych) przy pomocy techniki DAI. Natomiast dobranie odpowiednich warunków prowadzenia procesu izolacji/wzbogacania i końcowej analizy może umożliwić zastosowanie metod ekstrakcji do fazy gazowej do analizy związków mniej lotnych. Dodatkowo w ostatnich latach dąży się do tego, aby oznaczać jak największą liczbę związków o różnej lotności i polarności na bardzo niskim poziomie stężeń w skomplikowanych matrycach w jednym toku postępowania analitycznego.





Rysunek 1. Zakres zastosowania omawianych technik izolacji, wzbogacania związków organicznych z wody w zależności od lotności analitów i złożoności składu matrycy

Na Rys. 1 przedstawiono zakres zastosowania uprzednio omówionych technik izolacji, wzbogacania i oznaczania związków organicznych z wody w zależności od ich lotności i złożoności składu matrycy.

#### PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H.K. Lawrence, *Environmental Sampling and Analysis: A Practical Guide*, Lewis Publ., Inc., MI, USA 1991.
- [2] J.R. Dojlido, *Chemia Wód Powierzchniowych*, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 1995.
- [3] J.V. Hinshaw, *LC-GC*, 1999, 12, 83.
- [4] J. Namieśnik (red.), J. Łukasiak, Z. Jamróiewicz, *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy*, PWN, Warszawa, 1995, s. 47–64.
- [5] A. Zlatkis, J.Q. Walker, *J. Chromatogr.*, 1963, 1, 9.
- [6] D.H. Desty, *Advan. Chromatogr.*, 1965, 1, 218.
- [7] K. Grob, A. Habich, *HRCC&CC*, 1983, 6, 11.
- [8] K. Grob, *J. Chromatogr.*, 1984, 299, 1.
- [9] *Determination of Halocarbons in Drinking Water by Direct Aqueous Injection and Electron Capture Detector (DAI-ECD) Gas Chromatography*, Carlo Erba Instruments, Short Notes, Application Sheets, 1989.
- [10] K.J. Hyver, *High Resolution Gas Chromatography*, Hewlett-Packard Co., USA, 1989.
- [11] K. Grob, *J. Chromatogr.*, 1978, 151, 311.
- [12] C. Hewett, *Lab. Pract.*, 1990, 39, 74.
- [13] S.M. Pyle, D.F. Gurka, R. Titus, *Talanta*, 1994, 41, 1845.

- [14] *GC Analysis of Trihalomethanes by Direct Aqueous Injection Using Automatic Cool On-Column Injection and Electron Capture Detection*, Hewlett Packard, Application Note 228-135.
- [15] K. Grob, F. Kueeffler, *JHRC*, 1990, **13**, 561.
- [16] D. Carmichael, *JHRC*, 1990, **13**, 564.
- [17] M. Biziuk, *Gas chromatography by Direct Aqueous Injection in Environmental Analysis*, [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (red.), J. Wiley and Sons, Chichester 2000, tom. 3, s. 2549.
- [18] A.A. Nicholson, O. Meresz, B. Lemyk, *Anal. Chem.*, 1977, **49**, 814.
- [19] P.G. Simmonds, E. Kerns, *J. Chromatogr.*, 1979, **186**, 785.
- [20] K. Grob, G. Grob, W. Blum, W. Walther, *J. Chromatogr.*, 1982, **244**, 197.
- [21] W.D. Payne, T.W. Colette, *JHRC*, 1989, **12**, 693.
- [22] J.J. Ellington, C.D. Trusty, *JHRC*, 1989, **12**, 470.
- [23] D.V. McCalley, *JHRC*, 1989, **12**, 465.
- [24] K. Grob, E. Muller, *J. Chromatogr.*, 1989, **473**, 41.
- [25] Jr.K. Grob, *J. Chromatogr.*, 1982, **237**, 15.
- [26] J. Schultz, *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, 1984, **72**, 85.
- [27] I.F. Temmerman, F. David, P. Sandra, R. Soniassy, Hewlett Packard Application Note 228-135, Hewlett-Packard, 1991.
- [28] I.F. Temmerman, D.J. Quaghebauer, *JHRC*, 1990, **13**, 379.
- [29] D. Carmichael, W. Holmes, *JHRC*, 1990, **3**, 267.
- [30] M. Biziuk, Ż. Polkowska, D. Gorlo, W. Janicki, J. Namieśnik, *Chem. Anal.*, 1995, **40**, 299.
- [31] F. Fuji, *J. Chromatogr.*, 1977, **139**, 279.
- [32] G. Eklund, B. Josefsson, Roos C., *JHRCCC*, 1978, **1**, 34.
- [33] Ż. Polkowska, E. Kozłowski, *Zastosowanie nowej techniki TLHS do izolacji i wzbogacania mikrośladowych ilości trihalogenometanów (THM) w wodach głębinowych*, Materiały V Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej: „Analityka w służbie człowieka i środowiska”, 03.09-08.09.1995, Gdańsk, s. 570.
- [34] M. Biziuk, J. Namieśnik, J. Czerwiński, D. Gorlo, B. Makuch, W. Janicki, Ż. Polkowska, L. Wolska, *J. Chromatogr.*, 1996, **733**, 171.
- [35] A.A. Nicholson, O. Meresz, B. Lemyk, *Anal. Chem.*, 1977, **49**, 814.
- [36] S.K. Golfinopoulos, T.D. Lekkas, A.D. Nikolaou, *Chemosphere*, 2001, **45**, 275.
- [37] Maria N. Kostopoulou, M. Biziuk, Ż. Polkowska, *Pollutants in Environment*, 1993, **3**, 12.
- [38] M. Biziuk, Ż. Polkowska, D. Gorlo, W. Janicki, J. Namieśnik, *Monitoring of Volatile Organic Compounds (VOC's) in the Surface and Seawaters in the Gdańsk District*, [w:] *International River Water Quality*, red. Best G.A., T. Bogacka, E. Niemirycz, E&FN Spon, London, 1997, s. 127.
- [39] A.D. Nikolaou, T.D. Lekkas, S.K. Golfinopoulos, *Talanta*, 2002, **56**, 717.
- [40] L. Wolska, C. Olszewska, M. Turska, *Lotne i średniolotne związki chloroorganiczne w metodzie DAL-GC-ECD*, Materiały Sympozjum: „Związki organiczne w środowisku i metody ich oznaczania”, 12-16.05.1997 r., Jachranka, s. 183.
- [41] J. Czerwiński, D. Gorlo, Ż. Polkowska, M. Biziuk, J. Namieśnik, *Ecol. Chem.*, 1995, **4**, 261.
- [42] L. Wolska, C. Olszewska, M. Turska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, *Chemosphere*, 1998, **37**, 2645.
- [43] M. Biziuk, W. Janicki, M. Pertkiewicz-Piszcz, J. Czerwiński, Ż. Polkowska, M. Ślebioda, L. Zastawska, B. Zygmunt, *Chem. Inż. Ekol.*, 1994, **1/2**, 179.
- [44] M. Biziuk, Ż. Polkowska, W. Janicki, J. Namieśnik, *Determination of Volatile Organic Compounds (VOC's) in the Surface and Sea Water from the Gdańsk District*, *International River Quality Symposia, Poland-USA*, 13-17.07.1994, s. 12.
- [45] Ż. Polkowska, J. Namieśnik, J. Czerwiński, B. Zygmunt, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1996, **31**, 387.

- [46] Ż. Polkowska, M. Turska, J. Namieśnik: *Statistical Evaluation and Comparison of Direct Aqueous Injection DAI-GC-ECD and DAI-GC-ECD Combined With Thin Layer Head Space (TLHS)*, Materiały X Międzynarodowego Sympozjum: „Advances and Applications of Chromatography in Industry”, 30.06-4.07.1996, Bratysława, Słowacja, s. 114.
- [47] T. Maeda, Y. Yamaguchi, Y. Yasuki: *Purge and Trap Capillary GC/MS Method Using a Micro Scale Purge Vial*, Materiały: 16 International Symposium on Capillary Chromatography, 27-30.09.1994, Riva del Garda, (Italy), s. 1107.
- [48] M. Staniszcwska, praca doktorska pt: *Opracowanie „bezzropuszczalnikowych” metodyk jednoczesnego oznaczania szerokiej gamy lotnych i średniolotnych związków organicznych w próbkach wody*, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, 2000.
- [49] S.M. Pyle, A.B. Marcus, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 2000, 76, 17.
- [50] J. Namieśnik, Chem. Inż. Ekol., Opole 1997, 4, S1, s. 71-74.
- [51] *Leksykon Ochrony Środowiska*, Fundacja ECOBALTIC, Gdańsk, 1995.
- [52] G.R. Aiken, D.H.M. Mcknight, R.L. Wershaw, R. Maccarthy, *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, Isolation and Characterization*, J. Wiley and Sons, New York, USA, 1985.
- [53] G. Chiavari, G. Torsi, D. Fabbri, G. Galletti, *Analyst.*, 1994, 119, 1141.
- [54] E.W.B. de Leer, *Aqueous chlorination products, The Origin of Organochlorine Compounds in Drinking Waters*, PhD thesis, Delft University Press, 1987.
- [55] J. Pempkowiak, praca habilitacyjna: *Rozmieszczenie, pochodzenie i właściwości kwasów humusowych w Morzu Bałtyckim*, Instytut Oceanologii PAN, Ossolineum, 1989.
- [56] S. Gonet, *Rola substancji humusowych w glebach*, Materiały V Konferencji Naukowo Technicznej pt.: „Odpady przemysłowe, zanieczyszczenia oraz ochrona gleby i wody”, 2.06.1995, Bydgoszcz, s. 43.
- [57] D.A. Reckhow, P.C. Singer, R.L. Malcolm, *Environ. Sci Technol.*, 1990, 24, 1655.
- [58] M. Staniszcwska, L. Wolska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, *ACE*, 1998, 1, 179.
- [59] M. Biziuk, J. Czerwiński, E. Kozłowski, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1993, 50, 109.
- [60] Ż. Polkowska, M. Turska, J. Namieśnik, *Application of Thin Layer Head Space with Self Generation of Liquid Sorbent for Determination of Volatile Organic Halogen Compounds in Waste Water*, Materiały X Międzynarodowego Sympozjum: „Advances and Applications of Chromatography in Industry”, 30.06.-4.07 1996, Bratysława, Słowacja, s. 221.
- [61] Ż. Polkowska, M. Turska, T. Górecki, J. Namieśnik, *Process Contr. Qual.*, 1998, 11, 1.
- [62] Polska Norma PN-C-04549-1, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1998.
- [63] International Standard ISO/FDIS 10301: 1996(E), Water quality – Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons - Gas - chromatographic methods, s. 1-2.
- [64] *Determination of Halocarbons in Drinking Water by Direct Aqueous Injection and Electron Capture Detector (DAI-ECD) Gas Chromatography*, Carlo Erba Instruments, Short Notes, Application Sheets, 1989.
- [65] H. Dingyuan, Yanfei, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2078.
- [66] M.F. Mehra, N. Golkar, M. Mehra, W.J. Cooper, *JHRCCC*, 1988, 11, 610.
- [67] C. Maris, A. Laplanche, J. Morvan, M. Bloquel, *Wat. Sci.Tech.*, 1999, 40, 141.
- [68] D.F. Gurka, S.M. Pyle, Titus R., *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1749.
- [69] H. Tang, P. Heaton, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1996, 62, 263.
- [70] M. Turska, L. Wolska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, *Chem. Anal.*, 1997, 42, 787.
- [71] B.S. Middelbitch, N.J. Sung, A. Zlatkis, G. Settembre, *Chromatographia*, 1987, 23, 273.
- [72] M. Malaiyandi, M.J. Goddard, *J. Testing and Evaluation*, 1990, 18, 87.
- [73] P. Kuran, L. Sojak, *J. Chromatogr.*, 1996, 733, 119.
- [74] J. Namieśnik, T. Górecki, M. Biziuk, L. Torres, *Anal. Chim. Acta.*, 1990, 237, 1.

- [75] J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torress, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, WNT, Warszawa, 2000.
- [76] J. Namieśnik, T. Górecki, Pol. J. Environ. Stud., 2001, **10**, 77.
- [77] J.J. Vrelius, A.J.H. Louter, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 1999, **859**, 279.
- [78] J. Dewulf, H. Langenhove, J. Chromatogr. A, 1999, **843**, 163.
- [79] S. Liu, J.D. Pleil, J. Chromatogr. B, 2001, **152**, 159.
- [80] E. Pocurull, M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A, 2000, **876**, 135.
- [81] W. Vogt, K. Jacob, A.B. Ohnesorge, H.W. Obwexer, J. Chromatogr., 1979, **186**, 197.
- [82] H.G. Janssen, H. Mol, Chromatogr. Technical Notes No 11.
- [83] E. Pocurull, M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A., 2000, **876**, 137.
- [84] J. Staniewski, J.A. Rijks, *Materiały: 13th International Symposium on Capillary Chromatography*, 13-16.05.1991, Riva del Garda, Italy, s. 1334.
- [85] G. Schomburg, E. Bastian, H. Behlau, H. Husmann, F. Wcecke, JHRCCC., 1984, **7**, 4.
- [86] J. Staniewski, *Materiały: 16th International Symposium on Capillary Chromatography*, 30.09.1994, Riva del Garda, Italy, s. 1071.
- [87] H.G.J. Mol, H.G.M. Janssen, C.A. Cramers, J.J. Vrelius, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 1995, **703**, 277.
- [88] K. Grob Jr., Z. Li, J. Chromatogr., 1989, **473**, 423.
- [89] J. Staniewski, H.-G. Janssen, J.A. Rijks, C.A. Cramers, *Materiały: 15 International Symposium on Capillary Chromatography*, 24-27.05.1993, Riva del Garda, Italy, s. 401.
- [90] J. Staniewski, H.-G. Janssen, C.A. Cramers, *Materiały: 15 International Symposium on Capillary Chromatography*, 24-27.05.1993, Riva del Garda, Italy, s. 808.
- [91] K. Grob, *Classical Solit and Splitless Injection in Capillary GC*, 2nd ed. Heidelberg, Hüthing 1988.
- [92] J.V. Hinshaw, LC-GC, 1992, **5**, 14.
- [93] T. Welsch, H. Block, J. Fresenius, Anal. Chem., 1997, **357**, 904.
- [94] T. Ligor, B. Buszewski, Chromatographia Supplement, 2000, **51**, 279.
- [95] E.S. Farrell, G.E. Pacey, Anal. Chem., 1996, **68**, 93.
- [96] E.C. Goosens, D. de Jong, G.J. de Jong, U.A.Th. Brinkman, JHRC, 1997, **20**, 325.
- [97] V. Lang, J.Chromatogr., 1992, **595**, 1.
- [98] M.J. Yang, J. Pawliszyn, LC-GC, 1996, **9**, 283.
- [99] B. Hauser, P. Popp, A. Paschke, Int. J. Environ. Anal. Chem., 1999, **74**, 107.
- [100] B. Hauser, P. Popp, JHRC., 1999, **22**, 205.
- [101] W. Groszko, R.M. Moore, Chemosphere, 1998, **36**, 3083.
- [102] S. Mitra, X. Guo, Anal. Lett., 1998, **31**, 367.
- [103] J. Namieśnik, W. Wardencki, JHRC, 2000, **23**, 297.
- [104] L.E. Dejarne, S.J. Bauer, R.G. Cooks, F.R. Lauritsen, T. Kotiano, T. Graf, Rapid Comm. in Mass Spectrom., 1993, **7**, 935.
- [105] M. Leth, F.R. Lauritsen, Rapid Comm. in Mass Spectrom., 1995, **9**, 591.
- [106] R.A. Ketola, V.T. Virkki, M. Ojala, V. Komppa, T. Kotiaho, Talanta, 1997, **44**, 373.
- [107] B. Zygmunt, *Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej, Chemia XXXVII*, Gdańsk, 1997.
- [108] S.M. Abeel, K.A. Vickers, D. Decker, J. Chromatogr. Sci., 1994, **32**, 328.
- [109] Ż. Polkowska, E. Kozłowski, T. Górecki, J. Namieśnik, Toxicol. Environ. Chem., 1999, **68**, 1.
- [110] T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg; J. Am. Water Works Assoc., 1974, **66**, 739.
- [111] L. Wolska, praca doktorska: *Zastosowanie połączenia termiczna desorpcja-chromatografia gazowa w analizie próbek środowiskowych*, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, 1996.
- [112] B. Charnas, A.Gierak, R. Lebeda, Chem. Anal., 1994, **39**, 1.
- [113] W. Janicki, L. Wolska, W. Wardencki, J. Namieśnik, J. Chromatogr. A, 1993, **654**, 729.

- [114] P.V. Doskey, JHRCCC, 1991, 14, 724.
- [115] J.F. Pankow, Environ. Sci. Technol., 1991, 25, 123.
- [116] L. Wolska, W. Wardencki, Aparatura Badawcza i Dydaktyczna., 1999, 10, 14.
- [117] D.J. Djozan, Y. Assadi, J.Chromatogr. A., 1995, 697, 525.
- [118] M.R. Driss, M. Bougera, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1991, 45, 193.
- [119] W. Wardencki, M. Staniszevska, L. Wolska, W. Janicki, J. Namieśnik, Chem. Anal, 2000, 45, 291.
- [120] M. Staniszevska, L. Wolska, J. Namieśnik, *Trace Analysis of Volatile and Semivolatile Compounds in Water by PT-GC-MS*, Materiały międzynarodowej konferencji „Balaton Symposium'99 on high-performance separation methods”, 1-3.09.1999, Siofok, Węgry, P-185.
- [121] L. Wolska, W. Wardencki, *Połączenie Termiczna Desorpcja-Chromatografia Gazowa w analizie próbek środowiskowych*”, Materiały Sympozjum: „Związki organiczne w środowisku i metody ich oznaczania”, 12-16.05.1997r., Jachranka, s.77.
- [122] S.A. Rounds, J.F. Pankow, J.Chromatogr., 1993, 629, 321.
- [123] S.A. Rounds, J.F. Pankow, Environ. Sci. Technol., 1988, 22, 398.
- [124] R.P. Eganhouse, T.F. Dorsey, C.S. Phinney, A.M. Westcott, J. Chromatogr., 1993, 628, 81.
- [125] L.B. Barber, E.M. Thurman, Y. Takahaski, M.C. Noriega, Ground Water, 1992, 30, 836.
- [126] L. Lepine, J.F. Archambault, Anal. Chem., 1992, 64, 810.
- [127] I. Silgoner, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, J. Chromatogr., 1997, 768, 259.
- [128] W. Wardencki, Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej, Chemia XXXVI, Gdańsk 1997.
- [129] R.S. Brown, K. Pettit, D. Price, P.W. Jones, Chemosphere, 1991, 23, 1145.
- [130] A. Bianchi, M.S. Varney, J. Philips, J. Chromatogr., 1991, 557, 429.
- [131] A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel, Talanta, 2000, 51, 467.
- [132] A. Adachi, T. Kobayaski, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1991, 47, 701.
- [133] I.F. Hung, S.S. Lee, R.K. Chen, J. Chromatogr.B, 1998, 706, 352.
- [134] R.L. Dills, S.D. Kent, H. Checkoway, D. Kalman, Talanta, 1991, 38, 365.
- [135] L. Dunemann, M. Najimiragha, Anal. Chim. Acta, 1993, 283, 199.
- [136] V. Pinnel, P. Rosseels, J. Vandegans, *Materiały 16 International Symposium on Capillary Chromatography*, 27-30.09.1994, Riva del Garda, s. 549.
- [137] C.J.H. Miermans, L.E. Velde, P.C.M. Frintrop, Chemosphere, 2000, 40, 39.
- [138] A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel, Talanta., 2000, 51, 467.
- [139] T. Huybrechts, J. Dewulf, O. Moerman, V. Langenhove, J. Chromatogr.A, 2000, 893, 367.
- [140] M. Careri, G. Mori, M. Musci, P. Viaroli, J. Chromatogr.A, 1999, 848, 327.
- [141] M.J. Prieto, V. Berenguer, D. Marhuenda, A. Cardona, J. Chromatogr. B, 2000, 741, 301.
- [142] Ż. Polkowska, T. Górecki, J. Namieśnik, Appl. Occup. Environ. Hyg., 1999, 14, 240.
- [143] *Determination of Volatile Organic Compounds According to EPA Method 524.2*, Bulletin No. 503562, Chrompack, Middelburg, 1992.
- [144] *Measurement of Purgable Organic Compounds in Water by Capillary column Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Method 524.2*, Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1992.
- [145] *Federal Register Rules and Regulations*, Vol. 49, No. 209, Oct. 26, EPA Method 624 – Purgeables, s. 141–152, 1984.
- [146] *1997 Chromatography Products Guide*, Restek Corporation, Bellefonte 1997, s. 342–352.
- [147] *The Determination of Halogenated Chemicals in Water by the P&T Method, Method 502.1*, Environmental Monitoring and Support Laboratory, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1986.
- [148] E. Matisowa, S. Skrobakowa, J. Chromatogr., 1995, 707, 145.
- [149] R.J. van Wijk, J. Chromatogr. Sci., 1970, 8, 418.
- [150] A.P. Bianchi, M.S. Varney, J. Chromatogr., 1992, 643, 11.

- [151] Y.Z. Tang, Q. Fran, P. Fellin, W.K. Cheng, J. Drummond, *Chem. Anal.*, 1993, **65**, 1932.
- [152] H.T. Badings, C. de Jong, P.P.M. Dooper, *JHRCCC.*, 1985, **8**, 755.
- [153] J.G. Schnable, M.B. Capangpangan, B.W. Dussert, H. Suffet, *LC-GC*, 1992, **5**, 43.
- [154] J.L. Wang, W.L. Chen, *J. Chromatogr.A*, 2001, **927**, 143.
- [155] T.C. Chen, G.R. Her, *J. Chromatogr.A*, 2001, **927**, 229.
- [156] A. Ekdahl, K. Abrahamsson, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **457**, 197.
- [157] *Water quality - Gas chromatographic determination of a number of monocyclic aromatic hydrocarbons, naphthalene and several chlorinated compounds using purge and trap thermal desorption*, Committee Draft, ISO/CD 15680, ISO 1999.
- [158] H.A. Baltussen, *New Concepts in Sorption Based Sample Preparation for Chromatography*, Phd Thesis, Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, 2000.
- [159] T.P. Wampler, *LC-GC*, 1998, **11**, 653.
- [160] Z. Voznakova, M. Popl, *J. Chromatogr. Sci.*, 1979, **17**, 682.
- [161] J.F. Pankow, L.M. Isabelle, *J. Chromatogr.*, 1982, **230**, 25.
- [162] J.F. Pankow, L.M. Isabelle, W.E. Asher, *Environ. Sci. Technol.*, 1984, **18**, 310.
- [163] H.G.J. Mol, H-G.M. Jamssen, C.A. Cramers, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 1995, **703**, 277.
- [164] J.J. Vreuls, G.J. de Jong, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, *J. Microcol. Sep.*, 1993, **5**, 317.
- [165] J.J. Vreuls, G.J. de Jong, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, *On-Solid Phase Extraction -Thermal Desorption for Introduction of Large Volumes of Aqueous Samples into a Capillary Gas Chromatograph*, *Materiały 15 International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italy, 24-27.05.1993, s. 939.
- [166] J.F. Pankow, M.P. Ligocki, M.E. Rosen, L.M. Isabelle, K.M. Hart, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 40.
- [167] T. Hankemeier, S.P.J. van Leeuwen, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 1998, **811**, 117.
- [168] E. Baltussen, F. David, P. Sandra, H.G. Janssen, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 1998, **805**, 237.
- [169] L. Wolska, M. Staniszevska, J. Namieśnik, *Chem. Inż. Ekol.*, 2001, **8**, 925.
- [170] L. Wolska, W. Janicki, J. Namieśnik, *Analyst*, 1995, **120**, 2781.
- [171] D. Helming, L. Vierling, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4380.
- [172] B. Versino, H. Knöppel, M. De Groot, A. Peil, J. Poelman, H. Schauenburg, H. Vissers, F. Geiss, *J. Chromatogr.*, 1976, **122**, 373.
- [173] P.V. Doskey, *JHRC*, 1991, **14**, 724.
- [174] Y. Pico, J.J. Vreuls, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, 1994, **38**, 461.
- [175] J.F. Pankow, L.M. Isabelle, *J. Chromatogr.*, 1982, **230**, 25.
- [176] W. Janicki, B. Zygmunt, L. Wolska, W. Chrzanowski, W. Wardencki, *Chem. Anal.*, 1992, **37**, 599.
- [177] L.D. White, D.G. Taylor, P.A. Mauer, R.E. Kupel, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1970, **31**, 225.
- [178] J. Namieśnik, *Talanta*, 1998, **35**, 567.
- [179] J. Rudolph, K.P. Müller, R. Koppmann, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **236**, 197.
- [180] V. Camel, M. Caude, *J. Chromatogr.*, 1995, **710**, 3.

# BETULINA – TRITERPEN PENTACYKLICZNY

## BETULIN – A PENTACYCLIC TRITERPENE

**Jacek Achrem-Achremowicz<sup>1</sup>, Zbigniew Janeczko<sup>2</sup>**

*Katedra Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego CM UJ  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków*

*<sup>1</sup> mfachrem@cyf-kr.edu.pl, <sup>2</sup> mfjanecz@cyf-kr.edu.pl*

---

### Abstract

#### Wstęp

1. Występowanie
2. Biogeneza
3. Izolacja
4. Budowa i właściwości chemiczne
5. Przekształcenia chemiczne
  - 5.1. Utlenianie
  - 5.2. Izomeryzacja
  - 5.3. Dehydrogenacja
  - 5.4. Dehydratacja
  - 5.5. Uwodornienie
  - 5.6. Podstawione pochodne
    - 5.6.1. Estry
    - 5.6.2. Związki azotowe
    - 5.6.3. Połączenia z aminokwasami
    - 5.6.4. Glikozydy
6. Przekształcenia biotechnologiczne

Piśmiennictwo cytowane

---

**Zbigniew Janeczko**, urodził się w roku 1946 w Bielsku-Białej. W roku 1971 ukończył studia na Wydziale Farmaceutycznym w Krakowie. Stopień naukowy doktora (1977) uzyskał na Akademii Medycznej w Krakowie, habilitował się na Uniwersytecie Jagiellońskim w roku 1994. Stanowisko profesora UJ otrzymał w roku 2002 i obecnie jest kierownikiem Katedry Farmakognozji Collegium Medicum UJ w Krakowie. Zajmuje się badaniami strukturalnymi glikozydów saponinowych oraz analizą ilościową substancji roślinnych. Przebywał na stażach naukowych w Niemczech, Francji i Chinach. Jest wiceprzewodniczącym Sekcji Fitoterapii Polskiego Towarzystwa Lekarskiego.

**Jacek Achrem-Achremowicz**, urodził się w 1971 roku w Krakowie. W roku 1994 ukończył studia na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Krakowie, a w 1995 roku ukończył studia na drugim kierunku – Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Pracuje jako asystent w Katedrze Farmakognozji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zajmuje się triterpenami.



## ABSTRACT

Triterpenes are the group of natural compounds widespread in the plant kingdom [1]. They exhibit a range of biological activities. One of the most explored structures alike is betulin. This is a lupane type triterpene which is the main constituent of the extract of the white birch bark [2]. Betulin moiety is composed of four six- and one five membered rings with one isopropenyl and two hydroxyl groups (1) [2].

Betulin and its derivatives show: antitumor [3–8], antiviral (HIV-1) [9, 10], antiinflammatory [12–14] and antiprotosoal [15] properties. The most promising, however, is antitumor activity. Betulinic acid – a product of the selective oxidation of betulin displays proapoptotic activity against several highly resistant tumor cells *in vitro* and *in vivo* [3–8]. Apoptosis *i.e.* cell-suicide is induced only in “mutant” cells and not in normal ones.  $EC_{50}$  (effective concentration causing death of 50% of the ill cells) of betulinic acid and its derivatives lie in the  $\mu\text{M}$  range [3, 4, 6, 7].

Isolation, biogenesis and preparation of several modified betulin derivatives are reviewed in this article. Among the described reactions are: several routes of selective oxidation of betulin [3, 18, 23, 28–35, 38–41], dehydration [9, 35, 48–52], isomerisation [23, 38, 41–46], dehydrogenation [46–48], hydrogenation [53–55], glycosidation [59–61], esterification [28, 41, 42, 56, 57], preparation of amides (with the use of aminoacids) [5, 59] and synthesis of aminoderivatives [29, 58]. Some of these reactions give unexpected products [33, 43, 44].

The biological potency of these compounds may be due to their steroid-like structures (*all-trans* conformation and some more similarities). The exact mechanisms of the activities, however, remain unknown [3–8].

The case of obtaining highly pure betulin and the potent biological activity of its derivatives can be the reason for singling out the compound as a lead, model triterpene for further chemical and biological investigations.

## WSTĘP

Triterpeny są to substancje o charakterze cyklicznych węglowodorów, powszechnie występujące w naturze. Stanowią one podklasę większej grupy związków naturalnych – terpenoidów.

Triterpeny posiadają najczęściej niearomatyczną strukturę cztero- lub pięciopierścieniową z grupami funkcyjnymi jak: hydroksylowa, karboksylowa, ketonowa, metylowa itp. oraz jedno lub kilka wiązań podwójnych w układzie izolowanym lub sprzężonym. W przyrodzie występują również związki o dwu lub trzech pierścieniach i sporadycznie liniowe.

Wyróżnia się około 40 podstawowych struktur (typów) triterpenów a liczba dotychczas poznanych związków tego rodzaju sięga kilku tysięcy (1508 hasel kluczowych w *Dictionary of Terpenoids* [1]). W stanie naturalnym występują często w postaci glikozydów lub glikozydoestrów – tworząc tzw. saponiny lub pseudosaponiny, a także w połączeniach z kwasami organicznymi i alkoholami.

Szczególłą pozycję wśród tej bardzo interesującej grupy związków zajmują betulina. Wydzielona została w 1788 roku przez Lowitza i jest zapewne jedną z pierwszych substancji naturalnych wyizolowanych z roślin [2]. Podobnie jak wiele dotychczas wyizolowanych i zbadanych triterpenów, betulina i jej pochodne wykazują szereg ciekawych właściwości farmakologicznych. W 1995 r. zespół badaczy amerykańskich odkrył, że kwas betulinowy – produkt selektywnego utleniania betuliny, hamuje rozwój niektórych nowotworów poprzez indukowanie apoptozy, czyli samobójczej (zaprogramowanej) śmierci komórek, przy czym proces ten wywołany jest tylko w komórkach chorych [3, 4]. Pochodne betuliny, obok hamującego działania na rozwój czerniaka MEL-2 [3, 5], wstrzymują rozwój niektórych innych chemoopornych linii nowotworowych, m.in. neuroglejaków [6, 7]; aktywne są także wobec niektórych szczepów bakterii [8], wirusów, w tym wirusa HIV-1 [9, 10], zapobiegają tworzeniu kamieni nerkowych [11], działają przeciwzapalnie [12–14], oraz antymalarycznie w stosunku do bezpłciowych erytrocytalnych stadiów *Plasmodium falciparum* [15, 16]. Najbardziej obiecujące spośród tu wymienionych są jednak właściwości przeciwnowotworowe. Aktywność pochodnych betuliny *in vitro* jest bardzo wysoka, a wyraźnie zaznaczone działanie występuje w pikomolarnym zakresie stężeń (!). Jednocześnie toksyczność tych związków jest najczęściej mała lub znikoma [3, 6–9].

## 1. WYSTĘPOWANIE

Betulina występuje w wielu gatunkach roślin, lecz spotkać ją można także w świecie nieożywionym, np. w osadach organicznych, gdzie jej obecność ułatwia określanie wieku próbek w odkrywkach geologicznych [17]. Triterpen ten wykryto w ponad 240 gatunkach roślin w różnych częściach morfotycznych jak: kora, korzenie, kwiaty, itd. W korze niektórych gatunków brzoź, jak na przykład występują-

cych powszechnie w Polsce brzozie brodawkowatej (*Betula verrucosa*), czy omszonej (*Betula pubescens*), zawartość betuliny jest największa i może przekraczać 25% [2]. Białe gatunki brzoź zawdzięczają jej swe charakterystyczne zabarwienie. W większych ilościach (około 0,5–10%) betulina występuje w: *Alnus crispa*, *Alnus rugosa*, *Comptonia peregrina*, *Diospyros peregrina*, *Myrica pensylvanica*, *Porteria coarctata*, *Sorbus americana* i innych.

## 2. BIOGENEZA

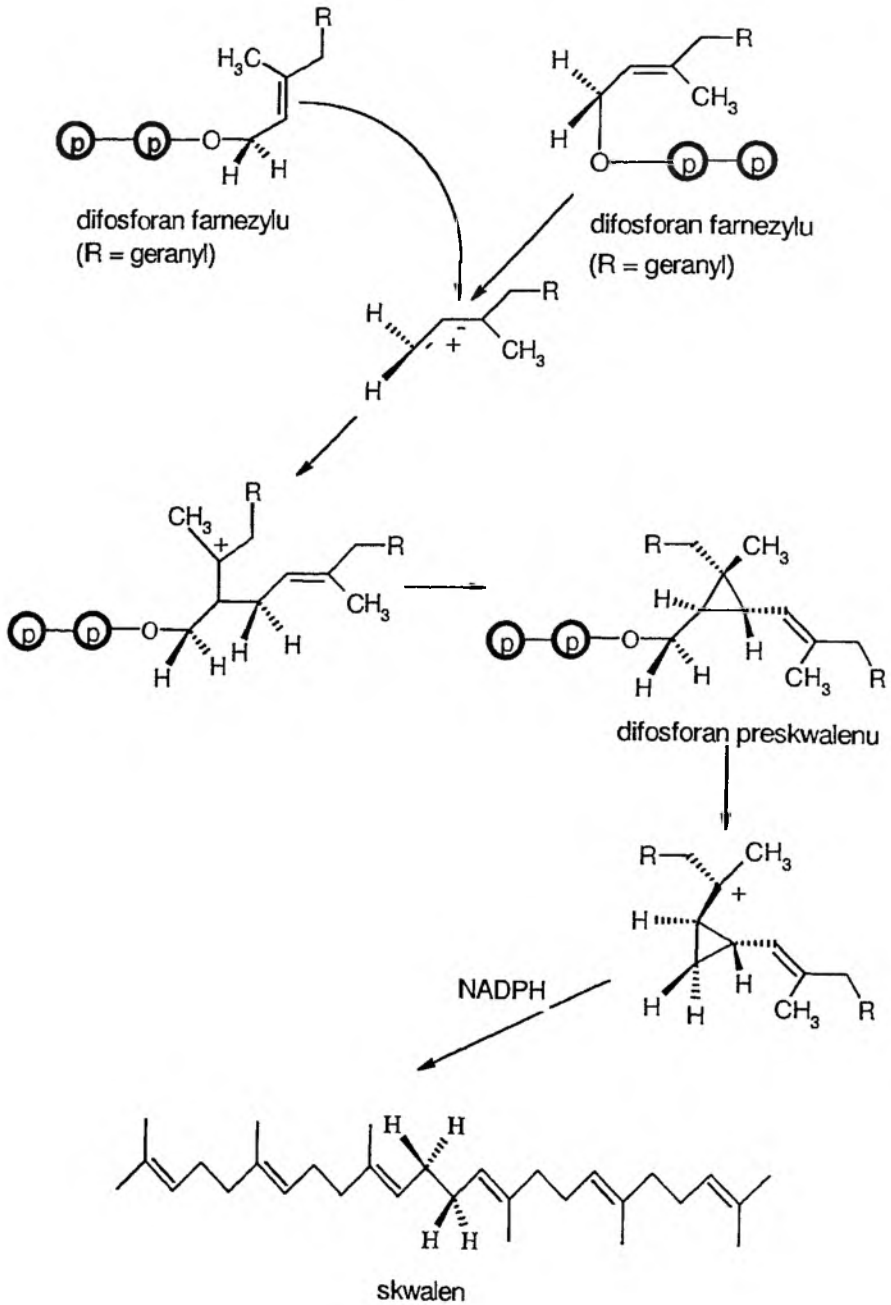
Bezpośrednim prekursorem związków terpenoidowych: triterpenów i steroidów, jest liniowy węglowodór (3*S*)-2,3-epoksyskwalen. W zależności od wyjściowej konformacji, jaką przyjmie ten związek podczas cyklizacji, mogą powstać różne typy strukturalne terpenoidów. Sterole i triterpeny tetracykliczne powstają, gdy enzym katalizujący reakcję „ułożyć” cząsteczkę (3*S*)-2,3-epoksyskwalenu w konformacji krzesło–łódka–krzesło–łódka–endo, podczas gdy z konformacji krzesło–krzesło–krzesło tworzone są triterpeny pentacykliczne.

Biosynteza epoksyskwalenu jest procesem wielostopniowym. W pierwszym etapie dwie cząsteczki pirofosforanu izopentenyłu kondensują tworząc dziesięciowęglową cząsteczkę pirofosforanu geranylu. Odszczepienie protonu od tego związku powoduje powstanie kationu, który jest następnie atakowany przez pirofosforan izopentenyłu. W kondensacji tej, przebiegającej również z odszczepieniem grupy pirofosforanowej, utworzona zostaje cząsteczka pirofosforanu farnezyłu (15 at. węgla). Reduktywne połączenie dwóch cząsteczek tego związku, katalizowane przez syntetazę skwalenu w obecności NADPH prowadzi do powstania skwalenu (schemat 1). W obecności tlenu i NADPH skwalen ulega następnie utlenieniu do aktywnego (3*S*)-2,3-epoksydu podlegającego z udziałem odpowiednich syntaz z klasy cyklaz przekształceni do formy cyklicznej kationu damarenylowego lub protosterylowego w zależności od ścieżki reakcji (triterpeny pentacykliczne/tetracykliczne lub steroidy).

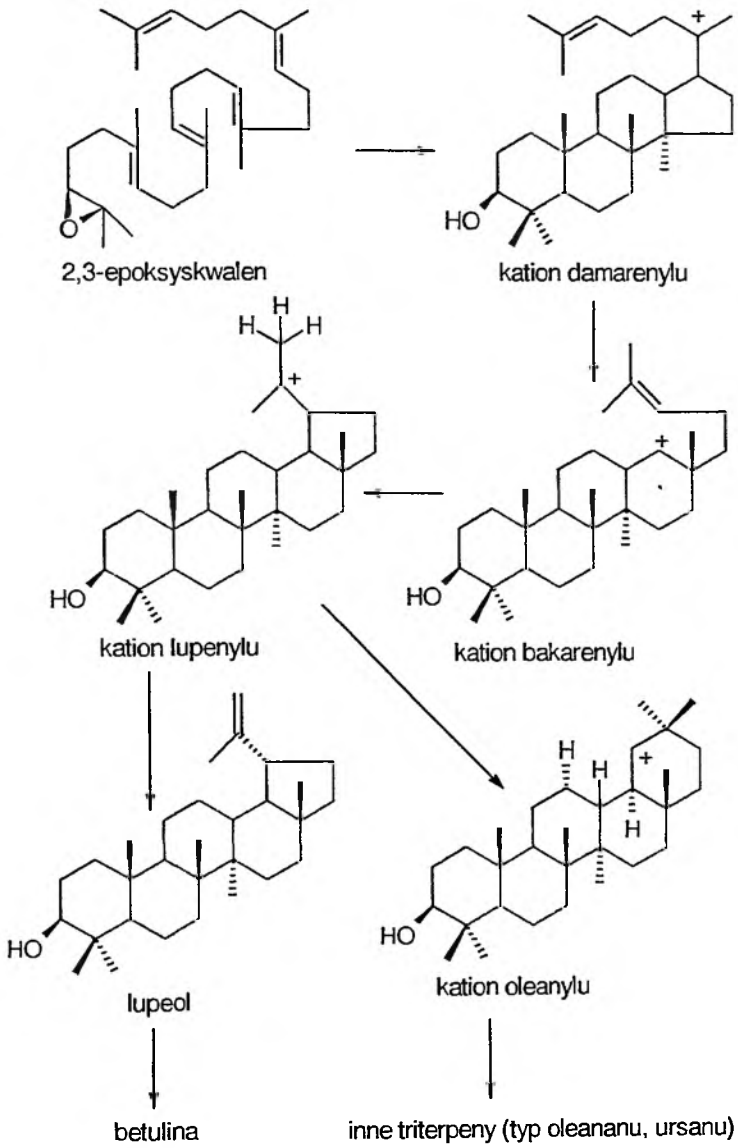
Dalsze etapy biosyntezy triterpenów pentacyklicznych (schemat 2) przebiegają z izomeryzacją kationu damarenylu do kationu lupenyłu, poprzez kation bakarenylu. Kation lupenyłu może podlegać dalszym reakcjom: utlenieniu z utworzeniem grup hydroksylowych, lub/i karbonylowych, przegrupowaniom Wagnera-McCormicka (migracja grup metyloowych), dehydrogenacji, bądź przekształceni do kationu olcanylowego, z którego powstają niektóre inne typy triterpenów jak np. ursan lub olcanan [18, 19].

Z kationu protosterylowego powstają steroidy zwierzęce w cyklu przemian przebiegających przez lanosterol, lub steroidy roślinne i triterpeny czterocykliczne poprzez cykloartenol (schemat 3) [18, 19].

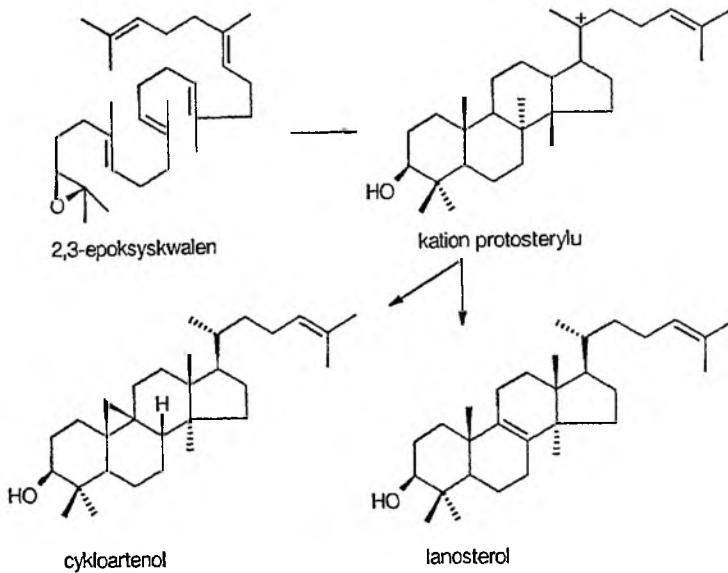
Znanych jest dotychczas 8 syntaz triterpenowych [20, 21], jednakże syntaza betuliny nie została dotychczas wyizolowana. Betulina powstaje prawdopodobnie w wyniku utlenienia lupocolu przez cytochrom P-450 [22].



Schemat 1



Schemat 2



Schemat 3

### 3. IZOLACJA

Betulina jest związkiem łatwo dostępnym a jej izolacja jest procesem łatwym, nie wymagającym wielkich nakładów finansowych. Wydziela się ją najczęściej z kory brzozejowej przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi jak: chloroform, chlorek metylenu, heksan, benzen, toluen, czy etanol.

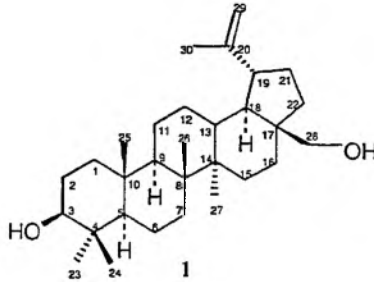
W Finlandii, w której udział kory brzozejowej w odpadach przemysłu drzewnego i papierniczego jest duży, opracowano metodę umożliwiającą izolację betuliny na skalę przemysłową; oszacowano, że przerób w tym kraju 200 tys. ton pulpy brzozejowej umożliwiłby wydzielenie 2500 ton betuliny rocznie [23]. Zmieloną w młynach kulowych korę poddaje się rozdziałowi flotacyjnemu. Lżejsze od wody frakcje lipidowo-triterpenowe zbiera się z powierzchni, ekstrahuje mieszaniną węglowodorów alifatycznych (LIAV200) i po odparowaniu rozpuszczalnika poddaje krystalizacji z azeotropu 2-propanol-woda lub 2-butanol-woda. W ten sposób z 1 kg zewnętrznej kory brzozy można otrzymać 180 g betuliny o czystości 95% [23].

Na skalę laboratoryjną najkorzystniejsza jest ekstrakcja w aparacie Soxhleta. W zależności od użytego rozpuszczalnika stopień czystości uzyskanego wyciągu jest różny. Najmniej zanieczyszczeń przechodzi do benzenu i toluenu, więcej do chlorku metylenu a najwięcej do chloroformu. Surowy związek poddaje się dalszemu oczyszczaniu przez wielokrotną krystalizację z etanolu, lub przeprowadza w diocjan, który po oddzieleniu od zanieczyszczeń hydrolizuje się do betuliny [2].

#### 4. BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE

Betulina – triterpen typu lupanu zbudowana jest z jednego pierścienia pięcioramionowego i czterech sześciocząłkowych o wzajemnej orientacji *trans-trans-trans-trans* [1, 2].

Z aktywnych ugrupowań posiada dwie grupy hydroksylowe i grupę izopropenylową przy C-19. Nazwa półsystematyczna to lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol (IUPAC 9CI) (**1**) [1].



Strukturę niektórych pochodnych betuliny potwierdzono rentgenograficznie. Na podstawie danych krystalograficznych określono, że ester benzylowy kwasu betulinowego ma konformację kopertową pierścienia cyklopentanowego (E) i krzesłowe pozostałych pierścieni (A–D) [16]. Analogiczną strukturę ma 3-ketobetulina [24]. 3-Ketopochodne allobetuliny, jak np.: 2 $\beta$ -bromo-3-ketoallobetulina, 2 $\beta$ -bromo-19 $\beta$ ,28-epoksy-18 $\alpha$ -olcanan-3-on [25], 3-ketoallobetulina (allobetulon) w stanie krystalicznym mają konformację pierścieni od A do E kolejno: łódka–krzesło–krzesło–krzesło–koperta, natomiast w roztworze pierścienie A tych związków występują w równowadze łódka–krzesło [26, 27].

#### 5. PRZEKSZTAŁCENIA CHEMICZNE

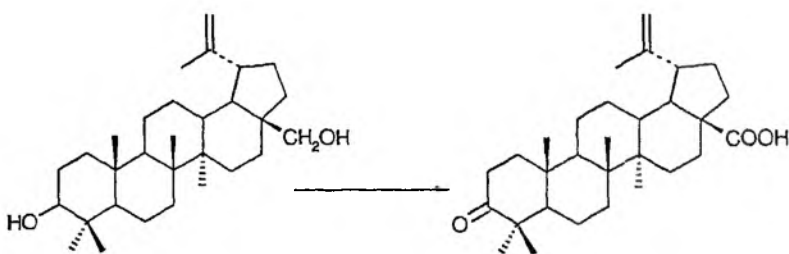
Opisywane w literaturze reakcje jakim może podlegać betulina obejmują nieliczne obecne w cząsteczce grupy funkcyjne: hydroksymetylową, hydroksylową, izopropenylową, lub grupy metylowe i rzadziej przekształcenia w obrębie pierścieni alicyklicznych.

##### 5.1. UTLENIANIE

Utlenianie betuliny może dotyczyć grup hydroksylowych, wiązania podwójnego lub szkieletu węglowego. Powszechnie wykorzystywanymi czynnikami utleniającymi są:  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{OsO}_4$ ,  $\text{SeO}_2$ ,  $\text{O}_3$  a także kwas chromowy w postaci: PCC, odczynnika Jonesa, lub stężonego, wodnego roztworu  $\text{CrO}_3$ .

Selektywne utlenianie betuliny do kwasu betulonowego jest najdogodniejszym sposobem otrzymania tego niezwykle interesującego pod względem właściwości biologicznych związku [3]. Pierwszy reakcję tę przeprowadził w 1938 r. von Ruzicka [28], przez utlenianie kwasem chromowym 3-octanu betuliny (otrzymanego w wyniku częściowej hydrolizy dioctanu betuliny). W trakcie tej reakcji tworzą się jednak różne, nie do końca zidentyfikowane produkty uboczne, m.in kwasy dikarboksyłowe, a całkowita wydajność reakcji jest niska – ok. 30% [28].

Podczas utleniania grupy hydroksylowej przy C-28 odczynnikiem Jonesa ( $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ) można otrzymać różne produkty w zależności od zastosowanych warunków. Gdy środowiskiem reakcji jest kwas octowy powstaje kwas betulonowy. Przeprowadzenie utleniania w acetonie lub przy użyciu łagodniejszych utleniaczy jak PCC (chlorochromian pirydyniowy), czy odczynnik Swerna (DMSO/chlorek oksalilu), umożliwiła otrzymanie aldehydu betulonowego. Niezabezpieczona grupa hydroksylowa przy C-3 ulega w obu przypadkach utlenieniu do ketonowej (schemat 4) [18, 29].



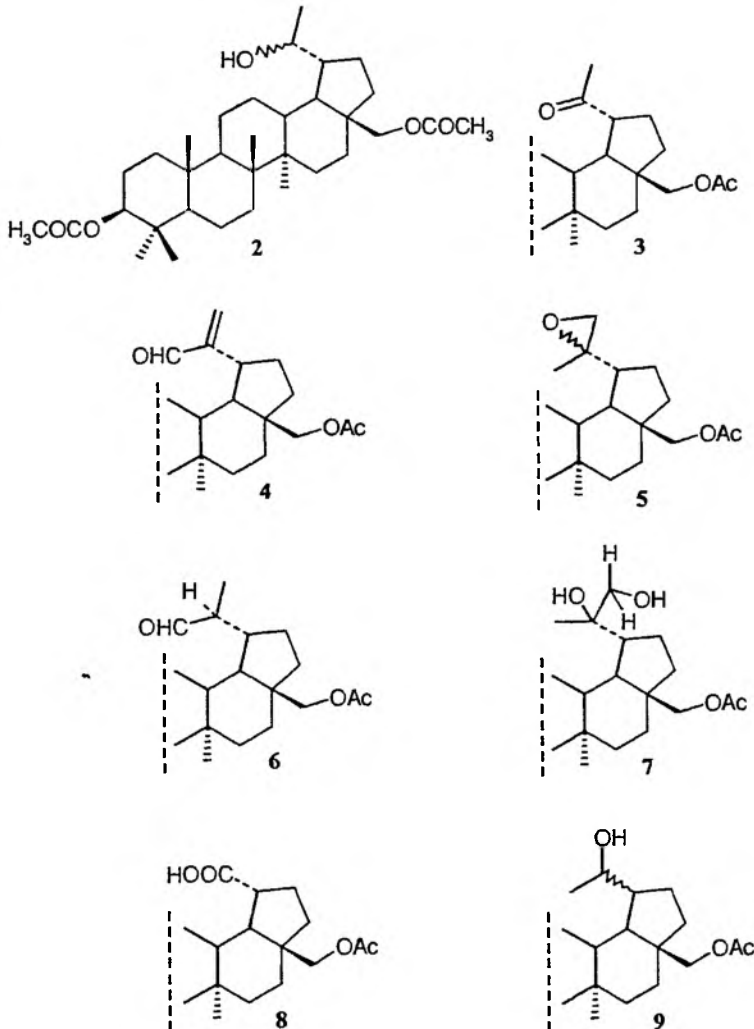
Schemat 4

Interesującym sposobem selektywnego utlenienia grupy hydroksylowej przy C-28 jest synteza opracowana przez Kima [30]. Pierwszorzędową grupę hydroksylową betuliny przeprowadza się w czterotetrahydropiranyłowy poprzez przyłączenie 2,3-dihydropiranu do betuliny w obecności 4-toluenosulfonianu pirydyniowego. Po acetylacji drugorzędowej grupy hydroksylowej i odczyszczeniu pierwszorzędowej, utlenia się ją do karboksylowej odczynnikami Jonesa; całkowita wydajność syntezy 54% [30].

Najwydajniejsza i nieco mniej skomplikowana jest metoda polegająca na utlenieniu betuliny mieszaniną  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$  do kwasu betulonowego a następnie selektywnej redukcji grupy ketonowej przy C-3 za pomocą tetrahydroboranu sodowego. Całkowita wydajność syntezy – ok. 70% [31]. Ilość powstającego w trakcie redukcji  $\alpha$ -izomeru kwasu betulonowego (epibetulonowego) zależy od rodzaju użytego rozpuszczalnika. W tetrahydrofuranie stosunek izomerów  $\alpha:\beta$  wynosi 5:95 [30], a w metanolu 15:75 [31]. Otrzymanie w przewodzie izomeru  $\alpha$  możliwe jest przy zastosowaniu do redukcji kwasu betulonowego odczynnika Meerweina-Verleya-Ponndorffa (izopropanolan glinu/alkohol izopropylowy) [32].



Grupa izopropenylowa betuliny dość łatwo utlenia się w obecności nadkwasów, chociaż reakcja ta nie przebiega całkiem typowo dla wiązania podwójnego. W obecności kwasu nadoctowego lub nadmirkowego nie powstają, jak możnaby oczekiwać 20,29-diole, ale dominuje tworzenie norpochodnych, czyli degradacja cząsteczki o jeden atom węgla. Produktami są głównie izomeryczne noralkohole (47%) (2), norketon (3%) (3) i nienasycony aldehyd (2,5%) (4) [33]. Zastosowanie łagodniejszego utleniacza jakim jest kwas mononadftalowy, umożliwiło wydzielenie produktu pośredniego, tj. mieszaniny izomerycznych oksiranów (5) [33]. Dalsze utlenianie tych epoksydów kwasem nadmirkowym daje identyczne produkty jak w przypadku utleniania betuliny kwasem nadoctowym [33]. Gdy utleniaczem jest kwas 3-chloronadbenzoesowy powstają nieco inne produkty – aldehyd (50%) (6) i spodziewany diol (40%) (7) [34].

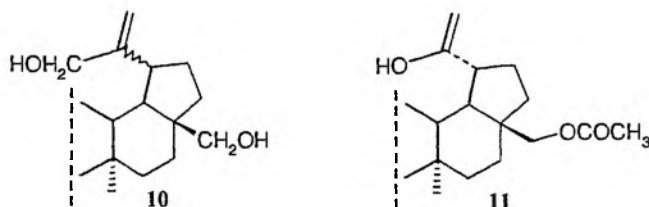


Dalsze utlenienie mieszaniny tych związków kwasem chromowym pozwala na uzyskanie samego norketonu **3** z dobrą wydajnością [33].

Norpo pochodne betuliny z grupą karbonylową przy C-20 (19-nor-19-acetylopo-chodne) (**3**) powstają z dobrą wydajnością (ok. 60%) w wyniku ozonolizy grupy izopropenylowej [35, 36, 37]. Dalsze utlenianie tych związków tlenkiem chromu (VI) w kwasie octowym powoduje usunięcie kolejnego atomu węgla i ostatecznie otrzymanie di-nor-związku z grupą karboksylową przy C-19 (**8**) [38].

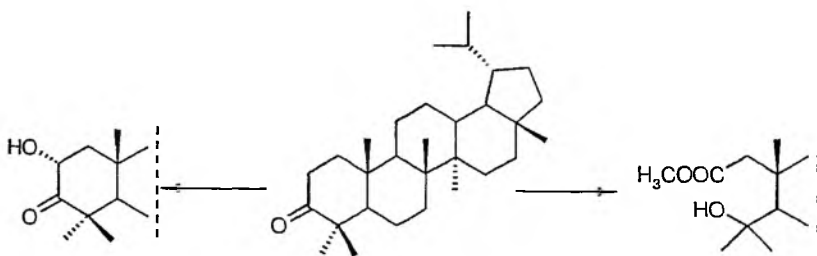
Zastosowanie nadtlenuku wodoru do utleniania grupy izopropenylowej umożliwia wprowadzenie grupy hydroksylowej z jednoczesną eliminacją atomu węgla przy C-20; z dioctanu betuliny po utlenieniu i hydrolizie powstaje 3,20,28-trihydrokso-20-nor-lupan (**9**) [23].

Gdy utleniaczem jest  $\text{OsO}_4$  powstają diole; z betuliny powstaje 20,29-dihydroksydihydrobetulina (**10**) [23].



$\text{SeO}_2$  w sąsiedztwie wiązania podwójnego wprowadza grupę aldehydową lub/i hydroksylową. W środowisku etanolu z dioctanu betuliny tworzą się: 3,28-diacetylo-20(29)-lupen-30-al. (**4**) (10,5%) i 3,28-diacetylo-30-hydrokso-20(29)-lupen (**11**) (9,4%) [36].

W bardziej polarnych rozpuszczalnikach (woda:dioksan:kwas octowy 2:2:1) reakcja przebiega lepiej – przykładowo z kwasu betulinowego powstaje kwas 3 $\beta$ -hydrokso-20(29)-lupen-30-al-28-karboksylowy z wydajnością 40%–70% [34].



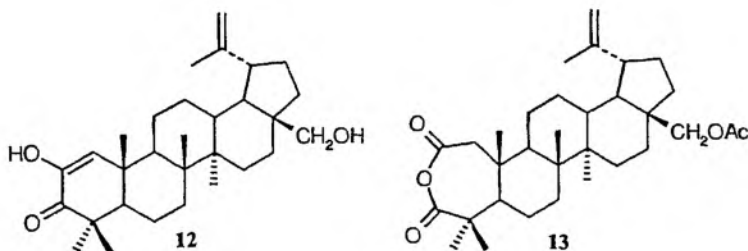
Schemat 5

Nadkwasę można również wykorzystywać do przekształcania pierścienia A – wprowadzenia dodatkowej grupy ketonowej lub jego otwarcia. Utlenianie nie posiadających wiązania podwójnego 20(29)-dihydro-3-ketopochodnych betuliny kwa-

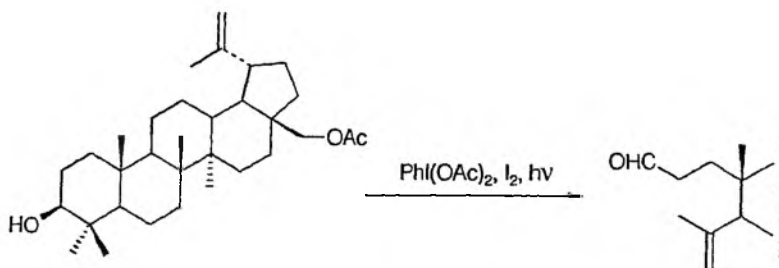
sem 3-chloronadbenzoesowym (*m*-CPBA) powoduje w zależności od warunków powstanie 3,4-sekopochnych (powstający przejściowo siedmioczłonowy pierścień w warunkach reakcji ulega otwarciu i tworzy się ester metylowy seko-kwasu), lub 2 $\alpha$ -hydroksy-3-ketonów. Gdy rozpuszczalnikiem jest metanol z dodatkiem kwasu siarkowego w ilości 0,01–0,1% (m/V) tworzą się głównie 2 $\alpha$ -hydroksypochnode. Obniżenie lub podwyższenie stężenia kwasu (z równoczesnym przedłużeniem lub skróceniem czasu reakcji) powoduje, że dominuje reakcja Bayera-Villigera i powstają sekozwiązki. Przykładowo przy stężeniu kwasu siarkowego 0,005% z 3-lupanonu tworzy się ester 3-metylowy kwasu 4-hydroksy-3,4-sekolupanowego (z otwartym pierścieniem A), a gdy stężenie kwasu wynosi 0,05% powstaje 2 $\alpha$ -hydroksy-3-lupanon (schemat 5) z wydajnościami: 45 i 67% [34].

Ponieważ nadkwasu utleniają wiązanie podwójne, wprowadzenie dodatkowej grupy karboksylowej do pierścienia A w obecności tego ugrupowania nie jest możliwe, stosuje się do tego celu inne reagenty. Utlenianie tlenem w obecności *tert*-butanolanu potasowego pozwala na wprowadzenie do pierścienia A 3-ketopochodnych betuliny **12** dodatkowej grupy ketonowej w pozycję 2.

Redukcja 2,3-diketobetuliny  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  z  $\text{TiCl}_4$  pozwala uzyskać pochodną 2,3-dikarboksylową [35], podczas gdy utlenianie tego diketonu nadtlenkiem wodoru w metanolowym roztworze KOH powoduje otwarcie pierścienia A i powstanie kwasu 2,3-*seko*-28-hydroksy-20(29)-lupen-2,3-dikarboksylowego, oraz jego mono-estrów metylowych jako produktów ubocznych [40]. Niezestryfikowany kwas dikarboksylowy w obecności bezwodnika octowego tworzy octan cyklicznego bezwodnika z siedmioczłonowym pierścieniem A (**13**) [39].



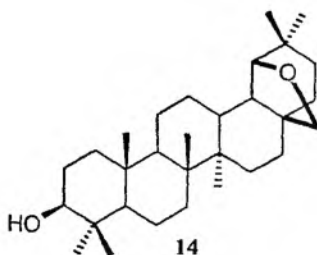
Użycie odczynnika Suareza pozwala również na rozszczepienie pierścienia A betuliny. Reakcja ta polega na naświetlaniu roztworu 28-octanu betuliny w heksanie z dodatkiem jodu i diacetoksyjodobenzenu (schemat 6) [41].



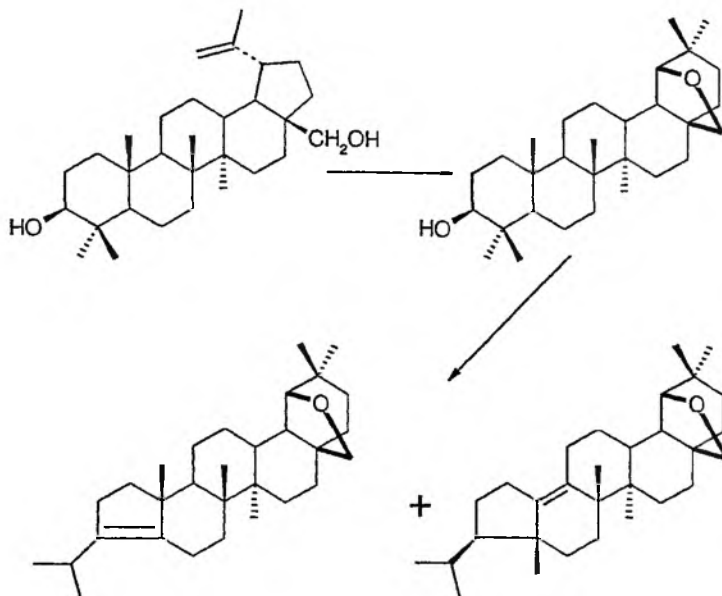
Schemat 6

## 5.2. IZOMERYZACJA

Grupa izopropenyłowa i hydroksymetyłowa znajdują się względem siebie w pozycji *trans*, jednak na tyle blisko, że możliwa jest reakcja pomiędzy nimi. Pierwszorzędowa grupa hydroksylowa betuliny dość łatwo tworzy wiązanie eterowe z ugrupowaniem izopropenyłowym, czemu towarzyszy równocześnie przegrupowanie pierścienia E i powstanie związku terpenowego o sześciu pierścieniach – allobetuliny, tj.  $19\beta,28$ -epoksy- $18\alpha$ -oleanan- $3\beta$ -olu (**14**).

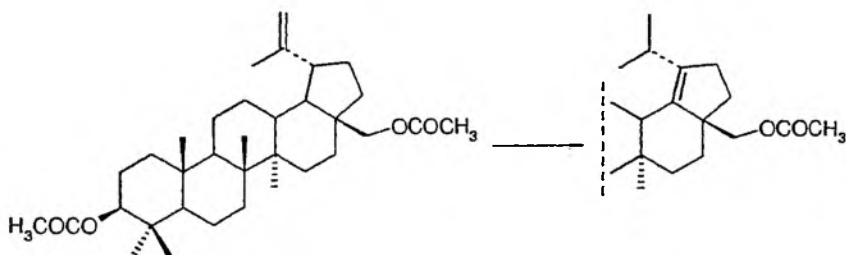


Tworzenie takiego eteru katalizowane jest kwasami, np. roztworem chlorowodoru w etanolu lub chloroformie, czy też gorącym stężonym kwasem mrówkowym. W tym ostatnim przypadku, obok allobetuliny tworzy się głównie jej 3-mrówczan i inne nieokreślone produkty uboczne [42]. Izomeryzacja betuliny jak i jej 3-octanu, czy też 3-ketobetuliny do odpowiednich allozwiązków zachodzi prawie ilościowo pod wpływem siarczanu dimetylu (ok. 80%) [43]. Cyklizację tę katalizują również stałe katalizatory kwasowe, jak: kaolinit, montmorylonit K10 lub KSF, żel krzemionkowy z kwasem siarkowym, lub *p*-toluenosulfonowym. Reakcję przeprowadza się przez ogrzewanie triterpenu z katalizatorem w chlorku metylenu w temperaturze wrzenia, przez 0,5–6 h. Gdy grupa hydroksylowa przy C-3 jest niepodstawiona, izomeryzacji towarzyszy dehydratacja i przegrupowanie pierścienia A – z betuliny, poprzez allobetulinę powstaje mieszanina izomerów (schemat 7) [44].



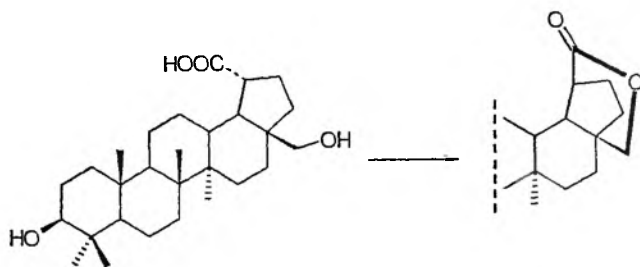
Schemat 7

Lepszymi katalizatorami stałymi są  $\text{FeCl}_3$  lub  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  na żelu krzemionkowym lub tlenku glinowym. Ich użycie nie wymaga wcześniejszego zabezpieczenia grupy hydroksylowej przy C-3 a proces zachodzi w ciągu 5–15 min. Dłuższe jednak ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej w obecności  $\text{FeCl}_3$  na  $\text{SiO}_2$  lub  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (przez ok. 2 h) powoduje dehydratację i powstanie mieszaniny izomerów opisanych wyżej, lub 3-ketoallobetuliny w przypadku, gdy katalizatorem jest  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  na  $\text{SiO}_2$  [45]. Bromowodór również katalizuje izomeryzację betuliny do allobetuliny, jednak wydajność takiego przekształcenia jest niewielka, a podczas reakcji powstaje wiele innych niepożądanych produktów [42]. Gdy grupa hydroksylowa przy C-28 jest zabezpieczona, np. zacetylowana, wówczas bromowodór powoduje jedynie migrację wiązania podwójnego z grupy izopropenylowej do pentacyklicznego pierścienia E między C-18 a C-19, bez jego powiększenia czy powstania epoksydu (schemat 8) [23].



Schemat 8

Izomeryzacji ulegają łatwo również pochodne betuliny. Np. w wyniku reakcji laktonizacji 20,29-dinor-19-karboksybetuliny w bezwodniku octowym z dodatkiem kwasu *p*-toluenosulfonowego zachodzi epimeryzacja grupy karboksylowej przy węglu C-19 (przechodzi ona ponad płaszczyznę pierścienia) i tworzy się czteroczłonowy pierścień laktonowy (schemat 9) [38].

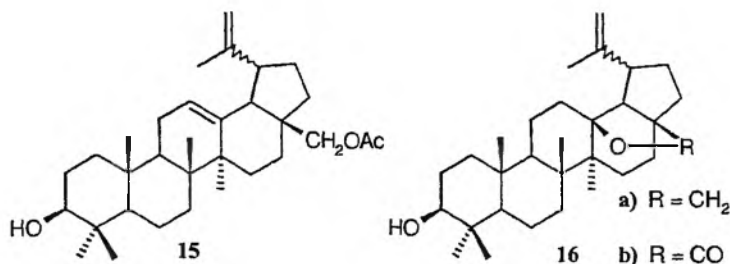


Schemat 9

Grupę ketonową z pozycji 3 można w warunkach reakcji Willgerodta-Kindlera (przez ogrzewanie w temperaturze wrzenia 3-ketozwiązku w morfolinie z dodatkiem siarki) przenieść w pozycję 2 (mechanizm reakcji jest nieznany) [46].

### 5.3. DEHYDROGENACJA

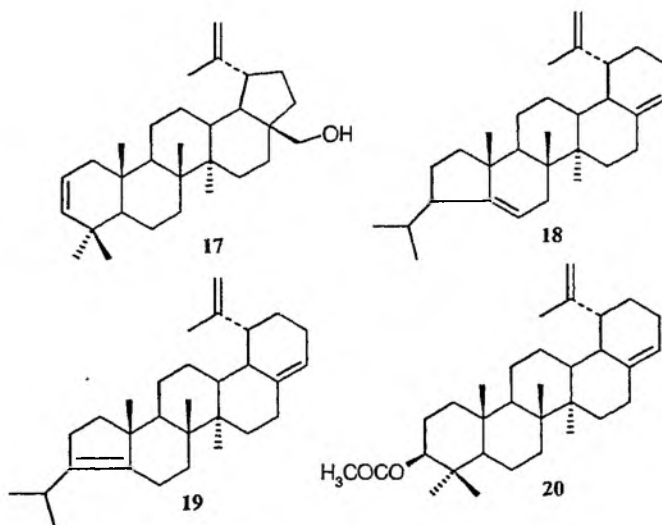
Dehydrogenacja betuliny octanem rtęci (II) w mieszaninie chloroform–kwas octowy pozwala na wprowadzenie dodatkowego wiązania podwójnego. Reakcja dehydrogenacji betuliny jest niezależna od obecności wolnych bądź związanych grup hydroksylowych w cząsteczce, ale do jej zajścia niezbędna jest obecność wiązania podwójnego [47]. W wyniku tego utleniania zostaje utworzone dodatkowe wiązanie podwójne, pomiędzy C-12 a C-13 (**15**). Gdy grupa hydroksymetylowa (lub karboksylowa) przy C-17 jest niezabezpieczona, reakcji odwodornienia towarzyszy utworzenie dodatkowego pierścienia cyklicznego eteru (estru). Cyklizacja ta katalizowana jest kwasem obecnym w środowisku reakcji. Z betuliny powstaje epoksyd 13 $\beta$ ,28-epoksy-20(29)-lupen-3 $\beta$ -ol (**16a**), natomiast z kwasu 3-acetylobetuliny tworzy się lakton **16b**. Podstawienie funkcji hydroksylowej lub karboksylowej przy C-28 uniemożliwia zajście cyklizacji i powoduje jedynie wprowadzenie wiązania podwójnego do wyjściowej cząsteczki. Z dioctanu betuliny tworzy się terpen z dodatkowym wiązaniem podwójnym w pierścieniu C 3 $\beta$ ,28-diacetoksy-lupa-12,20(29)-dien [47]. Podobnie przebiega dehydrogenacja 20(29)-lupenu, 20(29)-lupen-3-onu, i estru 3-hydroksy-20(29)-lupenu (związki te nie posiadają grupy hydroksylowej przy C-28) [48]. Konfiguracja grupy izopropenyłowej powyższych związków nie została potwierdzona.



#### 5.4. DEHYDRATACJA

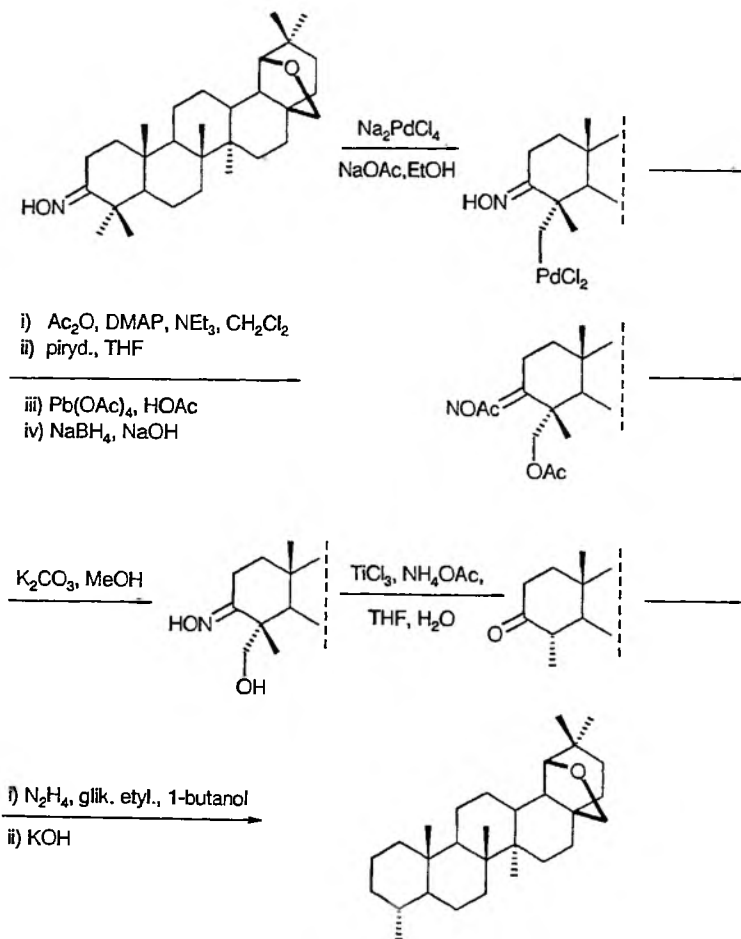
Odszczepieniu grup hydroksylowych towarzyszy utworzenie wiązania podwójnego lub przegrupowanie cząsteczki triterpenu. Drugorzędowa grupa hydroksylowa przy C-3 łatwo ulega odszczepieniu w reakcji Mitsunobu z utworzeniem wiązania podwójnego między C-2 i C-3. Roztwór betuliny w bezwodnym THF z trifenyllofosfiną dodaje się do 1,1'-azobis-(*N,N'*-dimetyloformamidu) (azodikarboksyłan dietylowy – ang. DEAD) na łaźni lodowej w atmosferze azotu (**17**) [9]. Użycie silnego czynnika odwadniającego, jakim jest  $\text{POCl}_3$  w pirydynie powoduje odszczepienie obydwu grup hydroksylowych betuliny i utworzenie podwójnych wiązań z jednoczesnym przegrupowaniem Wagnera-Meerweina w pierścieniu A oraz E, tj.: A-nor-19-izopropyllooleanan-5(6), 17(22)-dienu (**18**).

Obecność lub brak wiązania podwójnego **20(29)** nie ma wpływu na zachodzące przegrupowanie. Selektywna dehydratacja umożliwia zmodyfikowanie każdego z pierścieni z grupą hydroksylową (A lub E) z osobna [49].



Inną stosowaną metodą odszczepienia grup hydroksylowych z wprowadzeniem wiązań podwójnych jest solwoliza pochodnych tosylowych. W wyniku acetolizy 3-podstawionych związków w bezwodnym kwasie octowym z octanem sodu powstaje mieszanina A-nor-izomerów z wiązaniami podwójnymi 3(5) **18** i 5(6) **19**, natomiast odszczepieniu grupy tosylovej przy C-28 w tych samych warunkach towarzyszy powstanie tylko jednego wiązania podwójnego z przegrupowaniem pierścienia E (**20**) [49].

Zmiana warunków hydrolizy prowadzi do otrzymania innych produktów. W wyniku solwolizy 3-tosylovej pochodnej kwasu betulinowego w układzie DMF/AcONa nie dochodzi do przegrupowania Wagnera-Meerweina jak w przypadku acetolizy, a powstające wiązanie podwójne wprowadzone jest między C-2 i C-3 (powstaje kwas 2(3), 20(29)-lupadieno-28-karboksylowy) [35, 50].



Schemat 10



Mechanizm omawianych reakcji polega prawdopodobnie na utworzeniu nietrwałych, szybko ulegających przegrupowaniu karbokationów. Badania konfiguracyjne dehydratacji 3-acetylohidrobetuliny wykazały, że w reakcji tej nie biorą udziału atomy C-18 i C-19 [51]. Odszczepienie grupy hydroksylowej za pomocą  $\text{POCl}_3$  jest reakcją typu E2, podczas gdy solwoliza pochodnych tosylowych częściowo E-1 [49], co może wyjaśniać powstawanie izomerów w tym drugim przypadku.

Opisywane są również w literaturze przekształcenia betuliny umożliwiające uzyskanie z niej norpochodnych typu oleananu. W wyniku skomplikowanej syntezy z oksymu 3-ketoallobetuliny otrzymano 19,28-epoksy-24-nor-18 $\alpha$ -oleanan (schemat 10), triterpen występujący w niektórych złożach organicznych, np. w ropie naftowej z kanadyjskiej części Morza Beauforta [52].

## 5.5. UWODORNIENIE

Hydrogenacja wiązania podwójnego zachodzi z bardzo dobrą wydajnością przez bezpośrednie przyłączenie wodoru przy udziale katalizatora. Najczęściej jest to pallad na węglu aktywnym [53] lub tlenek platyny (katalizator Adamsa) [54]. Redukcję tą przeprowadza się w kwasie octowym zatem grupa hydroksylowa przy C-28 wymaga zabezpieczenia, aby nie zachodziła izomeryzacja cząsteczki do allobetuliny.

Homogeniczne uwodornienie/deuterowanie można przeprowadzić przy użyciu katalizatora Wilkinsona, tj. kompleksu chloro-*tris*(trifenylfosfina)rodu(I). Metoda ta pozwala na selektywną redukcję wiązań egzocyklicznych wobec endocyklicznych, czy wprowadzonej grupy nitrylowej z wydajnością prawie ilościową [55].

## 5.6. PODSTAWIONE POCHODNE

### 5.6.1. Estry

Betulina ulega stosunkowo łatwo reakcji estryfikacji, aczkolwiek z porównania stałych szybkości estryfikacji chlorkiem benzoilu wynika, że pierwszorzędowa grupa hydroksylowa tego związku (C-28) jest 25 razy mniej reaktywna niż w innym diolu – glikolu ctylenowym, a drugorzędowa grupa hydroksylowa betuliny (C-3) jest czterokrotnie mniej reaktywna od pierwszorzędowej [56]. Różnica reaktywności grup hydroksylowych w obrębie cząsteczki również zaznacza się dość wyraźnie – drugorzędowa grupa hydroksylowa przy C-3 wolniej ulega estryfikacji (trudniej hydrolizic) niż pierwszorzędowa przy C-28. Wykorzystuje się to niekiedy do syntezy 3-cstrów betuliny, przez częściową hydrolizę pochodnych diestrowych. Hydrolizę diestru przeprowadza się na zimno stosując stechiometryczną w stosunku do odłą-

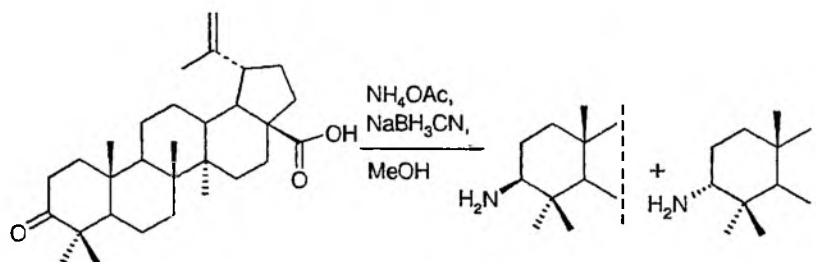
czanej cząsteczki kwasu ilość alkoholowego roztworu wodorotlenku lub węgla litowca [28].

Niektóre 28-monoestry można otrzymać przez działanie na zimno w temp. 0°C roztworem bezwodnika kwasowego w pirydynie na betulinę [57].

Diestry otrzymuje się przy użyciu nadmiaru odpowiedniego bezwodnika lub chlorku kwasowego w obecności pirydyny i niekiedy 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatorów. Do estryfikacji nie można stosować kwasów, gdyż powodują one izomeryzację w obrębie pierścienia E. Przykładowo w reakcji betuliny z kwasem mrówkowym powstaje 3-mrówczan allobetuliny [42, 43].

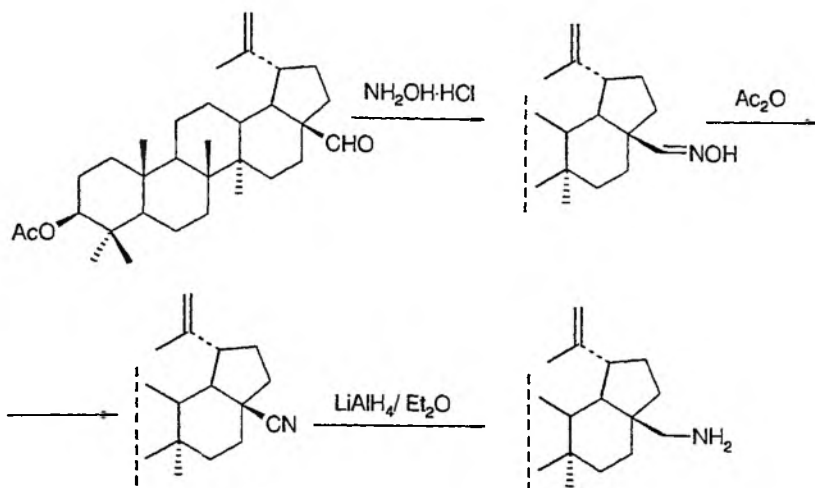
### 5.6.2. Związki azotowe

Wymiana zmodyfikowanych funkcji tlenowych betuliny na inne jest raczej łatwe. Kwas betulonowy (3-ketobetulonowy) w reakcji reduktywnej aminacji octanem amonowym w obecności  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  w metanolu daje z wydajnością ok. 60% mieszaninę izomerów kwasu 3-aminobetulonowego z przewagą formy  $\beta$  (stosunek  $\beta$ : $\alpha$  95:5) (schemat 11) [29].



Schemat 11

W reakcji pochodnych betuliny posiadających funkcję karbonylową (3-ketobetuliny lub aldehydu betulonowego) z chlorowodorkiem hydroksyloaminy lub metoksyloaminy w etanolowym roztworze NaOAc tworzą się odpowiednie oksymy [29], które łatwo ulegają przekształceniu do nitryli. Przykładowo 28-oksym 3-octanu aldehydu betulonowego podczas acetylowania na gorąco przekształca się w 3-octan nitrylu kwasu betulonowego, który po zredukowaniu daje 28-amino pochodną (acetylo-28-aminolup-20(29)-en) (schemat 12) [58].



Schemat 12

### 5.6.3. Połączenia z aminokwasami

Amidowe połączenia kwasu betulinowego z aminokwasami posiadają niekiedy silniejsze właściwości cytostatyczne wobec niektórych linii nowotworowych niż sam kwas betulinowy. Ich zaletą jest także nieco lepsza rozpuszczalność w wodzie - od 5 do 100 krotnie większa w stosunku do praktycznie nierozpuszczalnego kwasu betulinowego [5]. Związki te otrzymywane są w reakcji kwasu betulinowego z estrami metylowymi aminokwasów jak: fenyloalanina, tyrozyna, glicyna, metionina, tryptofan, izoleucyna, leucyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, alanina, prolina i walina w obecności 1,3-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i dimetyloaminopirydyny (DMAP) w temp. pokojowej w atmosferze azotu; grupę metylową odszczepia się przez hydrolizę roztworem LiOH w mieszaninie THF/H<sub>2</sub>O [5].

### 5.6.4. Glikozydy

Wydajną glikozylację można przeprowadzić łącząc stechiometrycznie acetylowane glikale z odpowiednim triterpenem w obecności LiBr i protonowanej sulfonowej żywicy jonowymiennej jako katalizatorów w bezwodnej mieszaninie chlorku metylenu z acetonitrylem (1:1). Ze względu na obecność kwasu, grupa hydroksylowa przy C-28 wymaga uprzedniego zabezpieczenia.

W opisany wyżej sposób otrzymano dotychczas dwa 3β-glikozydy betuliny z 2-deoksy-α-L-arabinozą i 2,6-dideoksy-α-L-arabinozą [59].

## 6. PRZEKSZTAŁCENIA BIOTECHNOLOGICZNE

W hodowlach zawiesinowych niektóre mikroorganizmy zdolne są do przekształcania kwasu betulinowego do hydroksy- i ketopochodnych. Metabolity kwasu betulinowego z hodowli *Bacillus megaterium* ATCC 14581 to: kwas 3-ketobetulino-owy (3-keto-20(29)-lupen-28-karboksyloowy), kwas 7 $\beta$ -hydroksybetulino-owy (również otrzymany z hodowli *Mucor mucedo* UI-4605) i kwas 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksybetulino-owy. Szczep *Cunninghamella elegans* ATCC 9244 syntezuje kwas 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroksybetulino-owy [60]. Przeprowadzono również glikozydację kwasu betulinowego do 28- $\beta$ -D-glukopiranozyloestru przy pomocy szczepu grzybów *Cunninghamella* sp. NRRL 5695 jednak z bardzo małą wydajnością – 0,77%. Otrzymany glikozydo-ester kwasu betulinowego w przeciwieństwie do wolnego triterpenu nie wykazuje aktywności wobec wielu linii czerniaka ludzkiego [61].

Betulina od ponad dwustu lat jest przedmiotem zainteresowania chemików a w ostatnim czasie również farmaceutów. Związek ten o ciekawej, skomplikowanej strukturze w przeciwieństwie do większości substancji naturalnych, można pozyskiwać w dużych ilościach, nawet na skalę przemysłową.

Betulina i jej pochodne posiadają interesujące właściwości biologiczne, w tym przeciwnowotworowe. Aktywność tych substancji jest wyraźna w pikomolarnym zakresie stężeń, a ich toksyczność jest z reguły bardzo mała. Dzięki tym cechom, triterpen ten stanowi bardzo dobry materiał wyjściowy do dalszych poszukiwań wysoce aktywnych środków farmakologicznych i prace takie są już podejmowane w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.D. Connolly, R.A. Hill, *Dictionary of Terpenoids*, 1-st ed., Chapman & Hall, London, NY, Tokyo, Melbourne, Madras, 1991.
- [2] E.W. Hayek, U. Jordis, W. Moche, F. Sauter, *Phytochem.*, 1989, **28**, 2239.
- [3] E. Pisha, H. Chai, I.S. Lee, T.E. Chagwedera, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, C.W. Belcher, H.H. Fong, A.D. Kinghorn, D.M. Brown, M.C. Wani, M.T. Wall, T.K. Gupta, J.M. Pezuto, *Nat. Med.*, 1995, **1**, 1046.
- [4] V. Zuco, R. Supino, S. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli. *Canc. Lett.*, 2002, **175**, 17.
- [5] H.J. Jeong, H.B. Chai, S.Y. Park, D.S. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 1201.
- [6] S. Fulda, I. Jeremias, H.H. Steiner, T. Pietsch, K.M. Debatin, *Int. J. Cancer*, 1999, **82**, 435.
- [7] W. Wick, C. Grimmel, B. Wagenknecht, J. Dichgans, M. Weller, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, **289**, 1306.
- [8] G.M. Koenig, A.D. Wright, S.G. Franzblau, *Planta Med.*, 2000, **66**, 337.
- [9] I.C. Sun, J.K. Shen, H.K. Wang, L.M. Cosentino, K.H. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 1267.
- [10] Y. Kashiwada, T. Nagao, A. Hashimoto, Y. Ikeshiro, H. Okabe, L.M. Cosentino, H.K. Lee, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 1619.

- [11] L. Vidya, P. Varalakshmi, *Fitoter.*, 2000, **71**, 535.
- [12] P.K. Mukherjee, K. Saha, J. Das, M. Pal, B.P. Saha, *Planta-Med.*, 1997, **63**, 367.
- [13] S.Y. Ryu, M.H. Oak, S.K. Yoon, D.I. Cho, G.S. Yoo, T.S. Kim, K.M. Kim, *Planta Med.*, 2000, **66**, 358.
- [14] A.L.P. de Miranda, J.R. Silva, C.M. Rezende, J.S. Neves, S.C. Parrini, M.L. Pinheiro, M.C. Cordeiro, E. Tamborini, A.C. Pinto, *Planta Med.*, 2000, **66**, 284.
- [15] J.C. Steele, D.C. Warhurst, G.C. Kirby, M.S. Simmonidis, *Phytother. Res.*, 1999, **13**, 115.
- [16] G. Bringmann, W. Saeb, L.A. Assi, G. Francois, A.S. Narayanan, K. Peters, E.M. Peters, *Planta Med.*, 1997, **63**, 255.
- [17] A. White, J.E. Horsington, N. Nedjar, T.M. Peakman, J.A. Curiale, *Tetr. Lett.*, 1998, **39**, 3031.
- [18] H.W. Kircher, *Phytochem.*, 1980, **19**, 2707.
- [19] G. Samuelson, *Drugs of Natural Origin*, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 1999.
- [20] Y.K. Kim, S.K. Yoon, S.Y. Ryu, *Planta Med.*, 2000, **66**, 485.
- [21] J.B. Herrera, B. Bartel, W.K. Wilson, S.P. Matsuda, *Phytochem.*, 1998, **49**, 1905.
- [22] T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, Y. Ebizuka, *Tetrah. Lett.*, 2000, **41**, 7705.
- [23] P. Jääskeläinen, *Pap. Puu*, 1981, **10**, 599.
- [24] J. Klinot, J. Podlaha, J. Podlahová, K. Malý, V. Petříček, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1989, **54**, 725.
- [25] J. Novotny, J. Podlaha, J. Klinot, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1993, **58**, 2737.
- [26] J. Klinot, J. Podlaha, J. Podlahová, S. Hilgard, E. Klinotová, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1989, **54**, 737.
- [27] M. Budešínský, J. Klinot, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1989, **54**, 1928.
- [28] L. von Ruzicka, A.H. Lambertson, E.W. Christie, *Helv. Chim. Acta*, 1938, **21**, 1706.
- [29] D.S. Kim, J.M. Pezzuto, E. Pisha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 1707.
- [30] D.S.H. Kim, Z. Chen, van T. Nguyen, J.M. Pezzuto, S. Qiu, Z.Z. Lu, *Synth. Commun.*, 1997, **27**, 1607.
- [31] L.B. Son, A.P. Kaplun, A.A. Spilevskii, I.E. Andii-Pravdivyi, S.G. Alekseeva, V.B. Gribor'ev, V.I. Shvets, *Bioorg-Khim.*, 1998, **24**, 787.
- [32] G. Ourisson, P. Crabbé, *Les triterpenes tétracycliques*, Hermann Paris, 1961, s. 26.
- [33] J. Klinot, N. Hovorkov, A. Vystrčil, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1970, **35**, 1105.
- [34] A. Dinda, A.K. Hajra, S.K. Das, G. Chel, R. Chakraborty, *Indian J. Chem.*, 1995, **34B**, 624.
- [35] M. Evers, C. Poujade, F. Soler, Y. Ribeill, C. James, Y. Lelievre, J.C. Gueguen, D. Reisdorf, I. Morize, R. Pauwels, E. De Clercq, Y. Henin, A. Bousseau, J.F. Mayaux, J.B. Le-Pecq, N. Dereu, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1056.
- [36] A.G. Gonzalez, I.A. Jimenez, A.G. Ravelo, *Phytochem.*, 1992, **31**, 2069.
- [37] F.A. Macias, A.M. Simonet, M.D. Esteban, *Phytochem.*, 1994, **36**, 1369.
- [38] A. Vystrčil, M. Budešínský, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1970, **35**, 312.
- [39] J. Sejbal, J. Klinot, A. Vystrčil, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1987, **52**, 1052.
- [40] M. Endova, E. Klinotová, J. Sejbal, B. Máca, J. Klinot, J. Protiva, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1993, **58**, 1420.
- [41] Y. Deng, J.K. Snyder, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 2864.
- [42] Beilstein E II 6, 938.
- [43] E. Linkowska, *Polish J. Chem.*, 1994, **68**, 875.
- [44] T.S. Li, J.X. Wang, X.J. Zheng, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1989, **1**, 3957.
- [45] S. Lavoie, A. Pichette, F.X. Garneau, M. Girard, D. Gaudet, *Synth. Commun.*, 2001, **31**, 1565.
- [46] J. Sejbal, E. Klinotová, M. Bludská, J. Klinot, M. Budešínský, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1989, **54**, 1036.
- [47] J.M. Allison, W. Lawrie, J. McLean, G.R. Taylor, *J. Chem. Soc.*, 1961, 3353.

- [48] J.M. Allison, W. Lawrie, J. McLean, J.M. Beaton, *J. Chem. Soc.*, 1961, 5224.
- [49] A.S.R. Anjaneyulu, M.N. Rao, A.S. Murty, V.S. Murty, *Indian Journ. of Chem.*, 1980, **19B**, 735.
- [50] T.V. Loc, T.V. Sung, G. Kamperdick, G. Adam, *J. Prakt. Chem.*, 2000, **342**, 63.
- [51] A. Vystrčil, V. Křeček, M. Budešňnský, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1974, **39**, 3131.
- [52] A. White, J.E. Horsington, N. Nedjar, T.M. Peakman, J.A. Curiale, *Tetr. Lett.*, 1998, **39**, 3031.
- [53] J.M. Lehn, G. Ourisson, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, 1133.
- [54] J. Klinot, J. Světlý, E. Klinotová, A. Vystrčil, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1985, **50**, 2918.
- [55] J. Protiva, L. Lepša, E. Klinotová, J. Klinot, V. Křeček, A. Vystrčil, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1981, **46**, 2734.
- [56] V.V. Vasnev, I.N. Konkina, V.V. Korshak, S.V. Vinogradova, *Makromol. Chem.* 1987, **188**, 683.
- [57] N.I. Uvarova, G.I. Oshitok, G.B. Elyakov, *Carbohydr. Res.*, 1973, **27**, 79.
- [58] U. Wrzeciono, H. Dembczyńska, *Ann. Soc. Chim. Polonorum (Rocz. Chem.)*, 1969, **43**, 1407.
- [59] O.B. Flekhter, L.A. Baltina, G.A. Tolstikov, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 992.
- [60] S.A. Kouzi, P. Chaterjee, J.M. Pezzuto, M.T. Hamann, *Appl. & Environm. Microbiol.*, 2000, **66**, 3850.
- [61] G. Matthee, A.D. Wright, G.M. Koenig, *Planta Med.*, 1999, **65**, 493.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lipca 2002

**BIOLOGICZNIE AKTYWNE POCHODNE  
1,8-NAFTYRYDYNY**

**BIOLOGICALLY ACTIVE 1,8-NAPHTHYRIDINE  
DERIVATIVES**

**Piotr Suryło, Piotr Kowalski, Magdalena Hołda**

*Institut Chemii i Technologii Organicznej, Politechnika Krakowska  
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków  
tel. (12) 628 27 22, fax: (12) 628 20 37, e-mail: kowapi@usk.pk.edu.pl*

---

**Abstract**

**Wprowadzenie**

1. Pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu przeciwbakteryjnym
  - 1.1. Chinolony
  - 1.2. Fluorochinolony
  - 1.3. Inne pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu przeciwbakteryjnym
2. Pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu przeciwmalarycznym
3. Pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu na układ krążenia
4. Pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu diuretycznym
5. Pochodne 1,8-naftyrydyny o działaniu przeciwnowotworowym
6. Pochodne 1,8-naftyrydyny o różnym działaniu biologicznym

**Podsumowanie**

**Piśmiennictwo cytowane**

---

**Dr inż. Piotr Suryło** w 1994 roku ukończył Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Obecnie jest asystentem w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej tej uczelni. Specjalność – chemia organiczna.

**Dr hab. inż. Piotr Kowalski** w 1971 roku ukończył Wydział Chemiczny Politechniki Krakowskiej, a w roku 1977 na tej Uczelni uzyskał stopień doktora. W 1996 roku na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu otrzymał stopień doktora habilitowanego.

Od 1998 roku jest profesorem Politechniki Krakowskiej. Specjalność – chemia organiczna.

**Mgr inż. Magdalena Holda** w 2001 roku ukończyła Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Obecnie jest wolnym słuchaczem Studiów Doktoranckich Uniwersytetu Jagiellońskiego.



## ABSTRACT

This review attempts to briefly summarise the recent developments in the synthesis and application of 1,8-naphthyridine derivatives as biological active compounds. A large number of these compounds still evolves interest of chemists and pharmacologists. From among of one thousand papers, which appeared within the last fifteen years, most described applications of 1,8-naphthyridine derivatives as biologically active compounds.

Nalidixic acid (**1**) was the first 1,8-naphthyridine derivative approved as the drug with antibacterial activity. There are many routes to the synthesis of nalidixic acid. The main routes are presented in the Schemes 1, 4, and 6. This compound was the first from the quinolone's family applied as the chemotherapeutic drug. Modification of the structure of nalidixic acid brought the discovery of a new group of most potent antibacterial compounds called fluoroquinolones. Enoxacin (**16**), esafloxacin (**21**), tosulfoxacin (**22**), trovafloxacin (**23**) and alatrofloxacin (**24**) are the examples of 1,8-naphthyridine derivatives belonging to that group. General reaction scheme of synthesis of **16** and **21** is similar to synthesis of nalidixic acid (Scheme 7), while synthesis of the compounds **22**, **23**, and **24** presented in Scheme 8 is quite different. Moreover, many other 1,8-naphthyridine derivatives **31–40** have been intensively studied as antibacterial agents *in vitro*, but none of them has been applied as a drug.

A number of 2- and 7-substituted 1,8-naphthyridines **41** showed some antimalarial activity *in vivo* [28], while the compounds of general structure **42** were found inactive [29].

2(4)-Piperazinyl-1,8-naphthyridines (**45**) have been pharmacologically investigated for their antihypertensive activity [33–35]. 1,8-Naphthyridines **46**, bearing a phenyl group in position 2, were found to be selective antagonists for the A<sub>1</sub> adenosine receptor subtype [36].

A series of 1,8-naphthyridines **47–49** exhibited appreciable diuretic and antihypertensive activity in rats [37–39].

In search for potential anticancer compounds study such as SAR (structure activity relationship) and QSAR (quantity structure activity relationship) have been used. As the result of the research the structure of the compounds **50** has established as the most potent inhibitor of tubulin polymerization. The nitrobenzo-1,8-naphthyridines (**52**) constitute a group of potential interest for the design of new cytotoxins [41].

Moreover, 1,8-naphthyridine derivatives have been found to be active as inhibitors of platelet aggregation agents **53–54** [42, 43]; antiviral **56–57** [45, 46] and antiallergic agents **62** [50, 51]. These derivatives possess bronchodilating **64** [52, 53], anti-inflammatory and sedative properties **67** [54–57].

## WPROWADZENIE

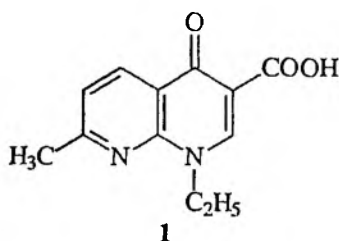
Pochodne 1,8-naftyrydyny i jej izomerów stanowią grupę połączeń, którym w ostatnich piętnastu latach poświęcono ponad tysiąc publikacji. Liczną grupę tych prac stanowią opisy patentowe wielokierunkowego zastosowania ich pochodnych. Najczęściej jednak cytowane są prace poświęcone biologicznym właściwościom pochodnych 1,8-naftyrydyny [1, 2].

Na światowym rynku farmaceutycznym, oprócz uznanych już chemioterapeutyków takich jak kwas nalidiksowy, enoksacyna czy tosulfoksacyna nadal poszukuje się nowych połączeń 1,8-naftyrydyny o interesujących właściwościach biologicznych. Poszukiwania aktywnych połączeń skupione są głównie na modyfikacji struktury substancji aktywnych o określonym profilu farmakologicznym. Wśród zbadanych dotąd różnych pochodnych 1,8-naftyrydyny wiele z nich wykazuje działanie bakteriobójcze, hipotensyjne, diuretyczne, antymalaryczne, antydepresyjne, antyalergiczne oraz przeciwnowotworowe.

## 1. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDYNY O DZIAŁANIU PRZECIWBAKTERYJNYM

### 1.1. CHINOLONY

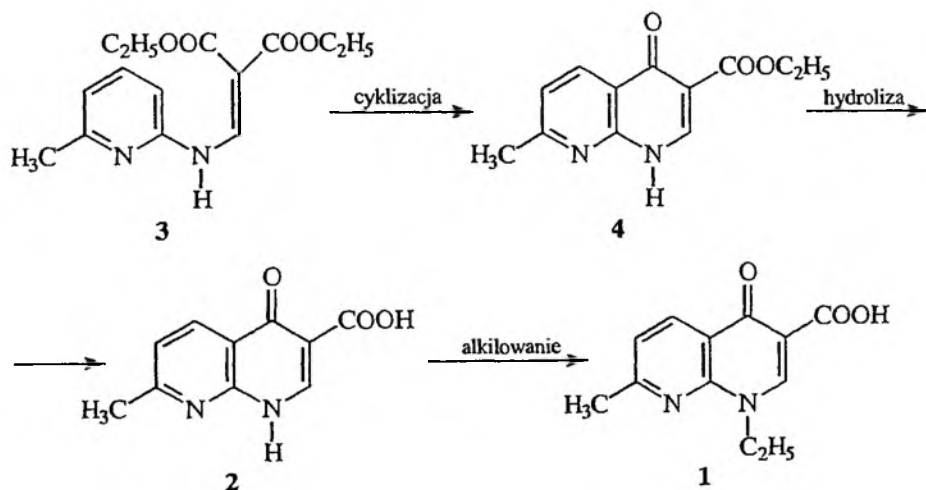
Pierwszą pochodną 1,8-naftyrydyny, która znalazła zastosowanie w lecznictwie był kwas nalidiksowy (**1**). Kwas nalidiksowy (**1**) wykazuje działanie przeciwbakteryjne i należy do chemioterapeutyków z grupy azachinolonów [3].



Chinolony działają bakteriobójczo przede wszystkim na pałeczki jelitowe ale odznaczają się również niewielką aktywnością wobec niefermentujących pałeczek Gram(-), beztlenowców oraz ograniczoną aktywnością wobec drobnoustrojów Gram(+). Znajdują zastosowanie w leczeniu układu moczowego i w znacznie mniejszym stopniu układu pokarmowego. W USA chinolon jakim jest ciprofloksacyna uznawany jest za lekarstwo na węglika [4]. Chinolony są na ogół dobrze tolerowane przez organizm i prawie całkowicie wydzielane z moczem, częściowo w postaci niezmienionej, a częściowo jako wolne lub związane metabolity.

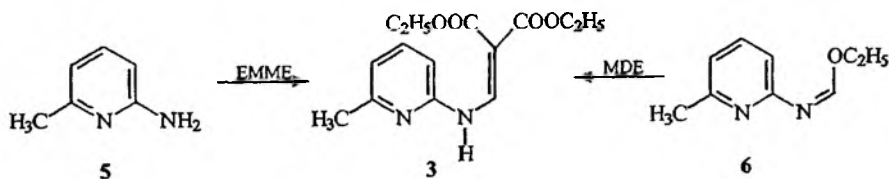
Azachinolon jakim jest kwas nalidiksowy (**1**) jest aktywny względem pałeczek jelitowych, głównie *Escherichia coli*, *Klebsiella* i *Enterobacter*. Mechanizm jego działania, podobnie jak wszystkich chinolonów, polega na hamowaniu syntezy bakteryjnego DNA. Jest on głównie stosowany w leczeniu zakażeń układu moczowego [5]. W organizmie ulega przemianie do kwasu 4-hydroksy-7-metylo-1,8-naftyrydyno-3-karboxylowego (**2**), który jest również mikrobiologicznie czynny.

Jeden ze sposobów otrzymywania kwasu nalidiksowego polega na cyklizacji estru etylowego kwasu  $\alpha$ -karboetoksy- $\beta$ -*N*-(6-metylo-2-pirydylo)aminoakrylowego (**3**), hydrolizie wytworzonego estru **3**, a następnie *N*-alkilowaniu powstałego kwasu **2** jodkiem bądź fosforanem etylu (Schemat 1) [6–9]. Przedstawiony na Schemacie 1 sposób otrzymywania kwasu nalidiksowego stanowi ogólny schemat syntezy większości chinolonów zawierających w cząsteczce układ 1,8-naftyrydyny.



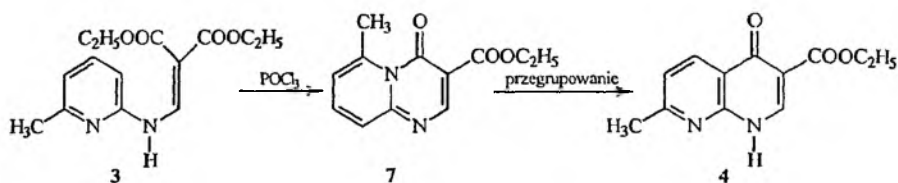
Schemat 1

Stosowany w syntezie kwasu nalidiksowego (**1**) ester **3** otrzymuje się w reakcji 2-amino-6-metylopirydyny (**5**) z estrem dietylowym kwasu etoksymetylenomalowego (EMME) bądź w reakcji **6** z malonianem dietylu (MDE) (Schemat 2) [10].



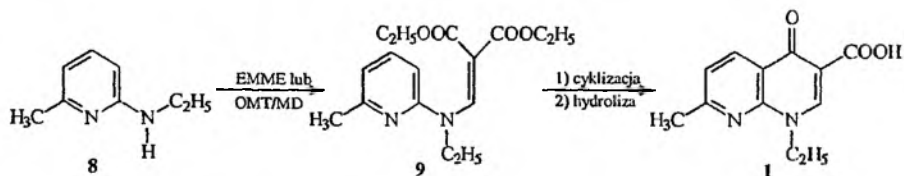
Schemat 2

Cyklizację **3** do **4** można prowadzić w obecności dibenzylbenzenu, kwasu polifosforowego (PPA), trichlorku tlenku fosforu(V), oleju parafinowego lub bezwodnika octowego. Najlepsze jednak wyniki uzyskuje się przy zastosowaniu wysokowrzących neutralnych rozpuszczalników takich jak np. olej parafinowy lub parafina [7]. Zastosowanie trichlorku tlenku fosforu(V) w PPA jako rozpuszczalniku sprawia, że cyklizacja **3** zachodzi z utworzeniem 3-karboetoksy-4-okso-6-metylo-pirydo-[1,2-a]-pirymidyny (**7**), z której po termicznym przegrupowaniu uzyskuje się 3-karboetoksy-7-metylo-4-hydrokso-1,8-naftyrydynę (**4**), półprodukt stosowany w syntezie **1** (Schemat 3) [11].



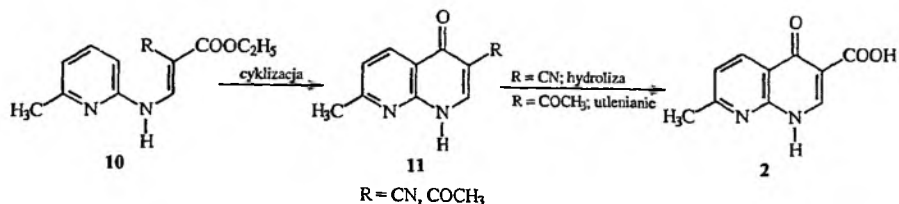
Schemat 3

W innej metodzie wytwarzania kwasu nalidikowego (**1**) jako substrat stosuje się 2-etyloamino-6-metylopirydynę (**8**), która w reakcji z EMME [12], bądź mieszaniną ortomrówczanu trietylu (OMT) i MDE w kwasie octowym [13] tworzy ester etylowy kwasu  $\alpha$ -karboetoksy- $\beta$ -*N*-(6-metylo-2-pirydylo)-*N*-etyloaminoakrylowego (**9**). Związek **9** po cyklizacji i hydrolizie ulega przemianom do kwasu nalidikowego (**1**) (Schemat 4).



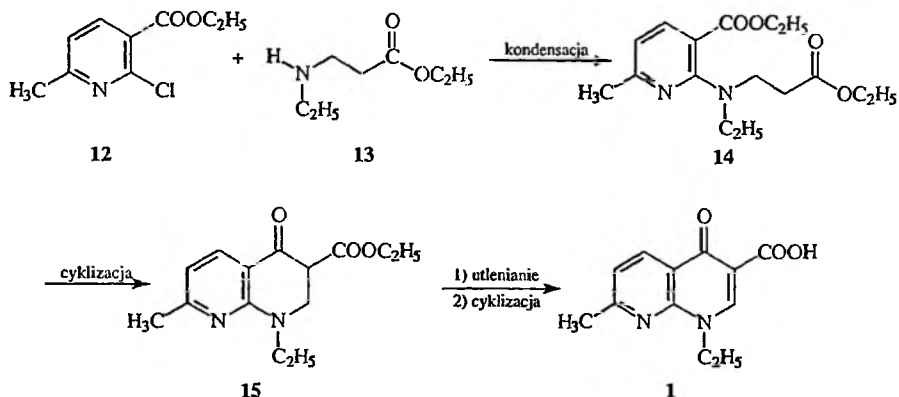
Schemat 4

Cyjanowe lub acetylowe pochodne estru kwasu  $\beta$ -*N*-(6-metylo-2-pirydylo)-aminoakrylowego **10** ulegają termicznej cyklizacji do pochodnych 1,8-naftyrydyny **11**, które po hydrolizie (gdy R = CN) lub utlenieniu (gdy R = COCH<sub>3</sub>) tworzą kwas 4-hydrokso-7-metylo-1,8-naftyrydino-3-karboxyowy (**2**) [10], połączenie stosowane w syntezie **1** (Schemat 5).



Schemat 5

Kolejna metoda otrzymywania kwasu nalidiksowego (1) polega na aminowaniu 2-chloro-6-metylnikotynianem etylu (12) estrem etylowym kwasu β-etyloaminopropionowego (13). Produkt aminowania 14 ulega cyklizacji Dieckmanna do estru kwasu 1-etylo-2,3-dihydro-4-okso-1,8-naftyrydno-3-karboksylowego (15), z którego po utlenieniu i hydrolizie otrzymuje się 1 (Schemat 6) [10].

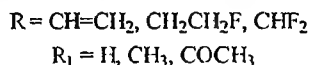
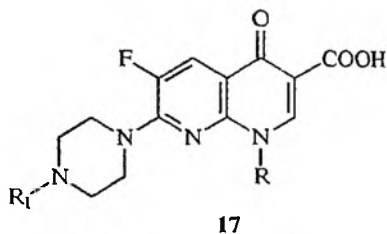
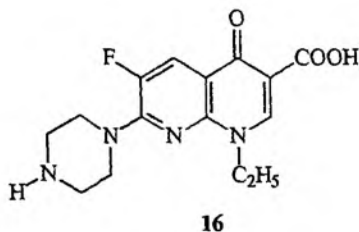


Schemat 6

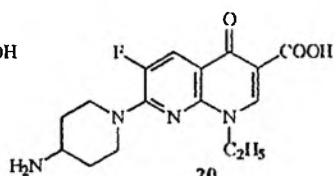
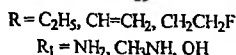
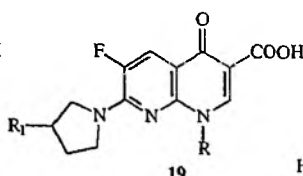
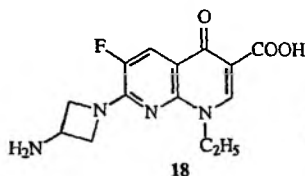
## 1.2. FLUOROCHINOLONY

Do pochodnych kwasu nalidiksowego, wykazujących większą od niego aktywność przeciwbakteryjną, należą połączenia zawierające atom/atomy fluoru w cząsteczce. Związki te należą do drugiej generacji chinolonów zwanej fluorochinolonami. Fluorochinolony charakteryzuje lepsza wchłaniania oraz szersze spektrum działania przeciwbakteryjnego niż chinolony. Badania zależności między budową a aktywnością fluorochinolonów wykazały, że obecność podstawnika alifatycznego lub cykloalifatycznego w położeniu N-1 wzmacnia działanie przeciwbakteryjne. Podstawnik piperazyłowy w położeniu C-7 rozszerza spektrum działania, atom fluoru w pozycji C-6 zwiększa aktywność leku na bakterie Gram(-) i rozszerza spektrum działania na bakterie Gram(+). Jednocześnie obecność atomu/atomów fluoru w cząsteczce zapewnia jej lipofilowość.

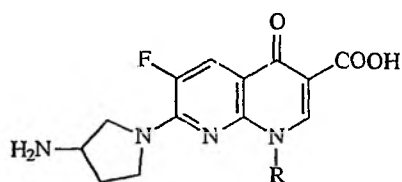
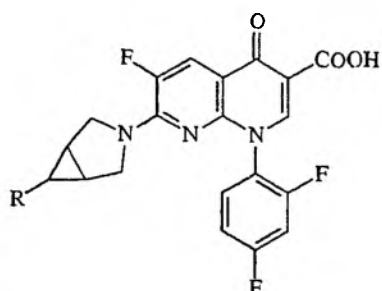
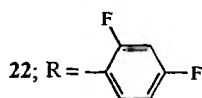
Przedstawicielem fluorochinolonów posiadających w swej budowie układ 1,8-naftyrydyny jest enoksacyna (**16**) [14]. Modyfikacja cząsteczki enoksacyny poprzez zmianę grupy etylowej w pozycji N-1 układu oraz poprzez acylowanie bądź metylowanie atomu azotu w podstawniku piperazyńlowym pozwoliło otrzymać szereg nowych biologicznie aktywnych połączeń **17**. Z wykonanych badań farmakologicznych wynika, że pochodne **17** działają głównie na bakterie Gram(+) (m.in. *Staphylococcus aureus*) i Gram(-) (*Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* Tsuchijima) [15].



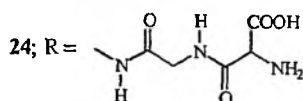
Zastąpienie podstawnika piperazyńlowego w enoksacynie układem 1-azacydyny, pirolidyny bądź piperydyny pozwala otrzymać cały szereg nowych wysoce aktywnych połączeń **18–20** [16].



W efekcie prowadzonych badań nad modyfikacją cząsteczki enoksacyny otrzymano i wprowadzono do leczenia kolejne pochodne 1,8-naftyrydyny takie jak: esafloksacyna (**21**), tosulfoksacyna (**22**), trowafloksacyna (**23**) i alatrofloksacyna (**24**) [5, 17].

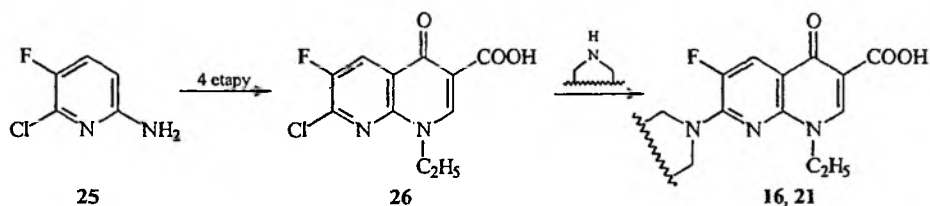
21; R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>23; R = NH<sub>2</sub>

22; R =



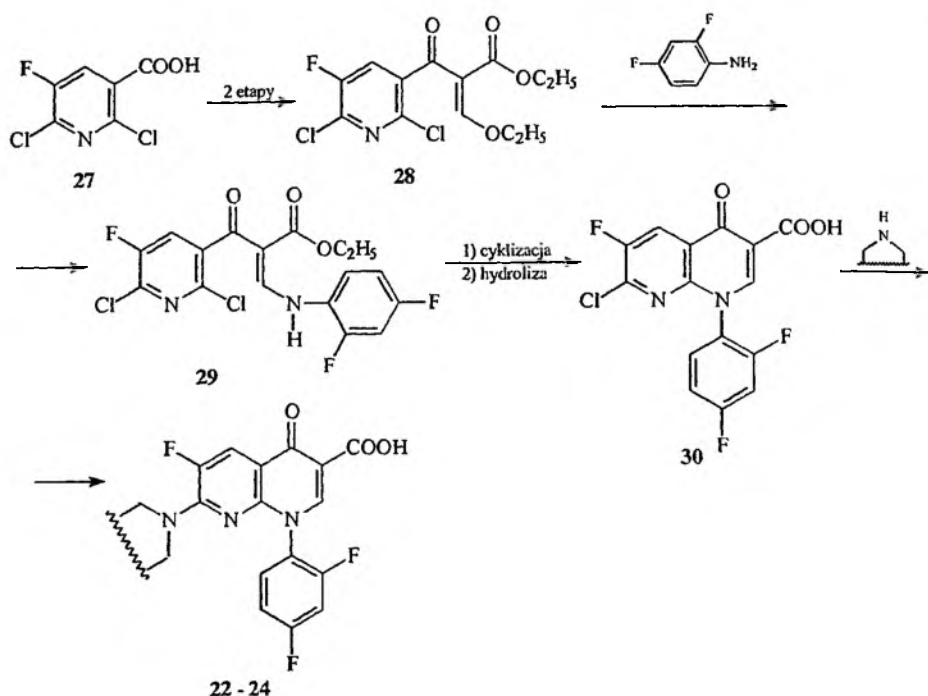
24; R =

Metoda otrzymywania enoksacyiny (**16**) i esafloksacyiny (**21**) jest analogiczna do opisaney przy otrzymywaniu kwasu nalidiksowego (Schemat 1). Substratem w tych przypadkach jest 6-chloro-5-fluoro-2-aminopirydyna (**25**), która w cyklu reakcji ulega przemianom do **16** lub **21**, co pokazano na Schemacie 7.



Schemat 7

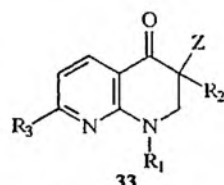
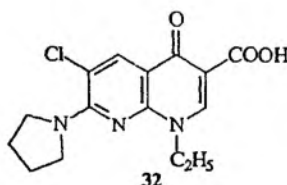
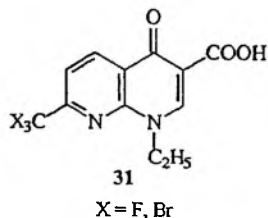
Metoda otrzymywania tosulfoksacyiny (**22**), trowafloksacyiny (**23**) i alatroflok-sacyiny (**24**), ze względu na obecność podstawnika arylowego w położeniu N-1 układu, jest różna od stosowanej przy otrzymywaniu kwasu nalidiksowego. Związkiem wyjściowym w syntezie tych połączeń jest kwas 2,6-dichloro-5-fluoro-3-pirydyno-karboxyowy (**27**), a wprowadzenie podstawnika 2,4-difluorofenyłowego do układu następuje na etapie reakcji **28** z 2,4-difluoroaniliną. Powstały w reakcji **29** w wyniku cyklizacji i hydrolizy a następnie aminowania ulega przekształceniu do **22**–**24** (Schemat 8) [18].



Schemat 8

### 1.3. INNE POCHODNE 1,8-NAFTYRYDINY O DZIAŁANIU PRZECIWBAKTERYJNYM

W literaturze opisywane są syntezy wciąż nowych połączeń, które są najczęściej analogami strukturalnymi kwasu nalidikowego (**1**) lub enoksacyny (**20**). Jako przykłady mogą posłużyć 7-trifluorometylo- oraz 7-trichlorometylo pochodne kwasu nalidikowego (**31**) bądź kwas 6-chloro-1-etylo-1,4-dihydro-4-okso-7-(1-pirolidyno)-1,8-naftyrydino-3-karboksylowy (**32**) oraz pochodne kwasu 1,2,3,4-tetrahydro-4-okso-1,8-naftyrydino-3-karboksylowego **33** wykazujące również aktywność przeciwbakteryjną [15, 19].

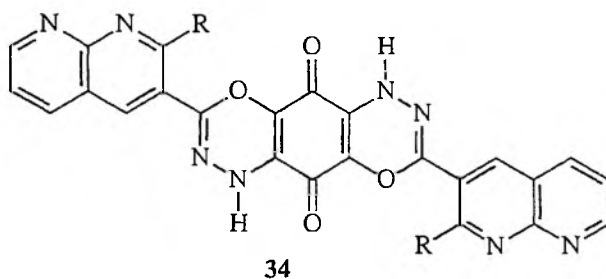


$R_1 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_4\text{H}_9$   
 $R_2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$   
 $R_3 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
 $Z = \text{COOC}_2\text{H}_5, \text{COOC}_4\text{H}_9, \text{CONH}_2, \text{CN}$



Badania aktywności połączeń **33** i aktywności kwasu nalidiksowego (**1**) prowadzone *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że porównywalną aktywność przeciwbakteryjną do **1** wykazuje tylko ester etylowy oraz *n*-butylowy kwasu 1-etylo-1,2,3,4-tetrahydro-7-metylo-4-okso-1,8-naftyrydyno-3-karboksylowego (**33**) [20].

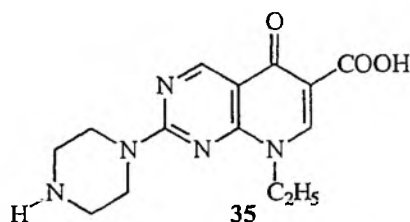
Do preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym należą także pochodne 1,8-naftyrydyny o strukturze **34** (3,8-di(2-podstawione-1,8-naftyrydyno-3-yl)benzo[1,2-*e*:4,5-*e'*]bis[1,3,4]-oxadiazino-5,10(1H,6H)-diony). Są one aktywnymi preparatami przeciw bakteriom *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus mycoides* i mogą być zatem stosowane w miejsce aminoglikozydów [21].



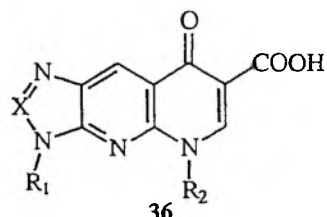
34

R = CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Bardzo silne działanie przeciwbakteryjne, porównywalne z działaniem kwasu pipemidowego (**35**), wykazują pochodne triazo[4.5-*b*]- oraz imidazo[4.5-*b*]1,8-naftyrydyny **36** [22].



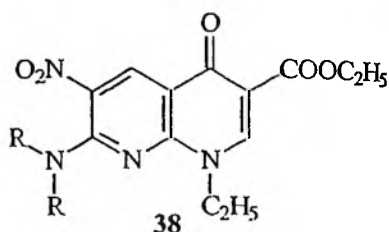
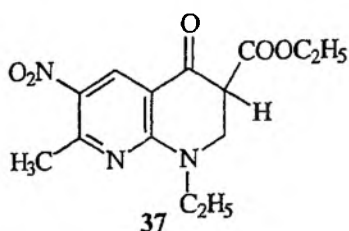
35



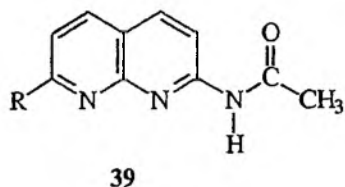
36

X = N, CH  
R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>  
R<sub>2</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH=CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl

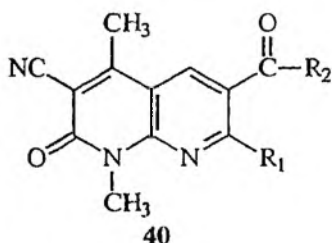
Działanie przeciwbakteryjne względem *Escherichia coli* wykazuje także nitro-*wa* pochodną estru etylowego kwasu 1,2,3,4-tetrahydro-4-okso-1,8-naftyrydyno-3-karboksylowego **37** [23], a przeciw drobnoustrojom – szczególnie *Trichomonas vaginalis* – nitropochodną 7-amino-1-etylo-1,4-dihydro-4-okso-3-karboetoksy-1,8-naftyrydyny **38** [24].



Z ostatnich doniesień literaturowych wynika, że poszukuje się wciąż nowych środków przeciwbakteryjnych w grupie pochodnych 1,8-naftyrydyny, do których należą 2-aminopochodne-1,8-naftyrydyny 39 i 40 [25, 26].



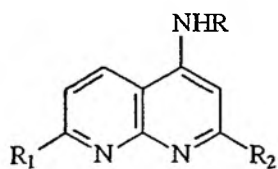
R = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Br, CHBr<sub>2</sub>



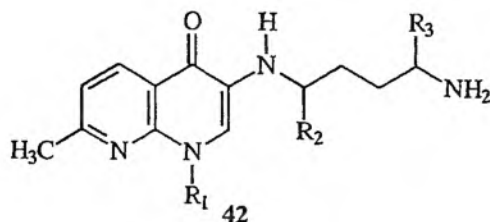
R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NCHOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
R<sub>2</sub> = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, NHNH<sub>2</sub>, morfolino, piperidyno

## 2. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDYNY O DZIAŁANIU PRZECIWMALARYCZNYM

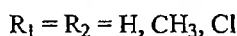
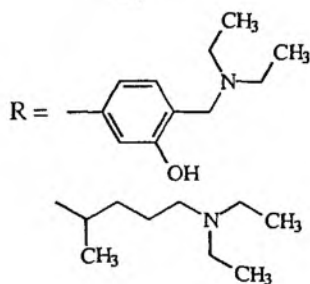
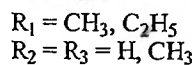
Dużą grupę związków o działaniu przeciwmalarycznym stanowią pochodne chinoliny [27]. Ze względu na podobieństwo strukturalne pomiędzy chinoliną, a naftyrydyną zaczęto prowadzić badania nad zastosowaniem naftyrydyn w leczeniu malarii w nadziei, że aktywność badanych pochodnych 1,8-naftyrydyny będzie zbliżona do aktywności pochodnych chinoliny [28, 29]. Z opisanych badań wynika jednak, że pochodne 1,8-naftyrydyny są mało aktywne jako preparaty przeciwmalaryczne. I tak połączenia 41 w teście *in vitro*, charakteryzują się słabą aktywnością względem *Plasmodium vinckei vinckei* [28] natomiast pochodne 42 nie wykazały aktywności przeciwmalarycznej [29].



41

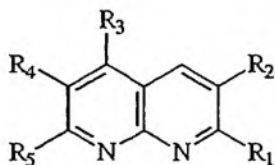


42

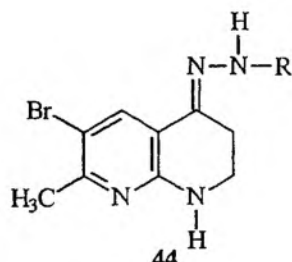
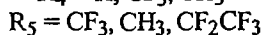
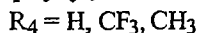
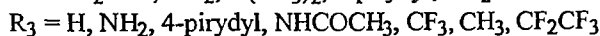
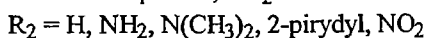
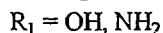


### 3. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDINY O DZIAŁANIU NA UKŁAD KRAŻENIA

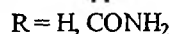
Cenną właściwością niektórych pochodnych 1,8-naftyrydyny jest ich działanie hipotensyjne i z tego względu wzbudziły zainteresowanie jako preparaty obniżające ciśnienie krwi. Z badań wykonanych na psach wynika, że szczególną aktywność hipotensyjną wykazują pochodne 2-amino- i 2-hydroksy-1,8-naftyrydyny 43. Połączenia te, w dawkach 5–75 mg/kg, obok działania hipotensyjnego wykazywały także działanie bronchodylatoryjne [30, 31].



43

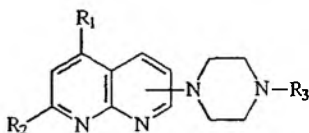


44

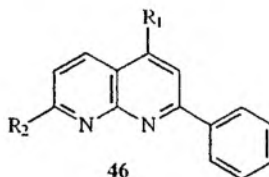
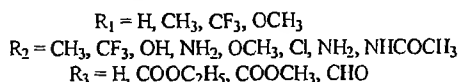


Podobne właściwości hipotensyjne wykazują pochodne hydrazynu 1,2,3,4-tetrahydro-4-okso-1,8-naftyrydyny **44**, co wykazano w badaniach przeprowadzonych na szczurach [32].

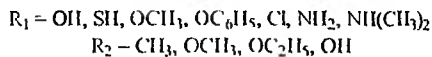
Ferrarini i wsp. dostrzegając podobieństwo 1-(4-amino-6,7-dimetoksy-2-chinazoli-nylo)-4-(2-furoilo)-piperazyny (wg INN Prazosin) z 2- i 4-piperazyńlo-pochodnymi 1,8-naftyrydyny otrzymali pochodne **45**, które w badaniach *in vivo* i *in vitro* potwierdziły ich działanie hipotensyjne [33–35].



45



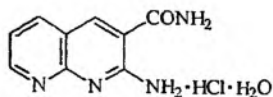
46



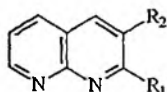
Pochodne 1,8-naftyrydyny **46** zawierające grupę fenyłową w pozycji 2 oraz zmienne podstawniki w pozycji 7 układu badano również w testach receptorowych jako preparaty będące selektywnymi antagonistami receptorów  $A_1$  adenozyń (adenozyń powoduje krótkotrwałe, lecz znaczne zwiększenie przepływu krwi przez naczynia wieńcowe). Z wykonanych badań zależności budowy testowanych połączeń od ich aktywności wynika, że obecność podstawników elektrodonorowych w pozycji C-7 układu zwiększa ich aktywność względem receptorów adenozyńowych  $A_1$ . Dla podstawników alkoksylowych aktywność zmniejszała się w szeregu  $\text{CH}_3\text{O} > \text{C}_2\text{H}_5\text{O} > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}$ . Spośród 28 przebadanych związków tylko 2 połączenia o budowie **46** ( $R_1 = \text{OH, } R_2 = \text{OCH}_3$  oraz  $R_1 = \text{OH, } R_2 = \text{Cl}$ ) okazały się pełnymi antagonistami receptorów  $A_1$  [36].

#### 4. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDYNY O DZIAŁANIU DIURETYCZNYM

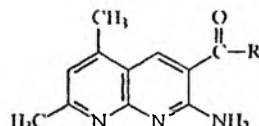
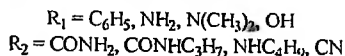
Silnymi właściwościami moczopędnymi, z jednoczesnym brakiem działania kaliuretycznego, charakteryzuje się chlorowodorek 2-amino-1,8-naftyrydyno-3-karboksyamidu (**47**), co wykazano w badaniach na szczurach [37].



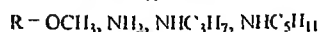
47



48



49

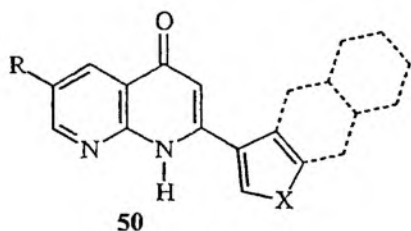


Autorzy badań wiaźali duże nadzieje w zastosowaniu pochodnych **47** jako preparatów diuretycznych co zaowocowało syntezą analogów strukturalnych **48** i **49**. Z wykonanych badań na zwierzętach wynika jednak, że otrzymane pochodne są mniej aktywne od **47** [38, 39].

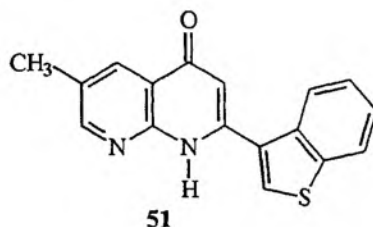
Działanie diuretyczne wykazywały także wcześniej omówione pochodne o strukturze **45** co należało oczekiwać w związku z przyjętą dla tych połączeń analogią strukturalną do Prazosinu, leku stosowanego nie tylko w leczeniu nadciśnienia lecz również w leczeniu łagodnego przerostu gruczołu krokowego.

## 5. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDYNY O DZIAŁANIU PRZECIWNOWOTWOROWYM

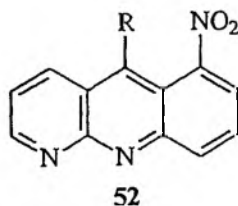
Poszukiwania selektywnie działających leków przeciwnowotworowych doprowadziły do przebadania pod tym kątem również pochodnych 1,8-naftyrydyny. Stosowanie odpowiednich baz w symulacjach komputerowych pozwoliło wygenerować najbardziej aktywne połączenia o ogólnym wzorze **50**. Dało to podstawę syntezy związku o strukturze **51**, a badania doświadczalne potwierdziły jego aktywność jako inhibitora polimeryzacji tubuliny [40].



R = CH<sub>3</sub>, morfolino, piroolidyno  
X = NH, S

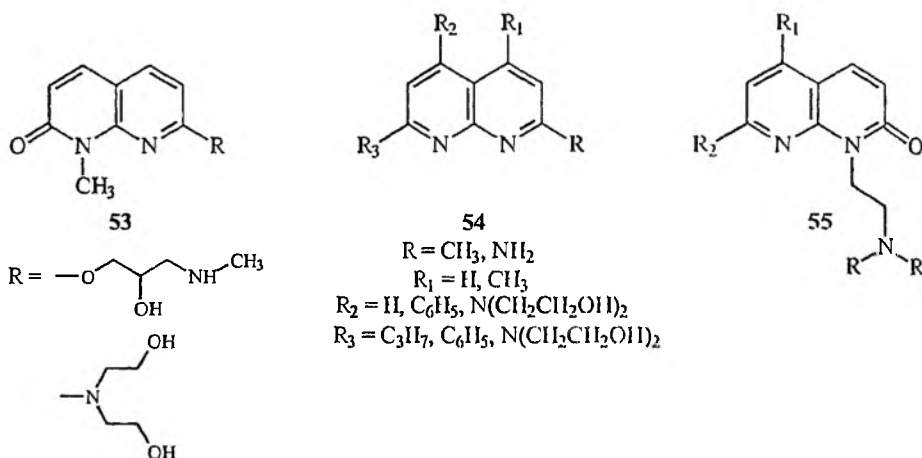


Bardzo cenną właściwość, hamującą rozwój komórek nowotworowych, wykazuje 5-nitro-1,9-diazaantracen (**52**, R = H). Obecność w pozycji C-10 grup aminowych takich jak; R = NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH zwiększa efektywność działania przeciwnowotworowego tych połączeń [41].

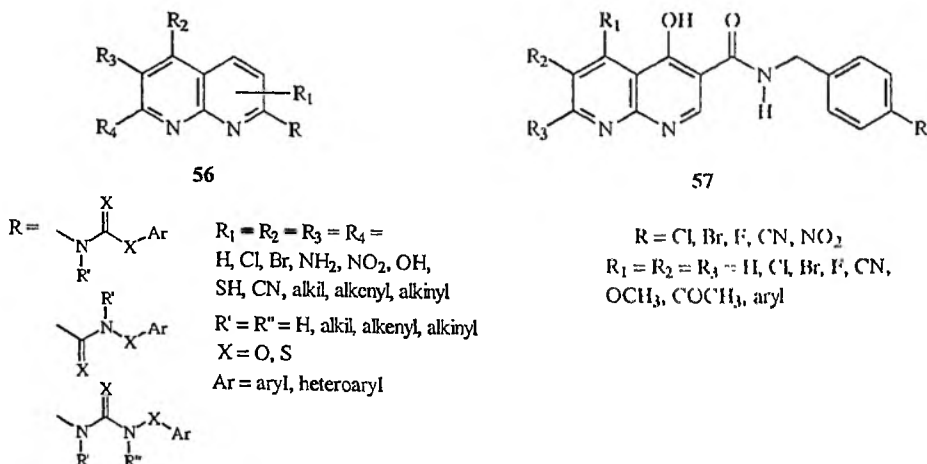


## 6. POCHODNE 1,8-NAFTYRYDINY O RÓŻNYM DZIAŁANIU BIOLOGICZNYM

Aktywność przeciwzakrzepową wykazują pochodne 1-metylo-1,2-dihydro-2-okso-1,8-naftyrydyny o ogólnej budowie przedstawionej wzorem 53 [42, 43]. Podobną aktywność przejawiają 2,4,5,7-podstawione pochodne 54, które są aminowymi pochodnymi 1,8-naftyrydyny [43]. Natomiast niektóre 1-(2-aminoctylo)-1,2-dihydro-2-okso-1,8-naftyrydyny 55, badano jako preparaty zmniejszające wydzielanie kwasu solnego w żołądku [44].

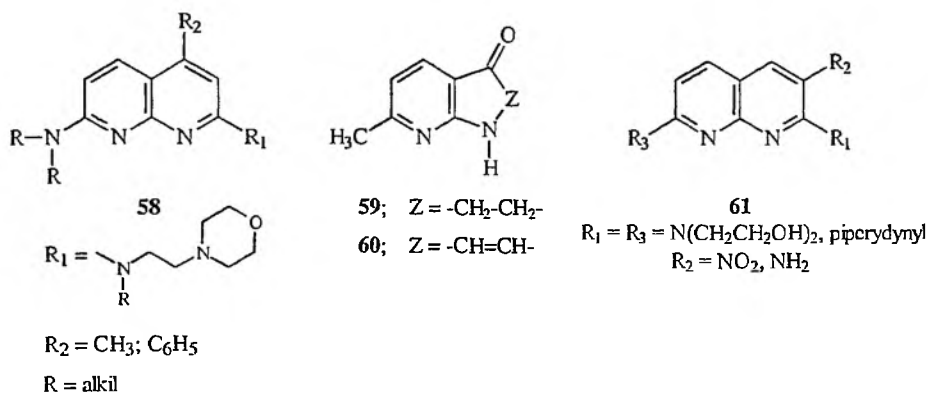


W ostatnich latach liczne pochodne 1,8-naftyrydyny 56 [45] oraz amide kwasu 4-hydroksy-1,8-naftyrydyno-3-karboksyłowego 57 były testowane jako preparaty przeciwwirusowe [46]. Połączenia 56 wykazywały szczególną aktywność przeciw wirusowi wywołującemu zapalenie wątroby typu C.

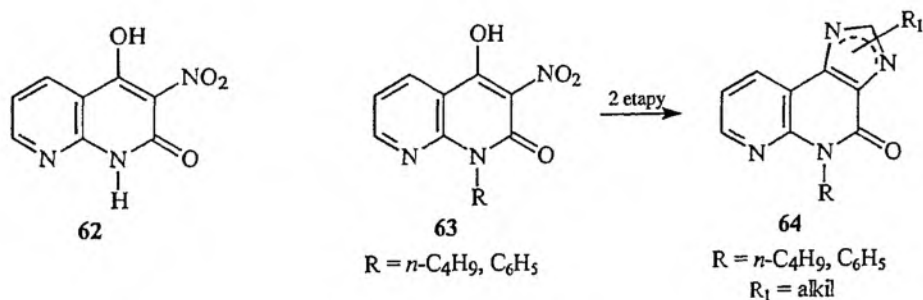


Aminopochodne 1,8-naftyrydyny **58** oraz 1,8-naftyryd-4-ony **59** i **60** poddawano wielokierunkowym testom biologicznym *in vivo* i *in vitro* jako preparaty między innymi: przeciwdrgawkowe, hipotensyjne, przeciwzakrzepowe, przeciwbakteryjne, przeciwmalaryczne i przeciwwirusowe. Pochodne te charakteryzowały się umiarkowaną toksycznością jednak nie wykazywały znamiennej aktywności biologicznych [47, 48].

Aminonitropochodne 1,8-naftyrydyny **61**, analogi strukturalne Dipirydamolu, leku hamującego agregację płytek krwi, były badane w testach na szczurach i królikach jako związki antyagregacyjne. Uzyskane wyniki wykazały, że ich aktywność antyagregacyjna była niższa niż Dipirydamolu [43].

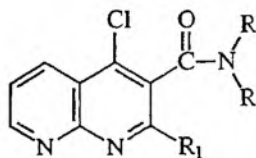


Nitronaftyrydyny stały się wartościowym produktem pośrednim w syntezie wielu antybakteryjnych mieszanin spełniających rolę komponentów przeciwzapalnych i antyalergicznymi [1]. Właściwości antyalergiczne, co stwierdzono w badaniach na szczurach, posiada 4-hydroksy-3-nitro-1,8-naftyryd-2(1H)-on (**62**). Związek **62** jest analogiem strukturalnym 2,4-dihydroksy-3-nitrochinoliny, która wykazuje również takie właściwości. [49]. Aktywność tych połączeń wiązana jest z ich charakterem kwasowym, co sprawia, że jako substancje aktywne zastrzegane są w patentach również ich sole, głównie sodowe i potasowe, posiadające również działanie antyalergiczne [50, 51].

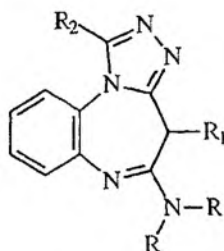


Pochodne 1,8-naftyrydyny o strukturze **63**, stosowane są w syntezie imidazo[4,5-c][1,8]-naftyryd-4(5H)-onów **64**, nieksantynowych połączeń heterocyklicznych. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że niektóre z nich wykazują większą aktywność od teofiliny oraz, że mogą być uznane jako nowa grupa związków o działaniu bronchodylatacyjnym. [52, 53].

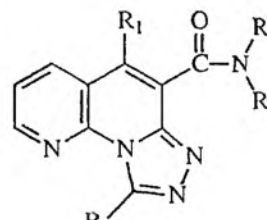
Di Braccio i Roma wykazali, że chloropochodne 1,8-naftyrydyny **65** wykazują znaczące właściwości przeciwzapalne i uspokajające oraz, że charakteryzuje je niska toksyczność ostra [54, 55]. Przeciwlękowe działanie pochodnych triazolobenzodiazepin **66**, skłoniło autorów do syntezy pochodnych [1,2,4]triazolo[4,3-a][1,8]naftyrydyny (**67**). Wykonane testy na myszach i szczurach potwierdziły ich przeciwzapalne i uspokajające właściwości [56, 57].



65



66



67

## PODSUMOWANIE

Spośród sześciu izomerycznych naftyrydyn najłatwiej i najwydajniej otrzymuje się układ 1,8-naftyrydyny co powoduje, że poszukiwania biologicznie aktywnych diazanaftalenów idą głównie w kierunku syntez z udziałem tego izomeru. Pochodne 1,8-naftyrydyny na stałe weszły do lecznictwa otwartego i zamkniętego głównie jako preparaty przeciwbakteryjne.

Najbardziej znany kwas nalidiksowy na polskim rynku farmaceutycznym występuje od wielu lat jako lek pod nazwami Gramurin i Nevigramon. Oba te preparaty wytwarzane są przez węgierską Firmę Farmaceutyczną Chinoin. Na światowym rynku leków kwas nalidiksowy występuje między innymi pod nazwami: Mictral, NegGram, Negram, Nelidix, Nogram i Uriben. [14] Sprzedaż leków zawierających kwas nalidiksowy jest coraz mniejsza co, należy przypuszczać, związane jest z dość dużą dawką terapeutyczną (np. kapsułka Nevigramonu zawiera 500 mg kwasu nalidiksowego) oraz z wprowadzanymi na rynek nowymi lekami z tej grupy. W latach 90. ubiegłego stulecia wprowadzono do lecznictwa nowoczesne chemioterapeutyki z grupy pochodnych 1,8-naftyrydyny, które produkowane są przez firmę Pfizer pod nazwami Trovan (trovafloksacyna) i Trovan I.V. (alatrofloksacyna). Są to leki, które zostały dopuszczone w USA tylko do lecznictwa zamkniętego i mogą być stosowane tylko wtedy gdy alternatywne środki zawiodą [58]. W Polsce leki zawierające



trovafloksacyne i alatrofloksacyne nie są wpisane do Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych [59].

Zastosowanie pochodnych 1,8-naftyrydyny, jako związków biologicznie aktywnych, nadal wzbudza zainteresowanie na świecie o czym świadczyć może pojawiająca się w ostatnim okresie duża liczba publikacji i opisów patentowych. Stwarza to nadzieję na odkrycie nowych, aktywnych preparatów będących pochodnymi tej grupy związków.

### PODZIĘKOWANIE

Dziękujemy Panu dr n. med. Maciejowi Sławińskiemu za pomoc i cenne uwagi okazane przy opracowaniu niniejszej publikacji.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Woźniak, H.C. van der Plas, *Adv. Heterocyclic Chem.*, 2000, **77**, 285.
- [2] V.P. Litvinov, S.V. Roman, V.D. Dyachenko, *Usp. Khim.*, 2000, **69**, 219.
- [3] H. Miao, V. Cecchetti, O. Tabarrini, A. Fravolini, *J. Heterocyclic Chem.*, 2000, **37**, 297.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention, Facts and Anthrax, September 2001, [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
- [5] H.P. Lambert, F.W. O'Grady, *Antybiotyki i chemioterapia*, Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 1994.
- [6] T. Tkaczyński, D. Tkaczyńska, *Synteza i technologia chemiczna leków*, PZWL Warszawa 1984.
- [7] *Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych*, red. K. Kieć-Kononowicz, Wydawnictwo UJ, Kraków 2000.
- [8] C. Lesker, E. Froehlich, M. Grutt, J. Bailey, R. Brundage, *J. Med. Pharm. Chem.*, 1962, **5**, 1063.
- [9] K.D. Demidova, V.V. Kazakova, T.I. Kudryashova, M.B. Lis, B.A. Morozov, A.G. Pechenkin, O.E. Pylacva, E.A. Rudzit, G.Kh. Khisamutdinov, K.E. Chistyakov, *Med. Prom. SSSR*, 1967, **20**(6), 18; *Chem. Abstr.* 1967, **66**, 2494u.
- [10] R. Albrecht, *Progress in Drug Research*, 1977, **21**, 9.
- [11] Z. Meczarus, I. Hermecz, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 1019.
- [12] Y.I. Wada, N.S. Watanabe, Patent japoński, 72 25 349 (1972); *Chem. Abstr.*, 1972, **77**, 88322.
- [13] Y. Morita, K. Wagatsuma, Patent japoński, 74 109 383 (1974); *Chem. Abstr.*, 1975, **83**, 9796.
- [14] J.K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlowska, *Leki współczesnej terapii – suplement do wyd. IX i X*, Fundacja Büchnera, Warszawa 1992.
- [15] J. Matsumoto, T. Miyamoto, A. Minamida, Y. Nishimura, H. Egawa, H. Nishimura, *J. Med. Chem.*, 1984, **27**, 292.
- [16] H. Egawa, T. Miyamoto, A. Minamida, Y. Nishimura, H. Okada, H. Uno, J. Matsumoto, *J. Med. Chem.*, 1984, **27**, 1543.
- [17] *The Merck Index*, wyd. 12, Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., USA 1996
- [18] T. Norris, Patent USA, 6 114 531 (2000).
- [19] B. Singh, G.Y. Leshner, *J. Heterocyclic Chem.*, 1983, **20**, 491.
- [20] A.A. Santilli, A.C. Scotese, J.A. Yurchenco, *J. Med. Chem.*, 1975, **18**, 1038.
- [21] K. Mogilaiah, D. Srinivasa Chowdary, R. Babu Rao, *Ind. J. Heterocyclic Chem.*, 2000, **9**, 311.
- [22] N. Suzuki, Y. Tanaka, R. Dohmori, *Chem. Pharm. Bull.*, 1980, **28**, 235.
- [23] A.A. Santilli, A.C. Scotese, R.F. Bauer, S.C. Bell, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 2270.
- [24] N. Suzuki, M. Kato, R. Dohmori, *Yakugaku Zasshi*, 1979, **99**, 155; *Chem. Abstr.*, 1979, **91**, 56865g.
- [25] R.A. Mekheimer, *Synthesis*, 2001, 103.
- [26] S. Goswami, B.K. Ghosh, R. Mukherjee, A.K. Adak, A.K. Mahaparta, *J. Heterocyclic Chem.*, 2001, **38**, 173.

- [27] T.R. Sweeney, R.E. Strube, *Burger's Medicinal Chemistry*, Ed. 4, M.E. Wolff, Ed., Interscience Inc., New York, N.Y., 1979.
- [28] G.B. Barlin, Weng-Lai Tan, *Aust. J. Chem.*, 1986, **37**, 1065.
- [29] F.I. Carroll, B.D. Berrang, C.P. Linn, *J. Heterocyclic Chem.*, 1981, **18**, 941.
- [30] C.S. Rooney, H.W.R. Williams, K.B. Wasson, Patent USA, 3 993 656; *Chem. Abstr.*, 1976, **86**, 106555.
- [31] H.W.R. Williams, C.S. Rooney, Patent USA, 4 031 103; *Chem. Abstr.*, 1977, **87**, 117836.
- [32] S. Carboni, A. De Settimo, P.L. Ferrarini, G. Primofiore, O. Livi, V. Menichetti, M. Del Tacca, E. Martinotti, C. Bernardini, A. Bertelli, *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.*, 1982, **17**, 159, *Chem. Abstr.* 1982, **97**, 6192p.
- [33] P.L. Ferrarini, C. Mori, G. Primofiore, *J. Heterocyclic Chem.*, 1986, **23**, 501.
- [34] P.L. Ferrarini, C. Mori, M. Badawneh, V. Calderone, L. Calzolari, T. Loffredo, F. Martinotti, G. Saccomanni, *Eur. J. Med. Chem.*, 1998, **33**, 383.
- [35] P.L. Ferrarini, C. Mori, V. Calderone, L. Calzolari, P. Nieri, G. Saccomanni, E. Martinotti, *Eur. J. Med. Chem.*, 1999, **34**, 505.
- [36] P.L. Ferrarini, C. Mori, C. Manera, A. Martinelli, F. Mori, G. Saccomanni, P.L. Barili, L. Betti, G. Giannaccini, L. Trincavelli, A. Lucacchini, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2814.
- [37] E.M. Hawes, D.J. Gorecki, *J. Med. Chem.*, 1973, **16**, 849.
- [38] D.K.J. Gorecki, E.M. Hawes, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 124.
- [39] E.M. Hawes, D.K.J. Gorecki, R.G. Gedir, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 838.
- [40] S. Zhang, J. Feng, S. Kuo, A. Brossi, E. Hamel, A. Tropsha, K. Lee, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 167.
- [41] A. Monge, S. Norro, F.J. Martinez-Crespo, A. Lopez de Cerain, E. Hamilton, A.J. Barker, *Eur. J. Med. Chem.*, 1994, **29**, 441.
- [42] I. Tonetti, D. Bertini, *Farmaco Ed. Sci.*, 1976, **31**, 175.
- [43] P.L. Ferrarini, C. Mori, M. Miceli, F. Franconi, *Eur. J. Med. Chem.*, 1994, **29**, 735.
- [44] W.A. Bolhofer, J.M. Hoffman, *J. Med. Chem.*, 1972, **22**, 301.
- [45] A. Bechand, S. Levesque, N. Nguyen-Ba, A. Siddiqui, Patent, WO 0050424 (2000).
- [46] V. Vaillancourt, Patent, WO 0170742 (2001).
- [47] S. Carboni, A. Da Settimo, D. Bertini, P.L. Ferrarini, O. Livi, I. Tonetti, *Farmaco Ed. Sci.*, 1975, **30**, 185.
- [48] S. Carboni, A. Da Settimo, D. Bertini, P.L. Ferrarini, O. Livi, I. Tonetti, *Farmaco Ed. Sci.*, 1975, **30**, 237.
- [49] D.R. Buckle, B. Christian, B. C. Cantello, H. Smith, Patent brytyjski, 1 453 863 (1976).
- [50] B.R. Buckle, B.C. Cantello, H. Smith, *J. Med. Chem.*, 1975, **18**, 726.
- [51] D.R. Buckle, H. Smith, B. C. Cantello, Patent brytyjski, 1 490 998 (1977); *Chem. Abstr.*, 1978, **88**, 190795a.
- [52] T. Kuroda, F. Suzuki, *J. Heterocyclic Chem.*, 1991, **28**, 2029.
- [53] F. Suzuki, T. Kuroda, T. Kawakita, H. Manabe, S. Kitamura, K. Ohmori, M. Ichimura, H. Kase, S. Ichikawa, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 4866.
- [54] M. Di Braccio, G. Roma, A. Balbi, A. Sottofattori, M. Carazzone, *Farmaco*, 1989, **44**, 865.
- [55] M. Di Braccio, G. Roma, M. Ghia, F. Mattioli, *Farmaco*, 1994, **49**, 25.
- [56] M. Di Braccio, G. Roma, G.C. Rossi, M. Ghia, F. Mattioli, *Farmaco*, 1997, **52**, 49.
- [57] G. Roma, M. Di Braccio, G. Grossi, F. Mattioli, M. Ghia, *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, **35**, 1021.
- [58] Informacja o lekach firmy Pfizer; [www.pfizer.com](http://www.pfizer.com).
- [59] *Pharmindex 01 – Kompendium Leków*; Wydawnictwo MediMedia International sp. z o.o., Warszawa 2000.

**POSZUKIWANIE NOWYCH SELEKTYWNYCH  
ANTAGONISTÓW RECEPTORÓW  
 $\alpha_1$ -ADRENERGICZNYCH\***

**DEVELOPMENTS IN  $\alpha_1$ -ADRENERGIC  
RECEPTOR ANTAGONISTS**

**Barbara Malawska, Katarzyna Kulig**

*Katedra Chemii Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, e-mail: mfmalaws@cyf-kr.edu.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

Receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne

Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych

1. Pochodne chinazoliny
2. Pochodne fenylalkilamin
3. Pochodne piperidyny
4. Pochodne arylopipezyn
5. Związki o różnej strukturze

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

\* Artykuł opracowany na podstawie materiałów wykładu wygłoszonego na 3-Multidyscyplinarnej Konferencji Nauk o Leku w Pile, 13-17.05.2002

---



**Dr hab. Barbara Malawska** – absolwentka chemii Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu Jagiellońskiego w 1973 r. Pracowała na stanowisku asystenta, oraz adiunkta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Krakowie (dr nauk farmaceutycznych – 1983 r.), obecnie Collegium Medicum UJ (dr hab. nauk farmaceutycznych, specjalność chemia leków – 1999 r.). Odebrała zagraniczne staże naukowe na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Montpellier we Francji (1990 i 1992 r.) oraz w Instytucie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Regensburgu w Niemczech (1995 r.). Jest członkiem

Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Jej zainteresowania badawcze koncentrują się na poszukiwaniu nowych związków biologicznie aktywnych o przewidywanym działaniu na układ krążenia oraz ośrodkowy układ nerwowy. Prace te uwzględniają, oprócz syntezy nowych związków i badań farmakologicznych, określenie właściwości fizykochemicznych (lipofilowość, właściwości kwasowo-zasadowe), badania strukturalne i modelowanie cząsteczkowe. Celem tych badań jest poszukiwanie ilościowej korelacji między strukturą a działaniem biologicznym, umożliwiające racjonalne projektowanie struktur aktywnych.



**Dr Katarzyna Kulig** – urodziła się w 1971 roku w Krakowie. W latach 1990–1995 studiowała chemię na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Będąc studentką IV roku chemii zaliczyła pełny kurs chemii leków zakończony zdaniem egzaminu na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum UJ. Dyplom magistra chemii otrzymała w 1995 r.

Od 1995 jest asystentem w Katedrze Chemii Farmaceutycznej CM UJ. Tematem rozprawy doktorskiej, zakończonej w 2001 uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem były „Badania w grupie

*N*-aryloaminopropylowych pochodnych pirolidyn-2-onu o działaniu hipotensyjnym i przeciwarytmicznym”. Katarzyna Kulig odbyła dwa miesięczne staże naukowe na Uniwersytecie w Montpellier (Francja) i Würzburgu.

Dr Katarzyna Kulig jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 1995 r. Jest współautorem dwunastu oryginalnych publikacji, w tym dziewięciu w czasopiśmie zagranicznych, zgłoszenia patentowego oraz kilku doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach naukowych w kraju i zagranicą. Za wyniki prac badawczych otrzymała trzykrotnie zespołowe nagrody naukowe na Wydz. Farmaceutycznym CM UJ (1997, 1998, 2000).

**ABSTRACT**

$\alpha_1$ -Adrenergic receptors ( $\alpha_1$ -AR) are members of the superfamily of G protein coupled receptors that transduce signals across the cell membrane.  $\alpha_1$ -ARs are comprised of multiple subtypes that have been identified by both pharmacological and binding studies [1]. To date, they are classified into  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , and  $\alpha_{1D}$  and the corresponding cloned counterparts termed  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ , and  $\alpha_{1d}$ -AR, respectively. These subtypes have different tissue distributions with the  $\alpha_{1A}$  receptors predominating in lower urinary tract tissue, whereas this receptor subtype is less prevalent in the vasculature [2–4]. In recent years, the search for new selective  $\alpha_1$ -AR antagonists has intensified, due to their importance in the treatment of hypertension and of benign prostatic hyperplasia (BPH) [5–7]. Tamsulosin, the first  $\alpha_{1A}$ -AR „selective” antagonists for the treatment of BPH, was approved in 1997 [9, 12]. A number of  $\alpha_{1A}$  subtype selective antagonists representing different structural classes of compounds were disclosed recently. These include: quinazolines [8–13], phenylalkylamines [9, 12, 14], piperidines [9, 15–23], arylpiperazines [24–36] and related compounds [37, 38]. A review on the development of  $\alpha_1$  selective antagonists are presented.

---

---

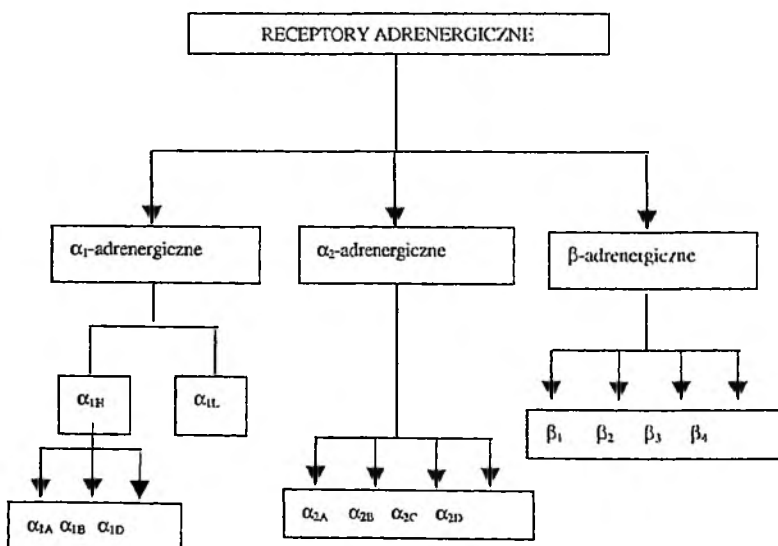
## WPROWADZENIE

Badania nad receptorami adrenergicznymi (AR) zostały rozpoczęte już na początku ubiegłego stulecia przez H.H. Dale'go. Wykazał on, iż alkaloidy sporyszu, zawierające ergotaminę, znoszą działanie adrenaliny. Jednak dopiero w roku 1948 R.P. Ahlquist wyróżnił dwie grupy receptorów adrenergicznych  $\alpha$  i  $\beta$ . Podział ten został zaproponowany w oparciu o obserwację efektów fizjologicznych wywołanych przez adrenalinę i noradrenalinę. Według Ahlquista, receptory  $\alpha$ -adrenergiczne miały większe powinowactwo do noradrenaliny, a  $\beta$ -adrenergiczne do adrenaliny. W wyniku dalszych badań w roku 1974 S.Z. Langer wprowadził podział receptora  $\alpha$ -adrenergicznego na dwa podtypy  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  [1].

Dalsze badania receptorów adrenergicznych były kontynuowane na dwóch drogach. Brano pod uwagę oddziaływanie receptorów z różnymi substancjami wzorcowymi (lekami), równocześnie poszukiwano potwierdzenia wyników badań farmakologicznych metodami biologii molekularnej.

## RECEPTORY $\alpha$ -ADRENERGICZNE

Receptory adrenergiczne są rodziną, zawierającą trzy wielkie podrodziny:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\beta$ . Obecnie wyróżnia się dziesięć naturalnych, kodowanych przez odrębne geny, podtypów receptora adrenergicznego:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\alpha_{2D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  (Rys.1) [2].



Rysunek 1. Aktualna klasyfikacja receptorów adrenergicznych

Mają one również swoje odpowiedniki w receptorach sklonowanych oznaczanych odpowiednio:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ . Zarówno receptory  $\alpha$  jak i  $\beta$  adrenergiczne należą do grupy receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkami regulacyjnymi G. Receptory metabotropowe niezależnie od ich konkretnych funkcji mają podobną budowę. Są one długimi łańcuchami białkowymi siedmiokrotnie przenikającymi przez błonę komórkową, tworząc w jej obrębie 7 helikalnych struktur hydrofobowych, połączonych naprzemiennie pętlami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi. Zakończenie łańcucha białkowego, mającego wolną grupę karboksylową (C-koniec) znajduje się wewnątrz komórki, natomiast zakończenie z wolną grupą aminową (N-koniec) jest na zewnątrz. Miejsce wiążące ligand znajduje się w części hydrofobowej błony komórkowej, w którym biorą udział reszty aminokwasowe należące do różnych obszarów transbłonowych (TM;  $\alpha$ -helisy).

W przypadku receptorów adrenergicznych, dla których endogennymi agonistami są aminy katecholowe (noradrenalina, adrenalina) domena rozpoznająca i wiążąca ligand poprzez reszty kwasu asparaginowego obecne w helisie 3 (TM III), tworzy mostek solny z uprotonowaną grupą aminową ligandu. Wiążą się do niej zarówno agonści jak i antagoniści receptorów. W helisie 5 (TM V) reszty seryny tworzą wiązanie wodorowe z grupami fenolowymi układu katecholu. Wiązanie to jest dodatkowo stabilizowane przez interakcję hydrofobową pomiędzy resztą fenyloalaniny (helisa 6, TM VI) a pierścieniem aromatycznym. Reszta asparaginowa w helisie 7 (TM VII) tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu aryloalkiloamin [1].

Podtypy receptorów adrenergicznych są różnymi od siebie białkami kodowanymi przez odrębne geny, często położone na różnych chromosomach. Jak wynika z analizy pokrewieństwa podrodziny receptorów AR są od siebie bardzo odległe, różnią się bowiem pochodzeniem, budową i funkcją, natomiast w obrębie każdej z tych wielkich podrodzin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\beta$  poszczególne typy są ze sobą blisko spokrewnione. Wykazano ponadto, że podtypy receptora adrenergicznego mogą być kodowane u różnych gatunków przez różniące się wzajemnie geny. Poszczególne typy receptorów adrenergicznych różnią się między sobą w istotny sposób pod względem funkcjonalnym na poziomie molekularnym, ponieważ receptory poszczególnych podrodzin są związane z różnymi układami sygnalizacyjnymi i białka G aktywowane przez nie stymulują odmienne procesy wewnątrzkomórkowe. Receptory  $\alpha_1$ -AR są receptorami pobudzającymi, uruchamiającymi po pobudzeniu wewnątrzkomórkowy sygnał, którym jest nagłe zwiększenie stężenia  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie. Receptory  $\alpha_{1A}$ -AR regulują poprzez białko G zależny od potencjału kanał wapniowy typu L, wrażliwy na 1,4-dihydropirydyny, natomiast receptory  $\alpha_{1B}$ -AR poprzez białko G aktywują fosfolipazę C. Wzrost aktywności fosfolipazy C wzmaga syntezę dwóch wtórnych przekaźników informacji  $IP_3$  (inozytolo(1,4,5)trifosforanu) i DAG (diacetyloglicerolu) co w efekcie prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce.

Definicja farmakologiczna określa receptory  $\alpha_1$ -AR jako te, które są silnie blokowane przez fentolaminę i prazosynę (kompetycyjnie) oraz wybiórczo pobudzane

przez fenylefrynę i metoksaminę. Receptory  $\alpha_1$ -AR regulują wiele funkcji fizjologicznych zarówno na poziomie ośrodkowego jak również obwodowego układu nerwowego. Receptory  $\alpha_1$ -AR są receptorami postsynaptycznymi umiejscowionymi głównie w mięśniach gładkich. Ich pobudzenie powoduje między innymi skurcz naczyń krwionośnych oraz mięśni okrężnych. Ponadto występują one w dużych ilościach w większości rejonów mózgu, regulując m.in. pobieranie pokarmów czy nastrój.

Receptory  $\alpha_{1A}$ -AR znajdują się głównie w mięśniówce gładkiej gruczołu krokowego (prostate) i drogach moczowych, stąd częste określenie tego receptora jako „uroselektywny” [3]. Wykazano, że receptory  $\alpha_{1A}$ -AR regulują napięcie mięśniówki gładkiej cewki moczowej, a zaburzenie tego procesu (nadmierna aktywacja, skurcz) są związane z dynamiczną komponentą łagodnego przerostu gruczołu krokowego (*benign prostatic hyperplasia*, BPH). Jest ono nie tylko dolegliwością występującą u mężczyzn po 50 roku życia, ale może być przyczyną powstania choroby nowotworowej. Receptory  $\alpha_{1B}$  występują w mięśniówce gładkiej naczyń krwionośnych i dlatego mają znaczącą rolę w regulacji ciśnienia krwi. Z tych względów selektywni antagoniści receptorów  $\alpha_{1A}$ -AR mogą być potencjalnymi lekami w leczeniu przerostu gruczołu krokowego, pozbawionymi działań niepożądanych wynikających z blokady receptorów w naczyniach i ośrodkowym układzie nerwowym. Rola podtypu receptora  $\alpha_{1D}$ -adrenergicznego nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Jednak na podstawie dotychczasowych wyników badań wydaje się, że związki aktywne w stosunku do receptorów  $\alpha_{1D}$ -AR mogą mieć korzystny wpływ na zmniejszenie efektów ubocznych w działaniu leku selektywnego do receptorów  $\alpha_{1A}/\alpha_{1B}$ . Związki te, oprócz ich zastosowania w terapii nadciśnienia tętniczego, mogą być stosowane w terapii pierwszej fazy łagodnego przerostu gruczołu krokowego.

Tożsamość podtypu receptora  $\alpha_{1L}$ -AR nie została całkowicie ustalona i potwierdzona, być może jest on innym stanem konformacyjnym receptora  $\alpha_{1A}$ -AR (farmakologiczny fenotyp). Ma on niskie powinowactwo do prazosyny, antagonisty receptorów  $\alpha_{1A}$ -AR [4].

## ANTAGONIŚCI RECEPTORÓW $\alpha_1$ -ADRENERGICZNYCH

Wykazana w ciągu ostatniej dekady heterogenność receptorów  $\alpha_1$ -AR, zarówno na poziomie molekularnym jako i farmakologicznym, stworzyła nowe możliwości terapeutyczne dla związków wpływających selektywnie na różne podtypy tego receptora. W ostatnich latach obserwuje się niezwykle intensywny wzrost badań nad selektywnymi  $\alpha_1$ -adrenolitykami a szczególnie nad związkami o wybiórczym działaniu w stosunku do podtypu receptorów  $\alpha_{1A}$ -AR. Związki blokujące receptory  $\alpha_1$ -AR mają zróżnicowaną budowę chemiczną [5–7] i można wśród nich wyróżnić następujące grupy:

1. pochodne chinazoliny,
2. pochodne fenylalkilamin,

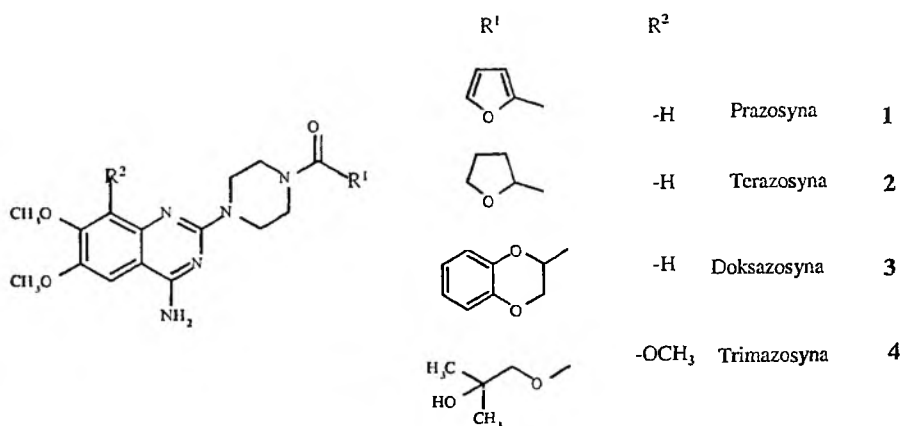


3. pochodne piperydyny,
4. pochodne arylopiperazyn,
5. związki o różnej strukturze.

Przedstawiony podział obejmuje związki stosowane w terapii, znajdujące się w różnych fazach badań klinicznych lub wykazujące dużą aktywność *in vitro*, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w lecznictwie.

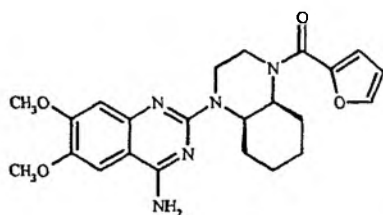
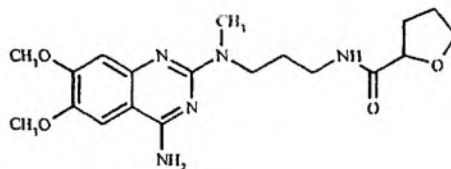
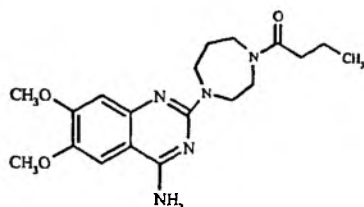
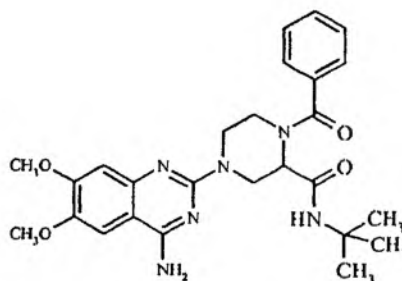
### 1. POCHODNE CHINAZOLINY

Pochodne chinazoliny: prazosyna **1**, terazosyna **2**, doksazosyna **3** i trimazosyna **4** wprowadzone do lecznictwa w połowie lat siedemdziesiątych były pierwszymi selektywnymi antagonistami receptorów  $\alpha_1$ -AR bez wpływu na receptory  $\alpha_2$  (Rys. 2) [8]. Związki te różniąc się od siebie podstawnikiem w położeniu 2 układu chinazoliny charakteryzują się zróżnicowanym, wysokim powinowactwem do receptorów  $\alpha_1$ -AR oraz brakiem selektywności względem poszczególnych podtypów tego receptora. Wartości stałej wiązania do klonowanych ludzkich receptorów dla prazosyny wynoszą:  $pK_i = 9,7 \alpha_{1a}$ ,  $pK_i = 9,7 \alpha_{1b}$ ,  $pK_i = 9,5 \alpha_{1d}$ . Pochodne zawierające podstawnik furanyłowy lub tetrahydrofuranylewowy, czyli prazosyna i terazosyna, wykazują także powinowactwo do podtypu receptora  $\alpha_{2B}$ -AR. Powyższe pochodne chinazoliny znalazły zastosowanie jako leki hipotensyjne. Leki te wpływają również korzystnie na gospodarkę lipidową, w związku z tym można je stosować w terapii nadciśnienia, któremu towarzyszą zmiany miażdżycowe. W leczeniu BPH stosowano przede wszystkim terazosynę i doksazosynę. Mają one jednak szereg działań ubocznych, wpływając na układ krążenia, co wynika z nieselektywnej blokady podtypów receptorów  $\alpha_1$ -AR, [8, 9].



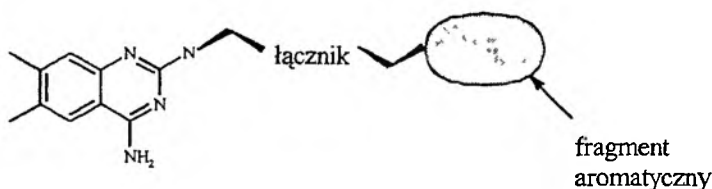
Rysunek 2. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR, pochodne chinazoliny

Poszukując nowych, selektywnych antagonistów pozbawionych działań niepożądanych, w grupie pochodnych chinazoliny, otrzymano związki o zróżnicowanej selektywności do podtypów receptorów  $\alpha_1$ -AR. Wybrane struktury tych związków przedstawiono na Rys. 3. Modyfikacje cząsteczki prazosyny polegały między innymi na usztywnieniu układu piperazyny poprzez wprowadzenie do niego dodatkowych grup metylowych lub dobudowanie pierścienia cykloheksanu. Otrzymano w ten sposób szereg związków, spośród których pochodna zawierająca pierścień *cis*-dekahydrochinoksaliny, (+)-cyklazosyna **5**, była najaktywniejsza. Cyklazosyna w badaniach *in vitro* na klonowanych receptorach zwieryżących wiąże się najsilniej z receptorem podtypu  $\alpha_{1b}$ . Odpowiednie wartości stałej wiązania dla cyklazosyny wynoszą:  $pK_1 = 7,6$   $\alpha_{1a}$  (krowa),  $pK_1 = 9,7$   $\alpha_{1b}$  (chomik),  $pK_1 = 7,5$   $\alpha_{1d}$  (szczur) [9, 10]. Cyklazosyna w farmakologii doświadczalnej stosowana jest często jako związek odniesienia selektywnie blokujący podtyp receptora  $\alpha_{1b}$ -AR. Inna modyfikacja cząsteczki prazosyny polegała na zastąpieniu pierścienia furanu ugrupowaniem fenylowym oraz na wprowadzeniu grupy (*S*)-*N*-*tert*-butyloamidowej w położenie 3 piperazyny. Uzyskany związek **8** o symbolu L-765,314 podobnie jak (+)-cyklazosyna jest selektywnym blokerem receptora  $\alpha_{1b}$ -AR ( $K_1 \alpha_{1a} = 500$  nM,  $\alpha_{1b} = 5,4$  nM,  $\alpha_{1d} = 50$  nM; szczur). Jego  $\alpha_{1b}$  adrenoselektywność tłumaczona jest możliwością tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy miejscem wiążącym w receptorze a grupą amidową w położeniu 3 piperazyny albo jak w przypadku (+)-cyklazosyny zawadą steryczną [11].

(+)-cyklazosyna **5**Alfuzosyna **6**Bunazosyna **7**L-765,314 **8**Rysunek 3. Pochodne chinazoliny o zróżnicowanym wpływie na podtypy receptora  $\alpha_{1a}$ -AR

Modyfikacje cząsteczki terazosyny polegające na zastąpieniu układu piperazyny bardziej giętkim łańcuchem propylowym oraz zmetylowaniu powstałej drugorzędowej grupy aminowej doprowadziły do powstania alfuzosyny 6. Lek ten wprowadzony do terapii nadciśnienia w roku 1988 jest silniejszym od terazosyny blokerem receptorów  $\alpha_1$ -AR, obecnie również stosowanym w leczeniu BPH [8, 12].

Poszukiwania nowych pochodnych chinazoliny nie ograniczyły się tylko do syntezy bardzo bliskich analogów stosowanych leków. Wykonano, poparte modelemolekularnym, badania zależności pomiędzy strukturą a powinowactwem tych połączeń do receptorów  $\alpha_1$ -AR [13]. Analizując budowę chemiczną antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR z grupy chinazoliny można wskazać ugrupowania niezbędne do blokady tego receptora (Rys. 4). Jest to pochodna chinazoliny z wolną grupą aminową w położeniu 4. Umożliwia ona jonową interakcję pomiędzy uprotonowaną grupą aminową i głównym miejscem nukleofilowym w receptorze. Podstawnik w położeniu 2 powinien zawierać II lub III-rzędowy atom azotu będący częścią łącznika oraz ugrupowanie aromatyczne. Te fragmenty strukturalne dodatkowo ułatwiają wiązanie z receptorem poprzez interakcje międzycząsteczkowe o charakterze oddziaływań krótkiego zasięgu: przyciągających (polarnych i dyspersyjnych) i odpychających (sterycznych). Spośród przedstawionych na Rys. 2 i 3 pochodnych chinazoliny: prazosyna, terazosyna, doksazosyna, alfuzosyna i bunazosyna zostały zarejestrowane w wielu krajach jako leki w terapii pierwszej fazy łagodnego rozrostu gruczołu krokowego.

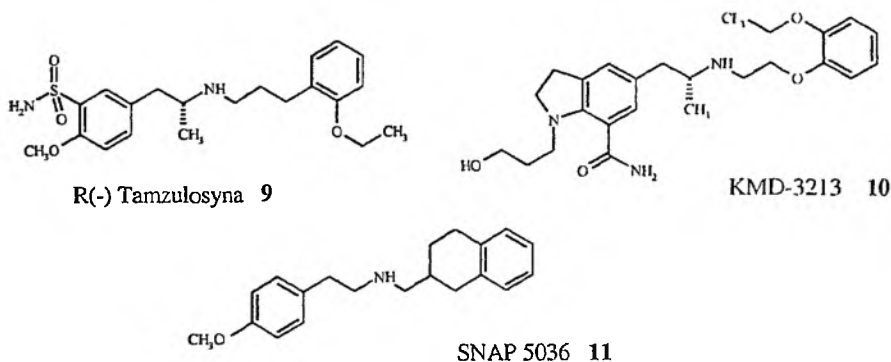


Rysunek 4. Elementy strukturalne pochodnych chinazoliny niezbędne do blokady receptora  $\alpha_1$ -AR

## 2. POCHODNE FENYLOALKILOAMIN

Wśród pochodnych fenyloalkiloamin można wyróżnić związki mające szkielet 2-fenyloetyloaminy charakterystyczny dla amin katecholowych, które są agonistami receptorów  $\alpha$ -AR. Lekiem otrzymanym w wyniku modyfikacji 2-fenyloetyloaminy jest tamzulosyna 9, która została zarejestrowana w USA w 1997 jako pierwszy lek do leczenia BPH (Rys. 5). Wykazuje ona ok. dziesięciokrotnie większą selektywność względem receptorów  $\alpha_{1a}$  i  $\alpha_{1d}$  w odniesieniu do  $\alpha_{1b}$ . Odpowiednie wartości stałej wiązania do ludzkich podtypów receptorów adrenergicznych wynoszą odpowiednio:  $pK_1 \alpha_{1a} = 9,7$ ;  $\alpha_{1b} = 8,9$ ;  $\alpha_{1d} = 9,8$ . Tamzulosyna wykazuje lepsze efekty kliniczne od nieselektywnych antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR, tj. terazosyny i doksazosyny. Skuteczność ta oraz niewielkie działania niepożądane wynikają

prawdopodobnie z korzystnej farmakokinetyki leku a nie zależą wyłącznie od selektywności w stosunku do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR. Stereoizomery tamzulosyny charakteryzują się różnym powinowactwem do receptorów  $\alpha$ -AR. Izomer (*S*)(+) jest bardziej selektywny, ale równocześnie jego siła wiązania z poszczególnymi podtypami receptora adrenergicznego jest mniejsza. W leczeniu stosowany jest jej mniej selektywny, ale mający większe powinowactwo do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR izomer (*R*)(-) [9, 12].



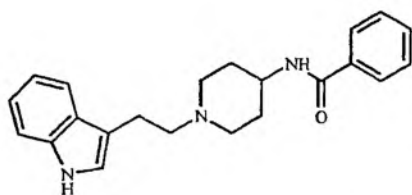
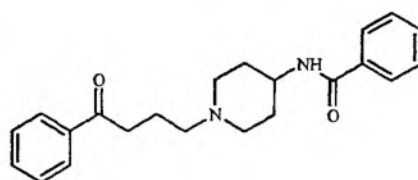
Rysunek 5. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR o strukturze fenyloalkilamin

Bliskim analogiem strukturalnym tamzulosyny jest pochodna indoliny, związek **10** oznaczony symbolem KMD-3213. Zamiana grupy metylowej w podobnym fragmencie strukturalnym tamzulosyny na trifluorometylową wpływa na zwolnienie szybkości metabolizmu leku, który w przypadku tamzulosyny polega na *O*-dealkilacji. Związek KMD-3213 wiąże się selektywnie z klonowanym ludzkim receptorem  $\alpha_{1a}$  ze stałą  $K_i = 0,036$  nM, ( $K_i \alpha_{1b}/K_i \alpha_{1a} > 586$  i  $K_i \alpha_{1d}/K_i \alpha_{1a} > 56$ ). Lek ten znajduje się w badaniach klinicznych w Japonii [9, 14]. Pochodną fenyloctylamin o prostej strukturze, którą charakteryzuje selektywność w stosunku do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR jest związek **11**, SNAP 5036. Wartości stałej wiązania  $pK_i$  do klonowanych ludzkich receptorów wynoszą dla związku **11**  $\alpha_{1a} = 8,4$ ,  $\alpha_{1b} = 7,4$ ,  $\alpha_{1d} = 6,8$ .

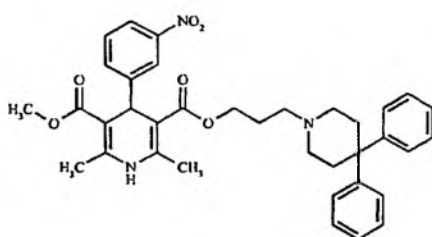
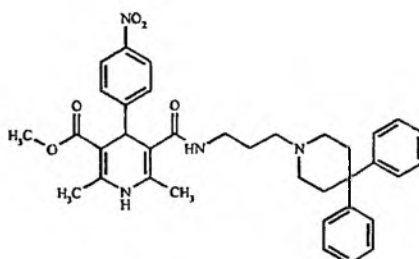
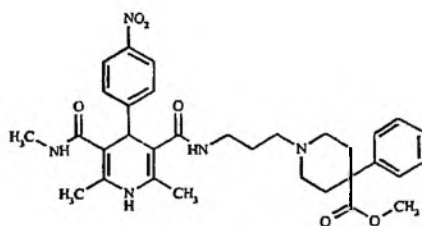
### 3. POCHODNE PIPERYDYNY

Indoramina **12** (Rys. 6) była jednym z pierwszych leków selektywnie blokujących receptor  $\alpha_{1a}$ -AR ( $K_i \alpha_{1a} = 4,0$  nM,  $\alpha_{1b} = 40$  nM,  $\alpha_{1d} = 160$  nM) stosowanym w terapii BPH. Jest ona pochodną indolu i dlatego oprócz działania na receptory  $\alpha_1$ -AR związek ten cechuje również powinowactwo do receptorów serotoninowych. Wywoływane przez indoraminę działania niepożądane ze strony ośrodkowego układu nerwowego, spowodowane wpływem na układ serotonergiczny i histaminergiczny, ograniczyły jej zastosowanie w leczeniu [9]. Korzystną modyfikacją cząsteczki indoraminy było zastąpienie układu indolu przez ugrupowanie fenylocto-

nowe. Otrzymany związek **13** o symbolu SNAP-1069 jest selektywnym blokerem receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR [8]. Zaliczany jest on do II generacji antagonistów receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR, pochodnych piperodyny; wartości  $K_i \alpha_{1a} = 16$  nM,  $\alpha_{1b} = 200$  nM,  $\alpha_{1d} = 790$  nM.

Indoramina **12**SNAP-1069 **13**Rysunek 6. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR pochodne piperodyny

Badania wśród arylopiperydyn rozpoczęły się od odkrycia (patent w 1994 r.) właściwości antagonistycznej względem podtypu receptora  $\alpha_{1a}$ -AR dla izomeru (*S*)(+)-niguldypiny **14**;  $K_i \alpha_{1a} = 0,15$  nM,  $\alpha_{1b} = 55$  nM,  $\alpha_{1d} = 100$  nM [13]. Niguldypina jest lekiem zawierającym układ 1,4-dihydropirydyny, stosowanym w leczeniu choroby wieńcowej i nadciśnienia poprzez blokowanie zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L.

(S)(+)-Niguldypina **14**SNAP 5089 **15**SNAP 5540 **16**Rysunek 7. Antagoniści receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR z grupy arylopiperydyn, pochodnych 1,4-dihydropirydyny

Obecnie przyjmuje się, że obydwa podtypy receptorów AR ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ) związane są z sygnalizacją wapniową, z tym, że receptory  $\alpha_{1a}$ -AR poprzez białko G sprzężone są z wrażliwym na dihydropirydyny kanałem wapniowym. Wyniki tych badań były punktem wyjścia do poszukiwań związków o zbliżonej strukturze i potencjalnym działaniu  $\alpha_{1a}$ -adrenolitycznym. Wybrane struktury związków najbardziej aktywnych i selektywnych w stosunku do podtypu receptora  $\alpha_{1a}$ -AR zostały przedstawione na Rys. 7.

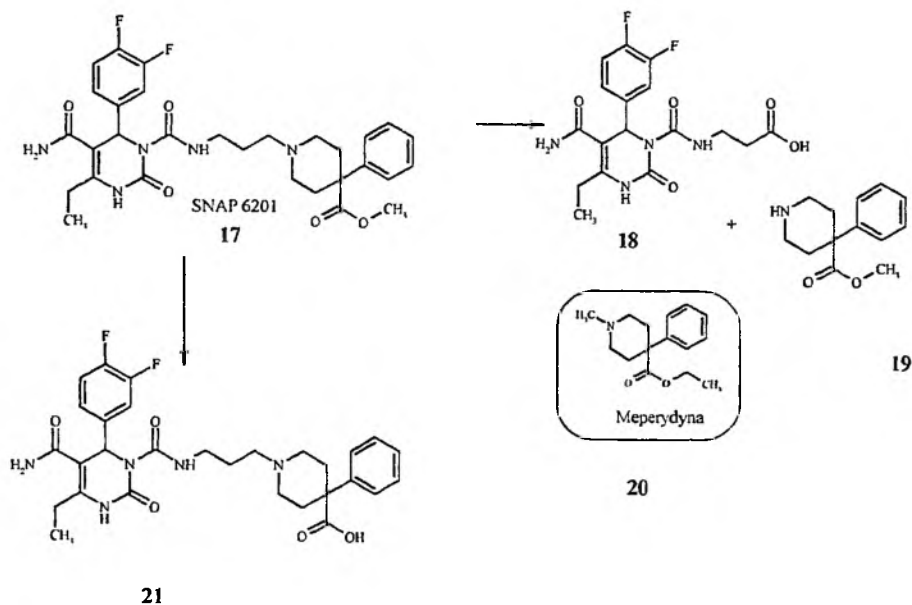
Związek **15** o symbolu SNAP 5089 najsilniej wiąże się z receptorem  $\alpha_{1a}$ -AR ( $K_1 \alpha_{1a} = 0,18$  nM,  $\alpha_{1b} = 180$  nM,  $\alpha_{1d} = 630$  nM) i w porównaniu z (*S*)(+)-niguldypiną w znacznie wyższych stężeniach blokuje kanały wapniowe ( $K_1 \text{Ca}^{2+} = 670$  nM). Podobnie pochodna **16** SNAP 5540, a przede wszystkim jej (-) enancjomer jest selektywnym antagonistą receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR; **16**  $K_1 \alpha_{1a} = 3,94$  nM,  $\alpha_{1b} = 4920$  nM,  $\alpha_{1d} = 7440$  nM, **16** (-)  $K_1 \alpha_{1a} = 2,42$  nM, **16** (+)  $K_1 \alpha_{1a} = 607$  nM. Ponadto wykazano, iż związek SNAP 5540 jest pozbawiony właściwości blokowania kanałów wapniowych a w badaniach *in vivo* ma korzystny profil farmakokinetyczny. Ze względu na jego uroselektywność został on wybrany do dalszych badań klinicznych jako potencjalny lek w terapii BPH, który jest pozbawiony niekorzystnych działań ubocznych prazosyny i terazosyny [9, 15–17].

Na podstawie analizy zależności między strukturą a działaniem w tej grupie połączeń stwierdzono, iż elementem umożliwiającym wiązanie się związków z receptorem  $\alpha_1$ -AR jest pierścień fenyłowy w położeniu 4 układu piperydyny. Przesunięcie grupy nitrowej w położenie 4 pierścienia fenyłowego powoduje osłabienie właściwości blokowania kanałów wapniowych, a siła oddziaływania uzyskanych związków z receptorami  $\alpha_{1a}$ -AR nie ulega zmianie. Zastąpienie grupy estrowej pomiędzy pierścieniami 1,4-dihydropirydyny i piperydyny grupą amidową nie ma wpływu na powinowactwo tych połączeń do kanałów wapniowych, ale równocześnie otrzymane związki charakteryzuje większa selektywność w stosunku do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR. Natomiast, zamiana grupy estrowej w położeniu 5 pierścienia 1,4-dihydropirydyny na ugrupowanie amidowe powoduje całkowitą utratę właściwości blokowania kanałów wapniowych przez te związki. Wprowadzenie grup alkilowych większych niż grupa etylowa w położeniu 2 lub 6 układu 1,4-dihydropirydyny powoduje zmniejszenie powinowactwa uzyskanych pochodnych do receptorów  $\alpha_1$ -AR.

Dalsze badania *in vivo* tych związków wykazały, iż pochodne 1,4-dihydropirydyny charakteryzuje po podaniu dożołądkowym niewielka biodostępność (5%). Jest ona najprawdopodobniej spowodowana ich szybkim metabolizowaniem polegającym na redukcji do pochodnych pirydyny. Z tych względów zmieniono układ 1,4-dihydropirydyny na pierścień 1,6-dihydropirimidyny lub 1,2,3,6-tetrahydropirimidyn-2-onu, co pozwoliło uzyskać związki o dużej selektywności do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR i korzystnych właściwościach farmakokinetycznych [18, 19].

W pierwszej fazie badań pochodnych 1,2,3,6-tetrahydropirimidyn-2-onu uzyskano związek **17** oznaczony symbolem SNAP 6201 [19]. Związek SNAP 6201 charakteryzuje wysokie powinowactwo i selektywność w stosunku do receptorów

$\alpha_{1a}$ -AR ( $K_i \alpha_{1a} = 0,2$  nM,  $\alpha_{1b} = 260$  nM,  $\alpha_{1d} = 350$  nM) a badania *in vivo* wykazały, iż cechuje go duża uroselektywność.

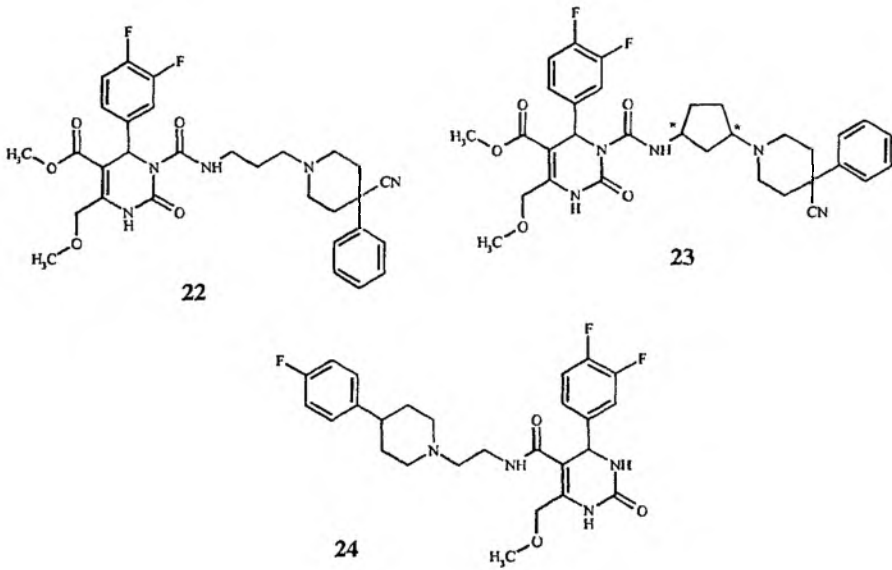


Rysunek 8. Główne szlaki metabolizmu związku 6201

Badając metabolizm tego związku stwierdzono, iż zachodzi on na dwóch drogach. Dominującym szlakiem metabolizmu (> 50%) jest tworzenie estru metylowego kwasu 4-fenyl-4-piperydynokarboksylowego **19**. Związek ten cechuje znaczne podobieństwo do narkotycznego leku przeciwbólowego, meperydyny **20** i podobnie jak ona jest on agonistą receptora opioidowego typu  $\mu$  (Rys. 8). Drugą drogą metabolizmu SNAP 6201 jest hydroliza grupy estrowej w położeniu 4-piperydyny prowadząca do otrzymania pochodnej kwasowej **21** [20]. Potencjalne działanie narkotyczne metabolitu **19** wyeliminowało dalsze badania kliniczne związku SNAP 6201. Zastąpienie ugrupowania estrowego w położeniu 4 piperydyny grupami metylową lub cyjanową pozwoliło uzyskać związki, które są pozbawione działania na receptory opioidowe typu  $\mu$ , a w badaniach na izolowanej tkance ludzkiej prostaty wykazują znaczną aktywność funkcjonalną oraz w badaniach *in vivo* na psach również wysoką uroselektywność (Rys. 9). Związek **22** cechuje wysoka selektywność do podtypu receptora  $\alpha_{1a}$ -AR ( $K_i \alpha_{1a} = 0,1$  nM,  $\alpha_{1b} = 130$  nM,  $\alpha_{1d} = 260$  nM).

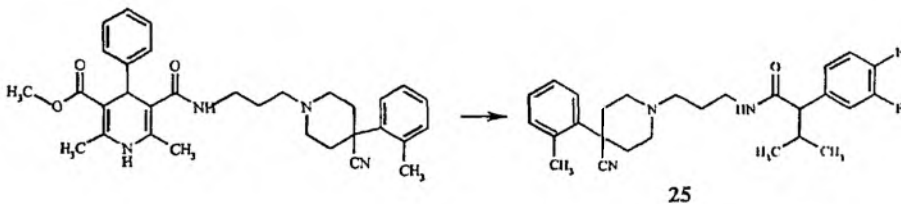
Modyfikacja podstawnika w położeniu „1” 1,2,3,6-tetrahydropiryminy-2-onu polegająca na zmianie giętkiego łącznika alkilowego między grupą amidową a pierścieniem piperydyny na układ cyklopentanu umożliwiła otrzymanie selektywnych antagonistów receptora  $\alpha_{1a}$ -AR. Wśród tych analogów związek **23** cechuje wysoka selektywność w stosunku do podtypów receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR oraz  $\alpha_{1d}$ -AR ( $K_i \alpha_{1a} = 1$  nM,  $\alpha_{1d} = 0,36$  nM). Wydaje się, że związki o takim powinowactwie do recepto-

rów adrenergicznych mogą mieć korzystne właściwości w dalszych badaniach *in vivo*. Przesuwając duży 4-fenylopiperydynoalkilowy podstawnik z położenia „1” 1,2,3,6-tetrahydropirydyn-2-onu w położenie „5” otrzymano kolejne związki o wysokim powinowactwie i selektywności względem receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR. Uzyskany związek **24** ( $K_1 \alpha_{1a} = 0,24$  nM,  $\alpha_{1b} = 41$  nM,  $\alpha_{1d} = 260$  nM) miał korzystny profil farmakokinetyczny i w badaniach *in vivo* na psach i szczurach łagodził symptomy BPH nie wywołując przy tym objawów niepożądanych ze strony układu krążenia [20–22].



Rysunek 9. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR z grupy arylopiperydyn, pochodne dihydropirydyn-2-onu (DPH)

Modyfikując układ 1,4-dihydropirydyny stwierdzono, że zastępując fragment 4-fenyl-1,4-dihydropirydyny przez odpowiednio podstawioną pochodną kwasu aryloalkilowego można uzyskać szereg nowych antagonistów receptora  $\alpha_1$ -AR (Rys. 10).



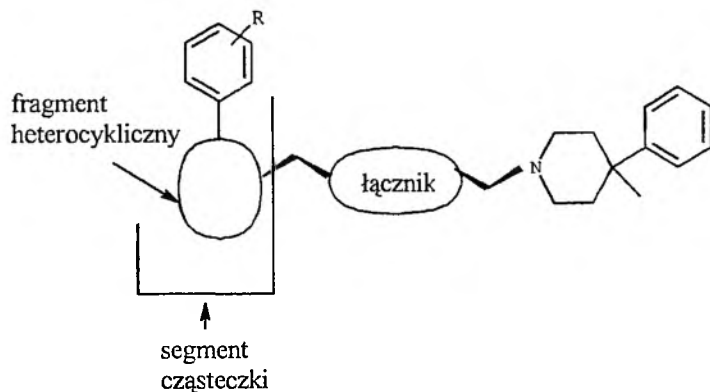
Rysunek 10. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR z grupy arylopiperydyn, pochodne fenyloacetamidu z fragmentem DHP

Otrzymana seria pochodnych piperydyny z podstawnikiem fenyloacetamidowym charakteryzowała się dużym powinowactwem i selektywnością w stosunku do rece-

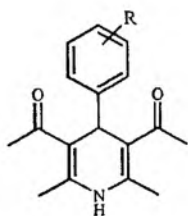


ptora  $\alpha_{1a}$ -AR. Poprzez zmniejszenie masy cząsteczkowej uzyskanych połączeń w porównaniu z pochodnymi 1,4-dihydropirydyny związki te cechuje znacznie lepszy profil farmakokinetyczny. Najaktywniejszym z uzyskanych połączeń był związek **25**, który jest silnym, selektywnym inhibitorem receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR ( $K_i \alpha_1 = 2,0$  nM,  $\alpha_{1b} = 1400$  nM,  $\alpha_{1d} = 2100$  nM) [23].

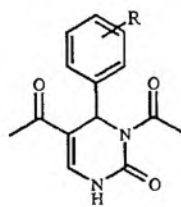
Analizując struktury opisanych pochodnych arylopiperydyn można wyróżnić elementy strukturalne niezbędne do blokady receptora  $\alpha_1$ -AR (Rys. 11). Struktury takich związków zawierają trzy segmenty. Pierwszym segmentem jest pierścień fenyllopiperydyny połączony łącznikiem z kolejnym segmentem. Łącznikiem może być ugrupowanie alkilowe, alkiloaminowe, alkiloestrowe a część alkilowa może być usztywniona poprzez pierścień karbocykliczny. W trzecim fragmencie jest układ heterocykliczny: 1,4-dihydropirydyny, dihydropirymidyn-2-onu (DPH) z różnie podstawioną grupą fenylową (atomem fluorowca, najczęściej atomem fluoru, grupą nitrową).



fragment heterocykliczny



grupa 1,4-dihydropirydyny



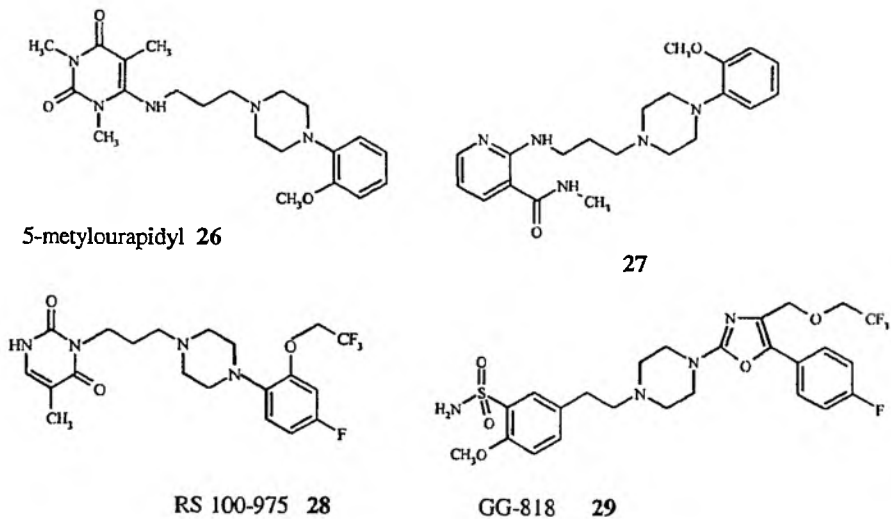
grupa dihydropirymidyn-2-onu (DPH)

Rysunek 11. Elementy strukturalne pochodnych arylopiperydyn niezbędne do blokady receptora  $\alpha_1$ -AR

## 4. POCHODNE ARYLOPIPERAZYN

Układ arylopiperazynowy jest obecny w strukturze wielu związków blokujących receptory  $\alpha_1$ -AR. Siła wiązania tych pochodnych z receptorami  $\alpha_1$ -AR zależy od obecności dodatkowego układu aromatycznego w cząsteczce. Ponieważ fragment arylopiperazynoalkilowy jest także charakterystyczny dla związków o działaniu serotoninowym, wiele z nich wykazuje również powinowactwo do receptorów serotoninowych typu 5-HT<sub>1A</sub>.

5-Metylourapidyl **26** był jednym z najwcześniej poznanych związków z podstawnikiem arylopiperazynowym, selektywnym w stosunku do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR. Równocześnie cechuje go znaczne powinowactwo do receptorów serotoninowych typu 5-HT<sub>1A</sub> (Rys. 12). Pochodną *N*-metylonikotynamidu mającą podobnie jak 5-metylourapidyl podstawnik *ortho*-metoksyfenylopiperazynopropylaminowy jest związek **27** (RS 97-078). Znajduje się on w badaniach klinicznych jako potencjalny lek. Związki **26** i **27** określane są obecnie jako I-generacja antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR pochodnych arylopiperazyn. Do II generacji tych pochodnych zaliczane są związki **28** (RS 100-975) i **29** (GG-818). Związek **28** ma budowę zbliżoną do 5-metylourapidylu i wykazuje w badaniach klinicznych również dużą uroselektywność.

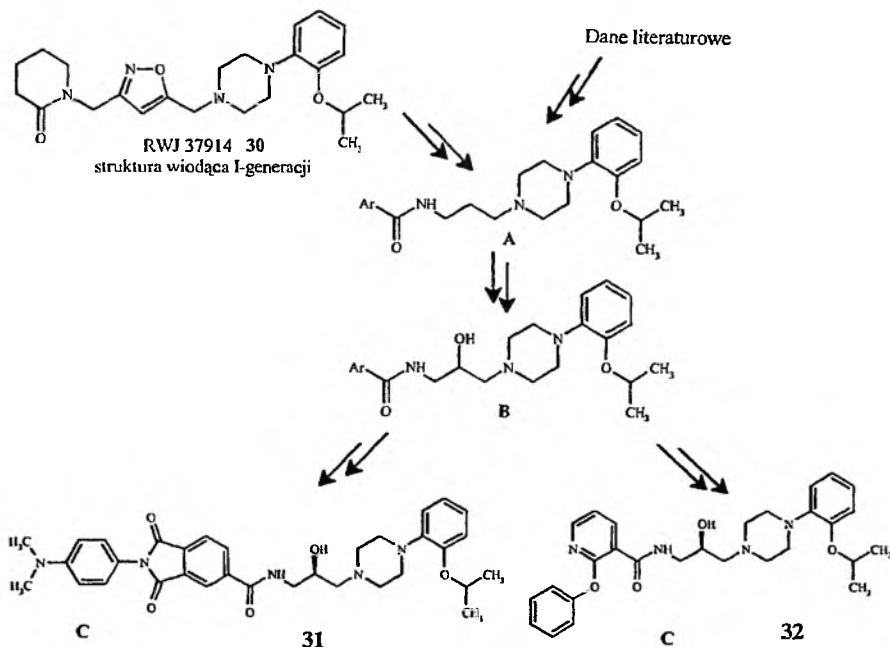


Rysunek 12. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR z grupy arylopiperazyn

Związek **29** (GG-818) jest pochodną piperazyny mającą w swojej strukturze fragment podobny do cząsteczki tamzulosyny. W badaniach farmakologicznych związek ten wykazał znaczną uroselektywność. Cechą charakterystyczną tego połączenia, podobnie jak w przypadku związków **10** i **28**, jest obecność ugrupowania 2,2,2-trifluoroetoksyowego, które prawdopodobnie może mieć znaczenie w jego tak znacznej uroselektywności [9, 19].

Poszukując nowych selektywnych blokerów receptorów  $\alpha_1$ -AR badano zależność pomiędzy aktywnością a podstawnikami w układzie fenylopiperazyny. Stwierdzono, że zastąpienie układu 2-metoksyfenylowego ugrupowaniem 2-izopropylksofenylowym lub 2-metoksy-5-chlorofenylowym, ma korzystny wpływ na siłę wiązania otrzymanych związków z receptorem  $\alpha_1$ -AR [24, 25].

W oparciu o dane literaturowe oraz wyniki wcześniejszych badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Kuo [26, 27] (związek RWJ 37914) zaproponowano dwie drogi poszukiwań nowych antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR (Rys. 13).

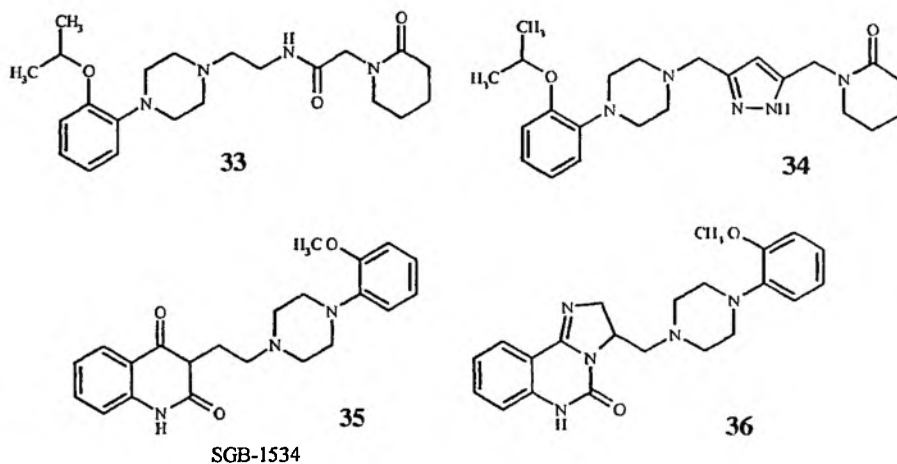


Rysunek 13. Kierunki poszukiwania nowych antagonistów receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR wśród pochodnych arylopiperazyn

Zakładając, że dodatnio naładowany atom azotu poprzez oddziaływanie z resztą kwasu asparaginowego, odgrywa główną rolę w wiązaniu z receptorem  $\alpha_1$ -AR, wnieść było można, że zmiany w obrębie farmakoforowej grupy fenylopiperazynowej powinny być ograniczone. Dopuszczalne mogły być modyfikacje w pozostałych fragmentach cząsteczki. Otrzymaną w ten sposób strukturę **A** poddano dalszym przekształceniom poprzez wprowadzenie grupy hydroksylowej w położeniu 2 łańcucha propylowego (struktura **B**). Zmiana ta miała na celu umożliwienie ewentualnych zmian właściwości farmakokinetycznych powstałych cząsteczek. Dalsze badania pozwoliły na wyodrębnienie struktur wiodących drugiej generacji (**C**) wykorzystywanych do dalszych badań [26, 27]. Uzyskane pochodne 2-izo-propylksofenylpiperazynowe tj. związki **31** i **32** charakteryzowały się wysoką selektywnością względem receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR i związaną z tym uroselektywnością. Również

w badaniach *in vivo* na zwierzętach (psy) związki **31** i **32** wykazały uroselektywność większą od tamzulosyny.

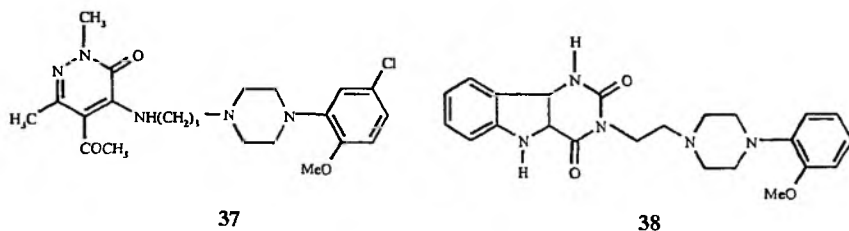
Nowych antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR, mających w swojej strukturze grupę arylopiperazynową, poszukuje się także wśród pochodnych piperidyn-2-onu (Rys. 14). Otrzymane związki **33** i **34** charakteryzuje większe od tamzulosyny powinowactwo i selektywność do receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR. Związki te zostały wybrane do dalszych badań klinicznych z zamiarem ich zastosowania do leczenia BPH [25, 28].



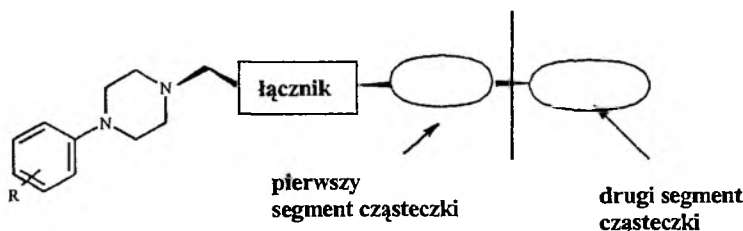
Rysunek 14. Antagoniści receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR z grupy arylopiperazyn.

Pochodne 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin-5(6H)-onu są kolejną grupą antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR zawierającą ugrupowanie arylopiperazynowe. Zaprojektowano je jako modyfikacje związku **35**, którego działanie hipotensyjne jest wynikiem blokady receptorów  $\alpha_1$ -AR. Otrzymany związek **36** charakteryzuje wysokie powinowactwo do receptorów  $\alpha_{1a}$  i  $\alpha_{1b}$  adrenergicznych, a w badaniach *in vivo* wykazał on działanie obniżające ciśnienie krwi [29].

Struktury nowych selektywnych związków projektowane są również w oparciu o modele farmakoforowe [30, 31, 35, 36]. Zespół Benedetti'ego [31] stosując podejście QSAR (*quantitative structure activity relationships*) zaprojektował fenylpiperazynoalkiloaminowe pochodne pirydazyonu-2 (rys. 15). Jeden z aktywnych związków tej serii, **37**, jest selektywnym antagonistą receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR ( $K_1 \alpha_{1a} = 0,89$  nM,  $\alpha_{1b} = 53,4$  nM,  $\alpha_{1d} = 94,5$  nM). Podobnie selektywny jest związek **38**, dla którego oznaczona wartość  $K_1 \alpha_{1a}$  jest 0,2 nM, podczas gdy teoretycznie obliczona wynosi 0,11 nM.

Rysunek 15. Antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR z grupy arylopiperazyn

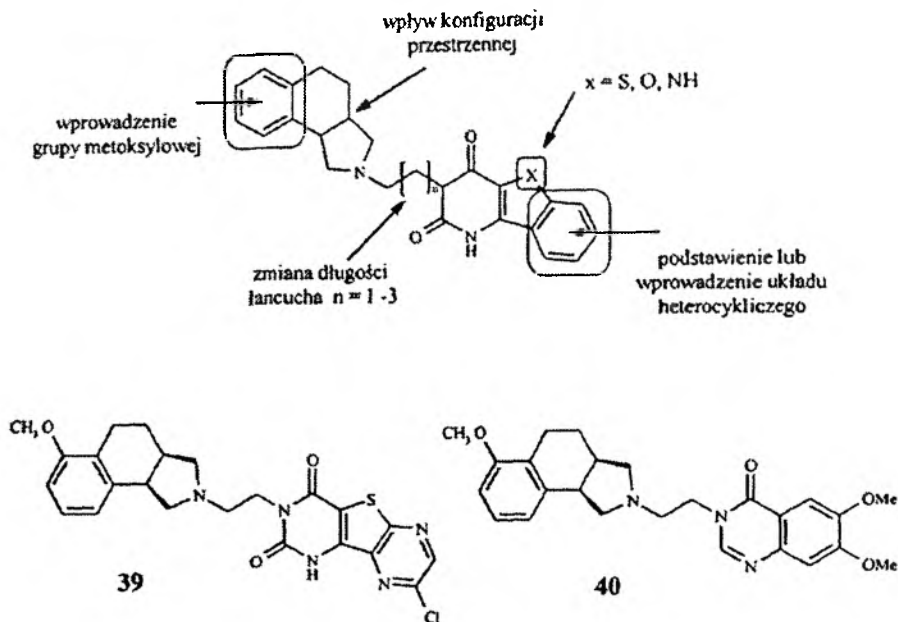
Liczba nowych antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR mających w swojej strukturze fragment arylopiperazynowy jest ogromna [24–34]. Świadczy to o podstawowym znaczeniu tego ugrupowania farmakoforowego w rozpoznawaniu miejsca wiążącego w receptorze. Duża różnorodność pozostałych fragmentów strukturalnych cząsteczek może mieć wpływ na selektywność wiązania w receptorze. Próba uogólnienia budowy antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR, pochodnych arylopiperazyn jest schemat przedstawiony na Rys. 16. Struktury antagonistów mają fragment arylopiperazynowy połączony łącznikiem z jednym lub dwoma segmentami cząsteczki. Pierwsza generacja antagonistów miała podstawnik fenylopiperazynowy, następna generacja *ortho*-metoksyfenylopiperazynowy. Najnowsza generacja związków posiada różnie podstawiony pierścień fenylopiperazyny (atomy fluorowców, grupy alkoksylowe). Segmenty antagonistów to różnorodne układy heterocykliczne, czego przykładem są związki przedstawione na Rys. 12–15.

Rysunek 16. Elementy strukturalne pochodnych arylopiperazyn niezbędne do blokady receptora  $\alpha_1$ -AR

## 5. ZWIĄZKI O RÓŻNEJ STRUKTURZE

Przykładem związków reprezentujących nowe struktury o działaniu antagonistów receptorów  $\alpha_1$ -AR są pochodne heksahydrobenzo[e]izindolu. Punktem wyjścia do poszukiwań w tej grupie pochodnych były wyniki badań farmakologicznych, otrzymanych wcześniej związków, których kierunki modyfikacji przedstawiono na Rys. 17. W wyniku tych chemiczno-farmakologicznych badań uzyskano pochodne heksahydrobenzo[e]izindolu, wśród których związki **39** i **40** charakteryzują się najsilniejszym działaniem adrenolitycznym. Związek **39** cechuje wysoka

$\alpha_{1a}$  selektywność ( $K_1 \alpha_{1a} = 0,69$  nM,  $\alpha_{1b} = 35,1$  nM,  $\alpha_{1d} = 3,83$  nM). Wykazuje on również wyższą od tamzulosyny uroselektywność. Natomiast związek 40 ma wysokie powinowactwo i umiarkowaną selektywność do receptorów  $\alpha_{1a}$ -adrenergicznych ( $K_1 \alpha_{1a} = 1,39$  nM,  $\alpha_{1b} = 1,63$  nM,  $\alpha_{1d} = 0,92$  nM). Związki te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako leki stosowane w leczeniu BPH [37, 38].



Rysunek 17. Antagoniści receptorów  $\alpha_{1a}$ -AR pochodne heksahydrobenzo[c]izindolu

## PODSUMOWANIE

Mimo różnorodności struktur chemicznych antagoniści receptorów  $\alpha_1$ -AR mają wspólne cechy, powodujące blokadę miejsca wiążącego ligand. Typowy antagonista  $\alpha_1$ -AR posiada centrum zasadowe, związane z obecnością atomu azotu ulegającego protonowaniu w fizjologicznym pH, oraz co najmniej jeden pierścień aromatyczny lub nienasycony, znajdujący się w bliskim sąsiedztwie atomu azotu. Uprotonowany atom azotu jest zasadniczym elementem farmakoforowym, zdolnym do rozpoznawania i wiązania reszty kwasu asparaginowego helisy 3 receptora poprzez jonowe oddziaływanie dalekiego zasięgu. Często jest ono dodatkowo wzmocnione poprzez wiązania wodorowe. Centrum zasadowe może być częścią łańcucha alifatycznego połączonego z układem heterocyklicznym (chinazoliny, imidazoliny) jak również częścią pierścienia heterocyklicznego (piperydyny lub piperazyny), połączonego z układem aromatycznym. Powinowactwo ligandu do miejsca wiążącego w receptorze, jak i selektywność, są modulowane przez siły krótkiego zasięgu (indukcyjne, odpychające, dyspersyjne). Stąd możliwa jest różnorodność struktur li-

gandów, które mają różne właściwości, kształt i wielkość cząsteczek oraz różnią się oddziaływaniami krótkiego zasięgu.

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa wskazuje na znaczący w ostatnich latach postęp w badaniach nad związkami blokującymi receptor  $\alpha_1$ -adrenergiczny, a w szczególności nad związkami, które selektywnie blokują podtyp  $\alpha_{1a}$  tego receptora. Wynika to z jednej strony z zapotrzebowania na związki o takim działaniu, które w przyszłości mogą się stać skutecznymi lekami, oraz z szybkiego rozwoju metodyki badań farmakologicznych *in vitro* na klonowanych receptorach ludzkich i zwierzęcych.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Z. Nowak, J. B. Zawilska (red), Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [2] S.Z. Langer, Eur. Urol., 1999, 36 (Suppl 1), 2.
- [3] Y. Hiraoka, T. Ohmura, M. Oshita, Y. Watanabe, K. Morikawa, O. Nagata, H. Kato, T. Taniguchi, I. Muramatsu, Eur. J. Pharmacol., 1999, 361, 119.
- [4] D.V. Daniels, J.R. Gever, J.R. Jasper, M.S. Kava, J.D. Lesnick, T.D. Meloy, G. Stepan, T.J. Williams, D.E. Clarke, D.J. Chang, A.P. Ford, *ibid.*, 1999, 370, 337.
- [5] M. Bock, M. Patane, Ann. Rep. Med. Chem. Academic Press, 2000, 35, 221.
- [6] J.B. Bremner, B. Coban, R. Griffith, J. Comp.-Aid. Mol. Design., 1996, 10, 545.
- [7] J.B. Bremner, B. Coban, R. Griffith, K.M. Groenewoud, B.F. Yates; Bioorg. & Med. Chem., 2000, 8, 201.
- [8] M. Witkowska, Nacdiśnienie tętnicze, 1998, 2, 124.
- [9] B. Kenny, S. Ballard, J. Blagg, D. Fox, J. Med. Chem., 1997, 40, 1293.
- [10] D. Giardina, U. Gulini, M. Massi, M.G. Piloni, P. Pompei, G. Rafaiani, C. Melchiorre, *ibid.*, 1993, 36, 690.
- [11] M.A. Patane, A.L. Scott, T.P. Broten, R.S.L. Chang, R.W. Ransom, J. DiSalvo, C. Forray, M.G. Bock, *ibid.*, 1998, 41, 1205.
- [12] R.R. Ruffolo Jr., W. Bondinell, J.P. Hielbe, *ibid.*, 1995, 38, 3681.
- [13] A. Leonardi, G. Motta, C. Boi, R. Testa, E. Poggesi, P.G. De Benedetti, M.C. Menziani, *ibid.*, 1999, 42, 427.
- [14] A. Hancock, Drug Develop. Res., 1996, 39, 54.
- [15] D. Nagarathnam, J.M. Wetzel, S.W. Miao, M.R. Marzabadi, G. Chiu, W.C. Wong, X. Hong, J. Fang, C. Forray, T.A. Branchek, W.E. Heydorn, R.S.L. Chang, T. Broten, T.W. Schorn, C. Gluchowski, J. Med. Chem., 1998, 41, 5320.
- [16] J.M. Wetzel, S.W. Miao, C. Forray, L.A. Borden, T.A. Branchek, C. Gluchowski, *ibid.*, 1995, 38, 1579.
- [17] W.C. Wong, G. Chiu, J.M. Wetzel, M.R. Marzabadi, D. Nagarathnam, D. Wang, J. Fang, S.W. Miao, X. Hong, C. Forray, P.J.-J. Vaysse, T.A. Branchek, C. Gluchowski, *ibid.*, 1998, 41, 2643.
- [18] W.C. Wong, W. Sun, B. Lagu, D. Tian, M.R. Marzabadi, F. Zhang, D. Nagarathnam, S.W. Miao, J.M. Wetzel, J. Peng, C. Forray, R.S.L. Chang, T.B. Chen, R. Ransom, S. O'Malley, T.P. Broten, P. Kling, K.P. Vyas, K. Zhang, C. Gluchowski, *ibid.*, 1999, 42, 4804.
- [19] D. Nagarathnam, S.W. Miao, B. Lagu, G. Chiu, J. Fang, T.G.M. Dhar, J. Zhang, S. Tyagarajan, M.R. Marzabadi, F. Zhang, W.C. Wong, W. Sun, D. Tian, J.M. Wetzel, C. Forray, R.S.L. Chang, T.P. Broten, R.W. Ransom, C.M. Harrell, K.P. Vyas, C. Gluchowski; *ibid.*, 1999, 42, 4764.

- [20] T.G.M. Dhar, D. Nagarathnam, M.R. Marzabadi, B. Lagu, W.C. Wong, G. Chiu, S. Tyagarajan, S.W. Miao, F. Zhang, W. Sun, D. Tian, Q. Shen, T.B. Chen, S. O'Malley, R. Ransom, K. Schneck, R. Bendesky, C.M. Harrell, K.P. Vyas, K. Zhang, J. Gilbert, D.J. Pettibone, M.A. Patane, M.G. Bock, R.M. Freidinger, C. Gluchowski, *ibid*, 1999, **42**, 4778.
- [21] J.C. Barrow, K.L. Glass, H.G. Selnick, R.M. Freidinger, R.S.L. Chang, S.S. O'Malley, C. Woyden, *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 2000, **10**, 1917.
- [22] J.C. Barrow, P.G. Nantermet, H.G. Selnick, K.L. Glass, K.F. Rittle, K.F. Gilbert, T.G. Steele, C.F. Hornick, R.M. Freidinger, R.W. Ransom, P. Kling, D. Reiss, T.P. Brotten, T.W. Schorn, R.S.L. Chang, S.S. O'Malley, T.V. Olah, J.D. Ellis, A. Barrish, K. Kassahun, P. Leppert, D. Nagarathnam, C. Forray, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2703.
- [23] M.A. Patane, R.M. DiPardo, R.C. Newton, R.A.P. Price, T.P. Brotten, R.S.L. Chang, R.W. Ransom, J. Di Salvo, D. Nagarathnam, C. Forray, C. Gluchowski, M.G. Bock, *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 2000, **10**, 1621.
- [24] T.R. Elworthy, A.P.W. Ford, G.W. Bantle, D.J. Morgans, R.S. Ozer, W.S. Palmer, D.B. Repke, M. Romero, L. Sandoval, E.B. Sjogren, F.X. Tamas, A. Vazquez, H. Wu, N.F. Arredondo, D.R. Blue, A. DeSousa, L.M. Gross, M.S. Kava, J.D. Lesnick, R.L. Vimont, T.J. Williard, Q.-M. Zhu, J.R. Pfister, D.E. Clarke, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 2674.
- [25] X. Li, W.V. Murray, L. Jolliffe, V. Pulito, *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 2000, **10**, 1093.
- [26] G.-H. Kuo, C. Prouty, W.V. Murray, V. Pulito, L. Jolliffe, P. Cheung, S. Varga, M. Evangelisto, C. Shaw, *Bioorg. & Med. Chem.*, 2000, **8**, 2263.
- [27] G.-H. Kuo, C. Prouty, W.V. Murray, V. Pulito, L. Jolliffe, P. Cheung, S. Varga, M. Evangelisto, J. Wang, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2183.
- [28] X. Li, K.A. McCoy, W.V. Murray, L. Jolliffe, V. Pulito, *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 2000, **10**, 2375.
- [29] J.-W. Chen, P.-L. Tao, K.-C. Wang, A. Gutcait, S.-W. Liu, M.-H. Yen, S.-I. Chien, J.-K. Rong, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 3128.
- [30] P.G. De Benedetti, F. Fanelli, M.C. Mecziani, M. Cocchi, R. Testa, A. Leonardi, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, **5**, 809.
- [31] D. Barlocco, G. Cignarella, V. Dal Piaz, M.P. Giovannoni, P.G. De Benedetti, F. Fanelli, F. Montesano, E. Poggesi, A. Leonardi, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 2403.
- [32] W.A. Carroll, K.B. Sippy, T.A. Esbenshade, S.A. Buckner, A.A. Hancock, M.D. Meyer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 1119.
- [33] R.M. DiPardo, M.A. Patane, R.C. Newton, R.A. Price, T.P. Brotten, R.S.L. Chang, R.W. Ransom, J. Di Salvo, R.M. Freidinger, M.G. Bock, *ibid.*, 2001, **11**, 1959.
- [34] V. Cecchetti, F. Schiaffella, O. Tabarrini, A. Fravolini, *ibid.*, 2000, **10**, 465.
- [35] R. Barbaro, L. Betti, M. Botta, F. Corelli, G. Giannaccini, L. Maccari, F. Manetti, G. Strappaghetti, S. Corsano, *J. Med. Chem.* 2001, **44**, 2118.
- [36] R. Barbaro, L. Betti, M. Botta, F. Corelli, G. Giannaccini, L. Maccari, F. Manetti, G. Strappaghetti, S. Corsano, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 361.
- [37] M.D. Meyer, R.J. Altenbach, F.Z. Basha, W.A. Carroll, I. Drizin, S.W. Elmore, P.P. Ehrlich, S.A. Lebold, K. Tietje, K.B. Sippy, M.D. Wendt, D.J. Plata, F. Plagge, S.A. Buckner, M.E. Brunc, A.A. Hancock, J.F. Kerwin Jr., *J. Med. Chem.*, 1997, **20**, 3141.
- [38] M.D. Meyer, R.J. Altenbach, F.Z. Basha, W.A. Carroll, S. Condon, S.W. Elmore, J.F. Kerwin Jr., K.B. Sippy, K. Tietje, M.D. Wendt, A.A. Hancock, M.E. Brunc, S.A. Buckner, I. Drizin, *ibid.*, 2000, **43**, 1586.



**INHIBITORY INTEGRAZY HIV**  
**INHIBITORS OF HIV INTEGRASE**

**Halina Niedbała, Jarosław Polański, Rafał Gieleciak**

*Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski  
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice*

---

Abstract  
Wstęp  
Inhibitory integrazy  
Styrylochinoliny  
Diketokwasy  
Podsumowanie  
Piśmiennictwo cytowane

---



**Halina Niedbała** jest starszym wykładowcą w Zakładzie Chemii Organicznej w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W roku 1977 ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Śląskim i została zatrudniona jako asystent w Instytucie Chemii, gdzie uzyskała stopień doktora w 1987 roku. W 1991 roku przebywała na rocznym stażu naukowym w Department of Chemistry, University of Idaho w USA.



**Jarosław Polański** jest profesorem nadzwyczajnym Uniwersytetu Śląskiego. W 1981 roku ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W latach 1981–1984 pracował w Centralnym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Przemysłu Izolacji Budowlanej w Katowicach. Od 1984 roku jest pracownikiem Zakładu Chemii Organicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego, gdzie uzyskał stopień doktora w 1990 roku. W 1998 roku habilitował się na Politechnice Łódzkiej. Od 2001 pełni funkcję kierownika Zakładu Chemii Organicznej.

Zajmuje się chemią organiczną oraz chemoinformatyką w szczególności projektowaniem i syntezą związków biologicznie aktywnych. Kilkakrotnie przebywał na krótkich zagranicznych stażach naukowych Labor für Computer Chemie, Organisch-Chemisches Institut, Technische Universität München oraz Computer-Chemie-Centrum, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg), zaś w 2000 i 2001 jako visiting professor Ecole Normale Supérieure de Cachan w Laboratoire de Biotechnologies et Pharmacogenetique Appliquee, CNRS UMR 8532, Paris-Cachan, Francja.



**Rafał Gieleciak** w 1999 roku ukończył studia chemiczne na Wydziale Mat-Fiz-Chem Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Obecnie jest doktorantem w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii UŚ.

---

**ABSTRACT**

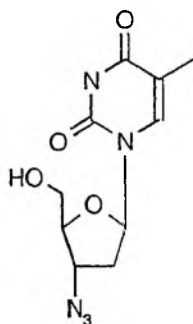
AZT was a first anti-HIV drug found during screening performed by National Institute of Health (Bethesda, USA) [1]. Anti-HIV drugs or potential drugs grouped according to the molecular target or compound class can be found in the NIH database at [<http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/intro.htm>] [2–13]. HIV integrase is one of the potential targets of anti-HIV drugs. Integrase is an enzyme that catalyzes the insertion of retrotranscribed viral DNA into the cellular host genome. Its structure is known [14] but until now there is no certified drug targeted at this enzyme. In the 90' several integrase inhibitors were described [18–28]. The investigations of these compounds allowed finding new active compounds, e.g., styrylchinolines that was described in recent years [29–32, 39]. In particular, the current publication discusses structure-activity relationships (SAR) for these compounds (Figure 1). It appeared that the SAR data from *ex vivo* experiments [33] can be both visualized and interpreted by the use of the Kohonen maps of the electrostatic potential of the molecular surface [34–38] as shown in Figure 2. Finally, the results of the Merck investigations on HIV-1 integrase inhibitors have been briefly discussed (Figure 3) [38, 39].

---

---

## WSTĘP

Współczesna cywilizacja przyzwyczaiła człowieka do dostępności skutecznych leków stosowanych zarówno w przypadku poważnych chorób jak i codziennych dolegliwości. Ciągłe jednak nie potrafimy znaleźć skutecznej terapii przeciw wielu schorzeniom. Jednym z poważniejszych jest AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). W 1984 roku Robert Gallo z National Cancer Institute i Luc Montagnier z Instytutu Pasteura udowodnili wirusową etiologię AIDS. Odkrycie to nie oznacza jednak, że umiemy skutecznie zapobiec atakowi wirusa HIV, który stanowi przyczynę rozwoju AIDS. Pierwszym lekiem stosowanym w terapii HIV była azidotymidyna (AZT) 1.



1

Związek ten został otrzymany już w latach sześćdziesiątych przez Jeroma Horowitza z Michigan Cancer Foundation, znacznie wyprzedzając pojawienie się AIDS. AZT poddano dokładnym badaniom z myślą o terapii przeciwnowotworowej. W projektowanej formie nie spełnił jednak nadziei i nigdy nie pojawił się na rynku jako lek przeciwnowotworowy. Kiedy w 1984 roku rozpoczęto prace nad potencjalnymi lekami przeciw HIV w amerykańskim instytucie badawczym NCI, dr Samuel Broder, jeden z dyrektorów tegoż instytutu, skutecznie zachęcił firmy farmaceutyczne do udziału w badaniach przesiewowych (ang. *screening*). Jedną z próbek dostarczonych przez brytyjską firmę Burroughs Wellcome było właśnie AZT [1]. Zarówno środki używane obecnie w terapii zakażenia HIV, jak i potencjalnie nowe farmaceutyki podzielić można na kilka typów w zależności od klasy połączenia chemicznego oraz molekularnego celu ataku. Wyróżnia się między innymi analogi nukleozydów [2], inhibitory proteazy HIV [3], nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy [4], fosfonianowe analogi acyklicznych nukleozydów [5, 6], produkty naturalne [7], inhibitory integrazy [8–13].

## INHIBITORY INTEGRAZY

Obecnie farmakoterapia AIDS oparta jest między innymi na lekach hamujących odwrotną transkryptazę oraz na inhibitorach proteazy HIV-1. Znanych jest kilka inhibitorów proteazy wprowadzanych do leczenia lub znajdujących się na etapie badań klinicznych. Leki te, choć szybko zmniejszają liczbę wirusów, nie zawsze są skuteczne. Przyczyna tkwi głównie w ogromnej zmienności genetycznej, która prowadzi do licznych mutacji wirusa. Duże nadzieje budzi nowa grupa leków wieloskładnikowych o różnych mechanizmach działania. Wśród nich znajdują się leki hamujące replikację wirusa HIV w zakażonych komórkach.

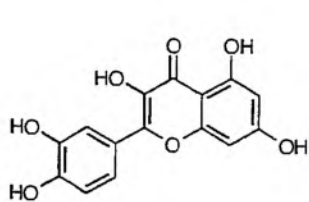
Szczególne zainteresowanie jako cel potencjalnego ataku odgrywa integraza HIV – enzym, który umożliwia zespolenie wirusa z DNA gospodarza. Pomimo tego, że jej struktura jest znana, dotychczas nie udało się wprowadzić na rynek żadnego leku, którego działanie polegałoby na hamowaniu integrazy wirusa HIV [14].

Integraza (IN) jest enzymem, którego obecność konieczna jest do replikacji wirusa HIV. Katalizuje on włączanie się (integrację) DNA wirusa do DNA gospodarza. Opracowanie efektywnych i bezpiecznych preparatów tego typu umożliwiłoby rozszerzenie spektrum działania leków przeciw AIDS oraz prowadzenie tzw. politerapii schorzenia AIDS. Pomimo znacznego zaawansowania badań oddziaływania otrzymanych inhibitorów z enzymem IN, do tej pory nie rozstrzygnięty pozostaje problem mechanizmu hamowania. Enzym integrazy zbudowany jest z trzech zasadniczych domen: domeny N-końcowej, centrum katalitycznego i domeny C-końcowej [15]. Centrum katalityczne IN wirusa HIV zawiera triadę aminokwasów posiadających wolne grupy karboksylowe: Asp<sup>64</sup>, Asp<sup>116</sup> i Glu<sup>152</sup>, które mogą wiązać metale dwuwartościowe. Przypuszcza się, że odgrywa to kluczową rolę w procesie katalitycznym. Konkurencyjne wiązanie inhibitora z integrazą w miejscu wiązania z DNA wirusa lub oddziaływanie z wolnymi grupami karboksylowymi kwasu asparaginowego i glutaminowego enzymu IN być może odpowiedzialne jest za hamowanie aktywności tego enzymu. Integraza w swej aktywnej formie kompleksuje kationy metali dwuwartościowych, najlepiej jony Mg<sup>+2</sup> [16]. Sądzi się, że mechanizm działania inhibitorów może być wynikiem konkurencyjnego kompleksowania tych jonów przez inhibitor [17].

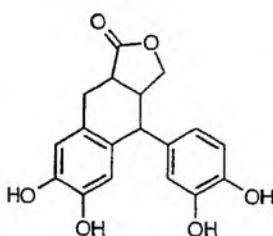
Działanie enzymu IN wirusa HIV przebiega w trzech etapach. Pierwszy etap, określany jako 3'-modyfikacja (ang. 3'-*processing*), polega na odszczepieniu dwóch nukleotydów z każdego 3'-końcowego łańcucha obu nici DNA wirusa HIV. Skrócenie łańcucha prowadzi do uwolnienia grup hydroksylowych co umożliwia nukleofilowe oddziaływanie końców – 3' DNA wirusa z DNA gospodarza. Etap drugi, zwany przeniesieniem nici (ang. *strand transfer*), to wbudowywanie pary zmodyfikowanych końców DNA wirusa do DNA gospodarza. W przypadku wirusa HIV, miejsca integracji w niciach atakowanego DNA oddzielone są przez pięć par zasad. Etap trzeci to dezintegracja polegająca na przywróceniu ciągłości, czyli naprawie przerwanych nici DNA gospodarza na skutek kopiowania tych pięciu par zasad [15].

W latach dziewięćdziesiątych opisano wiele klas związków organicznych, które wykazują hamujące działanie w stosunku do integrazy wirusa HIV-1 [18–25]. Wśród nich znajdują się naturalne i syntetyczne związki zbudowane zazwyczaj z dwóch fragmentów arylowych podstawionych grupami hydroksylowymi. Obie jednostki arylowe połączone są różnego typu mostkami zawierającymi wiązania typu  $\pi$ . Znane inhibitory integrazy podzielić można na następujące grupy, w zależności od budowy chemicznej:

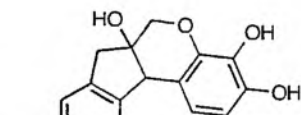
- pochodne flawonowe, jak np. kwercetyna (**2**) [18]
- bis katechole (**3**), (**4**) [19, 20]
- tyrofostryna i jej analogi (**5**), (**6**) [21]
- kurkumina (**7**) [22]
- pochodne kwasów cynamonowego, jak jego estry 2-fenylotylowe (CAPE, ang. *caffeic acid phenethyl ester*) (**8**) oraz analogi amidowe [18, 23], pochodne kwasu 1,2-dihydroksybursztynowego (ang. *chicoric acid*) (**9**) i kwasu chinonowego (3,5-DCQA, ang. *3,5-dicaffeoylquinic acid*) (**10**) [24, 25]
- pochodne kwasu aurynotrikarboksylowego (ATA) (**11**) [26]
- pochodne na bazie kumaryny (**12**) [27]



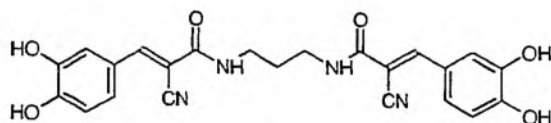
2



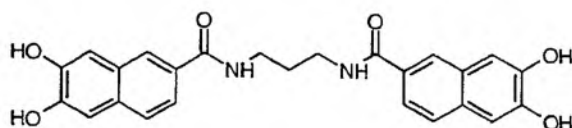
3



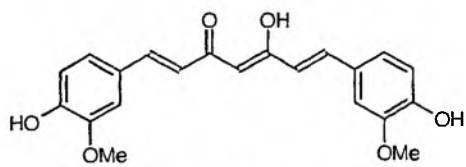
4



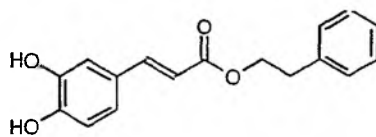
5



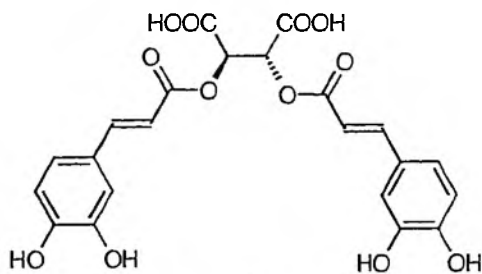
6



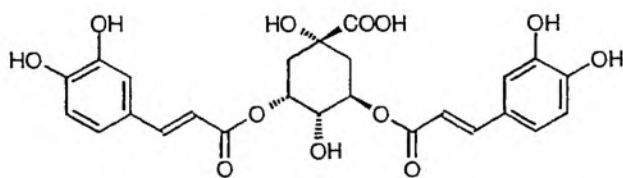
7



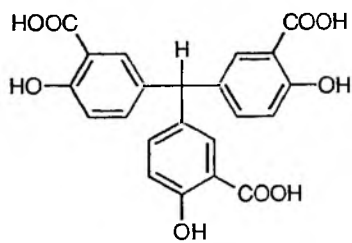
8



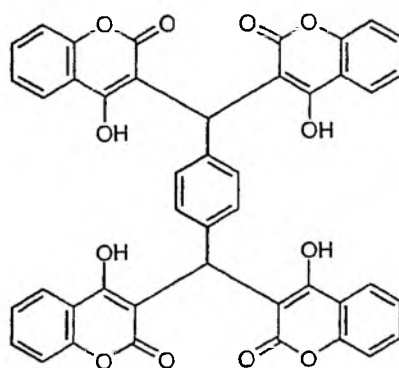
9



10

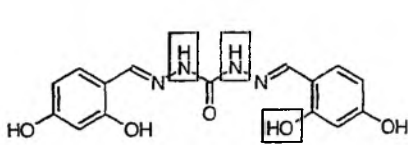


11

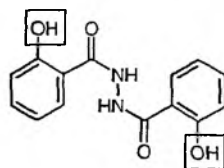


12

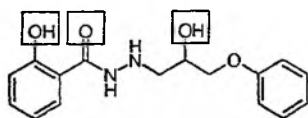
Analiza znanych inhibitorów integrazy wirusa HIV pozwoliła na utworzenie kilku modeli farmakoforów [28]. Na podstawie badań modelowych cząsteczek i po utworzeniu bazy trójwymiarowych struktur cząsteczkowych wyselekcjonowano szereg związków, które obejmowały poszukiwany farmakofor. Po przeprowadzeniu testów wykryto wśród nich nowe inhibitory integrazy (13–17) [29].



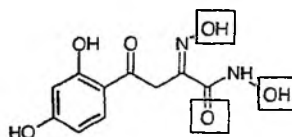
13



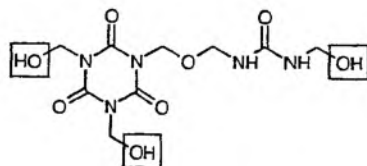
14



15



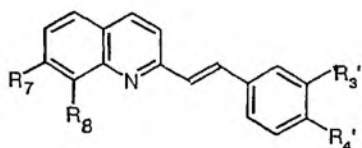
16



17

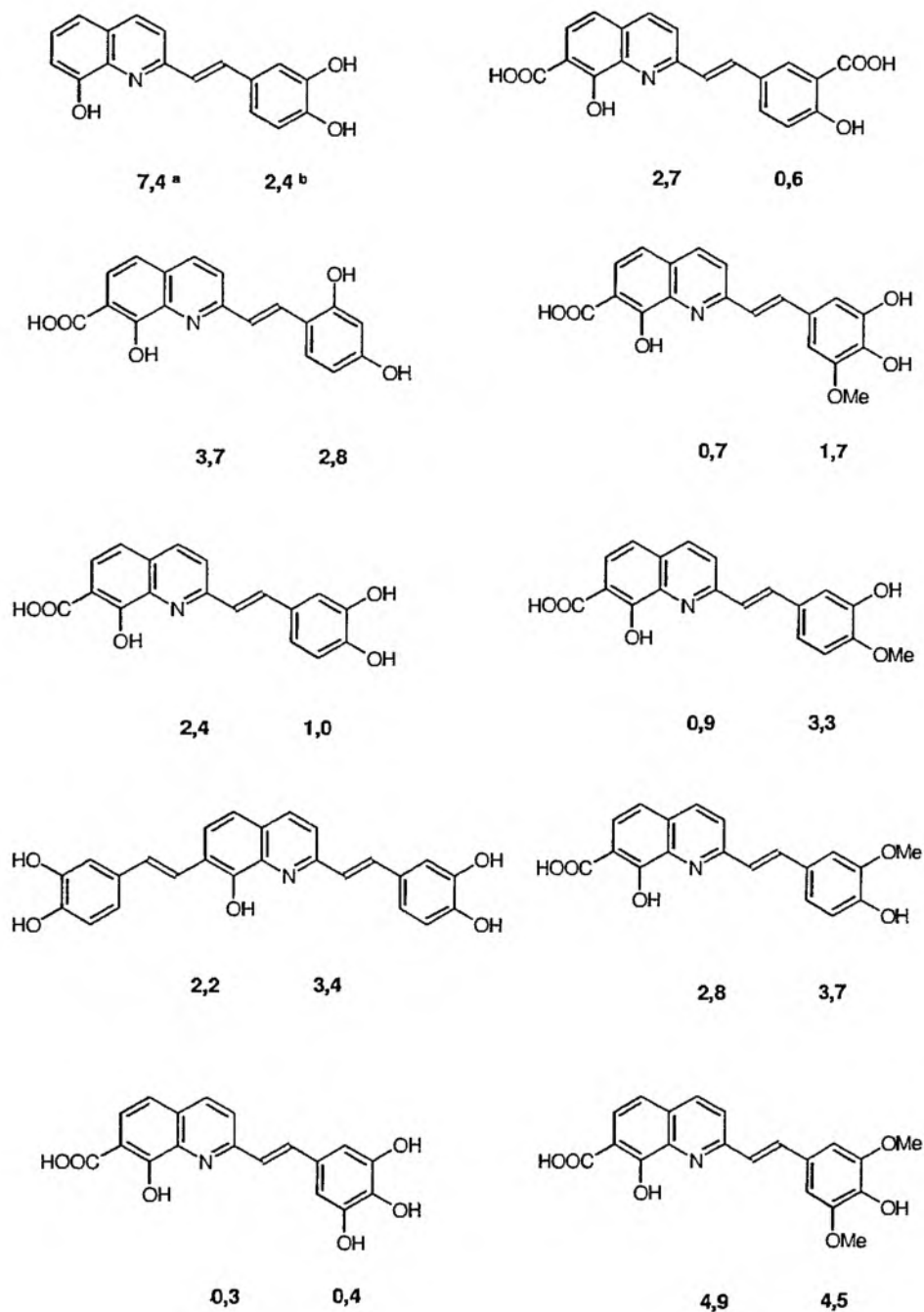
## STYRYLOCHINOLINY

W 1998 roku opisano nowy szereg związków, które hamują działanie integrazy wirusa HIV *in vitro*. Są to pochodne styrylochinolinowe (18) [30]. Wiele związków z tej grupy, pozbawionych jest toksyczności, hamuje działanie enzymu już przy stężeniach mikromolowych, a nawet submikromolowych i wyraźnie przeciwdziała replikacji wirusa HIV *ex vivo*.



18





Rysunek 1. Wzory strukturalne oraz aktywności styrylochinolinowych inhibitorów enzymu IN wirusa HIV-1.

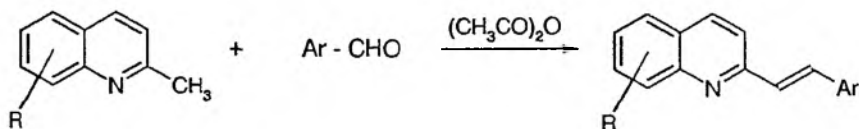
<sup>a</sup> wartość  $\mu\text{M IC}_{50}$  etapu 3' - modyfikacji,

<sup>b</sup> wartość  $\mu\text{M IC}_{50}$  etapu przeniesienia nici (integracji)

Wykazano, że obecność metali dwuwartościowych jest konieczna dla katalitycznej aktywności enzymu integrazy wirusa HIV [15]. Kationy metalu kompleksowane są przez aktywne centra enzymu o charakterze kwasowym. Autorzy cytowanej pracy [30] zaprojektowali nowy inhibitor integrazy, w którym dwa kationy metalu  $M^{2+}$  mogą być kompleksowane w podobny sposób. Związkiem takim może być 8-hydroksychinolina, powszechnie znany reagent do oznaczania metali  $M^{2+}$  ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ). Układ arylowy zawierający kilka podstawników hydroksylo- wych może stanowić drugi element zdolny do kompleksowania. Wiele znanych inhibitorów integrazy HIV zawiera fragment aromatyczny z grupami hydroksylowymi w położeniu orto względem siebie – układ typu katecholu.

Otrzymano wiele pochodnych styrylochinolinowych, wykazujących aktywność hamującą w stosunku do enzymu IN (Rysunek 1). Zawierają one różne podstawniki w jednostce chinolinowej głównie w pozycji 3' - i 4' - [29–32].

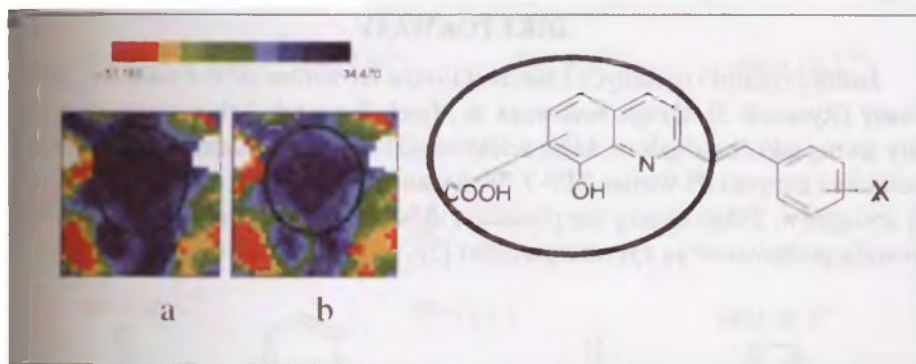
Zsyntezowane związki badano zarówno pod względem cytotoksyczności, jak i ich wpływu na oba etapy, w których uczestniczy enzym IN tzn. 3'-modyfikacja i przeniesienie nici. Wartości  $IC_{50}$ , oznaczano *in vitro* dla obu tych reakcji oddzielnie, w przypadku wielu styrylochinolinowych pochodnych nie przekraczają wartości  $2\mu M$ . Ogólna metoda syntezy tych pochodnych polega na kondensacji podstawionej 2-metylochinoliny z aromatycznym lub heteroaromatycznym aldehydem (schemat 1).



Schemat 1

Te analogi, w których pierścień benzenowy zastąpiony został układem heteroaromatycznym (3'-tienyl, 2'-furyl i 3'-pirydyl) okazały się również aktywne jako inhibitory IN. Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują na to, że obecność grupy hydroksylowej w położeniu 8- lub karboksylowej w pozycji 7- we fragmencie chinolinowym jest konieczna, aby związek był aktywny względem IN. Najkorzystniejsze rezultaty osiąga się wtedy, gdy jednocześnie obecne są obie te grupy. Zastąpienie grupy 7-karboksylowej grupą karbometoksyłową lub atomem chloru powoduje zmniejszenie aktywności lub całkowitą jej utratę. Postuluje się, że taki układ *o*-hydroksykarboksylowy w jednostce chinolinowej kompleksuje kationy  $Mg^{2+}$ , co stanowi mechanizm konkurencyjny dla integrazy, a w konsekwencji prowadzi do hamowania jej aktywności katalitycznej. Natomiast obecność grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym, połączonym mostkiem etnylenowym z fragmentem chinolinowym, nie jest konieczna dla zachowania zdolności hamowania IN. Zastąpienie grup hydroksylowych grupami metoksyłowymi lub atomami chlorowca nie powoduje utraty lub wyraźnego osłabienia aktywności względem enzymu IN. Wy-

kazano również, że większy wpływ na aktywność inhibitora ma obecność układu chinolinowego niż połączonego z nim polihydroksylogowego fragmentu aromatycznego.



Rysunek 2. Mapy potencjału elektrostatycznego wykonane techniką porównawczej mapy neuronowej Kohonena.

Mapy przedstawiają obszar cząsteczek cząsteczek styrylochinolin otoczony elipsą. Średnie mapy cząsteczek związków a) nieaktywnych, b) aktywnych wyraźnie różnią się kolorem [33]

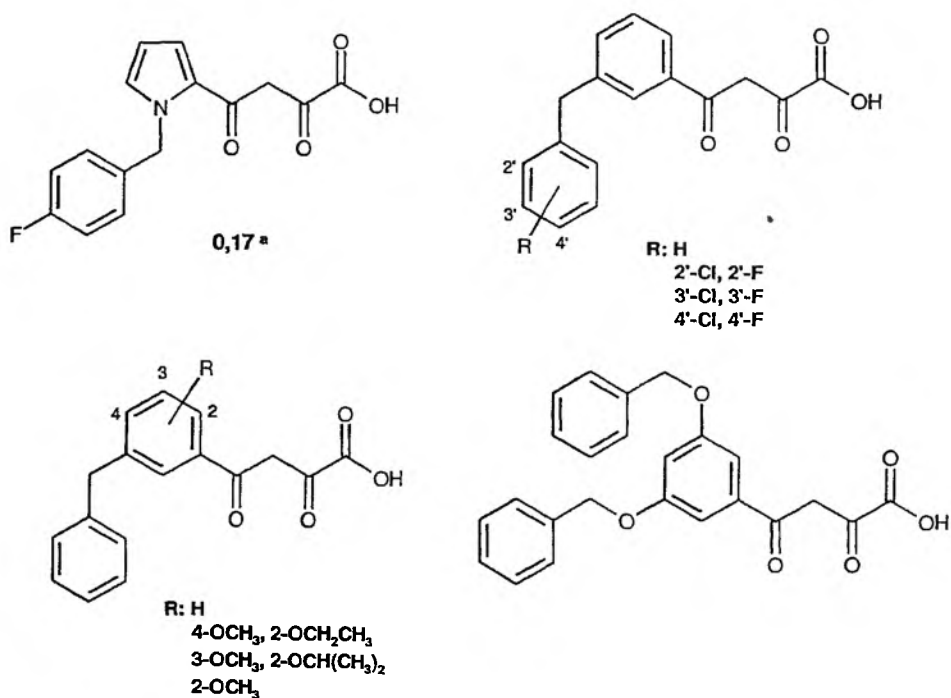
Rysunek 2 przedstawia wyniki badań [33] szeregu pochodnych styrylochinolin przeprowadzone techniką porównawczej sieci neuronowej Kohonena [34–37]. Mapy wykonane taką techniką pozwalają zróżnicować pochodne, które w badaniach *ex vivo* wykazują aktywność od tych, które nie są aktywne. Porównując mapy z konkretnymi strukturami, udaje się odnaleźć proste molekularne uwarunkowanie aktywności. Okazuje się, że decydujące znaczenie odgrywa możliwość występowania efektu mezomerycznego między parą elektronową podstawnika X a chinolinowym pierścieniem związku. Efekt taki może wystąpić wówczas, kiedy podstawnik znajduje się w położeniu para lub orto. Wykonanie map podobnych do tych, które pokazano na rysunku 2 pozwoliło na efektywne prognozowanie przeciwwirusowej aktywności w hodowlach komórkowych *ex vivo*, a więc projektowanie nowych inhibitorów [33].

Wartości aktywności enzymu IN oznaczone w badaniach *in vitro* nie zawsze korelują z aktywnością antywirusową określoną metodą *ex vivo* [29, 30]. Wyizolowane komórki zainfekowane wirusem HIV-1 traktowano roztworami inhibitorów o różnym stężeniu. Większość związków z grupy pochodnych styrylochinolinowych nie wykazywało cytotoksyczności przy stężeniach poniżej 100  $\mu\text{M}$ . Związki posiadające układ typu katechołu, czyli dwie grupy hydroksylowe w położeniach 3'- i 4', z reguły aktywne jako inhibitory IN, wykazywały relatywnie wysoką toksyczność komórkową. Fakt ten w zasadzie wyklucza ich zastosowanie w preparatach leczniczych przeciwko wirusowi HIV. Problem toksyczności jest barierą również w przypadku zastosowania do celów terapeutycznych pochodnej z fragmentem 3'-tlenylogowym, pochodnych zawierających pierścień benzenowy podstawiony w położeniu 4'- grupami  $-\text{NO}_2$  i  $-\text{NHAc}$ , a także niepodstawiony pierścień benze-

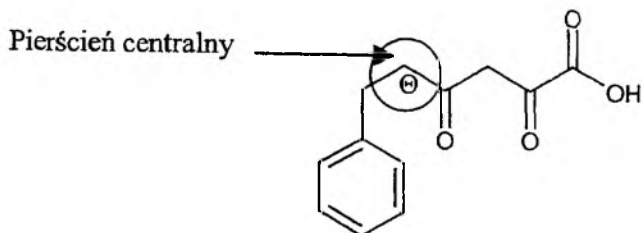
nowy. Często jednak te związki, które są najskuteczniejszymi inhibitorami IN, wykazują również aktywność przeciwwirusową *ex vivo* względem wirusa HIV [31].

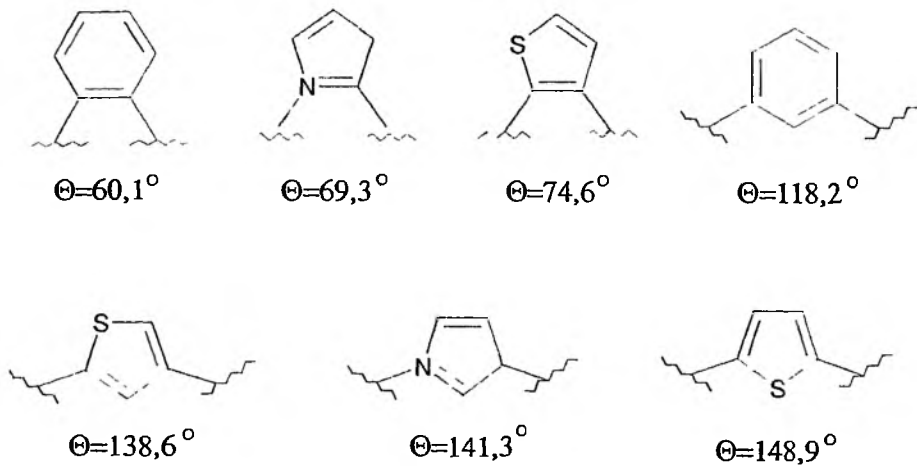
### DIKETOKWASY

Jedną z ostatnio opisanych klas inhibitorów IN wirusa HIV-1 stanowią diketokwasy (Rysunek 3). Grupa badawcza w Merck Research Laboratories otrzymała cały szereg takich związków, które selektywnie i skutecznie hamują proces przeniesienia nici enzymu IN wirusa HIV-1. Wykazano również aktywność *ex vivo* tej grupy związków. Diketokwasy nie posiadają układu typu katechol i być może z tego powodu pozbawione są cytotoksyczności [38, 39].



<sup>a</sup> wartość IC<sub>50</sub> (μM) dla procesu przeniesienia nici



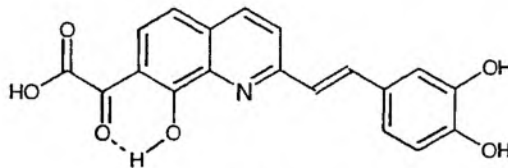


Rysunek 3. Wybrane analogi diketokwasów oraz centralny pierścień aromatyczny wyznaczający kąt  $\theta$  [38]

Zsyntezowano również takie pochodne, w których centralny pierścień aromatyczny został zastąpiony innym układem heteroaromatycznym lub inaczej niż 1,3-podstawionym pierścieniem benzenowym. W wyniku takiej modyfikacji fragment zawierający dwie grupy ketonowe i karboksylową oraz pozostały fragment benzyłowy, mogą być względem siebie różnie zorientowane w przestrzeni – parametrem, który określa to zorientowanie jest kąt  $\theta$  pokazany na rysunku 3.

Wzajemne ułożenie przestrzenne omawianych fragmentów wpływa na aktywność diketokwasów. Wartości  $IC_{50}$  zmierzone *in vitro* dla procesu przeniesienia nici (integracji) dla większości otrzymanych diketokwasów przyjmowały wartości rzędu  $0,1 \mu\text{M}$ . Wiele spośród otrzymanych pochodnych wykazuje również wysoką aktywność *ex vivo* [38].

Do grupy diketokwasów zaliczyć można również styrylochinolinową pochodną **19** [40], która jednak okazała się wbrew oczekiwaniom całkowicie nieaktywna *in vitro* wobec enzymu IN. Pomimo tego związek ten wykazuje znaczną aktywność *ex vivo*.



19

## PODSUMOWANIE

Poszukiwania nowych klas inhibitorów IN ciągle pozostają problemem otwartym. Enzym IN, który katalizuje proces replikacji DNA wirusa HIV-1 w komórkach nosiciela jest ostatnim celem, w stosunku do którego nie dysponujemy jeszcze efektywnie działającym lekiem. Sądzi się, że znalezienie takiego środka pozwoli w znacznym stopniu przełamać złożone problemy terapii AIDS, która wymaga stosowania wielu preparatów o różnych mechanizmach działania. Nowe klasy inhibitorów pozwalają również lepiej zbadać mechanizmy działania samej integrazy.

## PODZIĘKOWANIA

Praca częściowo finansowana z grantu KBN PBZ - 040 P04/08.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Ch.S.W. Koehler, *The Pharmaceutical Century, Ten Decades of Drug Discovery*, <http://pubs.acs.org/journals/pharmcent/Ch7.html>
- [2] B.A. Larder, S.D. Kemp, P.R. Harrigan, *Science*, 1995, **269**, 696.
- [3] N.A. Roberts, J.A. Martin, D. Kinchington, A.Y. Broadhurst, J.C. Craig, I.B. Duncan, S.A. Galpin, B.K. Handa, J. Kay, A. Krohn, R.W. Lambert, J.H. Merrett, J.S. Mills, K.E.B. Parkes, S. Redshaw, A.J. Ritchie, D.L. Taylor, G.J. Thomas, P.J. Machin, *Science*, 1990, **248**, 358.
- [4] T.M. Williams, T.M. Ciccarone, S.C. Mactough, C.S. Rooney, S.K. Balani, J.H. Condra, E.A. Emini, M.E. Goldman, W.J. Greenlee, L.R. Kauffman, J.A. O'Brien, V.V. Sardana, W.A. Schleif, A.D. Theoharides, P.S. Anderson, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 1291.
- [5] J.M. Cherrington, A.S. Mulato, M.D. Fuller, M.S. Chen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, **40**, 2212.
- [6] J. Balzarini, S. Aquaro, C.F. Perno, M. Witvrouw, A. Holy, E. Declercq, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, **219**, 337.
- [7] J.B. Kahlon, M.C. Kemp, R.H. Carpenter, B.H. Mcanalley, H.R. McDaniel, W.M. Shannon, *Mol. Biother.*, 1991, **3**, 127.
- [8] E. Eich, J. Schulz, S. Trumm, P.S. Sarin, A. Maidhof, H. Merz, H.C. Schroder, W.F.G. Muller, *Planta. Med. (short lectures)*, 1990, **56**, 506.
- [9] K. Pfeifer, H. Merz, R. Steffen, W.E.G. Muller, S. Trumm, J. Schulz, E. Eich, H.C. Schroder, *J. Pharm. Med.*, 1992, **2**, 75.
- [10] E. Eich, H. Pertz, M. Kaloga, J. Schulz, M.R. Fesen, A. Mazumder, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* 1996, **39**, 86.
- [11] W.E. Robinson, M.G. Reinecke, S. Abdel-Malek, S.A. Chow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 6326.
- [12] B. McDougall, P.J. King, B.W. Wu, Z. Hostomsky, M.G. Reinecke, W.E. Robinson, Jr, *J. Med. Chem.*, 1998, **42**, 140.
- [13] P.J. King, W.E. Robinson, Jr, *J. Virol.*, 1998, **72**, 8420.
- [14] J.C.-H. Chen, J. Krucinski, L.J.W. Miercke, J.S. Finer-Moore, A.H. Tang, A.D. Cavitt, R.M. Stroud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 8233.

- [15] R. Craigie, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 23213.
- [16] J. Kulkosky, K.S. Jones, R.A. Katz, J.P. Mack, A.M. Skalka, *Moll. Cell. Biol.*, 1992, **12**, 2331.
- [17] R. Garg, S.P. Gupta, H. Gao, M.S. Babu, A.K. Debnath, C. Hansch, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 3625.
- [18] M.K. Fesen, Y. Pommier, F. Leteurte, S. Hiroguchi, J. Young, K.W. Kahn, *Biochem. Pharmacol.*, 1994, **48**, 595.
- [19] R.L. La Femina, P.L. Graham, K. Le Grow, J.C. Hastings, A. Wolfe, S.D. Young, E.A. Ermini, D.J. Hazuda, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, **39**, 320.
- [20] R. Dupont, L. Jeanson, J.-F. Mouscadet, P. Cotellet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 3175.
- [21] A. Mazumder, A. Grazi, A. Levitzki, M. Nicklaus, J. Young, G. Kohlhaagen, Y. Pommier, *Biochemistry*, 1995, **35**, 15111.
- [22] A. Mazumder, K. Raghaven, J. Weistein, K.W. Kohn, Y. Pommier, *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **49**, 1165.
- [23] T.R. Burke Jr., M.R. Fasen, A. Mazumder, Y. Wang, A.M. Carothers, D. Grunberg, J. Driscoll, K. Kohn, Y. Pommier, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 4171.
- [24] W.E. Robinson Jr, M.G. Reinecke, S. Malek-Abdel, Q. Jia, S.A. Chow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 6326.
- [25] Z. Lin, N. Neamati, H. Zhao, Y. Kiryn, J.A. Turpin, C. Aberham, K. Strebel, K. Kohn, M. Witvrouw, Ch. Pannecouque, Z. Debyser, E. De Clercq, W.G. Rice, Y. Pommier and T.R. Burke, Jr., *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 1401.
- [26] M. Crushman, P. Sherman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **185**, 85.
- [27] H. Zhao, N. Neamati, H. Hong, A. Mazumder, S. Wang, S. Sunder, G.W.A. Milne, Y. Pommier, T.R. Burke, Jr., *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 242.
- [28] H. Hong, N. Neamati, S. Wang, M.C. Nicklaus, A. Mazumder, H. Zhao, T.R. Burke, Jr., Y. Pommier, G.W.A. Milne, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 930.
- [29] K. Mekouar, J.F. Mouscadet, D. Desmaële, F. Subra, H. Lech, D. Savoure, Ch. Auclair, J. d'Angelo, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 2846.
- [30] F. Zouhiri, K. Mekouar, J.F. Mouscadet, D. Desmaële, F. Subra, H. Lech, D. Savoure, Ch. Auclair, M. Le Bret, J. d'Angelo, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 1533.
- [31] M. Quali, C. Laboulais, H. Leh, D. Gill, D. Desmaële, K. Mekouar, F. Zouhiri, Ch. Auclair, J. d'Angelo, J.F. Mouscadet, M. Le Bret, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 1949.
- [32] M. Quali, C. Laboulais, H. Leh, D. Gill, D. Desmaële, K. Mekouar, F. Zouhiri, Ch. Auclair, J. d'Angelo, J.F. Mouscadet, M. Le Bret, *Acta Biochim. Polon.*, 2000, **47**, 11.
- [33] J. Polański, F. Zouhiri, L. Jeanson, D. Desmaële, J. d'Angelo, J.-F. Mouscadet, R. Gieleciak, J. Gasteiger, M. Le Bret, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 4647.
- [34] J. Polański, *SAR QSAR Environ. Res.*, 2000, **11**, 245.
- [35] J. Polański, J. Gasteiger, J. Jarzembek K., *Comb. Chem. & HTS*, 2000, **3**, 481.
- [36] J. Polański, J. Gasteiger, J. Wagener, M. Sadowski, *Quant. Struct. Act. Relat.*, 1998, **17**, 27.
- [37] J. Polański, R. Gieleciak, A. Bąk, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 2002, **42**, 184.
- [38] J.S. Wai, M.S. Egbertson, L.S. Payne, T.E. Fisher, M.W. Embrey, L.O. Tran, J.Y. Melamed, H.M. Langford, J.P. Guare, L. Zhuang, V.E. Grey, J.P. Vacca, M. K. Holloway, A.M. Naylor-Olsen, D.J. Hazuda, P.J. Felock, A.L. Wolfe, K.A. Stillmock, W.A. Schleif, L.J. Gabryelski, S.D. Young, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 4923.
- [39] D.J. Hazuda, P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J.A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau, M. D. Miller, *Science*, 2000, **287**, 646.
- [40] F. Zouhiri, D. Desmaële, J. d'Angelo, M. Ourevitch, J.F. Mouscadet, H. Leh, M. Le Bret, *Tetrahedron Letters*, 2001, **42**, 8189.





**ASPEKTY TECHNOLOGICZNE  
I CHARAKTERYSTYKA  
PRODUKTÓW DYNAMICZNEJ SYNTEZY  
GĘSTYCH ODMIAN WĘGLA I AZOTKU BORU**

TECHNOLOGICAL ASPECTS  
AND CHARACTERIZATION OF PRODUCTS  
OF DYNAMIC SYNTHESIS OF DENSE  
MODIFICATION OF CARBON AND BORON NITRIDE

**Radosław Trębiński, Andrzej Maranda**

*Zakład Materiałów Wybuchowych  
Wojskowa Akademia Techniczna  
ul. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa*

---

Abstract

Technologiczne aspekty syntezy diamentu i gęstych odmian azotku boru  
w falach uderzeniowych

Charakterystyki produktów uderzeniowej syntezy diamentu i gęstych  
odmian azotku boru

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. inż. Radosław Trębiński** jest absolwentem Wydziału Chemii i Fizyki Technicznej Wojskowej Akademii Technicznej. W latach 1974–1994 pracował jako pracownik naukowo-dydaktyczny na macierzystym wydziale, w latach 1994–2002 pełnił funkcję kierownika Zakładu Materiałów Wybuchowych i Fizyki Wybuchu na Wydziale Uzbrojenia i Lotnictwa WAT. W roku 2001 otrzymał tytuł profesora. Obecnie jest dziekanem Wydziału Mechatroniki WAT. Jest specjalistą w zakresie fizyki wybuchu. Zajmuje się zagadnieniami wykorzystania wybuchu w technice wojskowej oraz w technologiach cywilnych. Jest autorem i współautorem 6 patentów, 2 monografii, około 100 publikacji i 40 opracowań nieopublikowanych.



**Prof. dr hab. inż. Andrzej Maranda** w 1971 r. obronił pracę dyplomową na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od tego czasu pracuje w Wojskowej Akademii Technicznej. Jest specjalistą w dziedzinie technologii i zastosowania materiałów wybuchowych w wojsku oraz gospodarce narodowej. Prowadzi m.in. badania nad wyjaśnieniem udziału poszczególnych składników mieszanin wybuchowych w procesie detonacji. Od 1994 r. jest Przewodniczącym Normalizacyjnej Komisji Problemowej nr 12 ds. Materiałów Wybuchowych i Wyrobów Pirotechnicznych. Jest autorem lub współautorem

21 patentów, 2 monografii i ponad 300 publikacji.

**ABSTRACT**

In this review a survey of literature data concerning shock wave synthesis of dense modifications of carbon and boron nitride is presented. Various types of explosive set-ups used for shock loading of samples containing carbon materials and graphitic boron nitride are presented. Some characteristics of the products of shock wave synthesis are described.

---

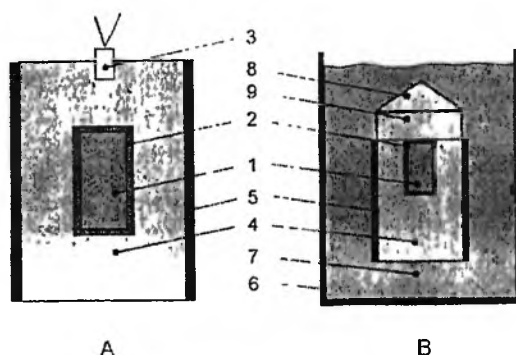
---

## TECHNOLOGICZNE ASPEKTY SYNTEZY DIAMENTU I GĘSTYCH ODMIAN AZOTKU BORU W FALACH UDERZENIOWYCH

Historia syntetycznego diamentu zaczęła się w roku 1953, w którym badacze szwedzcy Liander i Lunbland przeprowadzili pierwszą syntezę. Idea metody wytwarzania diamentu, która doprowadziła do pierwszej udanej syntezy, stała się podstawą przemysłowej technologii wytwarzania materiałów supertwardych. Realizacja bezpośredniej przemiany grafitu i  $\alpha$ BN w odmiany gęste wymaga osiągnięcia ciśnienia przekraczającego 10 GPa. Współczesna technika wysokich ciśnień statycznych pozwala wytworzyć ciśnienia sięgające 100 GPa. Jednak uzyskanie statycznego ciśnienia przekraczającego 10 GPa w dużej objętości materiału jest bardzo trudne.

Tymczasem technika ciśnień impulsowych pozwala na generowanie w prosty sposób ciśnień znacznie przekraczających 10 GPa. W wyniku detonacji wysokoenergetycznych materiałów wybuchowych (oktogen, heksogen, pentryt, trotyl itp.) powstają ciśnienia w zakresie 20–40 GPa. Ciśnienie to można zwiększyć o kilkadziesiąt procent poprzez odbicie fali uderzeniowej od metalowej przegrody. Dalszy wzrost ciśnienia można uzyskać wykorzystując energię produktów detonacji do napędzania płytek lub cylindrycznych i kulistych otoczek. Uderzeniowe sprężanie materiału powoduje nie tylko wzrost ciśnienia, ale również znaczny przyrost temperatury zapewniając warunki, przy których grafit i  $\alpha$ BN przechodzą w odmiany o strukturze typu sfalerytu i wurcytu.

Pierwszą publikacją, w której przedstawiono układy technologiczne do otrzymywania syntetycznych diamentów metodą wybuchową był patent [1]. P.S. DeCarli zaproponował w nim kilkanaście układów wybuchowych różniących się między innymi metodami obciążania próbek węglowych oraz sposobami zachowania ich fragmentów po dynamicznej obróbce.

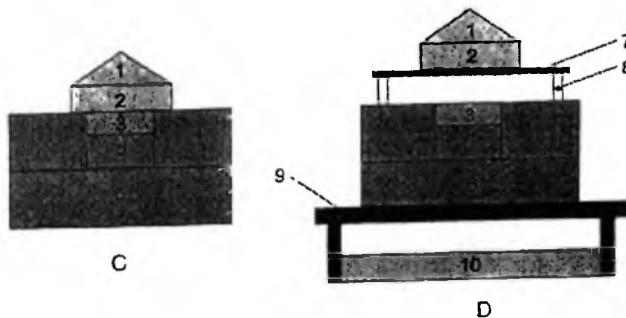


Rysunek 1. Najprostsze układy wybuchowe typu zaciskowego do otrzymywania diamentów:  
 1 – próbka węglowa, 2 – otoczka metalowa, 3 – zapalnik, 4 – podstawowy ładunek materiału wybuchowego,  
 5 – cylindryczna obudowa, 6 – pojemnik o wysokiej wytrzymałości mechanicznej, 7 – piasek,  
 8 – generator fali płaskiej, 9 – cylindryczny ładunek materiału wybuchowego [1]

Najmniej skomplikowane układy są przedstawione na rys.1. Są to układy typu zaciskowego, w których fala uderzeniowa jest generowana w próbce węglowej, poprzez oddziaływanie fali detonacyjnej propagującej się w ładunku materiału wybuchowego bezpośrednio się z nią stykającego. W układzie A materiał węglowy (1) znajdujący się w metalowej otoczce (2) jest osiowo umieszczony w ładunku (4) materiału wybuchowego (MW) uformowanego w szklanej lub metalowej cylindrycznej obudowie (5). Po zainicjowaniu ładunku MW za pomocą zapalnika elektrycznego (3) ciśnienie detonacji produktów wybuchowego rozkładu formuje w obciążonej próbce falę uderzeniową powodującą częściową transformację grafitu w diament.

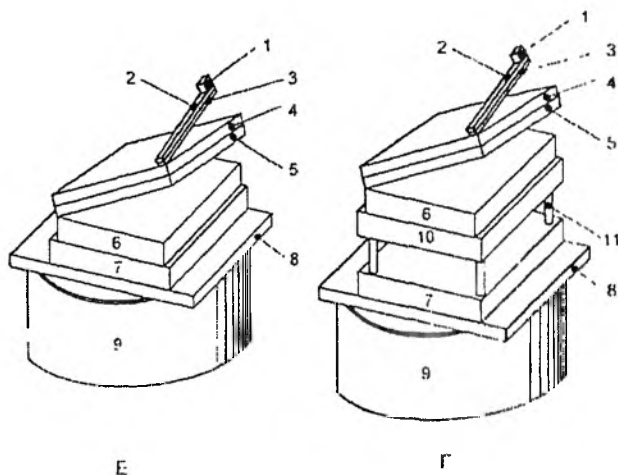
Modyfikacją tego układu jest układ B. W układzie tym próbka grafitowa (1) umieszczona jest w cylindrycznym ładunku wysokoenergetycznego materiału wybuchowego (4), na którym znajduje się dysk (9) wykonany również z MW. Do pobudzenia MW zastosowano generator płaskiej fali detonacyjnej typu stożkowego (8). Całość została umieszczona w wytrzymałym pojemniku (6) wypełnionym piaskiem (7). Parametry obciążenia wybuchowego można regulować poprzez zmianę parametrów detonacyjnych zastosowanego MW, a czas oddziaływania wielkością ładunku.

Innymi układami stosowanymi do wybuchowej syntezy diamentów są układy płaskie typu zaciskowego (C) lub uderzeniowego (D) – rys.2. W porównaniu z układami A i B, w których próbka węglowa znajdowała się w cienkościennej obudowie, w tych układach materiał węglowy umieszczony jest w bloku o wysokiej wytrzymałości. W płaskim układzie zaciskowym C próbka węglowa (3) podparta metalowym korkiem (5) znajduje się w pierścieniu aluminiowym, miedzianym lub stalowym (4), który umieszczony jest na podstawie (6). Na węglowej próbce znajduje się podstawowy ładunek materiału wybuchowego (2), w którym detonacja jest inicjowana za pomocą generatora fali płaskiej (1). Zastosowanie stalowego pierścienia umożliwi zachowanie fragmentów obciążonej próbki węglowej.



Rysunek 2. Układy płaskie do otrzymywania diamentów typu zaciskowego C i uderzeniowego D:  
 1 – generator fali płaskiej, 2 – podstawowy ładunek materiału wybuchowego, 3 – próbka węglowa,  
 4 – pierścień metalowy, 5 – korek metalowy, 6 – podstawa, 7 – napędzana płytka, 8 – dystanse,  
 9 – deska podpierająca, 10 – pojemnik z wodą [1]

Układ typu uderzeniowego D charakteryzują się tym, że na materiał węglowy nie oddziałują bezpośrednio produkty wybuchu, ale płytka metalowa nimi napędzona. Układy uderzeniowe są stosowane w celu uzyskania wyższych ciśnień w obciążanej próbce. W układach tych płaska fala detonacyjna propagująca się w podstawowym ładunku materiału wybuchowego (2) dochodzi do powierzchni metalowej płytki (7). Produkty wybuchu zaczynają napędzać płytkę, niszczone są plastikowe dystanse (8) i płytka, mając określoną prędkość, uderza w węglowy materiał. Płaska fala uderzeniowa rozprzestrzenia się w graficie powodując jego transformację w diament. Pod wpływem działania wybuchu niszczone jest deska podtrzymująca (9) i część elementów układu wpada do zbiornika z wodą (10).

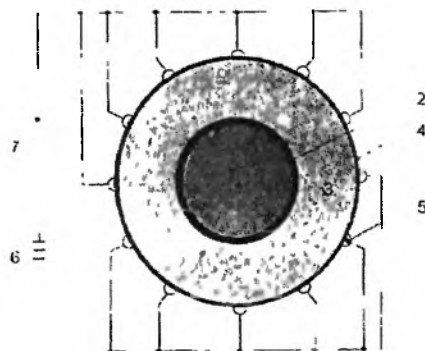


Rysunek 3. Układy do syntezy diamentów wykorzystujące generator fali płaskiej typu „pułapka na myszy”:  
1 – zapalnik, 2,4,6 – ładunki materiału wybuchowego, 3,5,10 – płytki metalowe, 7 – próbka węglowa,  
8 – deska podtrzymująca, 9 – pojemnik z wodą, 11 – dystanse [1]

Do generacji płaskiej fali detonacyjnej w układach typu C i D stosuje się generator stożkowy lub generator typu „pułapka na myszy” (*mouse-trap*) – rys.3. Pierwszym elementem tego generatora jest płaski ładunek materiału wybuchowego (2) uzbrojony w zapalnik elektryczny (1) znajdujący się na metalowej płytce (3). Jest on ustawiony pod odpowiednim kątem w stosunku do drugiego elementu składającego się również z płaskiego ładunku MW (4) i płytki metalowej (5). Generator fali płaskiej jest usytuowany pod odpowiednim kątem w stosunku do podstawowego ładunku MW (6), w którym formuje płaską falę detonacyjną.

Wyróżniającą cechą następnego układu (rys. 4) jest symetria sferyczna. Dzięki umieszczeniu na powierzchni kulistego ładunku materiału wybuchowego (3) serii zapalników (5) i ich jednoczesnym zainicjowaniu, w ładunku formuje się zbieżna fala detonacyjna. Wytwarza ona w próbce węglowej (1) zbieżną falę uderzeniową o wysokich parametrach, uzyskanych dzięki efektowi kumulacyjnemu. Odpowiednio wysoką kumulację fali uderzeniowej w materiale węglowym mogą zapewnić

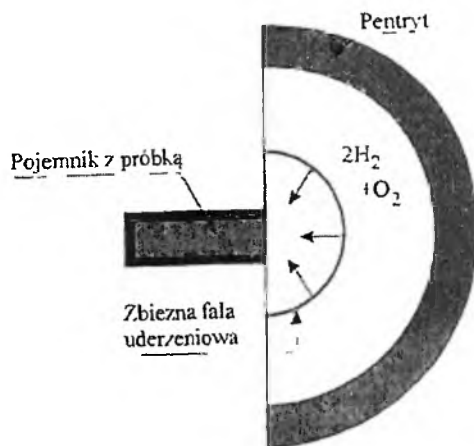
jednoczesność zainicjowania procesu detonacji na całej powierzchni ładunku materiału wybuchowego oraz jego homogeniczność.



Rysunek 4. Układ o symetrii kulistej do otrzymywania diamentów

- 1 – materiał węglowy, 2 – metalowa obudowa, 3 – ładunek materiału wybuchowego,  
4 – metalowy pojemnik, 5 – zapalniki, 6 – źródło prądu, 7 – przełącznik [1]

Inny układ sferyczny zaproponowany został w pracy [2]. Obciążana próbka znajduje się wewnątrz dwóch masywnych półkul, oddzielonych od ładunku materiału wybuchowego przerwą powietrzną. Wielkość dystansu jest uzależniona od wymiarów półkul, masy ładunku materiału węglowego i innych czynników. W patencie [2] proponowane jest również inne rozwiązanie polegające na rozczłonkowaniu ładunku materiału wybuchowego. Jego poszczególne fragmenty znajdują się w jednakowych odległościach, co zabezpiecza stopniowe obciążanie węglowej próbki. W przypadku układów sferycznych bardzo jest istotna synchronizacja inicjowania detonacji na całej zewnętrznej powierzchni ładunku materiału wybuchowego. Jedną z form realizacji takiego procesu jest pokrycie ładunku folią metalową i następnie jej elektryczne pobudzenie pod wpływem elektrycznego impulsu. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie komory implozyjnej – [3]. Komora ta przedstawia sobą półkulę wypełnioną mieszaniną tlenu i wodoru – rys. 5. Za pomocą zapłonika umieszczonego w centrum komory inicjowana jest w gazie kulista rozbieżna fala detonacyjna. Fala ta uderza w hemisferyczną powłokę materiału wybuchowego (pentryt, 3 mm grubości). Jej odbicie powoduje jednoczesne pobudzenie detonacji powłoki na całej jej wewnętrznej powierzchni. Rozprężające się produkty detonacji generują w gazie wypełniającym komorę (para wodna) zbieżną falę uderzeniową. W pobliżu centrum komory fala ta ma amplitudę wystarczająco wysoką, aby spowodować przemianę w diament grafitu znajdującego się w pojemniku umieszczonym na wylocie komory. W opisanym układzie uzyskiwano 5% stopień przemiany grafitu w diament.

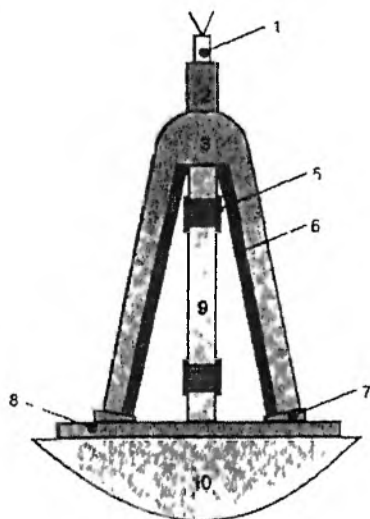


Rysunek 5. Schemat układu z komorą implozyjną [3]

W pracy [4] wprowadzono pewne modyfikacje do opisaney powyżej metody. Obciążeniu poddawano nie sam grafit, lecz jego mieszaninę z miedzią. Przed obciążeniem przepuszczano przez próbkę silny impuls prądowy. Odległość czasowa pomiędzy impulsem prądowym i początkiem uderzeniowej kompresji wynosiła 100–160  $\mu$ s. Amplituda fali uderzeniowej wynosiła 18–25 GPa. Stwierdzono, że wzrost energii impulsu prądowego powoduje zwiększenie stopnia przemiany grafitu w diament. Najwyższa osiągnięta wydajność przemiany wynosiła 25%.

Na rys. 6, zaczerpniętym z pracy [5], przedstawiona jest idea układu wykorzystującego efekt zderzenia dwóch przeciwbieżnych fal uderzeniowych. Obciążane są jednocześnie dwie kształtki (4) wykonane z mieszaniny zawierającej grafit, umieszczone w gniazdach podstawowej płyty metalowej (9). Płyta spełnia rolę pojemnika zabezpieczającego przed rozrzuconymi produktami. Próbkę materiału zawierającego grafit są zabezpieczone dodatkowymi stalowymi płytkami (5). Ładunek materiału wybuchowego (3) i napędzane płyty (6) za pomocą drewnianych klinów (7) są usytuowane pod kątem  $\alpha = 10^\circ$  do powierzchni metalowej płyty (9), umieszczonej na drewnianej podstawie (8). Materiał wybuchowy (3) jest inicjowany generatorem liniowej fali uderzeniowej (2). Płyty napędzane uderzają jednocześnie z przeciwnych stron w poszczególne fragmenty płyty podstawowej, generując zderzające się fale uderzeniowe. W wyniku obciążenia podstawowa płyta (9) zanurza się w piasek (10) na głębokość do 80 cm. Piasek spełnia również rolę medium chłodzącego, odprowadzając ciepło z produktów dynamicznego obciążenia. Stopień przemiany grafitu w diament w opisanym układzie jest bardzo niski i wynosi 1,36% lub 0,136 g na kilogram materiału wybuchowego.

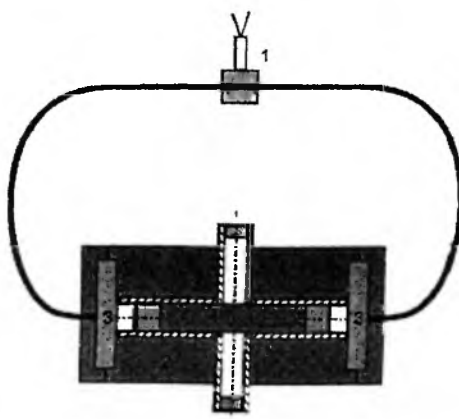




Rysunek 6 Schemat obciążania zderzającymi się falami uderzeniowymi.

1 – zapalnik elektryczny; 2 – generator liniowej fali uderzeniowej, 3 – ładunek materiału wybuchowego, 4 – mieszanina reakcyjna zawierająca grafit, 5 – płytka zabezpieczająca, 6 – płyty metalowe napędzane, 7 – drewniane kliny, 8 – drewniana podstawa, 9 – podstawowa płyta metalowa, 10 – piasek [5]

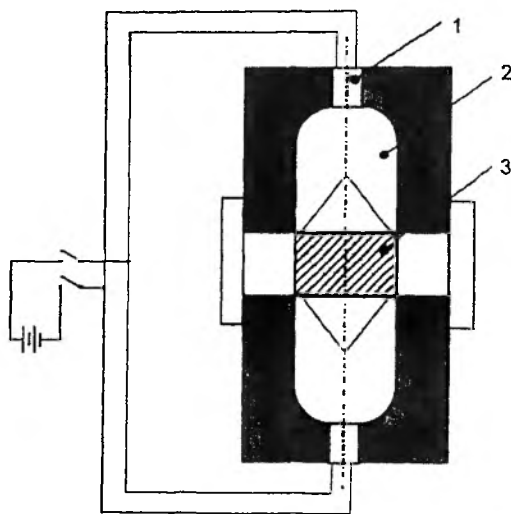
W kolejnym układzie (rys. 7), w którym po raz pierwszy w Polsce przeprowadzono syntezę diamentu [6], detonacja materiału wybuchowego (2) jest inicjowana jednocześnie z dwóch przeciwległych stron ładunku. W próbce zawierającej grafit (4) następuje proces zderzenia fal uderzeniowych. Po obciążeniu, próbki grafitowe rozdrobiono i wyizolowano drobne ziarna diamentu, których obecność potwierdzono na podstawie wyników analizy rentgenograficznej



Rysunek 7. Pierwszy polski układ do wybuchowej syntezy diamentów:  
1 – system inicjowania detonacji, 2 – ładunek materiału wybuchowego, 3 – ekrany,  
4 – próbka zawierająca grafit [6]

W literaturze patentowej opisano również układy w których wykorzystywano zjawisko kumulacji [7, 8]. Pod wpływem działania strumienia kumulacyjnego generowane jest w próbce zawierającej grafit ciśnienie rzędu 100 GPa i wyższe. Wkładka kumulacyjna może być również wykonana z grafitu. W celu zwiększenia stopnia przemiany do wyjściowej mieszaniny dodawane są zarodki kryształów diamentów, a próbka może być wstępnie podgrzewana. Czasami wykonywany jest w niej otwór spełniający rolę rezonansowej rurki. Ładunek kumulacyjny z wkładką miedzianą o masie 15 g przebija grafitową tarczę na głębokość 300 mm przy początkowej średnicy otworu do 10 mm.

Jedno z ciekawszych rozwiązań układu kumulacyjnego zostało zaproponowane w patencie [8]. Blok grafitowy (3) o średnicy 150 mm i długości 500 mm jest obciążany dwoma kumulacyjnymi ładunkami (2), z których każdy ma masę 800 g (rys. 8). Układy typu kumulacyjnego nie znalazły praktycznego zastosowania. Brak jest doniesień, aby w tego typu układach uzyskano znaczącą wydajność diamentu.



Rysunek 8. Schemat kumulacyjnego układu do obciążania materiału węglowego:  
1 - zapalnik elektryczny, 2 - kumulacyjny ładunek materiału wybuchowego, 3 - próbka węglowa [8]

Istotnym problemem przy realizacji procesu dynamicznej syntezy materiałów supertwardych jest zabezpieczenie produktu przed przemianą odwrotną spowodowaną wysoką temperaturą próbki po zdjęciu obciążenia. Aby zabezpieczyć produkt syntezy, należy szybko odprowadzić ciepło od nowo powstałych ziaren materiału supertwardego. Można to osiągnąć poprzez rozproszenie materiału wyjściowego w metalowej matrycy. Ten sposób zabezpieczenia produktu przed przemianą odwrotną zastosowano w patencie [9]. Metalowa matryca może tworzyć ciągły szkielet mieszaniny reakcyjnej (żeliwo) lub składać się z oddzielnych ziaren dodatku chłodzącego. Jako dodatek preferowane są metale takie jak żelazo, miedź, alumi-

niem, nikiel. W patencie [9] wykorzystano do obciążania mieszaniny reakcyjnej płaski układ wybuchowy typu uderzeniowego, analogiczny do przedstawionego na rys. 2. W opisanych próbach obciążano jednorazowo od 3 do 230 g materiału wyjściowego. Próbki mieszanin reakcyjnych miały kształt dysków o średnicy od 100 do 250 mm i grubości od 13 do 51 mm. Typowa grubość próbki wynosiła ok. 30 mm. Obciążenie było wytwarzane uderzeniem stalowej płytki, której grubość zmieniała się w granicach od 0,8 do 9,4 mm. Płytką znajdowała się początkowo w odległości 38 mm od pojemnika. Była ona napędzana produktami detonacji kompozycji B, inicjowanej za pomocą generatora fali płaskiej typu stożkowego. Masa ładunku zmieniała się od 1,8 do 12 kg, przy czym typowa była masa ok. 11 kg. Pojemnik z mieszaniną reakcyjną umieszczano we wgłębieniu w bloku ołowianym. Blok ten pełnił rolę układu amortyzującego, przejmującego część energii wybuchu poprzez plastyczną deformację. W przypadku, gdy dodatek chłodzący tworzy ciągłą matrycę (żeliwo), nie stosowano pojemnika i umieszczano obciążaną próbkę bezpośrednio w bloku ołowianym.

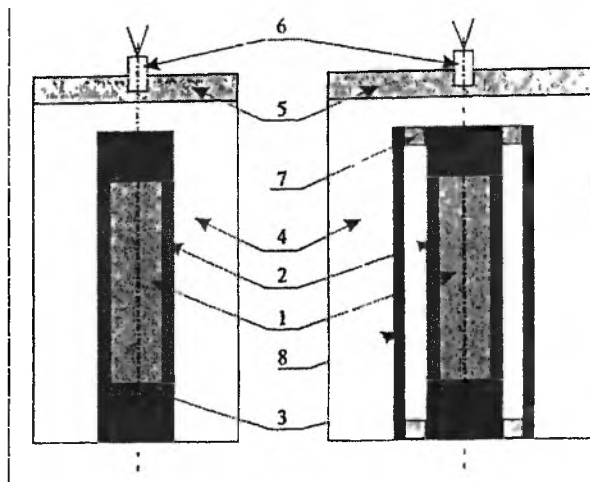
Rola dodatku nie sprowadza się jedynie do obniżenia końcowej temperatury produktu. Mała ściśliwość i duża gęstość materiałów stosowanych jako dodatek w patencie [9] ułatwia osiąganie wysokich wartości ciśnienia. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że wysoką wydajność uzyskano w próbach opisanych w patencie wówczas, gdy matrycę stanowiły duże ziarna dodatku (frakcje 75–104, 230–330 i 550–790  $\mu\text{m}$ ), natomiast w porach znajdowały się małe ziarna materiału wyjściowego (rozmiar 0,5–5  $\mu\text{m}$ ). Taka struktura sprzyja wykorzystaniu efektów lokalnego nagrzewania się materiału matrycy w pobliżu porów w trakcie uderzeniowej kompresji. Materiał wyjściowy, kontaktując się z nagrzanym metalem, przejmuje ciepło i łatwiej podlega przemianom. Dzięki temu, można lokalnie zwiększyć wartość temperatury, w której przebiega przemiana, bez zwiększania średniej temperatury w próbce.

Z opisu przedstawionego w patencie wynika, że w procesie odciążenia występuje niekorzystny efekt niszczenia pojemnika i rozpraszania materiału próbki. W przypadku próbek o gęstości zbliżonej do teoretycznej udaje się zachować powyżej 90% materiału próbki. Znacznie trudniej jest zachować materiał o dużej wyjściowej porowatości (gęstość rzędu 65–75% wartości teoretycznej). W tym przypadku straty mogą sięgać 90% wyjściowej masy próbki.

W próbach opisanych w patencie [9] uzyskano wydajność przemiany zmieniającą się od 2,5 do 52,4%. Najwyższą wydajność uzyskano przy obciążaniu żeliwa zawierającego płytkowe wtrącenia grafitu. Dla prasowanych mieszanin reakcyjnych uzyskano największą wydajność 31,9%. Sprawność metody, mierzona stosunkiem masy produktu do masy użytego materiału wybuchowego, wynosiła 10 g/kg dla próbek żeliwa i 3,7 g/kg dla próbek prasowanych. W drugim przypadku istotny wpływ na obniżenie sprawności miało rozpraszanie materiału próbki.

Istotną wadę płaskiego układu wybuchowego, jaką jest trudność zachowania całości próbki, można wyeliminować stosując układy cylindryczne opisane w patencie [10]. Układy te przedstawiono na rys. 9. Próbka mieszaniny reakcyjnej

1 umieszczona jest w cylindrycznym pojemniku 2 zamkniętym metalowymi korkami 3. W pierwszej wersji układu (układ typu zaciskowego) pojemnik jest otoczony warstwą materiału wybuchowego 4. Detonacja inicjowana jest z jednego końca ładunku poprzez wybuch pomocniczego ładunku 5, pobudzanego zapalnikiem 6. Fala detonacyjna propaguje się w warstwie materiału wybuchowego wzdłuż ścianki pojemnika. Ciśnienie detonacji za falą generuje w ściance pojemnika zbieżną falę uderzeniową. Fala ta przechodzi do mieszaniny reakcyjnej i powoduje zajście przemiany polimorficznej.



Rysunek 9. Schematy dwóch typów układów typu cylindrycznego:

a – układ typu zaciskowego, b – układ typu uderzeniowego, 1 – obciążona próbka, 2 – pojemnik, 3 – korki, 4 – materiał wybuchowy, 5 – ładunek inicjujący, 6 – zapalnik, 7 – elementy centrujące, 8 – otoczka [10]

W drugiej wersji układu (układ typu uderzeniowego) pojemnik usytuowany jest za pomocą elementów centrujących 7 wewnątrz cylindrycznej otoczki 8. Działanie ciśnienia produktów detonacji napędza otoczkę w kierunku pojemnika. Jej uderzenie w pojemnik wytwarza zbieżną falę uderzeniową. W patencie [11] zaleca się stosowanie układu typu uderzeniowego do syntezy diamentu. Inne zalecenia odnoszą się do charakterystyk mieszaniny reakcyjnej i doboru parametrów układu. I tak zaleca się, aby mieszanina reakcyjna zawierała 3–12% materiału wyjściowego. Preferowane jest stosowanie grafitu naturalnego o ziarnistości 0,5–5  $\mu\text{m}$ . Poleca się stosowanie miedzi jako dodatku, ze względu na wysoką przewodność cieplną i temperaturę topnienia mniejszą od temperatury grafityzacji diamentu. Względna gęstość materiału wyjściowego, określana jako stosunek jego masy do objętości przestrzeni porowej w matrycy utworzonej przez ziarna dodatku, powinna wynosić 25–60% gęstości teoretycznej. Zalecane jest stosowanie pojemników i otoczek wykonanych ze stali lub miedzi. Masa otoczki powinna być większa od 0,3 masy pojemnika i próbki, natomiast masa materiału wybuchowego powinna wynosić 1,5–8 mas otoczki. Zaleca się zachowanie odległości od pojemnika równej od 1 do 6 gru-

bości otoczki (w praktyce 1,5–2). Stosowane są materiały wybuchowe o stosunkowo niskiej prędkości detonacji 4000–5000 m/s. W przykładach opisanych w patencie podano wartości parametrów charakteryzujących układy o małych i dużych gabarytach. Układy o małych gabarytach miały długość od 30 do 45 cm. Stosowano pojemniki o średnicy 30,2 mm i grubości ścianki 3,2 mm. Jednorazowo obciążano od 4 do 8 g materiału wyjściowego, stosując ok. 0,5 kg materiału wybuchowego. Układ o dużych gabarytach miał długość 3 m. Średnica pojemnika wynosiła 114 mm, zaś średnica otoczki 280 mm. Otoczka miała grubość 32 mm. Obciążana próbka zawierała 4,1 kg materiału wyjściowego. Masa detonowanego ładunku wynosiła 4700 kg. Wydajność przemiany wynosiła od 42 do 76%. Sprawność metody zmieniła się w granicach 10–15 g/kg dla układów o małych wymiarach. W układzie o dużych gabarytach sprawność metody była znacznie mniejsza i wynosiła – 0,3 g/kg. Jednakże duża skala eksperymentu pozwoliła na zastosowanie taniego materiału wybuchowego (mieszanina amiatolu z solą kuchenną).

Dalsze poszukiwanie sposobów zwiększenia ekonomicznej efektywności metody doprowadziły do zastosowania materiału wybuchowego typu saletrol – patent [12]. Celem zwiększenia ciśnienia detonacji do materiału dodawano 8–20% tlenków żelaza. W patencie opisano wyniki obciążania mieszaniny miedziano-grafitowej w układach o długości 4,3 m. Jednorazowo obciążano ok. 10 kg grafitu, stosując 6000 kg materiału wybuchowego. Uzyskano wysoki stopień przemiany (30–60%) oraz sprawność metody rzędu 1g/kg.

Zastosowanie cylindrycznego układu wybuchowego ułatwia zachowanie po obciążeniu próbki mieszaniny reakcyjnej, jednakże i dla tego typu układu występują trudności z utrzymaniem całości próbki w pojemniku. W celu ich przewyższenia zaproponowano w patencie [13] specjalną konstrukcję korka zamykającego pojemnik. Korek utworzony jest ze sprasowanych pastylek stalowych. W części korka przylegającej do próbki, gęstość zaprasowania pastylek stalowych dobiera się w taki sposób, aby wyeliminować odbicie fali uderzeniowej na granicy próbki i korka. Odbicie fali uderzeniowej może prowadzić do lokalnego wzrostu ciśnienia, zagrażającego zniszczeniem ścianek pojemnika. Po przejściu fali uderzeniowej sprasowane pastylki stalowe tworzą monolityczny korek, utrzymujący próbkę wewnątrz pojemnika. Zewnętrzna część korka składa się z pastylek stalowych o zmniejszającej się gęstości. Dzięki temu po obciążeniu tworzy się stożkowe zakończenie pojemnika, utrzymujące korek. Część pastylek o małej gęstości zaprasowania jest wyrzucana z pojemnika. Unoszą one ze sobą nadmiar pędu, osłabiając rozciągające działanie fali. Tego typu rozwiązanie, zwane *momentum trap* (pułapka na pęd), stosuje się często w układach wybuchowych.

Technologia wytwarzania syntetycznych diamentów oparta na podstawach przedstawionych w patentach [10, 11, 13] została zastosowana na skalę przemysłową przez amerykańską firmę DuPont De Nemours.

Przemysłowa technologia wytwarzania azotku boru o strukturze wurcytu również została oparta na wykorzystaniu układów cylindrycznych. Układy takie opisane zostały w patentach [14–16]. W patencie [14] opisano układy cylindryczne,

w których w centralnej części próbki umieszczano stalowy pręt. W rezultacie obciążaniu podlegała próbka w postaci cylindrycznej warstwy mieszaniny reakcyjnej. Stosunek średnicy próbki do średnicy pręta wynosił 1,9. Próbka składała się z samego  $\alpha$ BN prasowanego do gęstości równej 78% teoretycznej lub mieszaniny z NaCl w stosunku objętościowym 1:1 oraz Cu w stosunku wagowym 1:9. W przypadku układu typu zaciskowego stosowano jako materiał wybuchowy kompozycję B. W układzie typu uderzeniowego użyto amatol 50/50. W zależności od warunków syntezy uzyskano 42–60% przemiany materiału wyjściowego w  $\gamma$ BN.

Zaciskowy układ cylindryczny z centralnym prętem zastosowano również w patencie [15]. Obciążano w nim spiek  $\alpha$ BN o gęstości 70% teoretycznej. Stosunek średnicy próbki do średnicy pręta wynosił 1,3. Uzyskano stopień przemiany ok. 40% i sprawność ok. 21g/kg.

W patencie [16] opisano wyniki prób obciążania mieszanin reakcyjnych zawierających  $\alpha$ BN w układzie cylindrycznym typu zaciskowego. Jako dodatek do materiału wyjściowego stosowano  $PbCl_2$ , NaCl, Mo,  $PbF_2$ , KBr, LiF, Cu, Fe, Al,  $H_2O$ ,  $H_2O+NaOH$ . Najwyższy stopień przemiany (99,5%) uzyskano stosując jako dodatek wodę z 1% NaOH. Dzięki zastosowaniu grubościennego pojemnika wykorzystano efekt kumulacji zbieżnej fali uderzeniowej w ściance pojemnika. Pozwalał on uzyskiwać bardziej jednorodny rozkład ciśnienia w obciążanym materiale. Stosowano pojemnik o długości 145 mm, wewnętrznej średnicy 8 mm i zewnętrznej średnicy rosnącej od 28 do 32 mm. Stosowano ładunki heksogenu o gęstości 1,1 g/cm<sup>3</sup> lub lanego trotylu. Masa materiału wybuchowego wynosiła 1,7 kg w przypadku heksogenu i 2,6 kg w przypadku trotylu. Jednorazowo obciążano od 2 do 5 g  $\alpha$ BN. Najwyższa uzyskana sprawność wynosiła 2,4 g/kg. Była ona wyraźnie niższa od uzyskiwanej w układach z centralnym prętem. Dlatego w zastosowaniach przemysłowych wykorzystuje się układ z centralnym prętem.

## CHARAKTERYSTYKA PRODUKTÓW UDERZENIOWEJ SYNTEZY DIAMENTU I GĘSTYCH ODMIAN AZOTKU BORU

Pierwsze doniesienia o wynikach badań charakterystyk produktu dynamicznej syntezy diamentu zawarte były w pracach [17, 18]. Pierwsza z tych prac poświęcona jest badaniom diamentów powstających przy uderzeniowym obciążeniu żeliwa. Produkt syntezy jest w tym przypadku mieszaniną dwóch form. Pierwszą z nich tworzą względnie płaskie i zwarte agregaty iglastych, submikronowych krystalitów. Druga forma ma postać matowych pojedynczych kryształów w postaci płytek, posiadających często heksagonalny kontur. Pierwsza z tych form występuje przede wszystkim we frakcji 0,5–4  $\mu$ m. Tworzą ją włókniste agregaty będące wiązkami krystalitów o długości 50–300 nm i szerokości 30 nm. Ze wzrostem rozmiaru ziaren rośnie udział pojedynczych kryształów od 12% dla frakcji 0,5  $\mu$ m do 57% w przypadku frakcji 30  $\mu$ m. Charakterystyczną cechą struktury pojedynczych kryształów jest występowanie defektów upakowania polegających na przerwaniu normalnej

sekwencji warstw przez warstwy heksagonalne. Materiał wewnątrz tych warstw posiada strukturę lonsdejlitu. Obok tej formy występowania lonsdejlitu stwierdzono również jego obecność w postaci oddzielnych kryształów. Zawartość lonsdejlitu w badanym materiale zmieniała się od 38% dla frakcji 0–1  $\mu\text{m}$  do 20% dla frakcji 22–36  $\mu\text{m}$ .

Dodatkowe informacje odnośnie charakterystyk diamentu powstającego przy uderzeniowym obciążeniu żeliwa podano w pracach [19–21]. Badany materiał posiadał rozmiar bloków mozaiki 14 nm. Mikrozakłócenia struktury wynosiły  $3,7 \cdot 10^{-3}$ , zaś gęstość dyslokacji  $1,7 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ . Wysoka gęstość dyslokacji (3–4 rzędy większa niż w mozaikowych kryształach lub polikryształach typu ballas lub karbonydo otrzymanych metodą statyczną, 8 rzędów większa niż w naturalnym doskonałym diamencie) jest świadectwem deformacyjnego charakteru przemiany.

Morfologia ziaren diamentu powstającego przy obciążaniu żeliwa zależy od morfologii wtrąceń grafitowych w żeliwie. Przy zastosowaniu żeliwa płytkowego otrzymuje się ziarna diamentu w postaci płatkowej, płytkowej, bliskiej izometrycznej oraz cienkowlóknistej (kryształity o długości 2,5–3  $\mu\text{m}$  i poprzecznym rozmiarze 0,03–0,1  $\mu\text{m}$ ). W żeliwie sferolitycznym diamenty tworzą się w całej objętości sferolitów o średnicy do 20  $\mu\text{m}$ . Zachowują się w postaci łuskowatych ziaren, rozkład których powtarza koncentryczno-strefową budowę grafitu. We wtrąceniach o większym rozmiarze przejście w diament obserwuje się na peryferiach sferolitów w postaci diamentowej powłoki. Wydzielone ziarna diamentu są na ogół odłamkami sferycznych diamentowych lub diamentowo-grafitowych agregatów. Oprócz tego obserwuje się mało zniszczone lub całkiem zachowane sferolity, o budowie zbliżonej do budowy wtrąceń grafitowych.

- W tabeli I przedstawiono zaczerpnięte z pracy [20] dane odnośnie rozmiarów ziaren diamentowych wytworzonych przy obciążaniu żeliwa. Jak wynika z wartości udziałów podanych w tabeli, w produkcie syntezy dominuje frakcja mikronowa. Zawartość wyższych frakcji można w pewnym stopniu zwiększyć wydłużając czas działania impulsu wysokiego ciśnienia.

Tabela 1. Rozkład wielkości ziaren diamentowych otrzymanych przy obciążaniu żeliwa dane w kolumnie „udział 2” odnoszą się do ok. dwukrotnie dłuższego czasu podtrzymywania wysokiego ciśnienia niż dla danych z kolumny „udział 1” [20]

| Frakcja [ $\mu\text{m}$ ] | Udział 1 [%] | Udział 2 [%] |
|---------------------------|--------------|--------------|
| 2/0                       | 59,3         | 59,6         |
| 3/2                       | 15,9         | 10,7         |
| 5/3                       | 11,7         | 7,0          |
| 7/5                       | 4,8          | 5,0          |
| 10/7                      | 4,4          | 4,6          |
| 14/10                     | 1,4          | 5,2          |
| 20/14                     | 2,2          | 4,6          |
| 28/20                     | 0,3          | 2,0          |
| 40/28                     | 0            | 1,0          |
| 60/40                     | 0            | 0,6          |

W pracy [21] przedstawiono informację odnośnie różnic pomiędzy charakterystykami diamentu i lonsdejlitu występujących w produkcie uzyskanym po obciążeniu żeliwa. Dla diamentu rozmiar subziaren (bloków mozaiki) wynosił  $4,4 \pm 0,5$  nm, zaś mikrozakłócenia siatki  $1,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$ . Subziarna lonsdejlitu były znacznie większe – 100 nm. Większe były również mikrozakłócenia siatki  $4 \pm 1 \cdot 10^{-2}$ . Zawartość lonsdejlitu oceniono na  $55 \pm 2\%$ , zaś diamentu na  $45 \pm 3\%$ .

Odmianą strukturą charakteryzują się diamenty wytworzone w warunkach umiarkowanych ciśnień i wysokich temperatur – [18]. W zakresie rozmiarów ziaren 0,005–2 mm mają one postać pojedynczych kryształów o rozmiarze nie przekraczającym 50 nm, losowo zorientowanych agregatów kryształitów o rozmiarze rzędu 20 nm oraz zorientowanych wiązek kryształitów o szerokości 10 nm i długości 80 nm. Frakcja 2–5  $\mu\text{m}$  zawiera cząstki składające się z mocno przylegających do siebie kryształitów. Interesujący jest dwumodowy rozkład wielkości kryształitów. Większość z nich stanowiły bardzo drobne kryształy o rozmiarach 1–4 nm. Obok nich wystąpiły w ilości ok. 10–15% znacznie większe kryształy. Ich rozmiar wahał się od 10 do 160 nm (większość 20–40 nm). Ziarna o rozmiarach większych od 5  $\mu\text{m}$  stanowiły agregaty mniejszych ziaren o strukturze charakterystycznej dla frakcji 2–5  $\mu\text{m}$ . W materiale badanym w pracy [19] nie stwierdzono obecności lonsdejlitu.

Rozmiar ziaren azotku boru o strukturze typu wurcytu zależy od warunków uderzeniowej syntezy, jednakże nie przewyższa rozmiarów ziaren wyjściowego  $\alpha\text{BN}$ . Jest to zrozumiałe, zważywszy na deformacyjny charakter przemiany. Przy obciążaniu samego azotku boru uzyskuje się ziarna wielkości ok. 0,05  $\mu\text{m}$ . W mieszaninie z wodą otrzymuje się znacznie większe ziarna – ok. 1  $\mu\text{m}$  [22]. Duża dyspersyjność produktu związana jest w znacznej mierze z dużą dyspersyjnością materiału wyjściowego, którego cząstki nie przekraczają rozmiaru 10  $\mu\text{m}$ . Ponadto kształt wyjściowego  $\alpha\text{BN}$  (cienkie płytki) sprzyja ich rozdrabnianiu w fali uderzeniowej. Większy rozmiar ziaren  $\gamma\text{BN}$  otrzymywanych w mieszaninach z wodą wynika z osłabienia efektu rozdrabniania. Inną drogą do uzyskiwania większych ziaren produktu jest zastosowanie spieku  $\alpha\text{BN}$  jako materiału wyjściowego. Według patentu [15] można w ten sposób uzyskać aglomeraty ziaren odmiany wurcytowej o rozmiarach od 4 do 500  $\mu\text{m}$ . Są one na tyle wytrzymałe, że mogą być wykorzystywane jako materiał ścierny. Ziarna o rozmiarze do 1 mm, przy średnim rozmiarze ok. 100  $\mu\text{m}$  można uzyskać obciążając duże próbki zrekrystalizowanego, pirolitycznego azotku boru – [23]. Ponieważ rekrytalizacja pirolitycznego azotku boru wymaga długotrwałego wygrzewania w temperaturze 2300–2600 K, zastosowanie tego materiału jest ekonomicznie nieopłacalne. Skłoniło to autora patentu [23] do proponowania innej metody otrzymywania dużych i wytrzymałych aglomeratów  $\gamma\text{BN}$ . Polega ona na zastosowaniu materiału wyjściowego o rozmiarze ziaren większym od 50  $\mu\text{m}$ . Sposób wytwarzania takich ziaren  $\alpha\text{BN}$  opisano w patencie [24].

Wytwarzany metodą syntezy uderzeniowej azotek boru o strukturze wurcytu charakteryzuje się bardzo wysoką koncentracją defektów. Gęstość dyslokacji nie jest mniejsza od  $10^{12}$   $\text{cm}^{-2}$ . Rozmiary obszaru koherentnego rozpraszania są rzędu 15–20 nm, a mikroodkształcenia sieci  $1,5\text{--}5 \cdot 10^{-3}$ . O stopniu niedoskonałości struk-



tury  $\gamma$ BN wytworzonego metodami wybuchowymi może świadczyć fakt, że stosunek stałych sieci  $c/a$  jest dla niego wyraźnie większy niż dla idealnej struktury. Jak podano w pracy [25],  $\gamma$ BN wytworzony w cylindrycznym układzie wybuchowym posiada stosunek  $c/a = 1,659$ , zaś idealna wartość  $c/a$  wynosi 1,633.

Przegląd danych odnośnie charakterystyk produktów syntezy dynamicznej pozwala wyodrębnić kilka podstawowych cech otrzymywanych na tej drodze materiałów. Po pierwsze, są to materiały wysokodispersyjne. Występują w postaci proszków o rozmiarach ziaren nie przekraczających 60  $\mu\text{m}$ . Typowy rozmiar ziaren produktu otrzymanego w układach wybuchowych zawiera się w granicach 1–10  $\mu\text{m}$ . Po drugie, ziarna produktu w większości przypadków przedstawiają sobą polikryształy o dość nieregularnych kształtach. Często ich kształt odzwierciedla kształt ziaren materiału wyjściowego, co jest odbiciem deformacyjnego mechanizmu przemiany. Po trzecie, produkty syntezy dynamicznej charakteryzują się silnie zdeformowaną strukturą. Gęstość deformacji odpowiada skrajnie zdeformowanym metalom.

Kierunki zastosowań produktów syntezy dynamicznej pokrywają się z kierunkami zastosowań materiałów supertwardych wytworzonych metodą statyczną. Jednakże ze względu na opisane powyżej cechy, ich zastosowanie jest węższe niż produktów syntezy statycznej. W szczególności, ze względu na mały rozmiar ziaren nie mogą być zastosowane jako materiał ścierny w pastach szlifierskich. Jednakże mogą być z powodzeniem zastosowane w pastach polerskich do końcowej obróbki powierzchni. Ich zaletą jest fakt, że nawet najmniejsze ziarna przedstawiają sobą polikryształy. Dzięki temu większa jest liczba powierzchni tnących, zaś pękanie ziaren nie jest zjawiskiem szkodliwym, gdyż odsłania nowe powierzchnie tnące. W związku z tym materiały te bardzo dobrze nadają się do obróbki szkieł, ceramiki i końcowej obróbki brylantów.

Materiały supertwarde wytworzone metodą wybuchową dobrze nadają się do wytwarzania spieków. Decyduje o tym duża gęstość defektów, która aktywizuje procesy spiekania. Ta cecha uzasadnia stosowanie materiałów supertwardych wytwarzanych wybuchem jako dodatków aktywizujących spiekanie materiałów uzyskanych metodą statyczną.

Bardzo dobrym materiałem do wytwarzania spieków okazał się wytwarzany metodą wybuchową azotek boru o strukturze typu wurcytu. W byłym ZSRR opracowano na jego podstawie materiał nazwany Gieksanit R, przeznaczony do skrawania stali i żeliwa [26]. Materiał ten otrzymuje się spiekając pod ciśnieniem 6–8 GPa azotek boru o strukturze typu wurcytu. Temperatura procesu jest tak dobierana, aby nastąpiła częściowa przemiana  $\gamma$ BN w  $\beta$ BN (w ok. 30–50%). Nie może ona być zbyt wysoka, aby nie nastąpił rozrost ziaren regularnego azotku boru. Podobne materiały do Gieksanitu R wytwarzane są na skalę przemysłową w różnych krajach. Na przykład w Japonii materiał ten występuje pod nazwą WURZIN [27]. W zależności od doboru warunków spiekania (ciśnienie ok. 5 GPa, temperatura 1500–1900 K) zawiera on azotek boru o strukturze typu wurcytu lub mieszaninę  $\gamma$  i  $\beta$ BN, a jego mikrotwardość zmienia się od 30 do 40 GPa.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] P.S. De Carli, Stanford Research Institute, Palo Alto, California, Patent US 3238019, 1966.
- [2] D.R. Garrett, wł. autora, Patent US 3659972, 1972.
- [3] J.J. Glass, S.P. Sharma, AIAA J., 1976, 14, 402.
- [4] J. Kleinman, R.B. Heinman, D. Hawken, N.M. Salansky, J.Appl.Phys., 1984, 56, 1440.
- [5] V.A. Lukash, A.I. Markov, Sverkhтвердые Materialy, 1983, 6, 13–19.
- [6] J. Statuch, Biul.WAT, 1974, 23, 101.
- [7] M. Reyne, wł. autora, Patent Fr. 1445597, 1966.
- [8] Wł. Societe Metallurgique du Borinage „SOMBRERO”, Patent Fr. 2256777, 1975.
- [9] G.R. Cowan, B.W. Dunnington, A.H. Holtzman, wł. E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, Patent US 3401019, 1966.
- [10] A.S. Balchan, G.R. Cowan, wł. E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, Patent US 3667911, 1972.
- [11] G.R. Cowan, wł. E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, Patent US 3823044, 1974.
- [12] G.A. Adadurov, A.V. Ananin, T.V. Bavina, O.N. Breusov et al. wł. Institut Khimicheskoy Fiziki Akademii Nauk SSSR, Chernogolovka, Patent GB 2090239, 1982.
- [13] G.R. Cowan, wł. E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, Patent US 3568248, 1971.
- [14] Wł. Showa Denko Kabushiki Kaisha i Nippon Oil and Fats Limited, Patent GB, 1348465, 1974.
- [15] Wł. Showa Denko Kabushiki Kaisha i Nippon Oil and Fats Limited, Patent GB1399564, 1975.
- [16] A.N. Dremin, O.N. Breusov, T.V. Bavina, S.V. Pershin, wł. autorzy, Patent US 4014979, 1977.
- [17] L.F. Treub, J.Appl.Phys., 1968, 39, 4707.
- [18] L.F. Treub, J.Appl.Phys., 1971, 42, 503.
- [19] V.D. Andreev, A.S. Vishnevskij, M.N. Voloshin, V.A. Lukash, V.N. Tkach, Sverkhтвердые Materialy, 1980, 3, 8.
- [20] V.D. Andreev, M.N. Voloshin, V.A. Lukash, Ju.I. Sozin, A.A. Pyzhikov, Sverkhтвердые Materialy, 1984, 5, 25.
- [21] V.D. Andreev, Ju.I. Sozin, M.N. Voloshin, Sverkhтвердые Materialy, 1985, 1, 13.
- [22] A.V. Kurdjumov, I.N. Borimchuk, V.V. Jarosh, [w:] *Trudy V Vsesojuznovo Soveshhanija po Detonatsii*, Krasnojarsk, Rosja, 1991, 171.
- [23] F.R. Corrigan, wł. General Electric Company, Patent GB 1481091, 1977.
- [24] F.R. Corrigan, wł. General Electric Company, Patent GB 1481026, 1977.
- [25] A.V. Kurdjumov, G.S. Olejnik, N.F. Ostrovskaja, A.N. Piliankevich, G.I. Savvakina, Poroshkovaja metallurgia, 1985, 1, 83.
- [26] V.I. Trefilov, I.N. Francevich, A.N. Piliankevich, Sinteticheskie almazy, 1974, 4, 24.
- [27] M. Akaraki, Y. Kuroyama, Physica B+C, 1986, 139&140, 819.

**FELIETON NAUKOWY**



**NOTATKI CHAOTYCZNE  
XLV. W STRONĘ CZASU TERAŹNIEJSZEGO**

**Ignacy Z. Siemion**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

---



**Ignacy Z. Siemion**, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 22 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 7 książek, 250 prac oryginalnych i ponad 80 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”.

Przeglądając ostatnio napisane notatki stwierdziłem, że coś za bardzo uciekają mi one w czas przeszły. Tymczasem czas teraźniejszy bez przerwy przecież bombarduje nas odkryciami o pierwszorzędym znaczeniu. Kiedyś, w przyszłości, patrzeć się będzie na miniony XX wiek jak na czas przełomowy, jeśli chodzi o początki rzeczywistego rozumienia zjawisk życiowych. W obszarach nauki, które zajmują się tą pasjonującą i niezwykle przecież ważną kwestią, codziennie niemal pojawiają się odkrycia najwyższej wagi. Tyle, że przytłoczeni dniem codziennym nie zawsze potrafimy ich wysoką rangę dostrzec i zrozumieć. Do takiej refleksji skłoniła mnie tegoroczna (2002) Nagroda Nobla.

Nagrodę tę podzielono w 2002 roku pomiędzy trzech uczonych. Połowę nagrody uzyskał Kurt Wüthrich, profesor biofizyki w ETH w Zurychu. Drugą jej połowę podzielono pomiędzy J.B. Fennem z Uniwersytetu w Richmond i Koichi Tanaką z Shimadzu Corporation w Kyoto. Tegoroczna nagroda została więc umiędzynarodowiona, jak rzadko. Zgodnie z orzeczeniem Komitetu Nagród Nobla, przyznano ją Fennowi za „rozwińnięcie metod identyfikacji i strukturalnej analizy makrocząsteczek biologicznych”, Tanace za „rozwińnięcie metod jonizacyjnej miękkiej desorpcji w analizie makrocząsteczek biologicznych przy pomocy spektrometrii mas” i Wüthrichowi „za rozwińnięcie spektroskopii NMR jako metody wyznaczania trójwymiarowej struktury makrocząsteczek biologicznych”. Sumarycznie więc sprawę traktując, możemy powiedzieć, że nagrodę przyznano za otwarcie nowych możliwości w badaniu struktury biopolimerów, najważniejszych składników żywej komórki. Zamieszczony tutaj Rys. 1 przedstawia podobizny tegorocznych Noblistów.



John B. Fenn  
ur. 1917

Koichi Tanaka  
ur. 1959

Kurt Wüthrich  
ur. 1938

Rysunek 1. Laureaci nagrody Nobla w chemii, 2002 r.  
[www.nobel.sc/chemistry/laureates/2002/index.html](http://www.nobel.sc/chemistry/laureates/2002/index.html)

W tej trójce uczonych pierwsze miejsce, jak wynika choćby ze sposobu podziału nagrody, przypada Wüthrichowi. Ostatnie lata były dla niego hojne. Cztery lata wcześniej (1998) otrzymał on *Kyoto Price in Advanced Technology*. Nagrodę tę uzyskał Wüthrich za to, że „rozwinął metodę wyznaczania konformacji białek, kwa-

sów nukleinowych i innych biomakromolekuł w roztworze lub w biopolimerach, to jest tam gdzie one wykonują swoją funkcję”. Orzeczenie to jest szersze od cytowanego wyżej orzeczenia Komitetu Nagród Nobla, ale dotyczy dokładnie tej samej sprawy.

Swoją drogę do wysokich wyróżnień naukowych krótko przedstawił Wüthrich w niewielkim artykule, jaki nie tak dawno ukazał się na łamach „Nature Structural Biology” [1]. Stamtąd też zaczerpnąłem kilka informacji biograficznych, dotyczących szwajcarskiego uczonego.

Po odbytych w latach 1962–1967 studiach doktoranckich w Bazylei, późniejszy Noblista odbył staż badawczy w laboratorium profesora R.E. Connicka w Berkeley. Zajmował się podówczas zastosowaniem spektroskopii NMR i EPR do studiów nad kompleksami jonów metali. Badaniami białek zajął się podczas kolejnego stażu w laboratorium biofizycznym R.G. Shulmana w Bell Telephone. Laboratorium dysponowało niezwykle dla tamtego czasu przyrządem – spektrometrem NMR pracującym przy częstotliwości 220 MHz. „W tym czasie – wspomina Wüthrich – znanych było dokładnie 10 publikacji na temat badań NMR-owskich nad białkami i kwasami nukleinowymi, jakie ogłoszono w latach 1957–1965. Wybitnymi postaciami wśród niewielkiej grupy spektroskopistów, którzy podjęli bezpośrednie obserwacje NMR-owskie makrocząsteczek biologicznych byli: Wiliam D. Philips, Oleg Jardetzky i Robert G. Shulman”. Wüthrich dołączył więc do znakomitej grupy uczonych.

Początkowo ciążyła na Wüthrichu jego własna naukowa przeszłość: badanie kompleksów jonów metali. Nic dziwnego, że do badań nad białkami wkroczył od strony hemoprotein. Zajmował się głównie elektronową strukturą hemu. Odbyte – w bardzo prestiżowych ośrodkach – staże badawcze umożliwiły uczonemu uzyskanie, w 1969 roku, stanowiska profesora biofizyki na ETH. Zajął się wówczas pracą nad monografią: *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*. Monografia ta ukazała się w 1977 roku. Jak wspomina sam autor, dopiero praca nad tą monografią skłoniła go do prób zastosowania technik NMR do badania struktury białek.

„Cztery – pisze Wüthrich – główne elementy zostały zespolone w NMR-owskiej metodzie badania budowy białek: (i) – jądrowy efekt Overhausera (NOE), jako parametr dostępny dla białek doświadczalnie; dostarczyć on może informacji potrzebnych do wyznaczenia *de novo* globalnego obrazu sfałdowania łańcucha polimeru; (ii) – przypisania wielu setek a nawet tysięcy zależnych od sekwencji sygnałów NMR białka; (III) – komputerowe sposoby interpretacji danych NMR oraz określania wynikających z nich struktur molekularnych; (IV) – wielowymiarowe techniki NMR, służące do efektywnego zbierania danych”. Pracę Wüthricha musiała niewątpliwie ułatwiać ta okoliczność, że na tej samej uczelni pracował twórca wielowymiarowych technik spektroskopii NMR (otrzymał za to dokonanie Nagrodę Nobla w 1991 roku) Richard R. Ernst.

W ciągu kilku lat pracy, zespół badawczy Wüthricha określił ogólny zarys budowy przestrzennej takich białek, jak inhibitor trypsyny z trzustki wołowej, cytochrom  $b_5$  i glukagon. W roku zaś 1984 przedstawił Wüthrich strukturę pierwszego

białka globularnego, jaka wynikała z jego badań NMR-owskich. Białkiem tym był inhibitor proteaz, wyizolowany z nasienia buhaja. „Kiedy – wspomina uczonego – zaprezentowałem tę strukturę w kilku wykładach na wiosnę 1984 roku, spotkałem się z niedowierzaniem, a ponieważ nasz wynik był zgodny z wynikami niezależnych badań krystalograficznych, wykonanych dla białka homologicznego inhibitora trypsyny z trzustki świni, zacząłem mówić, że naszą strukturę wymodelowaliśmy według tej ostatniej krystalograficznej struktury”. Takie podejrzania nie mogły nie poruszyć badaczy do głębi. W obronie swojego podejścia badawczego Wüthrich zastosował następujący zabieg: umówił się ze znanym krystalografem białek, R. Huberem (jest to laureat Nagrody Nobla z roku 1988), że równocześnie zbadają dwoma niezależnymi metodami, metodą NMR-owską i metodą rentgenowską strukturę przestrzenną nieznanego jeszcze od tej strony białka. Ich wybór padł na białkowy inhibitor  $\alpha$ -amylazy. Wyniki tych dwóch, niezależnie od siebie przedsięwziętych badań, były identyczne. (W tym miejscu warto wspomnieć, że to właśnie w laboratorium Hubera wyznaczono strukturę przestrzenną inhibitora trypsyny, który został wyizolowany z nasion dyni przez wrocławskich badaczy, A. Polanowskiego i T. Wilusza).

Ale wracajmy do rzeczy. Piękny wynik współpracy Wüthricha z Huberem nie sprawił tego, by metodę NMR w badaniach budowy białek zaczęto od razu powszechnie doceniać. Wüthrich przystąpił do badań nad nową grupą białek. Były to metalotioneiny ssaków, białka wiążące jony metali. Kiedy w roku 1985 Wüthrich zaprezentował na Uniwersytecie Yale strukturę, jaką uzyskał dla metalotioneiny królika, dowiedział się, że w druku w „Proceedings of National Academy of Sciences” znajduje się publikacja o strukturze innej metalotioneiny, wyznaczonej metodą rentgenowską. Ta struktura była jednak zupełnie inna od struktury Wüthricha. Przedstawiono mu również strukturę metalotioneiny szczura, jaką otrzymali badacze na uniwersytecie w Pittsburgu. Ta, również wynikająca z badań rentgenowskich, struktura, była też odmienna od struktury Wüthricha. Skrajnie zaniepokojony tymi okolicznościami uczonego spędził pełne dwie noce przy telefonie, jeszcze raz uzgadniając ze swoim szwajcarskim współpracownikiem wszystkie przyporządkowania sygnałów NMR białka. I odetchnął stwierdzając, że były one przecież zupełnie poprawne. Ostatecznie artykuł o krystalicznej strukturze metalotioneiny ukazał się w „Science” podczas gdy „Nature” odrzuciło artykuł Wüthricha o strukturze NMR-owskiej tego białka. Cóż, kiedy w 1992 roku doszło do rewizji wcześniejszych wyników krystalograficznych. Poprawiona struktura metalotioneiny okazała się całkowicie zbieżna z tą wyznaczoną przez Wüthricha.

Rok 1992 przypadł na czas pełnej już akceptacji podejścia szwajcarskiego uczonego. Metodę NMR-owską zaczęto traktować jako alternatywną w stosunku do rentgenowskiej. Dość powiedzieć, że w roku 1996 na 461 struktur białek uzyskanych metodą rentgenowską, przypadło 112 struktur NMR-owskich. Zaletą metody NMR-owskiej jest to, że działa ona w roztworach białek. Można przy jej pomocy badać białka trudno krystalizujące, niedostępne dla metody rentgenowskiej. Ograniczeniem metody jest natomiast wielkość białka. Jej stosowanie ogranicza się do obiektów

złożonych z mniej więcej stu reszt aminokwasowych. Zdaniem Wüthricha technika TROSY (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*) pozwoli rozszerzyć zakres stosowalności metody na obiekty o masie cząsteczkowej do 500 kDa.

W dalszych latach zespół Wüthricha badał struktury przestrzenne cyklofilin (są to białka wiążące niskocząsteczkowe immunosupresory, uczestniczące w generowaniu zjawisk immunopresyjnych) oraz prionów (białka ujawniające swoje złe moce w encefalopatiach, takich jak gąbczaste zwyrodnienie mózgu u bydła, BSE).

Kurt Wüthrich udowodnił więc światu, że wypracowana przezeń NMR-owska metoda badania struktury przestrzennej białek jest cennym uzupełnieniem i alternatywą dla metody krystalograficznej.

Z Kurtem Wüthrichem przyszło mi spotkać się przelotnie w roku 1977. Odbył się wtedy w Kopenhadze przeogromny kongres biochemiczny i Wüthrich przewodniczył tam obradom stosunkowo nielicznie jeszcze wtedy reprezentowanej sekcji spektroskopowych metod badania budowy biopolimerów. Na tej sekcji przedstawiłem własne wyniki dotyczące wykorzystania tzw.  $\gamma$ -efektu w spektroskopii  $^{13}\text{C}$ -NMR do wyznaczania wartości konformacyjnych kątów  $\psi$  polipeptydów. Wüthrich przyjął moje wyniki życzliwie, co o tyle mnie przyjemnie poruszyło, że ze strony innych zawodowych NMR-owców spotykałem się raczej z niechęcią. Nasze podejście „pracowało” wcale nieźle. Ale cóż, był to już koniec epoki klasycznego jednowymiarowego NMR-u i pojawienie się wyrafinowanych metod wielowymiarowych skazało to nasze podejście na zapomnienie.

Oddzielny problem w badaniach nad strukturą białek stanowią obiekty nie tylko nierozpuszczalne w wodzie, ale dodatkowo kiepsko, bądź wcale nie krystalizujące. Należą do nich układy amyloidowe i białka błon komórkowych. Jak się ostatnio okazało, można je atakować przy pomocy spektroskopii NMR ciał stałych, wykorzystującej technikę pomiarową „magicznego kąta” i wzbogacenie próbek w izotopy  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ . W taki właśnie sposób zbadano strukturę przestrzenną domeny SH3 białka nazwanego  $\alpha$ -spektryną [2]. Badaczom udało się wyznaczyć aż 286 odległości  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  oraz 6 odległości  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ , niektóre sięgające aż 7 Å, i na tej podstawie zaproponować przypuszczalną strukturę białka. Badany preparat był, jak piszą, „mikrokrystaliczny”, co, jak wiemy, jest sposobem opisu amorficznych zgoła próbek.

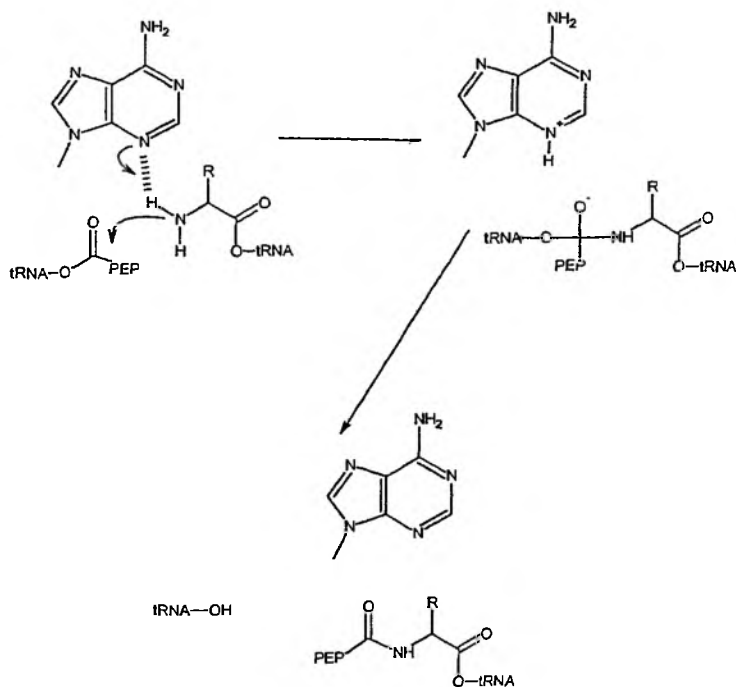
Przewaga natomiast metody krystalograficznej nad NMR-owską polega, jak już powiedzieliśmy, na możliwości badania na tej drodze złożonych kompleksów wielu białek, czy też kompleksów białek i kwasów nukleinowych. Oszałamiającym zgoła przykładem takiego stanu rzeczy są prace nad strukturą rybosomów. Rybosomy to ziarnistości komórkowe, w których dokonuje się synteza białek *de novo*. Dobrze poznany rybosom *E.coli* składa się z dwóch podjednostek: małej (30S) i dużej (50S). Podjednostka 30S zbudowana jest z kolei z 21 cząsteczek różnych od siebie białek, a podjednostka 50S z 35 cząsteczek różnorodnych białek. Każda podjednostka zawiera też własny kwas rybonukleinowy; RNA stanowi około 60% wagi rybosomu. Rybosomy eukariontów są nieco większe od bakteryjnych.

Mała podjednostka rybosomu pośredniczy w oddziaływaniu łańcucha polinukleotydowego informacyjnego RNA z cząsteczkami transferowych kwasów nukleino-



wych (tRNA), które przenoszą reszty aminokwasowe do miejsca syntezy nici polipeptydowej. Nie wchodząc w szczegóły, dobrze zresztą znanych z podręczników biochemii, mechanizmów molekularnych procesu biosyntezy białka, zważmy tylko, że reakcja syntezy kolejnych wiązań peptydowych, łączących reszty aminokwasowe w narastającym łańcuchu, dokonuje się w obrębie centrum peptydylo-transferazowego rybosomu.

Otóż, w ostatnich latach rozszyfrowano przy pomocy metody rentgenowskiej budowę przestrzenną tak małej, jak i dużej podjednostki rybosomu. Pierwsza chyba prezentacja tych bardzo złożonych struktur dokonana została na Milenijnym Sympozjum Biologii Strukturalnej w Heidelbergu, w roku 2000. Tom Steitz z Uniwersytetu Yale przedstawił tam budowę podjednostki 50 S rybosomu *Holoarcula marismortui*, rozszyfrowaną z dokładnością 2,7 Å. Zaraz potem Ada Yonath z Instytutu Weizmana mówiła o postępie prac nad ustaleniem budowy przestrzennej obydwu podjednostek rybosomu z organizmów *Thermus thermophilus* [3]. Dokładniejsze rozpoznanie budowy obydwu podjednostek rybosomu pozwoliło podjąć próbę konstrukcji modelu całej tej złożonej struktury. I wtedy okazało się, że w centrum peptydylo-transferazowym rybosomu nie ma białka. Podstawowa dla życia komórki reakcja syntezy białek katalizowana jest przez rybosomalny kwas nukleinowy. W akcie katalizy uczestniczy reszta adeninowa rybosomalnego RNA, a przypuszczalny mechanizm reakcji jest następujący:



PEP - łańcuch peptydowy

Ten wynik, szczegółowo omówiony w przeglądowym artykule zamieszczonym w „Nature” [4] jest zgoła niezwykły. Przekreśla on ostatecznie latami pielęgnowany pogląd o biernej w gruncie rzeczy roli kwasów nukleinowych w gospodarce komórki żywej. Miały one służyć jako narzędzia zapisu i powielania informacji genetycznej (DNA) oraz przekazu tej informacji do centrów biosyntezy białek (RNA). O gospodarce zaś komórki, o jej metabolizmie, miały decydować enzymy białkowe. Tymczasem, jak się okazało, kwasy nukleinowe tkwią w centralnym punkcie przemian, dokonujących się w komórce żywej.

Wynik ten, jak żaden inny, dokumentuje niezwykle możliwości badawcze, tkwiące w metodzie krystalograficznej. Trzeba jednak powiedzieć, że w świecie chemicznym nie wywołał on na razie nadzwyczaj dużego wrażenia, takiego jak niegdyś choćby podwójna helisa DNA. Bo do myśli o tym, że kwasy nukleinowe mogą mieć własności katalityczne zdążyliśmy się już przyzwyczaić. Odkrycie takich własności RNA ma już ponad 20-letnią historię, a związane jest z nazwiskami Cecha [5] i Altmana [6]. Początkowo wykryto, że RNA-katalizatory (rybozomy) katalizują procesy wewnątrzcząsteczkowej modyfikacji struktur RNA. Wprowadzenie techniki SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) pozwoliło znaleźć dziesiątki nowych aktywności katalitycznych RNA, częstokroć w ogóle nie występujących w metabolizmie komórkowym. O tej metodzie pisała nie tak dawno na naszych łamach pani B. Nawrot [7], nie będę się więc dłużej nad nią zatrzymywał. W szczególności, przy pomocy tej metody można wyselekcjonować cząsteczki RNA selektywnie wiążące dowolny ligand niskocząsteczkowy. Takie, selektywnie działające, rybonukleinowe „łapacze” odpowiednich ligandów nazwano aptamerami (od łac. aptus – dopasowany). Jak pisze jeden z głównych twórców metody SELEX, L. Gold, „metoda SELEX i podejście badawcze właściwe kombinatorycznej chemii oligonukleotydów pozwala znaleźć wysoce specyficzne i wykazujące wysokie powinowactwo ligandy dla dowolnego obiektu molekularnego” [8].

Jakże zmienia się nasze spojrzenie na kwasy nukleinowe! Okazało się, że są to układy elastycznie dopasowujące się do różnorodnych związków chemicznych, z którymi łączą się siecią oddziaływań specyficznych, na podstawie wzajemnego rozpoznawania molekularnego.

Jak wiemy, metaboliczne funkcje enzymów białkowych podlegają częstokroć kontroli allosterycznej. Polega ona na tym, że końcowy produkt określonego ciągu przemian hamuje pierwszą reakcję ciągu. Jak się okazało, w bardzo podobny sposób mogą być regulowane biologiczne funkcje kwasów nukleinowych. I tak np., bardzo efektywnym sposobem zahamowania biosyntezy jakiegoś białka może być zablokowanie procesu łączenia się informacyjnego kwasu nukleinowego (mRNA) z rybosomem. Wyłącza to biosyntezę odpowiedniego białka już w punkcie jej startu. W ten sposób, adozynokobalamina (witamina B<sub>12</sub>), łącząc się z mRNA białka transportującego kobalaminę do wnętrza komórki *E.coli*, powoduje zahamowanie syntezy tego białka [9]. Podobnie, biosynteza enzymów uczestniczących w organizmach bakterii w produkcji tiaminy (witaminy B<sub>1</sub>) jest na takiej właśnie drodze regulowana przez

pirofosforan tiaminy [10]. Jak bardzo niedawno wykazano, mRNA kodujące sekwencje enzymów syntezy tiaminy przyłącza pirofosforan tiaminy bez udziału jakichkolwiek kofaktorów białkowych. Tiamina stabilizuje taką konformację kompleksu, która nie pozwala na oddziaływanie mRNA z rybosomami [11]. Warto też dodać, że o ile oddziaływanie mRNA z tiaminą, jej fosforanem i pirofosforanem, prowadzi do wskazanego wyżej efektu, to analogi tiaminy takiego działania nie mają.

Podobne mechanizmy regulacyjne zostały też odkryte dla mononukleotydu flawinowego (FMN). Przypuszcza się, że tiamina, kobalamina i FMN stanowią mogą grupę pradawnych kofaktorów dawnego „świata RNA”, który zdaniem wielu badaczy poprzedzać miał świat kwasów nukleinowych i białek [12].

To, co mnie zawsze uderza, to stwierdzenie, że cała ta historia kwasów nukleinowych jest tak młoda. Rozegrała się ona na naszych oczach, w latach zawodowej działalności mojego pokolenia. Odkrycie podwójnej helisy DNA przypadło na czas mojej zawodowej młodości. Ale dobrze pamiętam to wstrząsające wrażenie, jakie wywarło ono na moich rówieśników i starszych kolegów. Oddziało ono w ten sposób nie tylko zresztą na ludzi związanych z pracą badawczą w obrębie biochemii i dyscyplin pokrewnych. Odbiło się echem nawet w sztuce. Dzięki inicjatywie i pomocy mojej współpracownicy, pani dr Kluczyk, mogę tu Państwu przedstawić reprodukcję obrazu Salvadore Dali, namalowanego w roku 1963. Obraz nosi tytuł: *Galacidalacidesoxiribuncleicacid. Homagium dla Cricka i Watsona*. Obraz ten przedstawia Fig. 2. W prawym jego rogu widzimy uszeregowane niczym w kryształach figury ludzkie. W rękach trzymają one wymierzoną w sąsiadów broń. Być może jest to symboliczne przedstawienie martwego świata nieorganicznego. Z lewej strony obrazu widzimy coś, co można by wziąć za strukturę DNA. Tajemnicza postać w lewym górnym rogu (Bóg?) zawieszka na nią ostrze gilotyny. Wszystko zaś utopione w ciemnym, dość upiornym krajobrazie, w gubiącej się jakiejś przestrzeni.



Rysunek 2. Salvador Dali: *Galacidalacidesoxiribuncleicacid. Homagium dla Cricka i Watsona* (1963), <http://www.geocities.com/SoHo/Gallery/7993/galacid.html>

Odkrycie podwójnej helisy DNA i wyjaśnienie na tej podstawie molekularnego mechanizmu dziedziczenia cech organizmów rodzicielskich przez organizmy potomne, było na początku lat 60. prawdziwym naukowym wstrząsem. Wtedy też upowszechniła się teza „jeden gen – jeden enzym”, można powiedzieć bojowe zawołanie tamtych lat. Teza, która zresztą powstała na gruncie klasycznej genetyki blisko 10 lat przed odkryciem Cricka i Watsona. Genetycy uważali, że hipotetyczne jeszcze wtedy geny można zidentyfikować określając produkty ich działania. Hasło zaś „jeden gen – jeden enzym” sformułował w roku 1945 G.W. Beadle [13]. Z hasłem tym wiąże się następująca moja przygoda. W roku 1962 obchodzono we Wrocławiu 10-lecie istnienia Instytutu Immunologii im. L. Hirszfelda. Mój ówczesny szef, prof. T. Baranowski, wygłaszał z tej racji na uroczystym posiedzeniu naukowym główny referat i poświęcił go rodzącej się właśnie genetyce molekularnej. Hasło „jeden gen – jeden enzym” było główną ideą wykładu. A ponieważ kolega, który zawsze sporządzał dla profesora potrzebne mu do wykładu plansze zachorował, musiałem go w miarę swych możliwości zastąpić. Moim więc dziełem była cała ilustracyjna oprawa wykładu, dodajmy, że nie najbardziej udana. Profesor narzekał, że narysowałem potrzebne mu rzeczy z zbyt małej skali i już nawet z drugiego rzędu niczego nie będzie widać.

Wykład profesora zapisał się w pamięci uczestników sesji z innej jednak przyczyny. Profesor wywodził się z lwowskiej szkoły Jakuba Parnasa. Przez całe życie zachował nabożny niemal stosunek do swego nauczyciela. A tu kazano mu głosić wykład na sławę Ludwika Hirszfelda! Musiała się zbuntować jego podświadomość, bo kiedy wykład skończył, nieoczekiwanie nawet dla siebie wypalił: „I wykład mój poświęcam pamięci mojego nieodżałowanego nauczyciela, Jakuba Parnasa!” Trudno opisać konsternację, jaka zapanowała na sali.

Czasy, w których żyjemy, tak bardzo przyzwyczyły nas do ciągłego bombardowania naszej świadomości wielkimi i jeszcze większymi odkryciami naukowymi, że przestajemy na nie reagować. Przypomina mi to sytuację, o jakiej opowiadał mi w młodości niepiśmienny zresztą chłop, Józef Greła. Mieszkał on z rodziną w zagubionym wśród lasu przysiółku, gdzie przez całą okupację niemiecką nie postąpiła noga Niemca. Można było tam okupację przeżyć, a okupanta nigdy nie widzieć. – Widzisz – opowiadał mi kiedyś ów chłop – przed pierwszą wojną światową, to w Bychawie był sędzią pokoju dziedzic z Nowin Żukowskich. Co wtorek do Bychawy rowerem jechał. To ludzie z całej okolicy się zlatywali, jak miał jechać i na niego czekali. Patrzyli – mówili – diabeł go niesie! A tera patrz: samochody! samoloty! I nikt się nie dziwi. Jakby się nic nie stało.

#### PIŚMIENICTWO CYTOWANE

[1] K. Wüthrich, *The way to NMR structures of proteins*, Nature Struct. Biol., 2001, 8, 923–925.

[2] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, Nature, 2002, 420, 98.

- 
- [3] Artykuł redakcyjny: *Brave new world view*, Nature Struct. Biol., 2000, 7, 434.
- [4] P.B. Moore, T.A. Steitz, Nature, 2002, 418, 229.
- [5] T. Cech, A. Zang, P. Grabowski, Cell, 1981, 27, 487.
- [6] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, Cell, 1983, 35, 849.
- [7] B. Nawrot, Wiadomości Chem., 2000, 54, 615.
- [8] L. Gold, D. Brown, Yi-Yuan He, T. Shtatland, B.S. Singer, Y. Wu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 59.
- [9] X. Nou, R.J. Kadner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 7190.
- [10] J. Miranda-Rios, M. Navarro, M. Soberon, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98, 9736.
- [11] W. Winkler, A. Nahvi, R.R. Breaker, Nature, 2002, 419, 952.
- [12] G.F. Joyce, Nature, 2002, 418, 214.
- [13] G.W. Beadle, Amer. Scientist, 1946, 34, 31.



## KRONIKA



**EKO-CHEMTECH'03  
ZIELONA CHEMIA  
Wrocław, 27-28 czerwca 2003 r.**

Green Chemistry – Zielona chemia techniczna – Czysta technologia chemiczna  
– Ekologiczna Chemiczna Technologia –  
Trwała technologia chemiczna – Zdolna do przyszłościowego przetrwania  
technologia chemiczna – Technologia chemiczna XXI wieku.

### I. KONFERENCJA nt. ZIELONEJ CHEMII

**Organizowana pod protektoratem:  
J. M. Rektora AE,  
Prof. dr hab. Mariana Nogi,  
Senatora RP  
przez:  
Katedrę Technologii Chemicznej  
Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny  
Akademii Ekonomicznej im. Oskara Langego we Wrocławiu**



## TEMATYKA WIODĄCA KONFERENCJI:

1. Zielona technologia chemiczna
2. Surowce odtwarzalne dla czystej technologii chemicznej
3. Nowe zielone chemikalia i materiały
4. Multifazowa kataliza – szansą dla zielonej chemii
5. Zielone rozpuszczalniki w procesach chemicznych:
  - ciecze jonowe
  - rozpuszczalniki organiczne w stanie nadkrytycznym
  - ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym
  - inne rozpuszczalniki w stanie około-nadkrytyczności
6. Procesy o zmniejszonym obciążeniu dla środowiska
7. Procesy o obniżonym zapotrzebowaniu energetycznym
8. Wykorzystanie ogrzewania mikrofalowego w procesach i operacjach technologicznych

## KOMITET NAUKOWY:

*Przewodniczący:*

**Prof. dr hab. inż. Romuald Bogoczek**  
*Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu*

Prof. dr hab. inż. Bogdan Burczyk,  
*Politechnika Wroclawska*

Prof. dr hab. inż. Tadeusz Paryjczak,  
*Politechnika Łódzka*

Prof. dr hab. inż. Juliusz Pernak,  
*Politechnika Poznańska*

Doc. dr inż. Bolesław Skowroński,  
*Instytut Nawozów Sztucznych Puławy*

Prof. dr hab. inż. Marian Taniewski,  
*Politechnika Śląska*

Prof. dr hab. Józef J. Ziółkowski,  
*Uniwersytet Wrocławski*

## SEKRETARIAT KONFERENCJI:

Katedra Technologii Chemicznej Akademii Ekonomicznej  
ul. Komandorska 118/120, 53-345 WROCLAW  
tel./fax: 071 3680 275  
e-mail: Romuald.Bogoczek@ae.wroc.pl  
<http://zielonachemia.ae.wroc.pl/>



Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

*Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989)*, tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

J. Połowicz, T. Młodnicka, *Metaloporfiryny jako katalizatory procesów utleniania*, cena 3 zł

*Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł

Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 zł

*Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996*, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

*Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996*, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i żoń-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

*Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

*Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997*, cena 3 zł

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

Do nabycia jest również książka Z. Ruzewicza *Ludzie i dzieła. Studia nad historią chemii na ziemiach polskich*, wyd. Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej, cena 10 zł.

## REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisanania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

**Maszynopisy** (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej strony**; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszerne streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o użytym edytorze. Pożądany edytor Word (co najmniej wersja 6).

**Rysunki** (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych**, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. Niezależnie od tego **do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji**.

**Tabele** należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

**Piśmiennictwo** zestawia się w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, 43, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane**. Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

**Honoraria** za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

**DO CZYTELNIKÓW  
„WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”**

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2003 r. wynosi od 1 stycznia 2003 r. 96 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 48 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.  
Oddział we Wrocławiu  
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław  
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”  
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2003 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 85 zł (składka – 75 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci, nauczyciele szkół średnich i podstawowych oraz studenci płacą 35 zł (składka – 25 zł, prenumerata – 10 zł);

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16  
Millennium BIG BG SA, Nr 5711602202-0000000027202458

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*

SPIS TREŚCI

|   |     |
|---|-----|
| Marta KRASOWSKA, Bronisław JAŃCZUK, Wiesław WÓJCIK: Teoretyczne i praktyczne zjawiska adhezji .....   | 155 |
| Marta STANISZEWSKA, Lidia WOLSKA, Jacek NAMIEŚNIK: Możliwości i ograniczenia oznaczania lotnych i średniolotnych związków organicznych w wodach ..... | 185 |
| Jacek ACHREM-ACHREMOWICZ, Zbigniew JANECZKO: Betulina – triterpen pentacykliczny  | 223 |
| Piotr SURYŁO, Piotr KOWALSKI, Magdalena HOLDA: Biologicznie aktywne pochodne 1,8-naftyrydyny .....  | 247 |
| Barbara MAŁAWSKA, Katarzyna KULIG: Poszukiwanie nowych selektywnych antagonistów receptorów $\alpha_1$ -adrenergicznych .....                         | 267 |
| Halina NIEDBAŁA, Jarosław POLAŃSKI, Rafał GIELECIĄK: Inhibitory integrazy HIV .....   | 289 |
| Radosław TRĘBIŃSKI, Andrzej MARANDA: Aspekty technologiczne i charakterystyka produktów dynamicznej syntezy materiałów supertwardych .....            | 305 |
| <b>Felieton naukowy</b>   |     |
| Ignacy Z. SIEMON: Notatki chaotyczne. XLV. W stronę czasu teraźniejszego .....  | 323 |
| <b>Kronika</b> .....  | 335 |

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAZĄ SIĘ:

- Sławomir KAŻMIERSKI: Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego
- Elżbieta J. TADEUSIAK: Badania układów racemat/enancjomer oraz określanie nadmiaru enancjomerycznego za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii NMR w cieczy i ciele stałym
- Robert ŁYSEK, Bartłomiej FURMAN, Katarzyna BORSUK, Marek CHMIELEWSKI: Stereokontrolowana synteza tlenowych analogów penicylin i cefalosporyn
- Krzyszyna BOGDANOWICZ-SZWED, Artur BUDZOWSKI: Synteza wielofunkcyjnych pochodnych tiopiranu w reakcjach cykloaddycji Dielsa-Aldera
- Dariusz POGOCCI, Katarzyna SERDIUK: Neurotoksyczność amyloidowego  $\beta$ -peptydu Alzheimer. Rola Met<sup>35</sup> i miedzi kompleksowanej przez peptyd
- Janusz MADAJ, Magdalena JANKOWSKA: Wybrane metody utleniania terminalnej grupy hydroksymetylowej w pochodnych cukrów
- Michał UHER, Halina WÓJTOWICZ: Naturalne i syntetyczne niecukrowe substancje słodkie

**Felieton naukowy**

Ignacy Z. SIEMON: Notatki chaotyczne. XLVI. W kręgu analogii chemicznych

**Nowe Wydawnictwa**