

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2018

(72)

9-10

(855-856)

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
BOGUSŁAW BUSZEWSKI (PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GORECKI,
MIETEK JARONIEC, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JERZY LESZCZYŃSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCCI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

MARCIN DRAĞ, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)
<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2018
pISSN 0043-5104
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w sierpniu 2018

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, e-mail: k2@druk-k2.pl

SIECI METALO-ORGANICZNE JAKO MULTIFUNKCJONALNE MATERIAŁY PRZYSZŁOŚCI – MECHANOCHEMICZNE PODEJŚCIE DO SYNTETY

METAL-ORGANIC FRAMEWORKS AS MULTIFUNCTIONAL MATERIALS OF THE FUTURE – MECHANOCHEMICAL APPROACH TO SYNTHESIS

Damian Jędrzejowski

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
e-mail: dj.jedrzejowski@student.uj.edu.pl

*Praca wyróżniona w konkursie Krakowskiego Oddziału PTChem na konferencji
studenckiej Horyzonty Nauki – Forum prac Dyplomowych 2017*

Abstract

Wprowadzenie

1. Sieci metalo-organiczne; 1.1. Definicja sieci metalo-organicznej; 1.2. Historia sieci metalo-organicznych; 1.3. Podziały istniejących sieci; 1.4. Wykorzystywane metody syntez i wyzwania stojące przed naukowcami
2. Mechanosynteza – przekazywanie energii mechanicznej do układu chemicznego; 2.1. Istota mechanochemii; 2.2. Zalety i ograniczenia podejścia mechosyntetycznego
3. Mechanosynteza sieci MOF; 3.1. Idea syntezy sieci MOF z wykorzystaniem siły mechanicznej; 3.2. Warianty mechosyntezy: NG, LAG, ILAG; 3.3. Metody badań *ex situ* oraz *in situ*

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Damian Jędrzejowski – brązowy medalista 47. Międzynarodowej Olimpiady Chemicznej w Baku, laureat 3 miejsca 61. Ogólnopolskiej Olimpiady Chemicznej. W 2015 r. rozpoczął studia licencjackie na kierunku chemia na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, w ramach Indywidualnego Programu Studiów. Pracę licencjacką wykonywał w Zespole Chemii Koordynacyjnej pod kierunkiem dr hab. Dariusza Matogi. Tematyka prowadzonych badań dotyczy wielu ścieżek syntezy, w tym mechanochemicznej, nowych sieci metalo-organicznych oraz ich modyfikacji, głównie w kontekście materiałów protonoprzewodzących.

ABSTRACT

Metal-organic frameworks (MOFs) are a relatively new class of advanced inorganic-organic materials. Due to their modular structures and possible incorporation of various properties, that materials find more and more applications in many fields of science and industry. MOFs are coordination polymers, i.e. compounds with coordination bonds propagating infinitely in at least one dimension. Their characteristic feature is the presence of potential free spaces, i.e. pores. The free spaces often appear after proper activation, e.g. thermal activation. Other common properties of MOFs include for instance large specific surface areas and pore volumes, modifiable size and chemical environment of the pores, and network flexibility. All these properties result in the use of MOFs in e.g. selective sorption, separation or storage of gases, heterogeneous catalysis, design and fabrication of sensors, etc.

During more than twenty years of the history of MOFs, many methods of their synthesis have been developed, including the most popular in solution at elevated temperatures (e.g. solvothermal method). Nevertheless, the activity of pro-ecological environments and the requirements set by international organizations encourage scientists to create new methods of synthesis, which, according to the guidelines presented by the 12 principles of green chemistry, will be safer, less aggressive, less toxic and less energy-consuming. One of the answers to meet these requirements is the use of mechanosynthesis. Mechanochemical synthesis relies on the supply of energy to a system by mechanical force, by grinding or milling. By combining or transforming solids in this way, the presence of a solvent, which is most often the main source of contamination and waste, can be minimised or completely excluded.

Mechanical force is typically used for purposes other than MOF synthesis, e. g. catalyst grinding. Nevertheless, the use of mechanical force in synthesis is becoming more and more popular. The most important advantages of this approach, apart from its environmental impact, are very high efficiency (usually close to 100%) and drastically reduced reaction time. Of course, there are examples where these advantages are not observed. In such cases, mechanosynthetic modifications are introduced, such as e.g. addition of small amount of liquid (Liquid-Assisted Grinding) and/or a small addition of simple inorganic salt (Ion- and Liquid-Assisted Grinding). Furthermore, new instrument setups are being developed to monitor reaction mixtures *in situ* during mechanosynthesis, e.g. by use of such techniques as powder X-ray diffraction and Raman spectroscopy. This enables valuable insights into mechanisms and allows for mechanosynthesis optimization.

Keywords:

Słowa kluczowe:

WPROWADZENIE

Obserwując rozwój współczesnej nauki można śmiało wysnuć tezę, iż zasadniczo każda jej dziedzina usiłuje znaleźć jak największą liczbę zastosowań dla życia codziennego każdego człowieka. Nie inaczej jest w przypadku chemii. Mimo że gałęzie takie jak chemia fizyczna, teoretyczna czy nieorganiczna w odczuciu osób nie zajmujących się chemią mogą być całkowicie nieprzydatne dla rozwoju współczesnego świata, to doniesienia naukowe zdają się twierdzić coś zupełnie odmiennego [1–3]. Chemia nieorganiczna posiada obecnie wiele zupełnie nowych „poddziedzin”, które naturalnie usiłują znaleźć jak najwięcej aplikacji w obszarach, jakie wyznacza dynamiczny rozwój współczesnego świata [1].

Jedną z gałęzi chemii, którą można zaliczyć do wspomnianych „poddziedzin” jest chemia koordynacyjna. W pojęciu tym zawierają się wszystkie substancje, nazywane związkami koordynacyjnymi, których kluczowym elementem budowy jest wiązanie koordynacyjne. Podklasę tej grupy stanowią z kolei polimery koordynacyjne, które podobnie jak polimery organiczne tworzone są zazwyczaj z indywidualów mogących istnieć samodzielnie i tworzą w ten sposób nieskończony łańcuch, warstwę lub szkielet trójwymiarowy. Kolejną klasą związków koordynacyjnych są sieci koordynacyjne, które obejmują dwu- oraz trójwymiarowe polimery koordynacyjne, oraz jednowymiarowe polimery, które zbudowane są z przynajmniej dwóch nici połączonych łącznikami. Jeśli sieć koordynacyjna posiada natomiast w swojej strukturze wolne przestrzenie bądź przestrzenie zajmowane przez cząsteczki, które na drodze aktywacji mogą zostać usunięte, nazywamy ją siecią metalo-organiczną (ang. *Metal-Organic Framework*, MOF) lub porowatym polimerem koordynacyjnym (ang. *Porous Coordination Polymer*, PCP) [4]. Przedstawioną genezę sieci metalo-organicznych przedstawia schematycznie Rysunek 1. Często porównuje się właściwości sieci metalo-organicznych do polimerów organicznych oraz do porowatych materiałów nieorganicznych, w szczególności zeolitów. W przeciwieństwie do typowych polimerów organicznych, sieci typu MOF są (w większości przypadków) krystaliczne, mają dobrze zdefiniowaną budowę; natomiast w przeciwieństwie do zeolitów, które często są porowatymi glinokrzemianami, sieci metalo-organiczne posiadają pewną elastyczność, związaną z obecnością wiązań koordynacyjnych; ponadto znacznie prostsza jest w ich przypadku modyfikacja wielkości oraz otoczenia chemicznego porów.



Rysunek 1. Hierarchia związków koordynacyjnych

Figure 1. Hierarchy of coordination compounds

Zainteresowanie sieciami metalo-organicznymi spowodowane jest ich różnorodnymi właściwościami, które modułują powstające zastosowania [5]. Początkowo, jednym z głównych celów w badaniach tych materiałów było zwiększanie porów aby zwiększyć ilość zaadsorbowanych gazów i umożliwić ich magazynowanie. Z kolei możliwość zmiany otoczenia chemicznego poru dodatkowo wpływa na selektywność chemisorpcji gazów [6, 7]. W kolejnych latach intensyfikowały się poszukiwania nowych właściwości, aby móc zastosować układy typu MOF np. w katalizie heterogenicznej [8], transporcie leków [9], konstruowaniu sensorów [10] oraz membran protonoprzewodzących [11]. Możliwość sprzęgania ze sobą kilku właściwości, np. fluorescencji z sorpcją wybranego gazu powoduje, że szczególnie takie materiały uważa się za wartościowe i mogące zrewolucjonizować świat.

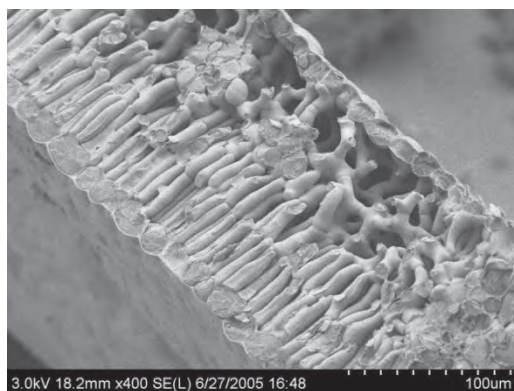
1. SIECI METALO-ORGANICZNE

1.1. DEFINICJA SIECI METALO-ORGANICZNEJ

Ogólnie przyjęta definicja [4] sieci metalo-organicznej podaje, że jest nią każdy polimer koordynacyjny, zbudowany z ligandów organicznych jako łączników (ang. *linkers*) oraz z jonów metali bądź klastrów (np. Zn_4O^{6+}) jako węzłów (ang. *nodes*). Dodatkowo, konieczne jest, by sieć zawierała potencjalne wolne przestrzenie, często nazywane porami. Pory mogą być wolne, lub zawierać małe cząsteczki/jony; nazywa się je gośćmi, w nawiązaniu do układów typu „gość–gospodarz”. Goście mogą być usunięci (poprzez aktywację, np. termiczną) albo wymienieni na innych gości [12]. W zależności od potencjału cząsteczek/jonów do oddziaływania z siecią metalo-organiczną, mogą one zajmować konkretne miejsca (np. poprzez wiązania wodorowe lub oddziaływania van der Waalsa) lub występować w miejscach losowych.

W powyższej definicji pojawia się pojęcie potencjalnych wolnych przestrzeni, których naturalną konsekwencją jest porowatość sieci. Z tego powodu, czasami

spotkać się można ze wspomnianym już akronimem, PCP. Porowatość jest zjawiskiem które jest bardzo rozpowszechnione w przyrodzie (Rys. 2). Na początku warto zwrócić uwagę na podział porów. Ze względu na wielkość, wyróżnia się mikropory (< 2 nm), mezopory (pomiędzy 2 a 50 nm) oraz makropory (> 50 nm). Można także się zetknąć z grupą ultramikroporów, których rozmiar jest mniejszy od 0,5 nm [13]. Oprócz oczywistych przykładów jak gąbki morskie czy pumeks, posiadających ogromne (w stosunku do dolnej granicy wielkości makroporów) pory, wymienić można również ziemię gruntową, która w swoim upakowaniu posiada wolne przestrzenie, płuca organizmów żywych, posiadające pęcherzyki, skały, jak np. piaskowiec czy także zeolity – materiały mikro- i mezoporowate, naturalnie występujące w przyrodzie, które jednocześnie wprost lub po pewnych modyfikacjach znajdują zastosowanie w przemyśle. W stosunku do porów glinokrzemianowych zeolitów pory sieci metalo-organicznych mają wiele zalet. Obecność ugrupowań organicznych na krawędziach czy też ścianach porów umożliwia wielorakie modyfikacje charakteru chemicznego przestrzeni poru. Te same łączniki, poprzez możliwość ich prostego zastępowania innymi umożliwiają kontrolę wielkości poru; w zależności od tego czy korzystna jest niewielka, specyficzna dla konkretnego gościa wielkość, czy też pożądana jest jak największa objętość poru – by dla przykładu zwiększyć fizysorpcję. Dla chemisorpcji z kolei duże znaczenie ma zwiększanie powierzchni wewnętrznej powierzchni właściwej materiału. Sieci MOF wykazują niezwykle rozwiniętą powierzchnię właściwą, która może osiągać wartości przewyższające 7000 m²/g [14]. Tak szerokie możliwości modyfikacji powodują, że sieci metalo-organiczne postrzegane są jako bardzo atrakcyjne w środowiskach naukowych, zwłaszcza jako wielofunkcyjne materiały przyszłości.

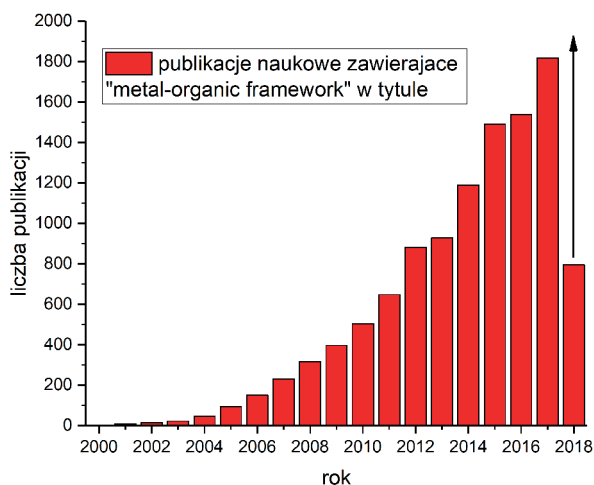


Rysunek 2. Zdjęcie SEM liścia orzecha włoskiego przedstawiające jego makropory. Zaczepnięto z: <http://www.trr141.de/index.php/research-areas-2/research-areas/> za pozwoleniem State Museum of Natural History, Stuttgart, Germany

Figure 2. SEM picture of a walnut leaf showing its macropores. Reprinted from: <http://www.trr141.de/index.php/research-areas-2/research-areas/> with permission from State Museum of Natural History, Stuttgart, Germany

1.2. HISTORIA SIECI METALO-ORGANICZNYCH

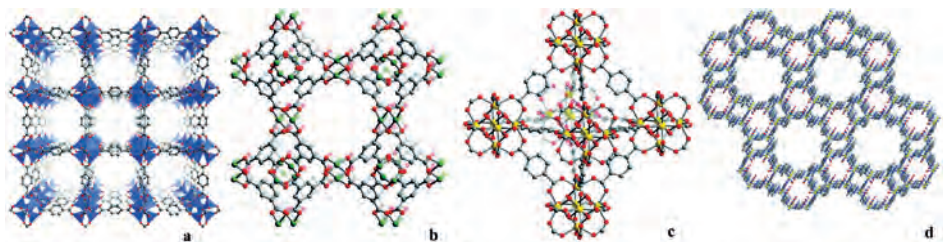
Sieci metalo-organiczne pojawiły się w nauce nieco ponad dwie dekady temu. Pierwsze sieci stworzone z nieorganicznego rdzenia i organicznego łącznika powstawały już wcześniej, i tak pierwszą opublikowaną strukturę podają Saito i współpracownicy [15]. Niemniej jednak początek historii sieci MOF datuje się często na 1995 rok, kiedy to pierwszy raz użyty został w literaturze termin sieć metalo-organiczna, w kontekście materiału opartego na jonach miedzi(II) i 4,4'-bipirydyłu [16]. W kolejnych latach rozwój układów typu MOF był niezwykle dynamiczny, stąd bardzo często prezentuje się niemal wykładniczy wzrost liczby publikowanych struktur czy artykułów naukowych o sieciach typu MOF (Rys. 3).



Rysunek 3 Liczba publikacji naukowych, które w tytule zawierają zwrot "metal-organic framework", stan na dzień 06.05.2018

Figure 3 Number of scientific publications containing „metal-organic framework” phrase in title, data from 06.05.2018

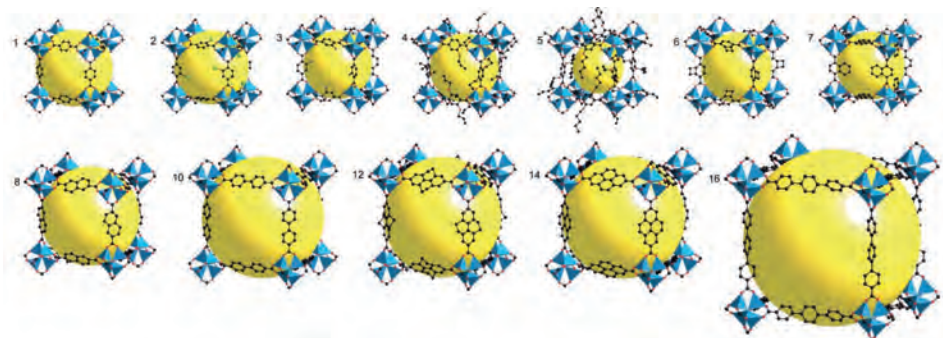
Istotnymi momentami w historii sieci typu MOF były publikacje kluczowych struktur (Rys. 4). Jednym z bardziej znanych jest MOF-5. Bazuje on na klastrach oksotetracyńkowych jako rdzeniach oraz jonach kwasu tereftalowego jako ligandach [17]. W przypadku, gdy węzeł sieci stanowi klaster zawierający kilka kationów metali zwykle się je nazywać drugorzędowymi jednostkami budulcowymi (ang. *Secondary Building Unit*, SBU). Kolejną z sieci, istotną dla chemii sieci metalo-organicznych jest HKUST-1, zbudowany z jonów miedzi(II) oraz anionów kwasu 1,3,5-benzenotrikarboksylowego. Szczególną jego cechą jest stabilność w wodzie, wówczas rzadko spotykana [18]. Kolejny przykład sieci, która znacząco wyróżnia się stabilnością termiczną jest UiO-66, skonstruowana z jonów cyrkonu(IV) oraz jonów tereftalanowych [19]. Warto wspomnieć też całą rodzinę sieci, których głównym ligandem jest imidazol i jego pochodne, którą zwykle się opisywać akronimem ZIF (ang. *Zeolitic Imidazolate Framework*).



Rysunek 4. Struktury opisywanych sieci: a – MOF-5, b – HKUST-1, c – UiO-66, d – ZIF-70. Rysunki zaczerpnięto z Chem. Rev., 2012, **112**, 2, 724, za zgodą American Chemical Society

Figure 4. Structures of described frameworks: a – MOF-5, b – HKUST-1, c – UiO-66, d – ZIF-70. Reprinted with permission from Chem. Rev., 2012, **112**, 2, 724. Copyright 2012 American Chemical Society

W swojej historii układy typu MOF doczekały się także zupełnie bezprecedensowej klasy, jaką jest szereg izoretikularnych sieci (ang. *Isoreticular Metal-Organic Framework*, IRMOF). Szereg IRMOF bazuje na topologicznie identycznych sieciach, których jedyną zmianą w kolejnych sieciach szeregu jest zwiększanie długości łącznika. Dla przykładu, wspomniana już sieć MOF-5 jest jednocześnie nazywana jako IRMOF-1, gdyż jest pierwszą siecią podstawowego szeregu izoretikularnych sieci cynkowych (Rys. 5). Modyfikacje wielkości porów, o których wspomniano w poprzednim paragrafie są dobrze widoczne na szeregu IRMOF.



Rysunek 5. Szereg izoretikularnych sieci MOF, 1–16. Rysunek zaczerpnięto z CrystEngComm, 2002, **4**, 401, za zgodą The Royal Society of Chemistry

Figure 5. Isoreticular MOF series. Reprinted from CrystEngComm, 2002, **4**, 401 by permission of The Royal Society of Chemistry

1.3. PODZIAŁY ISTNIEJĄCYCH SIECI

Ze względu na wykładniczo rosnącą liczbę opisanych struktur sieci metalo-organicznych, wielu naukowców podejmowało dyskusję na temat utworzenia klasyfikacji sieci metalo-organicznych. Obecnie wyróżnić można kilka podziałów, jak na przykład ze względu na:

- Wymiarowość: w zależności od tego, czy podstawowa jednostka sieci jest łańcuchem lub innym jednowymiarowym polimerem, czy jest warstwą lub biwarstwą, czy tworzy sieć trójwymiarową. Jedno- i dwuwymiarowe jednostki polimeryczne tworzą całość dzięki słabym oddziaływaniom, takim jak wiązania wodorowe czy oddziaływania van der Waalsa.
- Właściwości: w zależności czy głównym zadaniem sieci jest sorpcja gazów, czy ich separacja, czy też dostarczanie leków, rozróżnia się różne typy sieci MOF.
- Rodzaje ligandów: w zależności czy są to ligandy *O*-donorowe, czy *N*-donorowe. Pojawiają się także inne, choć rzadziej spotykane, jak *P*-donory czy *S*-donory. Bardzo częstymi są natomiast sieci posiadające więcej niż jeden rodzaj łącznika, tzw. *mixed-linker MOF*.
- Zachowanie po usunięciu cząsteczek gości – klasyfikacja Kitagawy; zachowanie to mówi o stabilności oraz elastyczności sieci. Pierwsza generacja to sieci ulegające destrukcji po ewakuacji gości. Druga generacja to sieci zachowujące pierwotną strukturę szkieletu. Trzecia generacja to natomiast sieci, których szkielet ulega deformacjom (tzw. sieci elelastyczne lub dynamiczne) [20].

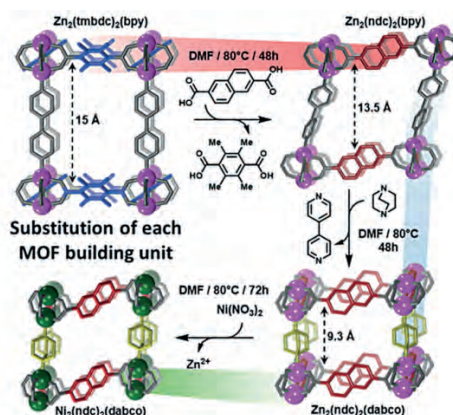
Poza wymienionymi, typowymi podziałami można spotkać w literaturze także rozróżnienie na sieci interpenetrowane oraz nie ulegające interpenetracji (np. MOF-5 oraz MOF-5-i); ze względu na niedawne odkrycie amorficznych sieci typu MOF o charakterze szkiele [21] można także dzielić sieci na krystaliczne i amorficzne; bardzo często sieci dzieli się ze względu na ładunek – znaczna część istniejących struktur to sieci obojętne ale często zdarzają się także naładowane szkielety, których ładunek kompensowany jest obecnością jonów w wolnych przestrzeniach. Innym podziałem jest rozróżnienie ze względu na wymiarowość porów – nawet dla analogicznych sieci zbudowanych np. z dwuwymiarowych warstw możliwe jest istnienie porów zerowymiarowych i jednowymiarowych [22]. Wraz z rozwojem tej nauki i zwiększającym się zainteresowaniem naukowców polimerami koordynacyjnymi spodziewać się można, iż w najbliższym czasie powstaną kolejne generacje i konieczne stanie się proponowanie nowych podziałów i wskazywanie nowych klas.

1.4. WYKORZYSTYWANE METODY SYNTEZ I WYZWANIA STOJĄCE PRZED NAUKOWCAMI

Przy rozróżnieniu metod syntezy sieci MOF podaje się zazwyczaj dwie główne gałęzie – syntezę *de novo*, z prostych niepolimerycznych prekursorów oraz post-syntetyczne modyfikacje (ang. *Post-Synthetic Modifications*, PSMs), które wykorzystują już istniejące polimery koordynacyjne. Przy konstrukcji *de novo* sieci metalo-organicznych wykorzystuje się metodę bloków budulcowych. Podobnie jak w przypadku polimerów organicznych gdzie prekursorem jest monomer, który jako zwielokrotniona jednostka (mer) tworzy całą sieć (polimer), tak i przy konstruk-

cji polimerów koordynacyjnych stosuje się bloki budulcowe – jak już wspomniano w definicji – łączniki i węzły, które budują całą sieć. Podobnie też, jak monomer jest prekursorem polimeru, tak też prekursorami węzłów są albo proste sole nieorganiczne albo preorientowane dyskretne kompleksy [23], natomiast dla ligandów karboksylanowych albo kwasy karboksylowe albo ich sole. Efektem wykorzystywanym przy konstrukcji sieci metalo-organicznych *de novo* jest zjawisko samoorganizacji (ang. *self-assembly*). W syntezie takiej wykorzystuje się spontaniczne uporządkowanie układu związane z obniżeniem energii w wyniku utworzenia oddziaływań, zwłaszcza koordynacyjnych. Oczywiście, są efekty które mają kluczowy wpływ na samoorganizację i są to parametry węzła, takie jak dołączalność, czy też parametry jonów metali w węzle, takie jak liczba koordynacyjna, stopień utlenienia, promień jonowy, twardość (w ujęciu teorii HSAB, twardych i miękkich kwasów i zasad), etc. Analogicznie, również można wyróżnić szereg właściwości liganda, pośród których warto wymienić dentność (liczba atomów zdolnych do związania się koordynacyjnie z węzłem) czy też kąt, który generuje bądź strukturę dyskretną, bądź polimeryczną. Wszystkie te efekty mają wpływ na samoorganizację sieci i bywają wykorzystywane w projektowaniu nowej struktury.

W odróżnieniu od syntezy *de novo*, PSM jest metodą modyfikującą już wcześniej zsyntezowany polimer koordynacyjny. Przykładów PSM jest bardzo wiele; istnieją sieci których jedyną metodą syntezy jest modyfikacja postsyntetyczna innych sieci [24, 25]. Wyróżnia się tu m.in. wymianę liganda karboksylanowego, wymiana liganda obojętnego, wymianę węzła, wymianę cząsteczek gości. Dosadnym przykładem syntezy poprzez modyfikacje postsyntetyczne jest praca Huppa, Farhy i współpracowników [26], w której przedstawiona została konstrukcja sieci poprzez całkowitą wymianę wszystkich jednostek budulcowych, jeden po drugim (Rys. 6). Modyfikacje postsyntetyczne nie dotyczą wyłącznie reakcji związanych z rozrywaniem wiązania koordynacyjnego. Istnieje także cała gama przykładów, które angażują np. potencjalne miejsca koordynacyjne na już istniejących łącznikach do stworzenia nowego wiązania koordynacyjnego z nowym jonem metalu. Jest to przykład postsyntetycznej metalacji. Szerzej ten temat opisuje praca Evansa, Sumbly'ego i Doonana [27]. Następnym przykładem jest reakcja organiczna, np. kondensacji na łącznikach organicznych obecnych w sieci.

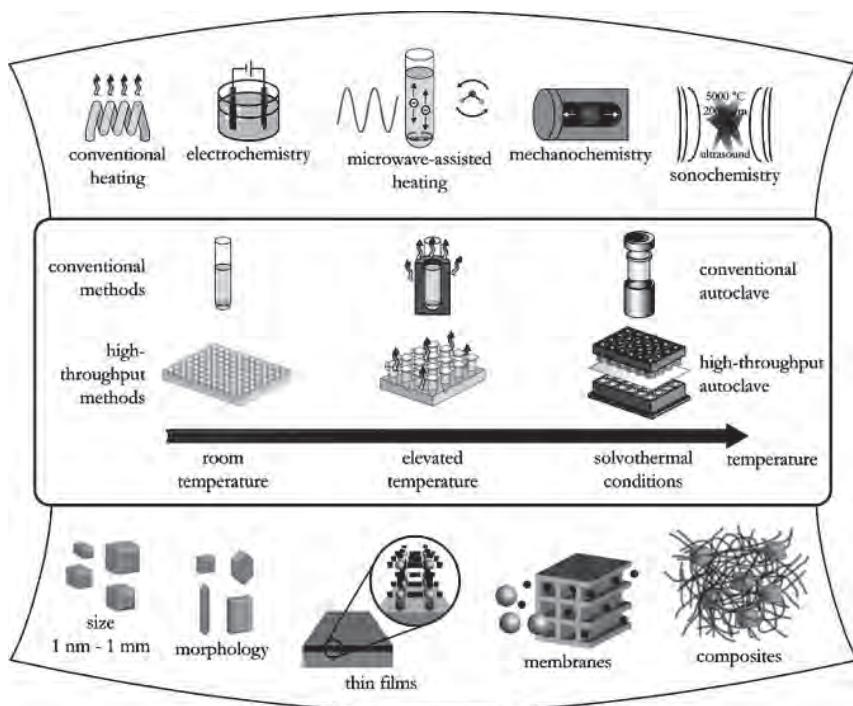


Rysunek 6. Pierwszy przykład całkowitej przebudowy sieci MOF za pomocą postsyntetycznych modyfikacji. Rysunek zaczerpnięty z Eur. J. Inorg. Chem., 2016, 27, 4345, za zgodą Wiley Online Library

Figure 6. First example of total reconstruction of a MOF by post-synthetic modifications. Reprinted from Eur. J. Inorg. Chem., 2016, 27, 4345 with permission from the Wiley Online Library

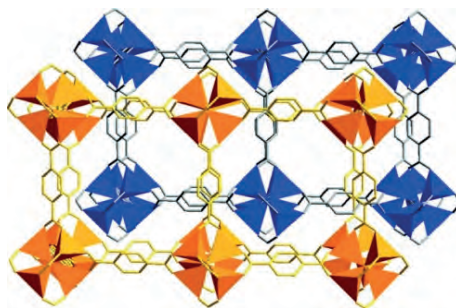
Wymieniwszy teoretyczne podejścia do syntezy, należy skupić się na wymiarze praktycznym. Kluczowym zagadnieniem jest odpowiednie dostarczenie energii do układu chemicznego (Rys. 7). Energia konieczna jest do powstania wiązania koordynacyjnego oraz innych reakcji towarzyszących (deprotonacja, reakcje redoks, itd.). Duża część publikacji opisuje solwotermalną metodę syntezy (czyli ogrzewanie powyżej temperatury wrzenia rozpuszczalnika). Także wykorzystując wyższą temperaturę, niższą jednak od temperatury wrzenia, można otrzymać sieci metalo-organiczne. Często spotykanym jest ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej w autoklawach lub piecach czy blokach termicznych. Na szczególną uwagę zasługuje popularna metoda ogrzewania w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF, lub jego analogach, *N,N*-dietyloformamidzie czy *N,N*-dimetyloacetamidzie, itp.), która ma zasadniczą zaletę przy wykorzystaniu ligandów anionowych. Ich prekursorzy są obojętne, jak np. kwasy karboksylowe czy imidazol. Mechanizm działania tego rozpuszczalnika opiera się na rozkładzie w temperaturze poniżej temperatury wrzenia (< 153°C) do m. in. zasadowej dimetyloaminy. Powstając, stopniowo deprotonuje ona prekursor liganda, umożliwiając powolną krystalizację. Takie podejście często umożliwia otrzymanie monokryształów, które przydatne są pod kątem rentgenowskich badań strukturalnych. Pomimo to, szczególnie ze względu na teratogenne właściwości DMF poszukuje się alternatyw dla tej metody. Jedną z mniej znanych metod dostarczania energii, która eliminuje konieczność ogrzewania jest metoda elektrochemiczna [28]. Inna metoda wykorzystuje promieniowanie mikrofalowe. Nierzadko powoduje to skrócenie czasu reakcji z kilkudziesięciu godzin do mniej niż jednej godziny, jednocześnie umożliwiając ograniczenie strat energii [29]. Dwie inne metody wykorzystują dostarczenie energii na sposób mechaniczny. Pierwsza to sonochemia, która wykorzystuje ultradźwięki i energię powstającą głównie w zjawisku kawitacji (gwałtowne zapadanie się pęcherzyków w roztworze i powstające

w ten sposób lokalnie bardzo duże ciśnienia) [30]. Druga metoda, której dotyczą kolejne dwa rozdziały tej pracy to mechanochemia w ciele stałym. Opiera się ona na dostarczeniu energii do układu chemicznego poprzez ucieranie bądź mielenie ciał stałych [31].



Rysunek 7. Sposoby dostarczania energii w celu syntezy sieci MOF i możliwe do otrzymania postaci produktu. Rysunek zaczerpnięto z Chem. Rev., 2012, **112**, 2, 933, za zgodą American Chemical Society
 Figure 7. Ways of supplying energy to synthesize MOFs and possible forms of a product. Reprinted with permission from Chem. Rev., 2012, **112**, 2, 933. Copyright 2012 American Chemical Society

W zależności od poszukiwanych właściwości, naukowcy muszą zmierzyć się z wieloma wyzwaniami stojącymi na ich drodze. W przypadku gdy głównym zastosowaniem sieci ma być interakcja (sorpcja lub rozdział) z gazem, kluczowe znaczenie ma wielkość oraz powierzchnia właściwa porów. Jak wspomniano, w niektórych przypadkach korzystniejszym może okazać się ograniczenie wielkości porów, celem zwiększenia selektywności sorpcji danej molekuly. Zjawiskiem, jakie w tym może pomagać ale też przeszkadzać jest interpenetracja sieci. Polega ona na wzajemnym przenikaniu się szkieletów i prowadzi do znacznego zmniejszenia wielkości porów. Zjawisko to można jednak kontrolować, na przykład poprzez dobór rozpuszczalnika, którego cząsteczki będą jednocześnie gośćmi w porach. Przykładem jest synteza MOF-5 oraz jego interpenetrowanej wersji, MOF-5-i, zaprezentowana przez Kima i współpracowników [32].



Rysunek 8. Struktura interpenetrowanej wersji MOF-5 (porównaj Rys. 4a). Rysunek zaczerpnięto z Inorg. Chem., 2011, 50, 8, 3691, za zgodą American Chemical Society

Figure 8. Structure of interpenetrated version of MOF-5 (Compare to Fig. 4a). Reprinted with permission from Inorg. Chem., 2011, 50, 8, 3691. Copyright 2012 American Chemical Society

Na zakończenie warto wspomnieć także o zastosowaniach, dla jakich projektuje się sieci metalo-organiczne. Przytoczono przykłady selektywnej sorpcji gazów i wynikającej z nich możliwości separacji gazów. Nierzadko wykorzystuje się także sprzężenie dwóch lub więcej właściwości, budując czujniki i sensory. I tak, jeśli np. pod wpływem wysokiego ciśnienia zmienia się struktura szkieletu i jednocześnie otoczenie chemiczne metalu będącego węzłem, może następować zmiana koloru sieci. Jeśli węzeł posiada wolne miejsca koordynacji, obecność nowego liganda (którym może być sorbowany gaz lub jon z roztworu) również może zmieniać właściwości spektralne lub magnetyczne danej sieci. Jeśli sieć posiada tendencję do sorpcji metali ciężkich (w przypadku wolnych centrów zasadowych) oraz toksycznych anionów (jak np. fluorki czy cyjanki), to poszukuje się dla niej zastosowań w uzdatnianiu wody [33]. Jeśli natomiast sieć ulega w środowisku wodnym powolnej degradacji do substancji obojętnych lub korzystnych dla organizmu żywego, rozważa się transport leków, uwięzionych w porach sieci typu MOF, co umożliwi ich stopniowe dozowanie wprost do zadanego miejsca [9]. Istnieje też wiele innych przykładów, które wzmacniają przekonanie, że sieci metalo-organiczne znajdują coraz więcej zastosowań w przemyśle, medycynie etc.

2. MECHANOSYNTeza – PRZEKAZYWANIE ENERGII MECHANICZNEJ DO UKŁADU CHEMICZNEGO

W dzisiejszych czasach jednym z istotniejszych wyzwań przed jakimi stoi nauka są zagadnienia koncentrujące się wokół słowa energia. Zwiększająca się jej konsumpcja, wyczerpywanie się złóż naturalnych, upowszechnienie energochłonnych urządzeń, wszelkie przejawy globalizacji skutkują tym, że naukowcy muszą poradzić sobie z wyzwaniami magazynowania energii, efektywnego przekazywania energii, odzysku energii z procesów gdzie jest ona tracona oraz pozyskiwania energii, w szczególności ze źródeł odnawialnych. Każdy chemik, znając 12 zasad zielonej

chemii wie, że także i w jego mikrośrodkowisku konieczne jest dbanie o oszczędność energii [34]. Naprzeciw takim wymaganiom stają nowe techniki syntezy, będące tak naprawdę świadomym wykorzystaniem tego, co wymyślone było już wieki, jeśli nie tysiąclecia temu.

2.1. ISTOTA MECHANOCHEMII

Konwencjonalnym podejściem do syntezy chemicznej jest synteza w roztworze. Ponieważ ogromna większość przeprowadzanych w laboratoriach reakcji chemicznych to reakcje syntez wymagające nakładu energetycznego, bardzo często do pokonania bariery aktywacji, mieszanina reakcyjna jest ogrzewana. Takie podejście często powoduje straty, w związku ze sposobami rozchodzenia się ciepła. Nawet tak wydajne układy, jak choćby autoklawy generują wiele strat. Nie dziwi zatem, że środowisko naukowe podejmuje coraz większe starania o zastosowanie nowych, bardziej wydajnych metod przekazywania energii do układu reakcyjnego.

Jedną z technik, jaka eliminuje proces ogrzewania ze ścieżki transportu energii do układu, jest mechanosynteza [35, 36]. Okazuje się, że energia dostarczana do układu złożonego z kilku sproszkowanych ciał stałych w postaci siły mechanicznej może być wystarczająca do stworzenia nowych wiązań, bądź rozerwania istniejących. Najczęściej są to wiązania wodorowe lub inne słabe oddziaływania czy wiązania koordynacyjne, jednak zdarzają się także przypadki wiązań kowalencyjnych [37]. W związku z tym, mechanochemia znajduje zastosowanie zarówno w syntezie kompleksów, syntezie prostych związków nieorganicznych, reorganizacji struktur krystalicznych (przejścia pomiędzy fazami polimorficznymi), reorganizacji struktur warstwowych, ale także w syntezie związków organicznych.

Warto zaznaczyć, że pośród metod syntezy mechanochemia znalazła swoje miejsce dopiero kilkadziesiąt lat temu. Jednocześnie jednak, pierwsze udokumentowane przykłady stosowania siły mechanicznej do wywołania reakcji pochodzą z ok. 4 tysięcy lat p.n.e., kiedy to otrzymywano rtęć poprzez ucieranie cynobru (minerał - siarczek rtęci(II)) w miedzianym móżdżerku.

2.2. ZALETY I OGRANICZENIA PODEJŚCIA MECHANOSYNTETYCZNEGO

Jedną z bardziej istotnych cech, jakie wyróżniają mechanosyntezę od innych metod syntezy, jest oszczędność energii. Jak wspomniano w poprzednim paragrafie, możliwość ograniczenia zużycia energii, a zwłaszcza wyeliminowania jej strat jest jednym z kluczowych przedsięwzięć szczególnie w przypadku syntez na dużą skalę. Z tego powodu, m.in. firma MOF Technologies™ oferuje na sprzedaż popularne sieci metalo-organiczne otrzymane metodą mechanochemiczną. Inną zaletą, pośrednio związaną z poprzednią jest skrócenie, często w sposób drastyczny czasu trwania reakcji. Sterowanie reakcją jest możliwe dzięki doborowi parametrów, takich jak

materiał wykonania urządzenia do mechanosyntezy, wielkość kul, częstotliwość obrotów (w przypadku młyna planetarnego) czy częstotliwość drgań (w przypadku młyna wibracyjnego). Dodatkowo, możliwe staje się monitorowanie stanów pośrednich zachodzącej reakcji. Nierzadko metodami mechanochemicznymi otrzymuje się produkty niedostępne dla innych metod syntezy. Kolejną wyjątkową zaletą jest wydajność syntez mechanochemicznych (które zazwyczaj są bliskie 100%) i możliwość stechiometrycznego kontrolowania produktu.

Należy wspomnieć także o pewnych ograniczeniach mechanosyntezy; próby ich przezwyciężenia są wciąż podejmowane i w niektórych przypadkach udaje się je wyeliminować. Jednym z ograniczeń jest niecałkowity kontakt ciał stałych wewnątrz fazy stałej i niemożliwość zajścia reakcji – problem ten znalazł bardzo szybko rozwiązanie, które zostanie opisane w następnym rozdziale. Bardzo istotnym ograniczeniem metod mechanochemicznych jest niemożliwość prostego określenia struktury metodami dyfrakcji rentgenowskiej na monokryształach (ang. *Single-Crystal X-Ray Diffraction*, SCXRD). Dla prostych lub znanych już substancji wystarczającym jest rozwiązanie struktury z dyfraktogramu proszkowego (ang. *Powder X-Ray Diffraction*, PXRD) lub porównanie takiego dyfraktogramu z danymi z baz krystalograficznych, jeśli jest to znana substancja. Jednak w przypadku skomplikowanych substancji organicznych, związków koordynacyjnych a w szczególności polimerów koordynacyjnych bardzo często rozwiązanie struktury z danych PXRD jest niezwykle trudne. Problem ten dla niektórych substancji można ominąć stosując rekrystalizację, jednak w przypadku sieci metalo-organicznych bardzo rzadko metoda ta jest skuteczna. Z tego powodu często mechanosyntezę dla sieci typu MOF stosuje się jako przegląd możliwości i reaktywności danych prekursorów, a w przypadku konieczności poznania struktury podejmuje się próby syntezy monokryształów w roztworze.

Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione zalety oraz ograniczenia podejmuje się próby zastosowania mechanosyntezy w wielu dziedzinach chemii. Szczególnym zastosowaniem, którego bardziej szczegółowy opis znaleźć można w trzecim rozdziale tej pracy, jest mechanosynteza sieci metalo-organicznych. Próby podejmowane w tej dziedzinie umożliwiły odkrycie rozwiązań wielu problemów syntetycznych oraz poznanie szczegółowych mechanizmów rządzących mechanochemią w ciele stałym.

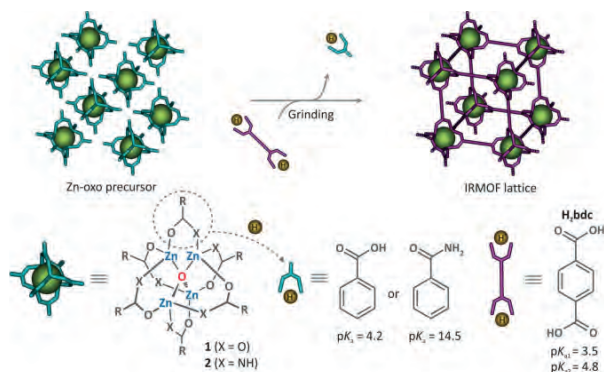
3. MECHANOSYNTENZA SIECI MOF

W tym rozdziale znajduje się część wspólna poprzednich dwóch rozdziałów – prezentacja osiągnięć mechanochemii w syntezie sieci metalo-organicznych; dodatkowo przedstawione zostaną także ważniejsze dokonania, podsumowane zostaną zalety i ograniczenia, wprowadzone zostaną podstawowe pojęcia oraz wyjaśnione zostaną metody badań i monitorowania reakcji mechanochemicznych.

3.1. IDEA SYNTEZY SIECI MOF Z WYKORZYSTANIEM SIŁY MECHANICZNEJ

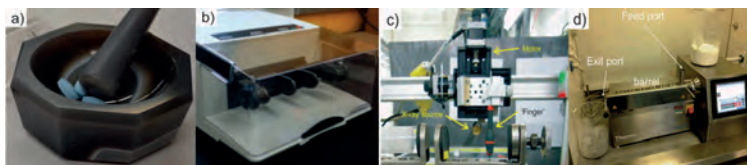
Biorąc pod uwagę, że chemia sieci MOF jest bardzo młodą nauką, także i wykorzystanie w niej siły mechanicznej jako źródła energii do wytworzenia wiązań koordynacyjnych jest względnie nową ideą. Pierwszy przypadek, w którym pokazano możliwość takiej syntezy podaje James i współpracownicy [38]. Od tego czasu naukowcy zdążyli jednak zetknąć się z wieloma problemami, ale także znaleźć dla nich pewne rozwiązania.

U podstawy syntezy każdego związku koordynacyjnego leży reakcja kwasu i zasady (w ujęciu Lewisa). Rozpoczynając zatem od tych bloków budulcowych, przedstawiony zostanie ich udział w mechanosyntezie. Pierwszym elementem jest centrum kwasowe, czyli wspomniany już wielokrotnie węzeł sieci. W przypadku gdy jest nim prosty kation metalu, w metodach syntezy wykorzystujących reakcje w roztworze stosuje się rozpuszczalną w danym rozpuszczalniku sól tego metalu. Ze względu na to obostrzenie, zastosowanie znajdują zazwyczaj azotany(V) i chlorki, rzadziej chlorany(VII), octany i siarczany(VI). W przypadku podejścia mechanochemicznego sytuacja jest zgoła odmienna. Syntetykowi bardziej zależy na wyeliminowaniu substancji korozyjnych, szkodliwych dla środowiska, takich które pozostawią produkt uboczny. Nie przeszkadza natomiast nierozpuszczalność soli, gdyż reakcja jest prowadzona w ciele stałym. Dodatkowo korzystne jest, gdy nie powstają żadne produkty uboczne lub są one albo cząsteczkami gośćmi w danej sieci albo podczas mechanosyntezy odparowują z układu reakcyjnego. Wymagania te spełniają węglany oraz tlenki, rzadziej octany i wodorotlenki. Jeśli natomiast węzeł stanowi większy klaster, istnieje możliwość syntezy z preorientowanego związku koordynacyjnego, poprzez prostą mechanochemiczną wymianę ligandów. Bardzo klarowny przykład takiej syntezy dla MOF-5 zaprezentował Lewiński i współpracownicy (Rys. 9) [23]. W przypadku ligandów zazwyczaj podejście mechanochemiczne nie wymaga ani nie preferuje innych form ligandów, niż te które są używane w innych metodach. Jeśli chodzi o cząsteczki gości, to w przypadku gdy są nimi cząsteczki wody, może ona powstawać w wyniku reakcji kwasowo – zasadowej (np. $n\text{MO} + n\text{H}_2\text{A} \rightarrow \{\text{MA}\cdot\text{H}_2\text{O}\}_n$), lub być sorbowana z otoczenia, jeśli nie jest ono pozbawione wilgoci). W przypadku gdy inna cząsteczka musi być obecna w porach syntezowanej sieci, zazwyczaj stosuje się ją w postaci niewielkiego dodatku cieczy jako wariant LAG, o którym traktuje kolejny paragraf.



Rysunek 9. Schemat mezosyntezy MOF-5 z preorientowanego klastra. Rysunek zaczerpnięto z Chem. Commun., 2015, 51, 4032, za zgodą The Royal Society of Chemistry
 Figure 9. Scheme illustrating mechanochemical synthesis of MOF-5 from a pre-oriented cluster. Reprinted from Chem. Commun., 2015, 51, 4032 by permission of The Royal Society of Chemistry

Pierwszym i często kojarzonym z mezosyntezą narzędziem jest młódkier (Rys. 10a). Umożliwia on proste przeprowadzenie reakcji chemicznej czy też przemiany fizycznej tylko za pomocą siły dostarczanej przez ręce osoby wykonującej doświadczenie. Niewątpliwą zaletą tego narzędzia odkryto przede wszystkim w życiu codziennym – stąd szerokie zastosowanie młódkierzy porcelanowych na przykład w kuchni. W laboratoriach, oprócz porcelanowych, stosowane są też młódkierze metalowe oraz agatowe. Naukowcy jednak częściej niż do przeprowadzenia reakcji chemicznej używają młódkierza do rozdrobnienia jakiejś substancji, np. celem zwiększenia jego zewnętrznej powierzchni, otrzymania mikro- i nanocząstek czy przygotowania próbki ciała stałego do pomiaru PXRD. Kiedy już używa się młódkierza w ujęciu mezosyntetycznym, często spotkać się można z wieloma ograniczeniami tej metody. Pierwszym z nich są trudności z długim czasem ucierania, który jest wymagany dla niektórych reakcji. Udało się to jednak obejść, poprzez stosowanie młódkierzy automatycznych. Innymi problemami są brak stałości i równomierności przykładanej siły, niemożliwość przeskalowania syntezy, a także częsty brak kontroli nad wpływem otoczenia (zwłaszcza powietrza, które w laboratoriach zawierać może różne substancje). Z tego powodu, proces mielenia/ucierania został usprawniony przez wprowadzenie różnego rodzaju młynów. Jednym z nich jest młyn rotacyjny, innym planetarny lub wibracyjny (Rys. 10b). Każdy z nich różni się sposobem wprawiania w ruch kulek, które znajdują się wewnątrz naczynia reakcyjnego. Wielkość i ilość tych kulek, materiał wykonania, gęstość, procent zapełnienia przestrzeni naczynia przez ciało stałe oraz przez kulki, czas ucierania/mielenia, częstotliwość oscylacji czy obrotów, mogą wpływać na stopień przereagowania czy nawet rodzaj produktu. Innym typem urządzenia dotychczas nieczęsto stosowanym w mezosyntezie jest wytłaczarka dwuślimakowa (Rys. 10d). Szczególnie dobrze nadaje się ona do syntez o większej skali niż laboratoryjna.



Rysunek 10. Urządzenia stosowane w mechanosyntezie: a – moździerz agatowy, b – młyn wibracyjny, c – młyn sprzężony z rentgenowskim dyfraktometrem proszkowym, d – ekstruder dwuślimakowy. Rysunek zaczerpnięto z *Molecules*, 2017, **22**, 144, na podstawie licencji Creative Commons

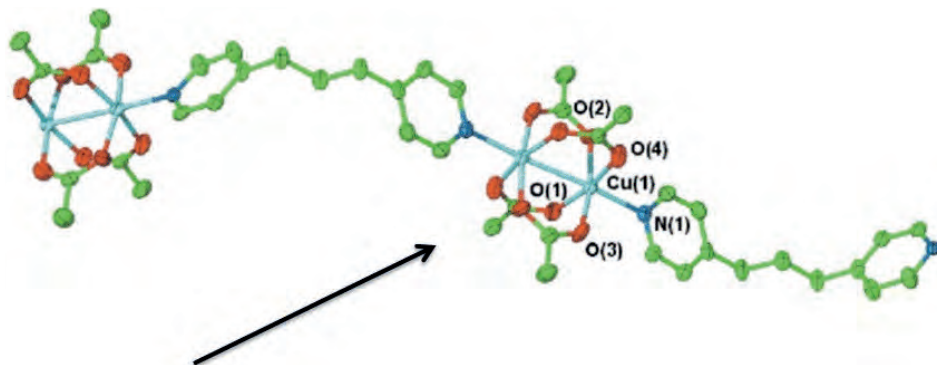
Figure 10. Devices used in mechanosynthesis: a – agate mortar, b – shaker mill, c – mill combined with powder X-ray diffractometer, d – twin screw extruder. Reprinted from *Molecules*, 2017, **22**, 144, under the Creative Commons Attribution License

Bardzo dobitnym przykładem zalet mechanosyntezy są udane próby syntez związków, których nie otrzymano na innej drodze. O takich przykładach, również w kontekście całej klasy polimerów koordynacyjnych traktuje praca Frišćića i współpracowników [31, 39]. W kolejnym paragrafie przedstawione zostaną trzy zasadnicze warianty syntezy mechanochemicznej w ciele stałym oraz wpływ dodatku niewielkiej ilości rozpuszczalnika i/lub niewielkiego dodatku prostej soli nieorganicznej na przebieg syntezy.

3.2. WARIANTY MECHANOSYNTAZY: NG, LAG, ILAG

Jedną z istotnych zalet, jaka wynika z zastąpienia syntezy w roztworze podejściem mechanochemicznym jest eliminacja udziału rozpuszczalnika [40]. Współczesna ekologia naciska na wprowadzanie metod będących bardziej przyjazne dla środowiska naturalnego; z tego powodu m.in. dla DMF, podejrzewanego o teratogenność, poszukuje się zamienników. Jedną z odpowiedzi na takie wymagania jest mechanosynteza bez udziału dodatku cieczy, tzw. *Neat Grinding* (NG). NG jest pierwszym stosowanym podejściem mechanosyntetycznym; w wielu przypadkach powoduje ono całkowitą konwersję substratów do produktów, eliminując jednocześnie całkowicie zastosowanie rozpuszczalników. Pierwsza synteza polimeru koordynacyjnego opartego na takim podejściu została opisana w 2001 roku przez Bourne'a i współpracowników [41]. Ucieranie bromku cynku z pirazyną (pyz) skutkuje otrzymaniem jednowymiarowego polimeru $\{ZnBr_2(py)_2\}_n$. Inna interesująca synteza opisana w 2002 roku przez Steeda i współpracowników [42] opiera się na modyfikacji istniejącego związku koordynacyjnego. Uwodniony octan miedzi(II) tworzy jednostkę koordynacyjną zbudowaną z dwóch jonów Cu^{2+} i czterech reszt octanowych, tworząc układ typu *paddlewheel*. Aksjalnie dokoordynowane są dwie cząsteczki wody, które poprzez ucieranie z liniowym, *N,N*-donorowym ligandem (w tym przypadku był to 1,3-(4-pirydylo)propan, dpp) tworzy jednowymiarowy polimer (Rys. 11). Jest to jedna z pionierskich prac, która obrazuje jak otrzymać interesujący polimer z preorientowanego motywu, jakim jest wyróżniona jednostka typu *paddlewheel*. Już na tym przykładzie zauważyć można, że nie zawsze ucieranie

bez udziału rozpuszczalnika faktycznie zachodzi bez udziału cieczy. W przykładzie powyżej, w wyniku reakcji uwalniane są cząsteczki wody. Innymi sposobami, w jakie woda może znaleźć się w środowisku reakcji jest synteza z wykorzystaniem uwodnionych prekursorów, synteza z udziałem kwasu i zasady w ujęciu Bröndsteda w czasie której również powstają cząsteczki wody, a także po prostu ucieranie w atmosferze powietrza zawierającego wilgoć. Wszystkie te obserwacje prowadzą do wniosku, że bardzo niewielki dodatek cieczy może znacząco wpłynąć na mechanosyntezę.



Rysunek 11. Fragment struktury polimeru koordynacyjnego zawierającego jednostkę typu *paddlewheel* (wskazany strzałką) tetraoctanu dimiedzi(II). Rysunek zaczerpnięto z Chem. Commun., 2002, 0, 1602, za zgodą The Royal Society of Chemistry

Figure 11. Part of the structure of a coordination polymer containing *paddlewheel* dicopper(II) tetraacetate unit (indicated by an arrow). Reprinted from Chem. Commun., 2002, 0, 1602 by permission of The Royal Society of Chemistry

Mechanosyntezę prowadzoną z bardzo niewielkim dodatkiem cieczy zwykło nazywać się jako ucieranie wspomagane cieczą – LAG (ang. *Liquid-Assisted Grinding*). Cząsteczki dodanej niewielkiej ilości cieczy, oprócz przyspieszenia mechanosyntezy, dodatkowo mogą pełnić rolę gości w porach sieci. Nierzadko także, pełnią one kluczową rolę przy samoorganizacji sieci. Niestety, dotychczas nie zdefiniowano w całości mechanizmu działania wariantu LAG, jedynie można się domyślać na jakie czynniki wpływać może dodatek cieczy. Po pierwsze, może zwiększać on powierzchniową mobilność reagentów; poza tym przy większej ilości cieczy spowodować może częściowe rozpuszczenie lub utworzenie eutektyków [43, 44]. Dla wariantu LAG utworzono parametr η , który opisuje ilość dodatku cieczy. Jest on zdefiniowany jako stosunek objętości cieczy w μL do sumy mas ciał stałych (w miligramach) biorących udział w reakcji. Friščić i współpracownicy [45] zaproponowali podział głównych czynników mających wpływ na reakcję mechanochemiczną, ze względu na parametr η . $0 \mu\text{L}/\text{mg}$ odpowiada wariantowi NG. Dla przedziału $0\text{--}2 \mu\text{L}/\text{mg}$ stwierdzono, że niska rozpuszczalność reagentów nie ma wpływu na mechanizm i najbardziej odpowiada taki dodatek cieczy wariantowi LAG. W przedziale od 2 do $12 \mu\text{L}/\text{mg}$ największy wpływ na wydajność mechanosyntezy ma rozpuszczalność

w danej cieczy. Dla większych wartości reaktywność układu kontrolowana jest przez termodynamiczną rozpuszczalność substratów i produktów. W wielu istniejących pracach można spotkać się z przykładami, gdy dodatek cieczy przyspiesza drastycznie czas potrzebny do pełnej konwersji [46] a nawet powoduje powstanie sieci, które bez udziału cieczy nie powstają [47]. W innych przypadkach wykazano, że istnieją sieci tworzące się tylko przy dodatku konkretnej cieczy [48].

Trzecią odmianą mechanosyntezy opisywaną w literaturze jest wariant ILAG (ang. *Ion- and Liquid-Assisted Grinding*), który polega na dodatku niewielkiej ilości prostej soli nieorganicznej wraz z niewielką ilością cieczy. Idea ta wynika z obserwacji, iż do syntezy niektórych sieci metalo-organicznych konieczne są niektóre aniony lub kationy, mogące pełnić rolę np. tzw. templatów. Metoda ta jest szczególnie użyteczna dla prekursorów metali takich jak tlenki i węglany – potrafi drastycznie zwiększyć szybkość zachodzenia reakcji. Typowymi dodatkami są siarczan(VI) lub azotan(V) amonu ale spotyka się także inne sole. Oprócz wsparcia w syntezie, przyspieszenia reakcji i wielu innych zalet metody ILAG, dodatek soli nieorganicznej może wywoływać też zmiany w już istniejących sieciach. Przykład takiego zachowania zaprezentował Matoga i współpracownicy; poprzez ucieranie z tiocyjanianem amonu obojętnej sieci opartej na jonach manganu(II) i łącznikach izonikotynianowych powstaje naładowana sieć, zdolna do przewodnictwa protonowego [25].

Jak więc można zauważyć, podane powyżej modyfikacje pozwalają wyeliminować niektóre wady mechanosyntezy. W rzeczywistości, barierą jakiej nie będzie się dało bezpośrednio obejść, jest brak możliwości otrzymania monokryształów, jednak jak już wspomniano wcześniej, coraz popularniejsze stają się inne techniki badawcze, umożliwiające bądź monitorowanie mechanosyntezy, bądź analizowanie jej produktów.

3.3. METODY BADAŃ *EX SITU* ORAZ *IN SITU*

W czasach współczesnych rozwinęło się wiele technik umożliwiających badanie struktury i właściwości sproszkowanych ciał stałych. Z punktu widzenia mechanizmu mechanosyntezy, istotnym jest możliwość monitorowania produktów syntezy w czasie jej trwania. Pozwala to ograniczyć jej czas, w przypadku gdy pełna konwersja zachodzi wcześniej, poznać produkty przejściowe w celu lepszego zrozumienia mechanizmu, a także poznać nowe substancje, powstające w czasie ucierania, znikające po pewnym czasie [49].

Najprostszym sposobem jest dokonywanie pomiaru *ex situ*, poprzez przerywanie syntezy, pobieranie próbek do pomiaru i kontynuowanie syntezy. W ten sposób można badać obecne fazy krystaliczne za pomocą PXRD, zanikanie lub powstawanie pewnych ugrupowań poprzez spektroskopię w podczerwieni lub ramanowską, analizować powierzchnię właściwą próbki poprzez pomiar izotermy adsorpcji próbki, analizować otoczenie konkretnego pierwiastka poprzez pomiar magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym (ssNMR). Podejście to jest oczywiście mniej

dokładne, ze względu na przerywanie procesu mechanosyntezy, możliwość zanieczyszczenia układu, zmiany jego warunków, możliwości zmian w czasie przenoszenia próbek do aparatów pomiarowych. Z tego powodu, coraz częściej konstruuje się układy sprzęgające aparaturę do syntezy z wybraną aparaturą pomiarową, dokonując analizy *in situ*. Takie rozwiązania wciąż są niezwykle kosztowne, pomimo to można spotkać już młyny lub ekstrudery sprzężone z dyfraktometrem PXRD lub spektrometrem ramanowskim [31, 49].

UWAGI KOŃCOWE

W niniejszej pracy przedstawione zostały podstawowe zagadnienia dotyczące sieci metalo-organicznych, ich geneza, historia, metody i optymalizacje syntez oraz poszukiwanie zastosowań na bazie istniejących właściwości. Przedstawiono istotę mechanochemii, zobrazowano przemiany zachodzące pod wpływem siły mechanicznej, zaprezentowano ideę zastosowania mechanosyntezy do projektowania i tworzenia sieci MOF. Wymieniono także kluczowe zalety mechanosyntezy w stosunku do konwencjonalnych metod syntezy oraz ukazano podstawowe sposoby pokonywania ograniczeń mechanochemii.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.D. Karlin, *Progress In Inorganic Chemistry*, Wiley Blackwell, 2014.
- [2] R. Xu, Y. Xu, *Modern Inorganic Synthetic Chemistry: Second Edition*, Elsevier Inc., 2017.
- [3] J.C. Taylor, *Advances In Chemistry Research*, Nova Science Publishers, Inc., 2018.
- [4] R.B. Stuart, N.R. Champness, X.-M. Chen, J. Garcia-Martinez, S. Kitagawa, L. Öhrström, M. O’Keeffe, M.P. Suh, J. Reedijk, *Pure Appl. Chem.*, 2013, **85**, 1715.
- [5] O.L. Ortiz, L.D. Ramírez, *Coordination polymers and metal organic frameworks: Properties, types and applications*, Nova Science Publishers, Inc., 2012.
- [6] X. Pei, Y. Chen, S. Li, S. Zhang, X. Feng, J. Zhou, B. Wang, *Chin. J. Chem.*, 2016, **34** (2), 157.
- [7] P. Kumar, A. Pournara, K.-H. Kim, V. Bansal, S. Rapti, M.J. Manos, *Prog. Mater. Sci.*, 2017, **86**, 25.
- [8] J. Gascon, A. Corma, F. Kapteijn, F.X. Llabres I Xamena, *ACS Catal.*, 2014, **4**, 361.
- [9] P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P.K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R.E. Morris, C. Serre, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1232.
- [10] L.E. Kreno, K. Leong, O.K. Farha, M. Allendorf, R.P. Van Duyne, J.T. Hupp, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1105.
- [11] P. Ramaswamy, N.E. Wong, G.K.H. Shimizu, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 5913.
- [12] A.J. Howarth, A.W. Peters, N.A. Vermeulen, T.C. Wang, J.T. Hupp, O.K. Farha, *Chem. Mater.*, 2017, **29** (1), 26.
- [13] S. Rashidi, J.A. Esfahani, N. Karimi, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2018, **91**, 229.
- [14] L. Ding, A.O. Yazaydin, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2013, **182**, 185.
- [15] Y. Kinoshita, I. Matsubara, Y. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1959, **7**, 741.
- [16] O.M. Yaghi, H. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117** (41), 10401.
- [17] H. Li, M. Eddaoudi, M. O’Keeffe, O.M. Yaghi, *Nature*, 1999, **402** (6759), 276.
- [18] J.L.C. Rowsell, O.M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128** (4), 1304.

- [19] J.H. Cavka, S. Jakobsen, U. Olsbye, N. Guillou, C. Lamberti, S. Bordiga, K.P. Lillerud, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130** (42), 13850.
- [20] S. Horike, S. Shimomura, S. Kitagawa, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 695.
- [21] T.D. Bennett, A.K. Cheetham, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1555.
- [22] K. Roztocki, D. Jędrzejowski, M. Hodorowicz, I. Senkovska, S. Kaskel, D. Matoga, *Cryst. Growth Des.*, 2018, **18**, 488.
- [23] D. Prochowicz, K. Sokołowski, I. Justyniak, A. Kornowicz, D. Fairen-Jimenez, T. Friščić, Lewiński, *J. Chem. Commun.*, 2015, **51**, 4032.
- [24] D.J. Lun, G.I.N. Waterhouse, S.G. Telfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5806.
- [25] D. Matoga, M. Oszejca, M. Molenda, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 7637.
- [26] Y. Xu, N.A. Vermeulen, Y. Liu, J.T. Hupp, O.K. Farha, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2016, **27**, 4345.
- [27] J. Evans, C.J. Sumby, C.J. Doonan, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 5933.
- [28] Y. Zhao, J. Liu, M. Horn, N. Motta, M. Hu, Y. Li, *Sci. Chin. Mat.*, 2018, **61** (2), 159.
- [29] J. Klinowski, F.A. Almeida Paz, P. Silva, J. Rocha, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 321.
- [30] G. Cravotto, E.C. Gaudino, P. Cintas, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 7521.
- [31] C. Mottillo, T. Friščić, *Molecules*, 2017, **22**, 144.
- [32] H. Kim, S. Das, M.G. Kim, D.N. Dybtsev, Y. Kim, K. Kim, *Inorg. Chem.*, 2011, **50** (8), 3691.
- [33] Q. Gao, J. Xu, X.-H. Bu, *Coord. Chem. Rev.*, (2018) (w druku), DOI: 10.1016/j.ccr.2018.03.015.
- [34] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, *Pol. J. Environ. Stud.*, 2005, **14** (4), 389.
- [35] S.L. James, C.J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, T. Friščić, F. Grepioni, K.D.M. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. Guy Orpen, I.P. Parkin, W.C. Shearouse, J.W. Steed, D.C. Waddell, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 413.
- [36] L. Takacs, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 7649.
- [37] J.G. Hernández, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 17157.
- [38] A. Pichon, A. Lazuen-Garay, S.L. James, *CrystEngComm*, 2006, **8**, 211.
- [39] V. Štrukil, L. Fábíán, D.G. Reid, M.J. Duer, G.J. Jackson, M. Eckert-Maksić, T. Friščić, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 9191.
- [40] V. Štrukil, M.D. Igrc, M. Eckert-Maksić, T. Friščić, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 8464.
- [41] S.A. Bourne, M. Kilkenny, L.R. Nassimbeni, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2001, 1176.
- [42] W.J. Blecher, C.A. Longstaff, M.R. Neckenig, J.W. Steed, *Chem. Commun.*, 2002, 1602.
- [43] A.A.L. Michalchuk, I.A. Tumanov, W.V. Boldyreva, *CrystEngComm*, 2013, **15**, 6403.
- [44] K. Užarević, V. Štrukil, C. Mottillo, P.A. Julien, A. Puškarić, T. Friščić, I. Halasz, *Cryst. Growth Des.*, 2016, **16**, 2342.
- [45] T. Friščić, S.L. Childs, S.A.A Rivizi, W. Jones, *CrystEngComm*, 2009, **11**, 418.
- [46] G.A. Bowmaker, N. Chaichit, C. Pakawatchai, B.W. Skelton, A.H. White, *Dalton Trans.*, 2008, 2926.
- [47] C.J. Adams, H.M. Colquhoun, P.C. Crawford, M. Lusi, A.G. Orpen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 1124.
- [48] D. Braga, M. Cruz, A. Johansson, M. Polito, K. Rubini, F. Grepioni, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 142.
- [49] L. Batzdorf, F. Fisher, M. Wilke, K.J. Wenzel, F. Emmerling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54** (6), 1799.

METODY OZNACZANIA BARWNIKÓW SPOŻYWCZYCH

METHODS FOR THE DETERMINATION OF FOOD DYES

Klaudia Kałwa*, Artur Mazurek

*Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
e-mail: klaudia.kalwa91@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody oznaczania barwników

- 1.1. Przygotowanie próbek do analizy
- 1.2. Metody spektrofotometryczne
- 1.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- 1.4. Elektroforeza kapilarna
- 1.5. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Podsumowanie

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Klaudia Kałwa absolwentka Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, aktualnie doktorantka III roku w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Radosława Kowalskiego.

W swojej pracy zajmuje się wpływem czynników fizyko-chemicznych na zawartość substancji aktywnych w ekstraktach z ziół oraz oceną wydajności ekstrakcyjnej wybranych układów hydrofilowych i liofilowych pod względem izolacji składników olejku eterycznego. Obszar zainteresowań: choroby dietozależne, farmakognozja, chemia.

Dr Artur Mazurek, adiunkt w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Zainteresowania naukowe Autora obejmują badania w obrębie analityki żywności ze szczególnym uwzględnieniem opracowania nowych metodyk analitycznych w zakresie analizy całkowitej zawartości witaminy C.

ABSTRACT

Food dyes are chemical substances that were developed to enhance the appearance of food by giving it artificial color. People have added colorings to food for centuries, but the first artificial food colorings were created in 1856 from coal tar. Over the years, hundreds of artificial food dyes have been developed, but a majority of them have since been found to be toxic. There is only a handful of artificial dyes that are still used in food. Food manufacturers often prefer artificial food dyes over natural food colorings, such as beta carotene and beet extract, because they produce a more vibrant color [1]. However, there is quite a bit of controversy regarding the safety of artificial food dyes. All of the artificial dyes that are currently used in food have gone through testing for toxicity in animal studies. Regulatory agencies, like the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Food Safety Authority (EFSA), have concluded that the dyes do not pose significant health risks. Not everyone agrees with that conclusion. Interestingly, some food dyes are deemed safe in one country, but banned from human consumption in another, making it extremely confusing to assess their safety [2]. Undesirable effects of azo dyes used for coloring food products led to the development of very sensitive and selective analytical methods successfully used for their determination in various food matrices. Many different methods have been employed for the determination of synthetic dyes in food and beverages including thin layer chromatography and capillary electrophoresis [3]. However, these methods can be time consuming and may not be applicable for the simultaneous analysis of many dyes. Conventional HPLC methods have been employed for the analysis of synthetic colorants and while useful, these methods require long analysis times and large amounts of expensive solvents [4, 5].

Preparation of the test sample involves the use of various techniques such as membrane filtration due to the complexity of food products. Therefore, the development of simple, selective extraction methods together with the combination of chromatographic and spectrophotometric techniques are of great importance [6].

One of the most difficult stages of the analysis is the appropriate selection of the method for the determination of food colors. In the case of spectrophotometric methods, the main advantage is the low cost of the determination, however, the lack of specificity of the absorption spectrum usually makes it difficult to apply this method in the case of a mixture of different absorbing dyes due to the overlap of the spectra. The CE (Capillary Electrophoresis) analysis is faster and more economical compared to conventional electrophoresis and chromatography. The production of cheap capillaries and the development of on-line detection systems contributed to the development of modern capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis has a number of types of separation. Ultimately, it is impossible to determine the one particular appropriate specific method for the determination of food dyes due to their diverse structure and chemical composition [4, 7].

Keywords: food dyes, HPLC, spectrophotometry, TLC, capillary electrophoresis

Słowa kluczowe: barwniki spożywcze, HPLC, spektrofotometria, TLC, elektroforeza kapilarna

WPROWADZENIE

Barwa jest jedną z najważniejszych właściwości, na podstawie, której oceniana jest żywność. Stosowany jest szeroki zakres barwników, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, do produktów spożywczych w celu poprawy ich wyglądu. Wprowadza się je również do żywności w celu przywrócenia produktom pierwotnego wyglądu, który został zmieniony podczas procesu produkcyjnego. Barwniki dodawane są także w celu zamaskowania niekorzystnych przebarwień lub ograniczenia strat związków zapachowych i witamin wrażliwych na działanie światła. Większość barwników, otrzymanych ze źródeł naturalnych, jest nietrwała i może łatwo ulegać degradacji podczas przetwarzania. W związku z tym barwniki pochodzenia syntetycznego są powszechnie stosowane, nie tylko ze względu na ich trwałość, ale także koszt produkcji, który jest bardzo niski w porównaniu do barwników pochodzenia naturalnego [7]. Dodatek substancji barwiących do żywności praktykowany był już w Średniowieczu i często wynikał z chęci jej zafałszowania. W XIX wieku, wraz z rozwojem syntezy organicznej, na rynku pojawiło się wiele syntetycznych barwników do tkanin, które dodawano również do żywności [8]. Także obecnie się zdarza, iż barwniki są dodawane do produktów spożywczych w celu zafałszowania lub zmiany ich właściwości, co wprowadza konsumenta w błąd, a nawet może mieć negatywny wpływ na jego zdrowie [9]. Jedną z podstawowych grup spośród substancji dodawanych do żywności są barwniki spożywcze a w latach 2010–2015 ich produkcja wzrosła o ponad 40% [8].

Wśród syntetycznych barwników stosowanych w przemyśle spożywczym, barwniki azowe stanowią około 65% związków obecnych na rynku [10]. Są to barwniki charakteryzujące się występowaniem grupy azowej ($-N=N-$) w strukturze cząsteczek. Barwniki te mają silne, żywe kolory i są wykorzystywane do barwienia różnych produktów spożywczych [11]. Zostały otrzymane po raz pierwszy przez Greissa w 1858 roku z odkrytych przez niego związków diazoniowych. Synteza barwników azowych jest bardzo prosta i niedroga. Są wysoko lub średnio odporne na działanie ciepła, tlenu, światła i wilgoci oraz są stabilne w pełnym zakresie pH żywności [12]. Barwniki azowe są zazwyczaj odporne na warunki tlenowe, ale mogą być łatwo zredukowane przez mikroflorę jelitową do amin aromatycznych [13]. W 2007 roku naukowcy z Uniwersytetu w Southampton odkryli związek pomiędzy konsumpcją produktów zawierających syntetyczne barwniki a występowaniem objawów nadpobudliwości u dzieci. Badanie zostało przeprowadzone na 153 dzieciach w wieku 3 lat oraz 144 dzieciach w wieku 8 i 9 lat. Dzieciom podawano napoje zawierające benzoesan sodu oraz mieszaninę czterech z sześciu barwników (żółcień pomarańczową FCF, żółcień chinolinową, azorubinę, czerwień Allura, tartrazynę i czerwień koszenilową A) lub placebo [12]. Obie mieszaniny zawierały żółcień pomarańczową w ilości 5 mg lub 7,5 mg. Wyniki badań wykazały, że spożycie napoju zawierającego konserwant oraz mieszaninę barwników, powodowało nadaktywne zachowanie u dzieci z obu grup wiekowych. U badanej grupy zaobserwowano takie objawy jak wiercenie się, impulsywność, przerywanie cudzych rozmów,

gadatliwość, nadpobudliwość ruchową, niepokój oraz problemy z koncentracją. Badania były analizowane przez niezależne organizacje naukowe: Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz Komitet Toksykologiczny Wielkiej Brytanii. Obie organizacje stwierdziły, że badanie zostało przeprowadzone prawidłowo [12, 14]. W wyniku badań w Southampton, w krajach Unii Europejskiej został wprowadzony obowiązek umieszczania na etykiecie produktów spożywczych, adnotacji o treści: „może mieć szkodliwy wpływ na aktywność i skupienie uwagi u dzieci”. Wszystkie produkty przywiezione do Polski z państw trzecich oraz żywność wprowadzona do obrotu i oznakowana po 20 lipca 2010 roku musi zawierać tę informację po nazwie lub numerze E barwnika z tej grupy [10, 14]. Ze względu na coraz częstsze stosowanie barwników syntetycznych do żywności oraz niekiedy ich niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka na szczególną uwagę zasługują metody, które pozwolą nam poprawnie oznaczyć ich zawartość w produktach spożywczych.

1. METODY OZNACZANIA BARWNIKÓW

1.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Nie ma ogólnie przyjętej, standardowej metody stosowanej do ekstrakcji barwnika. Niemniej jednak większość procedur przygotowania próbki do analizy polega na zastosowaniu odpowiedniej metody ekstrakcji w celu uwolnienia pożądaných analitów z matrycy, a następnie usunięciu substancji obcych [15, 16].

W celu oznaczenia zawartości barwników spożywczych w napojach, stosuje się procedurę przygotowania próbki obejmującą jednoetapową ekstrakcję membranową przy użyciu wody, jako rozpuszczalnika [17, 18].

Ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE) jest najczęściej stosowaną techniką w oznaczaniu barwnika spożywczego, ze względu na jej zalety, takie jak prostota i szybkość. Technika ta umożliwia oznaczenie dużej ilości próbek z wymaganą dokładnością [19]. Do analizy barwników wykorzystywane są różne rozpuszczalniki organiczne, więc wybór odpowiedniego rozpuszczalnika nie zawsze jest prosty. Struktura matrycy analitycznej i jej elementy odgrywają kluczową rolę przy wyborze rozpuszczalnika do ekstrakcji. Rozpuszczalniki, takie jak metanol, kwas octowy, etanol, octan etylowy, fosforan tetrabutylamonowy są odpowiednie do ekstrakcji barwników [9].

Do oznaczenia naturalnych i syntetycznych barwników w liofilizowanych produktach spożywczych zastosowano automatyczną ekstrakcję do fazy stałej, używając amoniaku i metanolu, jako eluentów i oktadecylosilanowej (C_{18}) fazy stacjonarnej [20]. Przeprowadzono ekstrakcję siedemnastu barwników spożywczych w czterdziestu siedmiu produktach spożywczych, stosując prosty proces SPE. Do skutecznej ekstrakcji wykorzystano wodę, aby wyekstrahować barwnik z galaretek, cukierków, napojów i mieszanek w proszku oraz kwas octowy do ekstrakcji barw-

nika z ciastek, wafli i makaronu [21]. W innym badaniu zastosowano ekstrakcję do fazy stałej do oznaczenia szesnastu barwników syntetycznych w daniach typu instant z dużą zawartością oleju. Na podstawie badania stwierdzono, że połączenie metanolu z acetonem w stosunku 1:1 (v/v) i 2 molowym roztworem mocznika zawierającego 5% amoniaku w metanolu wykazało doskonałą wydajność podczas oczyszczania za pomocą kolumny do chromatografii żelowej [22]. Badano użycie NH₂-LDC-MP (sieciowany polimer magnetyczny), jako sorbentu w SPE z zastosowaniem pola magnetycznego w celu zwiększenia odzysku ekstrakcji siedmiu syntetycznych barwników spożywczych przy użyciu wody o pH 9,0 jako rozpuszczalnika. Wyniki badania wykazały, że NH₂-LDC-MP może mieć zastosowanie do szybkiego i skutecznego usunięcia zanieczyszczeń [19].

Z kolei w innych badaniach zajmowano się spektrofotometrycznym oznaczeniem czerwieni Allura w próbkach wody poprzez efektywną procedurę ekstrakcji do fazy stałej na szklanej kolumnie zawierającej wysoce porowaty polimer styrenu i diwinylobenzenu MCL GEL CHP20P. Opracowano prostą i dokładną metodę o niskich kosztach analizy [23]. SPE jest techniką preferowaną przez wielu naukowców ze względu na swoje zalety. Charakteryzuje się wysokim współczynnikiem koncentracji oraz może być stosowana do obróbki próbek o dużej objętości. Technika ekstrakcji do fazy stałej jest powszechnie stosowana do zateżenia lub oddzielenia śladowych ilości pierwiastków i ultra śladowych ilości związków organicznych i nieorganicznych, w celu oddzielenia składników matrycy oraz obniżenia dolnej granicy oznaczalności [24, 25].

Ekstrakcja typu ciecz–ciecz (ang. Liquid-Liquid Extraction, LLE, znana również, jako ekstrakcja rozpuszczalnikowa) polega na oddzieleniu związków w oparciu o ich względną rozpuszczalność w dwóch płynach niemieszających się. Zazwyczaj jest to faza organiczna i woda. Najbardziej powszechnymi rozpuszczalnikami (zarówno same, jak i w połączeniu) używanymi do ekstrakcji barwnika z produktów spożywczych są woda, etanol, metanol, alkohol izopropylowy, roztwór amoniaku w etanolu, octan etylu, amoniak, cykloheksan i fosforan tetrabutylamoniowy [26, 12].

Przeprowadzono badania z użyciem różnych rozpuszczalników do jednoczesnej ekstrakcji czterdziestu barwników spożywczych w napojach i cukierkach. Stwierdzono, że roztwór amoniaku i etanolu w proporcji 1:1 (v/v) wykazał dobrą skuteczność ekstrakcji po ultrasonikacji i odparowaniu próbki [26]. Zaobserwowano, że trójskładnikową mieszaniną etanolu, amoniaku i wody w proporcji 80:1:19 można osiągnąć wysoką wydajność ekstrakcji siedmiu barwników z próbek paszy dla zwierząt oraz w mięsie [27]. W literaturze analizowano zawartość czternastu syntetycznych barwników spożywczych w kawiorze stosując połączenie wodnego roztworu amoniaku (25%) i metanolu w stosunku 1:9 [28]. W innym badaniu oznaczono siedem certyfikowanych barwników spożywczych w czterdziestu czterech produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej, za pomocą wodorotlenku amonu i metanolu zastosowanych jako rozpuszczalników do ekstrakcji [21].

Pomimo, że metody ekstrakcji ciało stałe–ciecz i ciecz–ciecz są najczęściej stosowanymi technikami do próbek żywnościowych, do analizy barwników stosowane są również inne metody ekstrakcji, np. ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) oraz ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE). Mają one zastosowanie, jako ekologiczne, alternatywne metody ekstrakcji. Opcje te są korzystne w laboratorium, ponieważ konwencjonalne metody ekstrakcji z rozpuszczalnikami organicznymi charakteryzują się użyciem dużej ilości rozpuszczalnika oraz są czasochłonne. Dodatkowo często charakteryzują się niskim odzyskiem barwnika, niską selektywnością i precyzją [9]. Badano ekstrakcję dwudziestu jeden syntetycznych barwników w mięsie stosując metodę MAE, używając metanolowego roztworu kwasu octowego (95:5), jako rozpuszczalnika [29]. Opracowano również metodę ekstrakcji za pomocą dwuskładnikowego rozpuszczalnika (metanol i aceton) używając UAE, co pozwoliło na osiągnięcie poprawy odzysku ekstrakcji pigmentów hydrofilowych i hydrofobowych [30].

Do oznaczania barwników stosowana jest również technika ekstrakcji w punkcie zmętnienia. Jest alternatywą dla innych technik rozdziału i może być stosowana na różnych matrycach do wstępnego oznaczania śladowych związków organicznych i związków nieorganicznych. Ekstrakcja w punkcie zmętnienia charakteryzuje się wieloma zaletami, w porównaniu z tradycyjną ekstrakcją typu ciecz–ciecz. Do tej ekstrakcji używana jest woda i nietoksyczne środki powierzchniowo-czynne, co pozwala na uniknięcie stosowania toksycznych, rakotwórczych i łatwopalnych rozpuszczalników organicznych. Jest zgodna z zasadami zielonej chemii. Może doprowadzić do wzrostu wydajności odzysku i dużego współczynnika wstępnego zażycia, ponieważ obecność środków powierzchniowo czynnych może zmniejszyć straty analitu z powodu ich adsorpcji na pojemniku. Ekstrakcja w punkcie zmętnienia daje bardzo niski limit detekcji i dobrą powtarzalność otrzymanych wyników. Jest metodą ekologiczną, a do tego czułą, prostą, selektywną i o względnie krótkim czasie analizy [31, 32]. Dla kontrastu, istnieje również kilka dostępnych metod, w których nie jest wymagana ekstrakcja przed analizą [33].

1.2. METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Barwniki spożywcze są substancjami absorbującymi falę elektromagnetyczną w obszarze widzialnym, więc spektrofotometria jest najbardziej odpowiednia do ich oznaczania ilościowego. Jest to jedna z najczęściej stosowanych technik analitycznych ze względu na niskie koszty oprzyrządowania. Ta metoda nie wymaga również wysoce wykwalifikowanych operatorów. Jednakże brak swoistości widma absorpcyjnego zwykle utrudnia stosowanie tej metody w przypadku mieszaniny różnych barwników absorbujących, z powodu nakładania się widm [9].

W literaturze dokonano przeglądu metod spektrofotometrycznych do oznaczania syntetycznych barwników spożywczych metodą spektrofotometrii pochodnej widma oraz metody dodatku wzorca w punkcie H (HPSAM). Spektrofotometria

ta znalazła szerokie zastosowanie w analizie próbek wieloskładnikowych. Technika ta opiera się na wykorzystaniu pochodnych widma, wynikających z tworzenia pochodnych rzędu zerowego, rzędu pierwszego, rzędu drugiego itd. z widma absorpcji. W przypadku tej metody próbki muszą być starannie oczyszczone, aby jednoczesne oznaczanie było możliwe i dawało satysfakcjonujące efekty [34].

Drugą opisaną metodą w spektrofotometrii jest metoda dodatku wzorca w punkcie H. W tej metodzie kalibracyjnej rozwiązywany jest problem nakładania się widm dwóch analitów co pozwala otrzymać prawidłowe stężenie analitu, gdy zarówno analit, jak i związki zakłócające są obecne w próbce. Metoda wykorzystuje analityczne sygnały otrzymane przy dwóch wybranych długościach fali, dając dwie linie proste, które mają wspólny punkt o współrzędnych H ($-C_H$, A_H), gdzie $-C_H$ jest poszukiwanym stężeniem analitu, a A_H jest sygnałem analitycznym spowodowanym obecnością substancji interferującej. Metoda ta jest bardzo uniwersalna i może być stosowana w wielu systemach. Największą zaletą HPSAM jest to, że przekształca nieusuwalny błąd, wynikający z bezpośredniego zakłócenia, w błąd systematyczny [34]. Dzięki temu może być jednocześnie określone stężenie analitu oraz wielkość zakłócenia. Metoda HPSAM jest nową, prostą i czułą metodą do jednoczesnego oznaczania azorubiny i czerwieni koszenilowej A, których widma bardzo się pokrywały [34]. W innych badaniach, oznaczono jednocześnie azorubinę i czerwień koszenilową w napojach za pomocą czwartej pochodnej widma absorpcji i porównano wyniki z metodą HPLC. Zaobserwowano, że metoda spektrofotometryczna okazała się prosta, bezpośrednia, szybka i uniwersalna [33].

W literaturze opisano ekonomiczną metodę do jednoczesnego oznaczania pięciu barwników spożywczych w handlowych produktach poprzez zastosowanie dwuwiązkowego fotokolorymetru. Pomiar oparty jest na różnicy stosunków absorbancji przy analitycznej długości fali dla dwóch lub trzech analizowanych substancji. Multi-kolorowe diody LED (czerwony-zielony-niebieski, RGB) zostały użyte, jako źródła światła w celu uzyskania danych przy dwóch lub trzech długościach fali. Metoda ta opiera się na podzieleniu absorbancji mieszaniny przez absorbancję roztworu wzorcowego związków zakłócających i odjęciu otrzymanych danych. Opracowana procedura została z powodzeniem zastosowana do równoczesnego oznaczania barwników spożywczych w produktach handlowych. Uzyskane wyniki wskazują na bardzo dobrą dokładność i precyzję metody. Urządzenie do analizy ma prostą budowę i jest łatwe do obsługi. Charakteryzuje się również niskim kosztem [34]. Ponadto, w literaturze dostępne są badania opierające się na dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganą ultradźwiękami połączonej ze spektrofotometrią pochodnej (UAS-DLLME-UV-vis) jako użytecznej techniki selektywnego oznaczania fioletu krystalicznego (CV) i lazuru b (Az-B). Opracowana metoda charakteryzuje się minimalną interferencją spowodowaną innymi substancjami obecnymi w matrycy próbki, a odzysk analizowanych barwników zawiera się w zakresie 86–100% [36].

1.3. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa jest to najprostsza, ekonomiczna i najbardziej odpowiednia technika chromatograficzna do jakościowej analizy mieszaniny analitów. Jej cechą jest możliwość uzyskania bardzo dobrych wyników w stosunkowo krótkim czasie. Dokonano przeglądu różnych technik i warunków przygotowania próbki do analizy chromatograficznej barwników spożywczych w różnych matrycach żywnościowych poprzez technikę chromatografii cienkowarstwowej. W odpowiednich warunkach możliwe jest rozdzielenie mieszaniny kilku barwników oraz ich identyfikacja za pomocą porównania: współczynnika migracji R_f , kształtu i koloru plamki z wzorcami [37, 38]. Najczęściej w chromatografii cienkowarstwowej, jako fazę ruchomą stosuje się rozpuszczalniki organiczne. Niestety zazwyczaj mają intensywne, nieprzyjemny zapach i wykazują działanie kancerogenne. Alternatywnym rozwiązaniem jest zastosowanie jako fazy ruchomej roztworu cyklodekstryny poliamidowego sorbentu jako fazy stacjonarnej. Ten układ chromatograficzny umożliwił rozdział następujących barwników: eozyny, erytrozyny i rodaminę 6G [38].

Pochodną chromatografii cienkowarstwowej jest wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC). Metoda ta opiera się na wykorzystaniu odpowiednich płytek, co zapewnia lepszą separację związków i daje zadowalający wynik na krótkiej drodze rozdziału. Technika ta została wykorzystana do oznaczania syntetycznych barwników w napojach alkoholowych. Separacja była przeprowadzona na Whatman LHP-K, Analtech HETLC i Analtech HERPS za pomocą następujących faz ruchomych: butanol/2-butanol/acetonytryl/tetrahydrofuran/keton aceto-metylowy/0,5% wodny roztwór NaCl/amoniak w stosunku 10:10:25:15:20:18:2 lub propanol/acetonytryl/ tetrahydrofuran/keton etylowo-metylowy/octan etylu/ 0,5% wodny roztwór NaCl/ amoniak w proporcji 20:15:25:20:10:8:2 [39]. W innym przypadku, jako fazę stacjonarną użyto porowaty żel krzemionkowy połączony z 3-aminopropylową grupą funkcyjną. Jako eluent zastosowano mieszaninę izopropanolu/eteru dietylowego/amoniaku w stosunku 2:2:1 [6]. Technika HPTLC zapewnia lepszy rozdział substancji, plamki są mniej rozmazane i bardziej wyraźne.

Analiza ilościowa powoduje więcej trudności, które związane są z wydzieleniem analitów z fazy stacjonarnej. Można to osiągnąć poprzez zdrapanie plamy i ekstrakcję barwnika za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika a następnie pomiar absorbancji roztworu z wykorzystaniem spektrofotometru. Niemniej jednak jest to bardzo pracochłonne. Intensywność barwy wydobytego barwnika może być słaba i nie gwarantuje wysokiej precyzji. Znacznie lepsze wyniki można uzyskać przy zastosowaniu cyfrowego przetwarzania obrazów. Płytki chromatograficzne są skanowane na densytometryrze skanerowym i przetwarzane za pomocą odpowiedniego oprogramowania. [7]. Intensywność plam jest mierzona w trybie RGB (wiązka czerwona, zielona i niebieska). Długość i szerokość są określane za pomocą elektronicznej linijki i ostatecznie obliczane w umownych jednostkach poprzez odpowiednie równanie. Jest to prosta, szybka i precyzyjna metoda ilościowego oznaczania barwników spożywczych. Technika TLC gwarantuje prawidłową interpretację wyników

analizy, ponieważ trzeba wziąć pod uwagę kilka elementów: kształt i kolor plamki, współczynnik RF i odporność na światło (naturalne barwniki narażone na światło zanikają w miarę upływu czasu). Chromatografię cienkowarstwową zastosowano do określenia występowania oraz sprawdzenia zgodności z etykietą, barwników spożywczych w gazowanym napoju bezalkoholowym. Metoda wykazała granicę wykrywalności dla żółcieni pomarańczowej na poziomie 0,024 mg/L [40].

1.4. ELEKTROFOREZA KAPILARNA

Elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis, CE) jest to elektroforetyczna metoda wykorzystująca kapilarę do skutecznego rozdziału zarówno małych, jak i dużych cząsteczek. Analiza CE jest szybsza i bardziej ekonomiczna w porównaniu z konwencjonalną elektroforezą i chromatografią. Do rozwoju nowoczesnej elektroforezy kapilarnej przyczyniła się produkcja tanich kapilar oraz rozwój systemów detekcji on-line. Elektroforeza kapilarna jest stosowana w wielu wariantach, należą do niej kapilarna elektroforeza strefowa, micelarna chromatografia elektrokinetyczna (ang. micellar electrokinetic chromatography, MEKC) oraz izotachoforeza kapilarna, wykorzystująca wysokie napięcie w celu osiągnięcia efektywnej separacji [41].

Zostały opublikowane liczne metody analizy barwników spożywczych metodą CE. Oznaczono jedenaście syntetycznych barwników w napojach alkoholowych, bez przygotowania próbki, za pomocą CE-UV/Vis. Ta metoda elektroforezy kapilarnej, zastosowana do syntetycznych barwników, wykazała zadowalające wyniki rozdziału tych dodatków. Granica wykrywalności dla żółcieni pomarańczowej FCF wyniosła 2,5 mg/L a jej granica oznaczalności wyniosła 8,3 mg/L. Wydajność odzysku dla żółcieni pomarańczowej wyniosła w badaniu metodą CE-UV/Vis 104%. Zalecono stosowanie tej metody w celu określenia obecności barwników syntetycznych w napojach [42].

Zaproponowano metodę elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem detektora z matrycą diodową (CE-DAD) do ilościowej oceny żółcieni pomarańczowej FCF, azorubiny, czerwieni koszenilowej A w lodach. W badaniu tym opisano analizę tych barwników oddzielnie lub równocześnie poprzez strefową elektroforezę kapilarną (CZE). Jest to metoda, która może być rutynowo stosowana, a jednocześnie daje korzyści w postaci większej czułości, lepszej separacji i zwiększonej dokładności. Wykrycie trzech syntetycznych barwników dozwolonych tylko w niskich stężeniach (max. 0,05 mg/kg) w domowych i przemysłowych lodach poprzez CZE stanowi bardzo prostą alternatywę dla innych technik analitycznych stosowanych dotychczas. Jako technika rozdzielania CZE daje w tym przypadku bardzo dobre wyniki jest optymalnym, wstępnym narzędziem sprawdzania. Analiza jakościowa metodą elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem detektora z matrycą diodową jest porównywalna pod względem powtarzalności, czułości i liniowości do metod chromatograficznych. W oznaczeniu żółcieni pomarańczowej FCF, przeprowadzo-

nym za pomocą strefowej elektroforezy kapilarnej granica wykrywalności wyniosła 0,005 mg/kg. Rzeczywiste koszty analizy są jedną z głównych zalet metody CZE, w porównaniu z innymi technikami. Kapilarna elektroforeza strefowa ze względu na swoją elastyczność, niski koszt i całkowitą automatyzację jest lepszą techniką niż HPLC do oznaczania barwników w lodach [43].

Zaproponowano szybką i ekonomiczną metodę oznaczania dziesięciu powszechnie stosowanych syntetycznych barwników spożywczych dozwolonych w słodyczach i środkach nasercowych metodą micelarnej chromatografii elektrokinetycznej. MEKC wykazuje lepszą zdolność rozdzielczą niż wysokosprawna chromatografia cieczowa, podobną powtarzalność oraz jest szybsza i mniej kosztowna niż metody HPLC [16, 42]. W technice tej, bufor elektroforetyczny jest modyfikowany jonowym środkiem powierzchniowo czynnym. Anionowe i kationowe środki powierzchniowo czynne stosowane są, jako modyfikatory miceli do rozdziału mieszanin, które nie mogą być łatwo rozdzielane z zastosowaniem tradycyjnej kapilarnej elektroforezy strefowej [45]. W literaturze opisano rozdział barwników metodą MEKC przy użyciu buforu fosforan/boran modyfikowanego dezoksycholanem sodu i acetonitrylem. Azorubinę, która jest rzadko stosowana, jako sztuczny barwnik, użyto, jako wewnętrzny standard w oznaczeniach ilościowych [14].

Opisano metodę analizy ośmiu barwników spożywczych za pomocą mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej (MEEKC) stosując roztwór mikroemulsji. Stosując MEEKC badano wpływ stężenia środka powierzchniowo czynnego SDS, rodzaju modyfikatora organicznego, kosurfaktanta i oleju pod kątem optymalizacji rozdzielenia barwników. Finalnie, wyniki rozdzielenia analizy próbek barwników spożywczych według MEEKC zostały porównane do tych metod CE, które były już znane. Stężenie modyfikatora organicznego silnie determinuje wydajność rozdzielenia. Stwierdzono, że faza olejowa i kosurfaktant również mogą mieć niewielki wpływ na separację barwnika. Wreszcie, optymalne warunki dla MEEKC zostały wykorzystane do rozdziału barwników w kilku próbkach rzeczywistych bez przygotowania próbki za pomocą SPE. W porównaniu z innymi metodami CE stosowanymi do analizy barwników, w których zastosowanie SPE jest niezbędne do zmniejszenia interferencji matrycy przed rozdziałem analitów, MEEKC wykazuje większą zdolność rozdzielczą, w czasie analizy niektórych próbek żywności. Granica wykrywalności w przypadku mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej do oznaczenia żółcieni pomarańczowej FCF wynosi 0,78 mg/L, a w przy zastosowaniu klasycznej elektroforezy kapilarnej ta granica wynosi 0,45 mg/L [46].

1.5. WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

Techniki analityczne w oparciu o chromatografię cieczową mają szeroki zakres zastosowań do analizy syntetycznych barwników spożywczych. Większość z tych metod stosowana jest w połączeniu z detektorami absorpcji w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis), fotodiodowym (DAD) oraz spektrometrem mas (MS). Naj-

powszechniej stosuje się metodę chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, kiedy faza stacjonarna jest niepolarna (oktadecyl C_{18} , monomer oktylowy C_8), a faza ruchoma jest polarna [9]. Ponieważ barwniki spożywcze są polarne, były one bardzo szybko wymywane w pobliżu objętości martwej. W takich przypadkach zastosowanie kolumn C_{18} z polarnie modyfikowanym ligandem zwiększa czas retencji związku barwnika azowego. Wysokosprawna chromatografia par jonowych (HPLC-IP) jest również stosowana, aby poprawić retencje barwników. [9]. Do oznaczenia analitów zastosowano bromek heksadecylotrimetyloamoniowy, jako kationowy środek powierzchniowo czynny w postaci pary jonowej w fazie ruchomej. Zaproponowana metoda, obejmuje prosty sposób ekstrakcji barwnika z żywności i zapewnia połączenie czułości i selektywności, prostoty i krótkiego czasu analizy. Metoda ta pozwala na wykrywanie barwników w bardzo małym stężeniu [47].

W innych badaniach oznaczano czerwone barwniki w słodyczach stosując chromatografię par jonowych z użyciem fosforanu oktyloamoniowego, jako modyfikatora fazy ruchomej [40]. W innym badaniu wykorzystano automatyczną metodę ekstrakcji w oparciu o ługowanie i ekstrakcję do fazy stałej w celu oznaczenia zarówno barwników naturalnych i syntetycznych w produktach mlecznych i tłustych potrawach metodą HPLC. Rozdzielenie barwników uzyskano w trybie elucji gradientowej na kolumnie C_{18} , stosując jako fazę ruchomą roztwór bromku cetylotrimetyloamoniowego w wodzie i etanolu [20]. Opracowano również prostą metodę do jednoczesnego oznaczenia czerwieni Allura i czerwieni koszenilowej w napojach poprzez zastosowanie wody i acetonitrylu, jako fazy ruchomej. Metoda ta pozwoliła uzyskać wiarygodne wyniki, jest precyzyjna i dokładna, daje zadowalającą granicę oznaczalności (0,3 mg/L) w stosunkowo krótkim czasie (14 minut) oraz charakteryzuje się krótkim procesem przygotowania próbki do analizy [48].

W innym badaniu zaproponowano jednoczesne oznaczanie czerwonych i żółtych barwników w stałych matrycach żywnościowych oraz czerwonych, żółtych i niebieskich barwników w napojach podczas jednego cyklu ekstrakcji i chromatografii. Zastosowano fazę stacjonarną C_8 a fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i buforu octanowego. Analizę przeprowadzono w trybie elucji gradientowej. Metoda wykazała się dobrymi parametrami liniowości, powtarzalności i odtwarzalności, biorąc pod uwagę różnorodność analizowanych matryc i dużą liczbę analitów [49]. W innym badaniu opracowano metodę gradientową RP-LC do jednoczesnej oceny dodatków do żywności, w tym barwników, sztucznych słodzików i konserwantów przy minimalnym przygotowaniu próbki. Zastosowano kolumnę C_{18} , eluent składający się z 0,1 M buforu fosforanowego (pH 4,0) z dodatkiem metanolu oraz detektor spektrofotometryczny. Opracowana procedura równoczesnego oznaczania różnych typów dodatków w napojach okazuje się zapewniać wiarygodne i powtarzalne wyniki, stosując prostą ekstrakcję i krótki czas analizy. Te atrakcyjne cechy, wraz z granicami wykrywalności (od 0,1 do 3 mg/L dla wszystkich dodatków), które są znacznie poniżej maksymalnych poziomów, sprawiają, że metoda ta szczególnie nadaje się do rutynowych pomiarów [48].

W artykule opublikowanym przez Yildirim i Yaşar [50] pierwszy raz opisano zastosowanie kolumn z wypełnieniem C18 typu „core-shell” do analizy ośmiu sztucznych barwników w żywności. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 100 mM buforu octanu amonu (pH 7) i acetonitrylu w trybie elucji gradientowej. Zastosowana kolumna umożliwiła skrócenie czasu analizy do 5,5 minut w porównaniu do czasu uzyskiwanego na klasycznej kolumnie C18 rzędu 30–40 minut. Opracowana metoda charakteryzowała się granicą wykrywalności w zakresie 58–69,1 ng/mL, odzyskiem analizowanych barwników na poziomie 97,95–102,89% a względne odchylenie standardowe otrzymanych wyników analiz próbek żywności było mniejsze od 3%. Otrzymane wartości parametrów walidacyjnych oraz szczególnie bardzo krótki czas analizy pozwalają na rekomendowanie tej metody do rutynowych analiz.

W literaturze opisano analizę ośmiu rozpuszczalnych w wodzie oraz ośmiu rozpuszczalnych w tłuszczach barwników syntetycznych czułą metodą LC-DAD z wykorzystaniem kolumny C₈ jako fazy stacjonarnej oraz mieszaniny metanolu i buforu fosforanowego, jako fazy ruchomej w trybie elucji gradientowej. Syntetyczne barwniki w daniach typu instant, z dużą zawartością oleju, kolejno wyekstrahowano 2-molowym roztworem mocznika, zawierającym 5% amoniaku (rozpuszczonego w metanolu) oraz mieszaniną metanolu z acetonem, oddzielono za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz, oczyszczono i jednocześnie oznaczono metodą HPLC z użyciem detektora diodowego. Metoda ta skutecznie zmniejsza zakłócenia matrycy oraz charakteryzuje się wysoką precyzją i niskimi granicami wykrywalności [22].

W większości metod LC używa się, jako fazy ruchomej, rozpuszczalników organicznych, które negatywnie wpływają na zdrowie człowieka i środowisko. Problem ten można rozwiązać poprzez rozwój ekologicznych metod analitycznych. Jednym ze sposobów jest użycie tritonu X-100 (środek powierzchniowo czynny), jako fazy ruchomej [31]. W badaniu dowiedziono, że następująca po sobie ekstrakcja próbki metanolem i acetonem wspomagana ultradźwiękami, zwiększa odzysk pigmentów hydrofilowych i hydrofobowych w różnych produktach. Zoptymalizowana metoda HPLC może zidentyfikować i oznaczyć ilościowo żółte i czerwone pigmenty sztuczne i naturalne karotenoidy z wysoką czułością i powtarzalnością [31]. Opracowano i zoptymalizowano efektywne i dokładne, ekologiczne metody analizy do jednoczesnego oznaczania barwników spożywczych. Sposób ten zapewnia znaczne korzyści ekologiczne, bez stosowania rozpuszczalników organicznych w procedurze ekstrakcji oraz metodach chromatograficznych. Zaproponowana metoda obejmuje prostą procedurę obróbki wstępnej, aby wyodrębnić barwniki z żywności i leków. Oferuje połączenie czułości, selektywności i prostoty. Pozwala na wykrywanie barwników w niskich stężeniach (0,18 mg/L dla żółcieni pomarańczowej). Należy jednak podkreślić, czas analizy próbki jest wydłużony z powodu konieczności przemycania kolumny. Ponadto, jeśli wszystkie barwniki zostaną rozdzielone w jednym cyklu, metoda ta staje się bardziej przyjazna dla użytkownika [48, 49].

Chromatografia cieczowa połączona z detekcją spektrofotometryczną jest najczęstszą metodą analityczną do oznaczania jakościowego i ilościowego barwników

spożywczych. W przypadku systemów chromatograficznych z detektorem UV-Vis lub DAD trudne jest zapewnienie prawidłowej identyfikacji barwnika, zwłaszcza w złożonych matrycach żywnościowych. Wiele widm barwników spożywczych jest bardzo do siebie podobnych, dlatego wielu naukowców uzupełniło identyfikację barwników w oparciu o spektrometr mas. Wśród technik jonizacji zgodnych z chromatografią cieczą, najbardziej optymalną do analizy barwników jest jonizacja metodą elektrorozpylania (ESI). Wydajność jonizacji związków zależy od matrycy obecnej w próbce oraz zastosowanej fazy ruchomej. Większość barwników może być skutecznie jonizowana w trybie jonów ujemnych, stosując jako bufor octan amonu i mrówczan amonu [11].

Za pomocą LC-DAD-MS oznaczono jednocześnie barwniki syntetyczne rozpuszczalne w wodzie i w tłuszczach. Materiałem do badań były napoje bezalkoholowe, imbir i chilli. Zastosowano jonizację w trybie jonów dodatnich i ujemnych do jednoczesnej analizy barwników syntetycznych. Jako rozpuszczalnika, do ekstrakcji barwników, użyto dimetylosulfotlenku. Ta metoda okazała się zapewniać jednoznaczność identyfikacji i dokładne określenie badanych barwników w próbkach, bez konieczności pracochłonnego przygotowania próbki. Uzyskano również dobrą powtarzalność i wysoką dokładność przy niskich granicach wykrywalności oraz niskich granicach oznaczalności. Wykazano, że opisana metoda może być efektywnym narzędziem w wykrywaniu zafałszowań [29].

Opracowano metodę UFLC-MS/MS (ultraszybka chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas) do analizy siedmiu barwników spożywczych w winie i napojach bezalkoholowych z wykorzystaniem kolumny C_{18} i mieszaniny octanu amonu w acetonitrylu i wodzie, jako fazy ruchomej. Barwniki jonizowano techniką elektrorozpylania (ESI) w trybie jonów ujemnych a spektrometr mas pracował w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji. Dokładność metody wyrażona jako odzysk siedmiu barwników zawierała się między 84,0 a 116,2%. Granice oznaczalności (LOQ) dla oznaczanych barwników mieściły się w zakresie od 1,51 do 5,0 $\mu\text{g/L}$ [19].

W kolejnych badaniach porównano granicę wykrywalności 7 barwników spożywczych oznaczonych metodą HPLC-DAD i HPLC-MS/MS. Metoda HPLC-DAD charakteryzowała się granicą wykrywalności w zakresie 6,43–74,81 $\mu\text{g/L}$ a HPLC-MS/MS w zakresie 0,02–21,83 $\mu\text{g/L}$. Wykazano, że metoda HPLC-DAD jest wystarczająco selektywna i czuła do oznaczania siedmiu powszechnie stosowanych barwników sulfonowych w próbkach paszy oraz mięsa. Tymczasem, metoda HPLC-MS/MS służyła jako kolejny krok potwierdzający poprawność identyfikacji oznaczanych barwników [27].

PODSUMOWANIE

Substancje dodatkowe nie mają wartości odżywczej, ale nadają żywności określone cechy np. smakowe, czy zapachowe. Są to oczywiście substancje chemiczne

i jako takie wywołują określony wpływ na zdrowie człowieka. Barwniki spożywcze są jedną z podstawowych grup dodatków do żywności. Ich obecność znacząco wpływa na wygląd produktu, co w oczywisty sposób zwiększa popyt na ten produkt. Rynek barwników spożywczych, zatem stale się rozwija i z roku na rok wzrasta ilość spożywanych produktów z ich dodatkiem.

Ważnym zadaniem analizy żywności jest analiza jakościowa i ilościowa podstawowych składników odżywczych, przede wszystkim białek, sacharydów, lipidów, witamin, składników mineralnych, oznaczanie dodatków funkcjonalnych, wykrywanie zafałszowań i zanieczyszczeń żywności oraz rodzaju i ilości substancji szkodliwych dla zdrowia. Ostatecznie nie można wyznaczyć odpowiedniej konkretnej metody oznaczania barwników spożywczych ze względu na ich różnorodną strukturę i skład chemiczny. Jednak można wywnioskować, że dobrą metodą jest metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odpowiednio dobranymi parametrami w zależności od oznaczanego barwnika. Metoda ta charakteryzuje się dobrą czułością i selektywnością. Kolejną odpowiednią metodą może być TLC ze względu na szybkość oznaczenia badanej próbki. Podstawowe zalety chromatografii cienkowarstwowej to możliwość przechowywania płytek z rozdzielonymi substancjami a także możliwość obserwacji stopnia rozdzielania na każdym jego etapie i przerwanie procesu w dowolnym czasie jak również detekcja w każdym etapie rozwijania chromatogramu. W przypadku kolumny chromatograficznej, można dokonać detekcji i ocenić stopień rozdzielania dopiero po opuszczeniu kolumny przez składniki rozdzielanej mieszaniny.

UWAGI KOŃCOWE

Przegląd badań nad ilością barwników spożywczych w żywności wskazuje, że w większości przypadków związki te stosowane są na znacznie niższych stężeniach niż obowiązujące limity. Bezpieczeństwo zdrowotne tych związków podlega ocenie przez m.in. Europejski Urząd d/s Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Powstała w wyniku tego opiniowania lista zawiera kilkadziesiąt substancji, z których około 30% stanowią barwniki naturalne. Uznane są one za bezpieczne dla naszego zdrowia pod warunkiem przyjmowania ich z żywnością w ilości nieprzekraczającej podanych dla części substancji wartości ADI, czyli dopuszczalnego dziennego spożycia. Wspomniana lista nie jest zamknięta. Może być weryfikowana w miarę pojawiania się nowych faktów naukowych dotyczących wpływu danych substancji na zdrowie człowieka. Niepożądanе działanie barwników azowych stosowanych do barwienia produktów spożywczych doprowadziły do opracowania bardzo czułych i selektywnych metod analitycznych z powodzeniem stosowanych do ich oznaczania w różnych matrycach spożywczych. Przygotowanie próbki do badań obejmuje stosowanie różnych technik takich jak filtracja membranowa, ekstrakcja ciecż–ciecż (LLE), ekstrakcja do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), ekstrakcja ciecż–ciecż w otwartej kolumnie ekstrakcyjnej (OCLLE). Konieczność takiego

postępowania wynika ze złożoności produktów spożywczych. Stąd też rozwój prostych, selektywnych metod ekstrakcji wraz z połączeniem technik chromatograficznych i spektrofotometrycznych ma ogromne znaczenie.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L.E. Arnold, N. Lofthouse, E. Hurt, *Neurotherapeutics*, 2012, **9**(3), 599.
- [2] J.P. Harley, C.G. Matthews, P. Eichman, *Pediatrics*, 1978, **62**(6), 975.
- [3] S.L.J. Burgess, J.R. Stochelski, M.A. Kuczek, *Clin. Pediatr.*, 2014, **3**, 156.
- [4] T. Zou, P. He, A. Yasen, Z. Li. *Food Chem.*, 2013, **138**, 1742.
- [5] L.H. Ahlstrom, C. Sparr, E.E. Bjorklund. *TrAC*, 2005, **24**, 49.
- [6] B. Bateman, J.O. Warner, E. Hutchinson, T. Dean, P. Rowlandson, C. Gant, J. Grundy, C. Fitzgerald, J. Stevenson, *Arch. Dis. Child.*, 2004, **89**(6), 506.
- [7] F. Soponar, A. Cătălin Moț, C. Sârbu, *J. Chromatogr. A.*, 2008, **1188**, 295.
- [8] A. Rutkowski, *Przem. Spoż.*, 2003, **3**(57), 2.
- [9] L.H. Ahlström, C.S. Eskilsson, E. Björklund, *Tr AC*, 2005, **24**, 49.
- [10] K. Kozłowska, M. Jeruszka-Bielak, L. Piwowarczyk, A. Brzozowska, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **4**, 1157.
- [11] M. Ziarno, D. Zaręba, *Forum Mleczarskie Biznes.*, 2012, **3**, 24.
- [12] K. Yamjala, M.S. Nainar, N.R. Ramisetty, *Food Chem.*, 2016, **92**, 813.
- [13] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok, L. Porteous, E. Prince, *Lancet*, 2007, **370**(9598), 1560.
- [14] F. Rafii, J.D. Hall, C.E. Cerniglia, *Food Chem. Toxicol.*, 1997, **35**, 8.
- [15] C.O. Thompson, V.C. Trenerry, *J. Chromatogr. A*, 1995, **704**, 195.
- [16] H. Wu, J.B. Guo, L.M. Du, H. Tian, C.X. Hao, Z.F. Wang, J.Y. Wang, *Food Chem.*, 2013, **141**, 182.
- [17] F. Gosetti, P. Frascarolo, E. Mazzucco, V. Gianotti, M. Bottaro, M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1202**, 58.
- [18] K.S. Minioti, C.F. Sakellariou, N.S. Thomaidis, *Anal. Chim. Acta.*, 2007, **583**, 103.
- [19] X.H. Chen, Y.G. Zhao, H.Y. Shen, L.X. Zhou, S.D. Pan, M.C. Jin, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1346**, 123.
- [20] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Agr. Food Chem.*, 2003, **51**, 2121.
- [21] B.P. Harp, E. Miranda-Bermudez, J.N. Barrows, *J. Agr. Food Chem.*, 2013, **61**, 3726.
- [22] B. Tang, C. Xi, Y. Zou, G. Wang, X. Li, L. Zhang, D. Chen, J. Zhang, *J. Chromatogr. B*, 2014, **960**, 87.
- [23] M. Soylak, Y.E. Unsal, M. Tuzen, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 1183.
- [24] K. Farhadi, R. Maleki, N.M. Nezhad, N. Samadi, *Spectrosc Lett.*, 2010, **43**, 101.
- [25] M. Tuzen, M. Soylak, *J. Hazard. Mater.*, 2006, **129**, 266.
- [26] N. Yoshioka, K. Ichihashi, *Talanta*, 2008, **74**, 1408.
- [27] T. Zou, P. He, A. Yasen, Z. Li, *Food Chem.* 2013, **138**, 1742.
- [28] J. Kirschbaum, C. Krause, H. Brückner, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 572.
- [29] M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1103**, 170.
- [30] H. Sun, N. Sun, H. Li, J. Zhang, Y. Yang, *Food Anal. Method.*, 2013, **6**, 1291.
- [31] Y. Shen, X. Zhang, W. Prinyawiwatkul, Z. Xu, *Food Chem.* 2014, **157**, 553.
- [32] A.D. Kaur, U. Gupta, G.U. *Journal of Science*, 2012, **25**, 579.
- [33] M. Hajimahmoodi, M.R. Oveisi, N. Sadeghi, B. Jannat, E. Nilfroush, *Food Anal. Method.*, 2008, **1**, 214.

- [34] M.H. Sorouraddin, A. Rostami, M. Saadati, *Food Chem.*, 2011, **127**, 308.
- [35] F. Turak, M.U. Ozgur, *AOAC*, 2013, **96**, 1377.
- [36] D.E. Alipanahpour, M. Ghaedi, A. Asfaram, *Ultrason Sonochem.*, 2017, **34**, 27.
- [37] K. Rovina, S. Shafiqzaman, S.M. Shaarani, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2017, **47**, 4, 309.
- [38] V.Z. Atayan, E.G. Sumina, S.N. Shtykov, *J. Anal. Chem.*, 2003, **58**, 3.
- [39] J.A. Steele, *JAOAC*, 1984, **58**, 540.
- [40] F.I. Andrade, M.I.F. Guedes, I.G.P. Vieira, F.N.P. Mendes, P.A.S. Rodrigues, C.S.C. Maia, M.M.M. Ávila, L. Matos Ribeiro, *Food Chem.*, 2014, **157**, 193.
- [41] Y. Xu, *The Chemical Educator*, 1996, **1**(2), 11.
- [42] H. Qu, S.W. Linder, T.K. Mudalige, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 979.
- [43] H.Y. Huang, C.L. Chuang, C.W. Chiu, M.C. Chung, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 867.
- [44] L. Del Giovine, A.P. Bocca, *Food Control*, 2003, **14**, 131.
- [45] N.A. Zatar, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2007, **5**, 220.
- [46] M.C. Gennaro, E. Gioannini, S. Angelino, R. Aigotti, D. Giacosa, *J. Chromatogr. A.*, 1997, **767**, 87.
- [47] M.M. Jurcovan, E. Diacu, *Revista De Chimie*, 2014, **65**, 137
- [48] S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, *Dyes and Pigments*, 2013, **99**, 36.
- [49] M.A. Prado, L.F.V. Boas, M.R. Bronze, H.T. Godoy, *J. Chromatogr. A.*, 2006, **1136**, 231.
- [50] S. Yıldırım, A. Yaşar, *Food Anal. Method.*, 2018, **11**, 1581.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2018

**FAZY STACJONARNE DO CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ Z WBUDOWANYMI GRUPAMI
POLARNYMI – SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI
POWIERZCHNIOWE**

**CHEMICALLY BONDED STATIONARY PHASES WITH
INCORPORATED POLAR GROUPS FOR LIQUID
CHROMATOGRAPHY – THE SYNTHESIS AND
SURFACE PROPERTIES**

Szymon Bocian, Katarzyna Krzemińska

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

Abstract

Wprowadzenie

1. Chemicznie związane fazy stacjonarne o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, zawierających wiązania estrowe, fosfoestrowe oraz wiązanie fosforoamidowe
2. Fenyłowe fazy stacjonarne z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi
3. Dendrymerowe fazy stacjonarne do chromatografii jonowej
4. Właściwości powierzchniowe faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi – potencjał zeta na granicy faza stacjonarna/faza ruchoma
5. Procesy solwatacyjne na powierzchni faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Szymon Bocian – w 2011 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor- prof. dr hab. Bogusław Buszewski) a w 2016 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Rozprawa habilitacyjna została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Obecnie pracuje jako adiunkt w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jest laureatem Stypendium "Start" Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. Autor 60

publikacji z zakresu chromatografii cieczowej, syntezy faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej i opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.



Mgr Katarzyna Krzemińska – w 2014 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra chemii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie wykonuje doktorat w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki (promotor - dr hab. Szymon Bocian) i pracuje w Boruta-Zachem Biochemia Sp. z o.o.. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy syntezy i badania właściwości powierzchniowych nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej z wbudowanymi grupami polarnymi. Jest autorką czterech publikacji naukowych.

ABSTRACT

In recent years high performance liquid chromatography (HPLC) has gained a dominant position in the life sciences. The widespread use of this technique allows to perform an analysis of compounds which are used in various areas of human life. Currently, there are wide and fully untapped opportunities for synthesis of chromatographic packings with chemically bonded stationary phases.

Some of the liquid chromatographic analyses needs the application of water-rich mobile phases (more than 85% water or a buffer). In such condition the performance of hydrophobic stationary phases indicate that the bonded ligands might be collapsing. This problem could be solved by increasing of organic content in the mobile phase which should improve solvation and bring bonded ligands back to the original conformation. To avoid this procedure, which reduces the retention and selectivity of the separation, it is possible to apply stationary phases with incorporated polar groups mixed with the original alkyl ligands (polar embedded stationary phases). Another possibility is to add some polar groups during endcapping procedure (polar end-capped stationary phases). This produces variation in the bonding.

Chemically bonded stationary phases which include both hydrophobic and hydrophilic ligands are so-called mixed mode stationary phases. These materials can be used in reversed phase liquid chromatography (RPLC) and there is also a possibility to use them in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). They allow to separate polar and non-polar analytes.

Following the idea of green chemistry, especially green analytical chemistry, a series of stationary phases was synthesized. The obtained materials connect polar and hydrophobic groups in the structure of bonded ligands. These specific surface properties provide the stability of the stationary phase in pure water as a mobile phase. Surface properties of novel material were analyzed using various instrumental and chromatographic methods. Finally, the mixtures of various compounds were applied to test the separation selectivity of stationary phases in various chromatographic system, including purely aqueous conditions.

Keywords: liquid chromatography, stationary phases, polar embedded stationary phases, description of surface properties, solvation processes

Słowa kluczowe: chromatografia cieczowa, fazy stacjonarne, fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi, opis właściwości powierzchniowych, procesy solwatacyjne

WPROWADZENIE

Specyficzne i niespecyficzne oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną, analitytem i składnikami fazy ruchomej determinują retencję i selektywność w chromatografii cieczowej i technikach pokrewnych. Historycznie, w zależności od właściwości powierzchniowych fazy stacjonarnej, chromatografia cieczowa została podzielona na normalny (NP) i odwrócony układ faz (RP) [1, 2]. W normalnym układzie faz, faza stacjonarna jest polarna (stanowi ją np. niemodyfikowany żel krzemionkowy), z kolei faza ruchoma to najczęściej mieszanina rozpuszczalników o niskiej polarności. W odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej faza stacjonarna ma charakter hydrofobowy (najczęściej zawiera łańcuchy C18 związane do powierzchni krzemionki), a fazę ruchomą stanowi mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego o znacznej polarności, jak np. metanol i acetonitryl [3, 4]. W ostatnich latach opracowano nowy układ chromatografii cieczowej – chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [5]. HILIC stanowi połączenie układów NP i RP, które opiera się na zastosowaniu polarnej fazy stacjonarnej i fazy ruchomej, która zawiera więcej niż 60% (v/v) rozpuszczalnika organicznego, najczęściej acetonitrylu w połączeniu z wodą. Układ ten umożliwia rozdzielanie substancji polarnych. Typowymi fazami stacjonarnymi dla HILIC są więc materiały stosowane dotychczas w normalnym układzie faz, takie jak niemodyfikowana krzemionka, fazy diolowe, aminowe, ect. [6]. Niemniej jednak istnieje zapotrzebowanie na nowe fazy stacjonarne do HILIC, charakteryzujące się większą selektywnością niż dotychczas stosowane. Efekt ten można osiągnąć poprzez opracowywanie materiałów zawierających w swej strukturze różnego rodzaju grupy funkcyjne, których specyficzne oddziaływania z rozdzielanymi substancjami zaowocują zwiększoną selektywnością rozdzielania.

Dodatkowym powodem dla syntezy nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej są oczekiwania tzw. zielonej chemii [7]. Prowadzone są badania nad zmniejszeniem zużycia rozpuszczalników organicznych poprzez miniaturyzację układów chromatograficznych czy też wymiarów kolumn. Ponadto rozpatruje się zastąpienie toksycznych rozpuszczalników innymi, które mogą ulegać biodegradacji, np. etanol [8] lub zmianę warunków chromatograficznych w celu zastosowania wody bez dodatku modyfikatora organicznego jako fazy ruchomej [9, 10]. Z tego właśnie powodu istotnym wydaje się możliwość syntezy materiałów, które będzie można wykorzystać do prowadzenia oznaczeń chromatograficznych z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej.

Kolejnym „problemem” współczesnych metod chromatograficznych jest powszechne zastosowanie oktadecylowej fazy stacjonarnej (C18) w odwróconym układzie faz do analiz substancji polarnych. O ile odwrócony układ faz miał służyć do rozdzielania substancji hydrofobowych, zastosowanie fazy C18 do analiz związków polarnych narzuca konieczność znacznych modyfikacji fazy ruchomej, takich jak dodatek soli buforujących, kwasów, odczynników tworzących pary jonowe, jonowych środków powierzchniowo czynnych itd. Zastosowanie powyższych dodatków komplikuje skład fazy ruchomej powodując problemy z jej odtwarzalnością, a przez

to z powtarzalnością wyników, jak również skraca czas pracy kolumn chromatograficznych. W związku z czym wydaje się być uzasadnione wprowadzenie alternatywnych materiałów o zwiększonej polarności, których zastosowanie w odwróconym układzie faz umożliwiłoby rozdzielanie substancji o znacznej polarności.

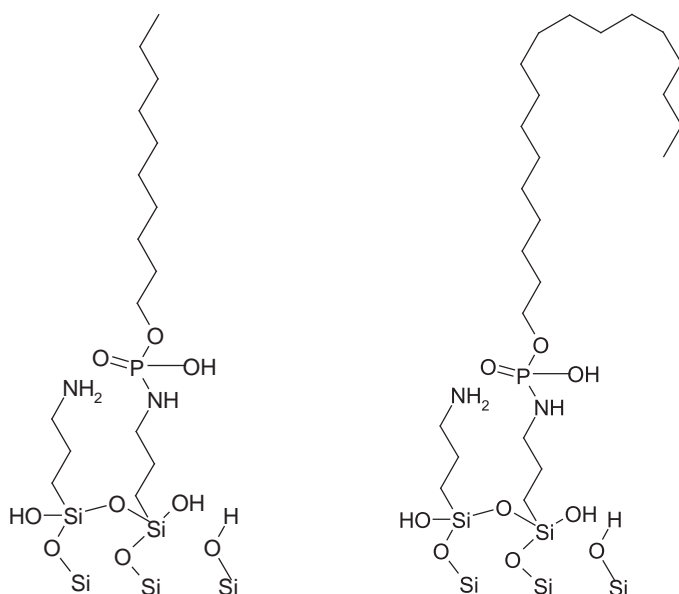
Obecnie znane są materiały chromatograficzne dla odwróconego układu faz, które w swojej strukturze zawierają polarne grupy funkcyjne wbudowane w łańcuch hydrofobowy (ang. *polar embedded*) lub dołączone są one do fazy stacjonarnej na etapie wtórnej silanizacji (ang. *polar endcapped*) [11]. Modyfikacje te miały zazwyczaj na celu zwiększenie stabilności materiału w fazie ruchomej o zwiększonej zawartości wody. Przykładem takiego wypełnienia mogą być fazy *N*-alkilamidowe [12, 13], jak również komercyjnie dostępne materiały, dla których producenci nie podają rodzaju zastosowanych grup funkcyjnych. Wprowadzenie nowych faz stacjonarnych o specyficznych właściwościach jest jednocześnie powiązane z koniecznością pełnego/dokładniejszego opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących na granicy faz: faza stacjonarna/faza ruchoma w układzie chromatograficznym.

Z wyżej wymienionych powodów niniejsze badania miały na celu syntezę nowych faz materiałów oraz opis procesów w chromatografii cieczowej zachodzących na powierzchni fazy stacjonarnej. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi wykazują odmienne właściwości w stosunku do klasycznych faz alkilowych. Różnice te dotyczą głównie zdolności do pracy w szerokim zakresie stężeń rozpuszczalnika organicznego w fazach ruchomych, w tym również w warunkach czystej wody oraz w układzie HILIC. Stąd też podjęto próby syntezy nowego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane grupy funkcyjne oraz dokonano opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.

1. CHEMICZNIE ZWIĄZANE FAZY STACJONARNE O WŁAŚCIWOŚCIACH HYDROFOBOWO-HYDROFILOWYCH, ZAWIERAJĄCYCH WIĄZANIA ESTROWE, FOSFOESTROWE ORAZ WIĄZANIE FOSFOROAMIDOWE

Ideą przewodnią badań była synteza nowych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych. Właściwości powierzchniowe takich materiałów umożliwiają ich zastosowanie zarówno w odwróconym układzie faz i w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Specyfika dedykowana tym wypełnieniom przejawia się w ich unikalnych właściwościach powierzchniowych powodujących lepszą selektywność rozdzielania i stabilność w warunkach wysokiej zawartości wody w składzie fazy ruchomej. Nadrzędnym celem prowadzonych badań było opracowanie chemicznie związanych faz stacjonarnych, które w obrębie jednej struktury zawierają zarówno grupy hydrofobowe (alkilowe, aryłowe, itp.), jak i grupy polarne. Główne przeznaczenie tych adsorbentów to analiza związków chemicznych o znacznej polarności.

Pierwszy otrzymany nowatorskim materiałem chromatograficznym stanowią fazy *N,O*-dialakilofosforoamidowe [14, 15]. Jako nośnik do syntezy wykorzystano żel krzemionkowy ze względu na jego bardzo dobrze poznane i opisane właściwości chromatograficzne [16, 17]. Otrzymanie tego materiału miało przebieg stopniowy. W pierwszym etapie żel krzemionkowy został zmodyfikowany grupami aminopropylowymi [18, 19]. Następnie do grup aminowych poprzez grupę fosforanową (wprowadzaną jako tlenochlorek fosforu) przyłączono łańcuch organiczny (pochodzący z alkoholu). Tak otrzymany materiał chromatograficzny zawierał w swej strukturze hydrofobowy łańcuch węglowodorowy (dekanowy C10 lub oktadecylowy C18 w zależności od zastosowanego alkoholu), oraz polarną grupę fosforanową wbudowaną w łańcuch a także grupy aminowe, związane z grupą fosforanową, jak i w formie wolnej. Struktury opracowanych faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Struktury faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych

Figure 1. Structures of *N,O*-dialkylphosphoramidate stationary phases

Kluczowymi parametrami charakteryzującymi fazę stacjonarną są hydrofobowość i polarność (mierzona jako np. aktywność silanolowa). W tym celu zastosowano test opracowany przez Galushko [20]. Następnie sprawdzono możliwości zastosowania otrzymanych materiałów w odwróconym układzie faz chromatografii ciekowej. Niezależnie od obecności w strukturze *N,O*-dialkilofosforoamidowych faz stacjonarnych polarnych grup funkcyjnych (aminowych i fosforanowych), wypełnienia te spełniają warunki stawiane chemicznie związanym fazom stacjonarnym do chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz [14]. Zastosowanie

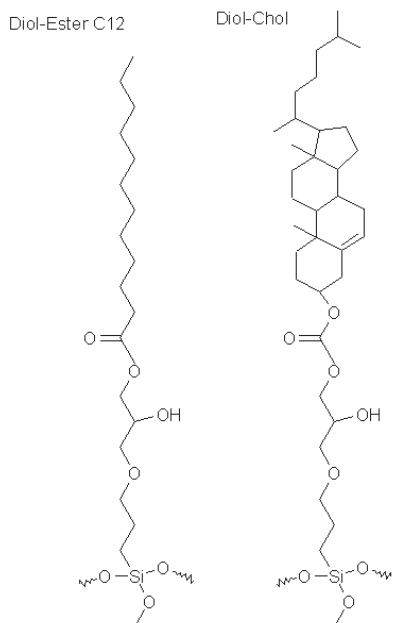
otrzymanych materiałów umożliwiło rozdzielanie alkilowych pochodnych benzenu, co świadczy o dobrej selektywności metylenowej. Ponadto używanie tych materiałów umożliwi również rozdzielanie wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Warto wspomnieć, iż istnieje możliwość prowadzenia analiz stosując zdecydowanie mniejszą ilość rozpuszczalnika organicznego w składzie fazy ruchomej (50% lub 60% objętościowych) niż stosując tradycyjne fazy oktadecylowe. Selektywność fenyłowa wyznaczona dla tych materiałów w stosunku do konwencjonalnych faz C18 odznacza się niższą wartością. Wynika to z faktu, iż gęstość pokrycia powierzchni fazy stacjonarnej chemicznie związanymi ligandami jest niższa. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż poprawę parametrów chromatograficznych, np. wyższą sprawność, fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe wykazują kiedy składnikiem binarnej wodno-organiczej fazy ruchomej jest metanol a nie acetonitryl jak w przypadku faz oktadecylowych. Wynika to z preferencyjnej solwatacji polarnych grup funkcyjnych – głównie aminowych, przez metanol [15]. Fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowe w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej (bez dodatku rozpuszczalnika organicznego) również są bardzo dobrze solwatowane. W takim układzie możliwe było ich zastosowanie do rozdzielania mieszaniny nukleozydów. Otrzymanie materiału umożliwiającego wykonywanie rozdzieleń chromatograficznych w warunkach czystej wody jest niewątpliwie pożądane z kilku powodów. Przede wszystkim wpływa to na wartości ekonomiczne jak i ekologiczne, poprzez ograniczenie zużycia toksycznych rozpuszczalników organicznych.

Interesującą własnością faz *N,O*-dialkilofosforoamidowych są właściwości pseudomembranowe [21], które umożliwiają zastosowanie chromatografii cieczowej do badania oddziaływań substancji z błoną biologiczną [22–25]. Dotychczas, jako materiał referencyjny w tego typu obserwacjach była stosowana faza IAM (ang. *Immobilized Artificial Membrane*) [26, 27]. Eksperyment przeprowadzony dla czterech grup związków o różnym charakterze chemicznym (nukleozydów i zasad azotowych, alkilowych pochodnych benzenu, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz flawonoidów) wykazał bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem $\log k_w$ otrzymanym z wykorzystaniem kolumny IAM oraz fazą stacjonarną *N,O*-dialkilofosforoamidową z łańcuchem C18. Zaobserwowano również bardzo wysoką korelację pomiędzy parametrem $\log k_w$ a parametrem $\log P$, stanowiącym o hydrofobowości substancji. Otrzymane wyniki świadczą o zbliżonych właściwościach powierzchniowych tych materiałów, jak również potwierdzają założenie, że otrzymana faza stacjonarna, dzięki kombinacji odpowiednio dobranych grup funkcyjnych, symuluje w równie dobry sposób właściwości błony biologicznej. Badania potwierdzają również możliwość zastosowania otrzymanej fazy stacjonarnej do przewidywania oddziaływań substancji z błoną biologiczną ze zbliżoną skutecznością, jak obecnie stosowana faza IAM. Należy dodać, że niewątpliwą zaletą fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowej w stosunku do IAM jest fakt, iż posiada ona mniej skomplikowaną strukturę przez co jej synteza jest łatwiejsza. [21].

Kolejnym zastosowaniem fazy *N,O*-dialkilofosforoamidowej jest rozdzielanie fosfolipidów względem ich polarności w układzie RP HPLC. Pomiaru wykonano

w układzie off-line dwuwymiarowej chromatografii cieczowej [28]. Ze względu na ortogonalne właściwości w porównaniu do fazy oktadecylowej, otrzymany układ dwuwymiarowy wykazał bardzo dobrą rozdzielczość względem fosfolipidów. Faza *N,O*-dialkilofosforoamidowa zastosowana została również z powodzeniem w układzie HILIC [29].

Kolejną grupę materiałów z wbudowanymi grupami polarnymi stanowią fazy estrowe i fosfoestrowe. W przypadku syntezy faz z wiązaniem estrowym [30] oraz z wiązaniem fosfoestrowym [31], materiałem wyjściowym do syntezy była krzemionka zmodyfikowana silanem zawierającym grupy hydroksylowe (diolowe). W przypadku faz estrowych modyfikację powierzchni wykonano poprzez reakcję z chlorkiem kwasu dodecylowego lub chloromrówczanem cholesterolu. Otrzymane w ten sposób chemicznie związane fazy stacjonarne zawierające łańcuch dodekanyowy (Diol-Ester C12) lub cząsteczkę cholesterolu (Diol-Chol) związane z nośnikiem poprzez wiązanie estrowe. Struktury estrowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 2.



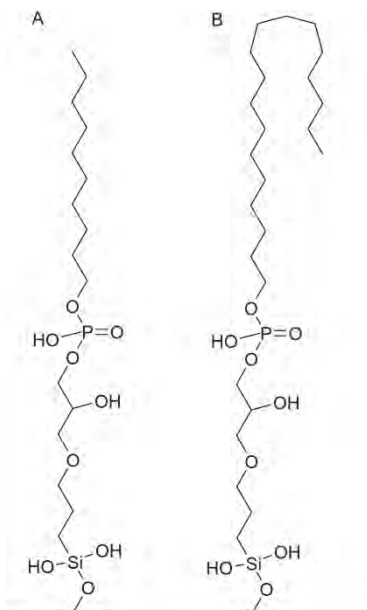
Rysunek 2. Struktury estrowych faz stacjonarnych
Figure 2. Structures of ester bonded stationary phases

Otrzymane fazy estrowe wpisują się doskonale w ideę materiałów, zawierających wbudowane grupy polarne w strukturę związanych ligandów. Jednocześnie, nieprzereagowane ligandy diolowe stanowią dodatkowe polarne centra aktywne.

Modelowanie molekularne otrzymanych materiałów, potwierdza zróżnicowanie właściwości powierzchniowych z punktu widzenia polarności i hydrofobowości. W otrzymanych fazach stacjonarnych można wyróżnić regiony oddziaływań polar-

nych przy powierzchni nośnika i w obrębie grup diolowych a także region oddziaływań hydrofobowych. W konsekwencji w zależności od zastosowanego składu fazy ruchomej możliwe jest rozdzielanie zarówno cząsteczek hydrofobowych, jak i polarnych [30]. Właściwości te powodują, iż fazy te można zastosować do rozdzielania m.in. alkilowych pochodnych benzenu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Świadczy to o dostatecznej hydrofobowości materiału, aby mógł on być zastosowany w odwróconym układzie faz chromatografii cieczonej [30]. Ponadto materiały te umożliwiają również rozdzielanie substancji polarnych w układzie RP oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej.

Żel krzemionkowy modyfikowany ligandami diolowymi wykorzystano również jako nośnik do syntezy faz fosfoestrowych [31]. Materiały te otrzymano poprzez modyfikację nośnika diolowego tlenochlorkiem fosforu i długołańcuchowym alkoholem. Łańcuch alkiowy (C10 lub C18) związany był z nośnikiem diolowym poprzez grupę fosforanową tworzącą dwa wiązania estrowe. Struktury otrzymanych faz przedstawia Rysunek 3.



Rysunek 3. Struktury fosfo-estrowych faz stacjonarnych z różnymi długościami łańcuchów alkiowych: A-C10 i B-C18

Figure 3. Structures of phospho-ester stationary phases with various length of alkyl ligands: A-C10 and B-C18

W porównaniu do faz estrowych, obecność grupy fosforanowej w strukturze związanego ligandu w znacznym stopniu wpływa na zwiększenie polarności powierzchni chemicznie związanej fazy stacjonarnej. Spotęgowanie polarności skutkuje zmianą procesów solwatacyjnych zachodzących na powierzchni adsorbentu podczas analiz chromatograficznych. W rezultacie obecność grupy fosfora-

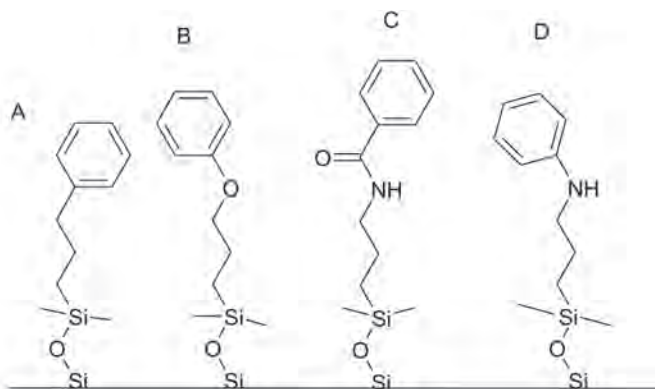
nowej powoduje silną adsorpcję wody, czego efektem jest tworzenie poliwarstwy cząsteczek wody, najprawdopodobniej od powierzchni nośnika do wysokości grup fosforanowych. W wyniku preferencyjnej adsorpcji wody możliwe jest zastosowanie fosfoestrowych faz stacjonarnych w chromatografii oddziaływań hydrofilowych [31]. Zastosowanie fazy z Diol-P-C18 w układzie HILIC umożliwi rozdzielenie m.in. nukleozydów i zasad azotowych.

Pomimo znacznej polarności faz fosfoestrowych, ich hydrofobowości są wystarczające do zastosowania ich w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej. Materiały te w układzie RP wykazują dobrą selektywność metylenową, jak również umożliwiają rozdzielenie wybranych WWA. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż mechanizm rozdzielania w układzie RP dla faz estrowych, fosfoestrowych i *N,O*-dialkilo-fosforanowych jest odmienny w stosunku do typowych faz alkilowych. Obecność polarnych grup funkcyjnych powoduje silną adsorpcję wody i wytworzenie warstwy wodnej, nazywanej poduszką hydroilową [12, 32]. Konsekwencją jej obecności jest fakt, iż polarne grupy funkcyjne stają się niedostępne dla hydrofobowych analitów, które oddziałują jedynie z hydrofobowymi grupami fazy stacjonarnej.

Podsumowując, odpowiedni dobór hydrofobowych i polarnych grup funkcyjnych w znaczący sposób wpływa na proces solwatacji powierzchni fazy stacjonarnej w układzie chromatograficznym. Poprzez odpowiednie modyfikacje powierzchni, możliwe jest otrzymanie materiałów umożliwiających ich szerokie zastosowanie chromatograficzne zarówno w układzie RP, jak i HILIC oraz w warunkach czystej wody jako fazy ruchomej.

2. FENYLOWE FAZY STACJONARNE Z WBUDOWANYMI POLARNYMI GRUPAMI FUNKCYJNYMI

Wykonano również syntezę serii faz stacjonarnych zmieniając polarną grupę funkcyjną wbudowaną w krótki łańcuch alkilowy (propylowy), zachowując niezmienną grupę hydrofobową, którą był pierścień fenyłowy [33]. Fazy fenyłowe są znane i dostępne komercyjnie [34–38], ale celem podjętych badań było określenie wpływu polarnych grup funkcyjnych na retencję i selektywność przy zachowaniu stałego fragmentu hydrofobowego związanych ligandów. Seria materiałów fenyłowych obejmowała następujące fazy stacjonarne: fenylo-propylową, fenoksy-propylową, fenylo-aminową i fenylo-amidową. Dla wszystkich materiałów otrzymano bardzo zbliżone wartości gęstości pokrycia powierzchni ligandami. Umożliwiło to wnioskowanie, że za zmiany retencji i selektywności otrzymanych materiałów odpowiada rodzaj wbudowanych polarnych grup funkcyjnych, a nie są one efektem różnej gęstości pokrycia powierzchni nośnika. Struktury otrzymanych materiałów fenyłowych przedstawia Rysunek 4.



Rysunek 4. Fenylove fazy stacjonarne: fenylo-propylova (A), fenoksy-propylova (B), fenylo-amidova (C) i fenylo-aminova (D)

Figure 4. Phenyl-bonded stationary phases: phenyl-propyl (A), phenoxy-propyl (B), phenyl-amide (C) and phenyl-amine (D)

Obecność grup funkcyjnych o charakterze polarnym – aminowej i amidowej, zmniejsza w sposób istotny hydrofobowość fazy stacjonarnej, a w rezultacie obserwowana jest mniejsza retencja dla hydrofobowych analitów na tych fazach. Szczególnie uwidacznia się to wtedy, gdy modyfikatorem organicznym fazy ruchomej jest metanol. Nieco odmienna sytuacja miała miejsce w przypadku zastąpienia metanolu acetonitrylem. Mniejsze powinowactwo acetonitrylu do polarnych grup funkcyjnych (aminowej i amidowej), powoduje względnie słabszą siłę elucyjną acetonitrylu, co skutkuje zbliżoną retencją i mniejszym zróżnicowaniem chemicznie związanych faz stacjonarnych. Zmiana modyfikatora organicznego wpływała znacząco również na selektywność metylenową i selektywność fenyłową otrzymanych materiałów, co potwierdza tezę, że dobór odpowiednich grup funkcyjnych w strukturze fazy stacjonarnej umożliwia sterowanie procesem solwatacji. W wyniku tych zmian obserwuje się zmiany siły elucyjnej rozpuszczalników względem szeregu eluotropowego [33].

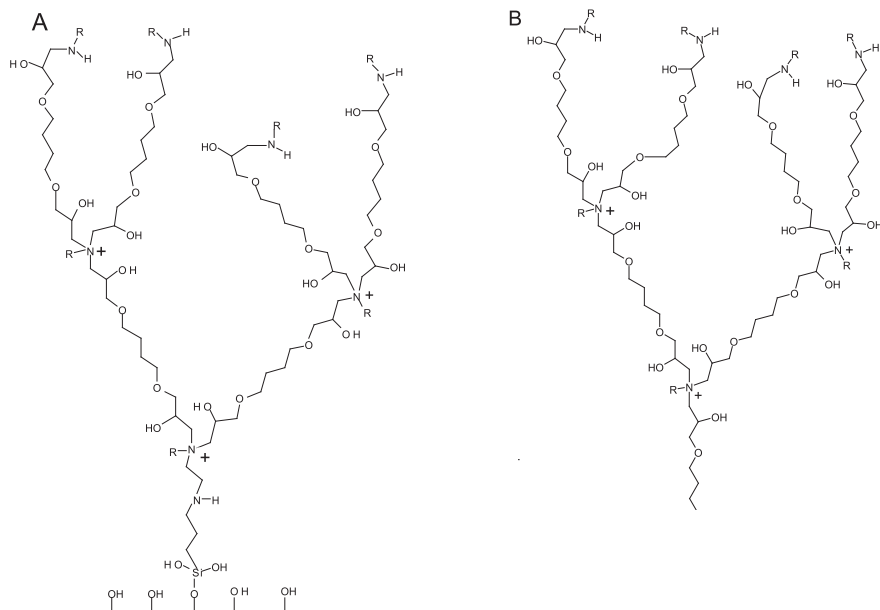
W przypadku zastosowania serii fenyłowych faz stacjonarnych do rozdzielania wybranych WWA, znacznie większą retencję zaobserwowano na fazach: fenylo-propylowej i fenoksy-propylowej. Obecność aminowej i amidowej grupy funkcyjnej znacznie zmniejszała retencję, jednak obniżenie zawartości procentowej modyfikatora organicznego w fazie ruchomej umożliwiało uzyskanie satysfakcjonującej selektywności rozdzielania. Dodatkowo należy wskazać fakt, iż fazy z polarnymi grupami umożliwiały uzyskanie podobnych parametrów rozdzielania przy mniejszym zużyciu rozpuszczalników organicznych w porównaniu z fazą stacjonarną fenylo-propylową [33].

3. DENDRYMEROWE FAZY STACJONARNE DO CHROMATOGRAFII JONOWEJ

Chromatografia jonowa jest bardzo szybko rozwijającą się techniką analityczną. Rozwój ten powiązany jest z otrzymywaniem nowych faz stacjonarnych zawierających centra aniono- i kationowymienne. Z tego też powodu podjęto prace nad otrzymaniem dendrymerowej anionowymiennej fazy stacjonarnej syntetyzowanej na bazie żeluz krzemionkowego do chromatografii jonowej [39, 40]. Pierwotna metoda syntezy dendrymerowej fazy anionowymiennej wewnątrz kapilar kwarcowych została opracowana przez Pohl'a i in. [41–43]. W dalszych pracach została rozwinięta metodologię syntezy fazy dendrymerowej na powierzchni sferycznego porowatego polimeru [44–46].

Otrzymanie dendrymeru zawierającego czwartorzędowe grupy amoniowe jako centra anionowymienne polega na kondensacji epoksydu z aminą. W przypadku syntezy materiału na powierzchni nośników polimerowych warstwa wiążąca do powierzchni tworzona była przez pokrywanie powierzchni polimerem. Wadą tej metody był brak wiązań kowalencyjnych między warstwą polimeru a powierzchnią nośnika. Powodowało to odrywanie się fazy stacjonarnej przy dużych wartościach przepływu fazy ruchomej. Stąd też podjęto prace nad kowalencyjnym związaniem dendrymerowych ligandów do powierzchni żeluz krzemionkowego. Cel ten osiągnięto poprzez silanizację powierzchni krzemionki ligandem zawierającym dwie grupy aminowe, który wcześniej został zastosowany do syntezy fazy cholesterolowej. Przyłączone do powierzchni grupy aminowe stały się punktem wyjściowym do polikondensacji z epoksydem [40]. Dalszy etap syntezy dendrymeru był analogiczny jak w przypadku na nośniku polimerowym. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych przedstawia Rysunek 5.

Tworzenie dendrymeru o zwiększonej liczbie warstw powoduje zmiany w mechanizmie retencji. W przypadku krótkich ligandów retencja jest wynikiem oddziaływań jonów z fazy ruchomej z centrami jonowymiennymi na powierzchni fazy. W przypadku wydłużania ligandu i zapełniania porów, centra jonowymienne znajdują się na całej długości ligandów powodując migrację jonów pomiędzy ligandami w stronę powierzchni nośnika. Proces ten w znaczny sposób zwiększa parametry retencyjne. Tak więc do celów analitycznych wystarczające są materiały o 3 warstwach dendrymeru. Zapewniają one dobrą selektywność przy krótkim czasie analizy [40].



Rysunek 5. Struktury dendrymerowych faz stacjonarnych: A – na nośniku krzemionkowym, B – na nośniku polimerowym

Figure 5. Structures of dendrimer stationary phases: A – using silica gel support, B – using polymer support

Porównując fazy otrzymane na nośniku krzemionkowym z analogicznymi materiałami syntetyzowanymi na bazie polimeru, znacznie lepsze parametry analityczne (sprawność, symetria pików) uzyskano dla faz krzemionkowych. Wynika to z lepszych parametrów geometrycznych nośnika krzemionkowego, zapewniającego znacznie poprawienie sprawności. Umożliwiają one rozdzielanie 9 anionów nieorganicznych w czasie 20 minut [40].

Dendrymerowe fazy anionowymienne zastosowano w analizie monofosforanów nukleotydów [40]. Retencja i rozdzielczość monofosforanów nukleotydów zwiększała się wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru (od 1 do 4 warstw). W przypadku anionów nieorganicznych, do rozdzielania fluorków, chlorków, bromków, azotanów(III) i azotanów(V) potrzebna była faza stacjonarna z dwoma warstwami dendrymeru. W celu rozdzielania 4 monofosforanów nukleotydów wystarczająca okazała się faza ze związaną tylko warstwą. Podane przykłady nie wykluczają aplikacji, dla których wymagana będzie większa liczba warstw dendrymeru, którą można w prosty sposób uzyskać opracowaną metodą.

W celu pełnej charakterystyki otrzymanych faz stacjonarnych do chromatografii jonowej zarówno na nośniku polimerowym, jak i krzemionkowym zastosowano nowatorską metodę pomiaru potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer [39]. Potencjał zeta jest wartością charakterystyczną dla powierzchni pozostającej w kontakcie z roztworem. W poniższych rozważaniach dla uproszczenia podawany

jest termin „potencjał zeta fazy stacjonarnej”. Zgodnie z oczekiwaniami, chemicznie związane fazy stacjonarne obdarzone trwałym ładunkiem dodatnim wykazały dodatnie wartości potencjału zeta, podczas gdy nośniki (polimerowy i krzemionkowy) wykazywały ujemne wartości potencjału zeta. Zaobserwowano również wzrost wartości potencjału zeta wraz ze wzrostem liczby warstw dendrymeru, co jest efektem większej ilości trwałych ładunków dodatnich w strukturze związanych ligandów. Wzrost ten nie jest jednak liniowy. Potencjały zeta dendrymerowych faz anionowymiennych zmieniały się również wraz ze zmianą eluentu (rosły w kolejności: NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃). Dodać należy, że w przypadku faz otrzymanych na nośniku krzemionkowym nie można stosować faz ruchomych o alkalicznym pH, stąd pewne ograniczenia zarówno dla pomiarów potencjałów zeta, jak i dla zastosowania analitycznego otrzymanych materiałów. Nie zmienia to jednak faktu, że dla materiałów otrzymanych na nośniku krzemionkowym można zastosować szereg faz ruchomych umożliwiających rozdzielenie anionów nieorganicznych [40].

Pomiar potencjału zeta faz jonowymiennych wydaje się być kluczowym parametrem ich charakterystyki. Mierzona wartość potencjału na granicy faza stacjonarna – roztwór wydaje się być siłą przyciągającą jony z roztworu. Ponadto, rozkład potencjału zeta daje dodatkową wiedzę na temat homogeniczności ziaren chemicznie modyfikowanej fazy stacjonarnej [39]. Dla faz stacjonarnych nie posiadających trwałych ładunków w strukturze związanych ligandów również można zastosować pomiar potencjału zeta.

4. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE FAZ STACJONARNYCH Z WBUDOWANYMI GRUPAMI POLARNYMI – POTENCJAŁ ZETA NA GRANICY FAZA STACJONARNA / FAZA RUCHOMA

Pomiar potencjału zeta zastosowany do charakterystyki powierzchniowej chemicznie związanych faz stacjonarnych pozwala na uzyskanie informacji, które nie są dostępne dla innych technik [47–50]. Poza zastosowaniem pomiaru potencjału zeta do charakterystyki faz do chromatografii jonowej, możliwe jest również zastosowanie tej techniki do charakteryzowania typowych faz stacjonarnych dla normalnego i odwróconego układu faz [51]. Szczególnie interesujące wydają się być badania potencjałów zeta chemicznie związanych faz stacjonarnych zawierających w swej strukturze polarne grupy funkcyjne [52]. Pośród testowanej grupy chemicznie związanych faz stacjonarnych znajdowały się fazy alkilowe, fenyłowe, fazy z wiązaniem amidowym, fosforoamidowym oraz fazy aminowe. Pomiar potencjału zeta z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer podzielił testowane materiały na fazy z dodatnią i ujemną wartością potencjału zeta. Dla większości faz stacjonarnych potencjał zeta ma wartość ujemną. Jest to związane z obecnością na powierzchni krzemionki ujemnych ładunków pochodzących z jonizacji grup silanolowych oraz ligandów nieobdarzonych ładunkiem. Dodatkowo wartości potencjałów zeta wykazały fazy aminowe i fazy posiadające resztkowe grupy aminowe nie zmodyfikowane na etapie

syntezy. Należy zwrócić uwagę, że pomiary wykonywane były w rozpuszczalnikach organicznych i ich mieszaninach z wodą. Zatem przeprowadzone badania wykazały, że grupy aminowe obecne w strukturze chemicznie związanych faz stacjonarnych w warunkach RP HPLC mają przyłączony proton i mogą oddziaływać jak słabe wymieniacze jonowe, modyfikując mechanizm retencji wielu analitów. Porównując wpływ modyfikatorów organicznych faz ruchomych na potencjał zeta można zauważyć, że w środowisku metanolu obserwuje się wyższe (bardziej dodatnie) wartości potencjału zeta, a w przypadku zastosowania acetonitrylu wartości te są niższe (bardziej ujemne) [52].

5. PROCESY SOLWATACYJNE NA POWIERZCHNI FAZ STACJONARNYCH Z WBUDOWANYMI GRUPAMI POLARNYMI

W przypadku faz o właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych istotne są badania powiązane z tematyką procesów solwatacyjnych, szczególnie w układzie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Przeprowadzono pomiary adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu, ponieważ wiadomym było, że proces ten pełni istotną rolę w mechanizmie retencji. Przeprowadzone badania potwierdzają, że na fazach stacjonarnych stosowanych w układzie HILIC tworzy się warstwa zaadsorbowanej wody, a retencja analitów odbywa się na zasadzie podziału substancji między fazę ruchomą, a warstwę zaadsorbowanej wody. Dzięki tym badaniom udało się uzyskać korelację pomiędzy ilością zaadsorbowanej wody na powierzchni fazy stacjonarnej, a retencją analitu [53]. Opracowana metoda pomiaru adsorpcji wody z roztworu acetonitrylu posłużyła również do opracowania testu przydatności fazy stacjonarnej dla układu HILIC.

Opracowaną metodę zastosowano również do charakterystyki chemicznie związanych faz stacjonarnych, w których grupy silanolowe zostały zastąpione wiązaniem krzem-wodór (Si-H). Materiały syntezowane w ten sposób także znajdują zastosowanie w układzie HILIC [54]. Do pełnej charakterystyki nowych materiałów chromatograficznych wykorzystano również mikrokalorymetryczne pomiary ciepła adsorpcji rozpuszczalników, na podstawie których możliwe jest obliczenie ilości centrów na powierzchni fazy stacjonarnej, które są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych [55]. Przeprowadzone badania dowiodły, że pomiar procesów solwatacyjnych, zarówno poprzez wyznaczenie izoterm adsorpcji jak i mikrokalorymetryczne pomiary ciepła zwilżania są bardzo dobrymi metodami do charakteryzowania powierzchni chemicznie związanych faz stacjonarnych w układzie HILIC [53, 54].

UWAGI KOŃCOWE

Fazy stacjonarne z wbudowanymi polarnymi grupami funkcyjnymi stanowią interesującą alternatywę dla tradycyjnych wypełnień chromatograficznych. Oferują one specyficzne właściwości powierzchniowe, które mogą umożliwić selektywne rozdzielanie związków organicznych, również takich o znaczącej polarności. Dodatkowo, obecność polarnych grup funkcyjnych powoduje, że materiały te mogą być stosowane w znacznie szerszym składzie faz ruchomych, np. zarówno w układzie odwróconych faz chromatografii ciekowej jak i w chromatografii oddziaływań hydrofilowych. Prowadzone badania pokazały, że ich zastosowanie umożliwia również rozdzielanie polarnych substancji z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej.

PIŚNIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam 1979.
- [2] U.D. Neue, *HPLC Columns. Theory, technology and practice*, Wiley-VCH, New York 1997.
- [3] B. Buszewski, K. Krupczyńska, R.M. Gadzała-Kopciuch, G. Rychlicki, R. Kaliszan, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 313.
- [4] M. Jaroniec, *J. Chromatogr. A*, 1993, **656**, 37.
- [5] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 1990, **449**, 177.
- [6] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 231.
- [7] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupka, T. Górecki, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1370**, 1.
- [8] P. Sandra, K. Sandra, A. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, *LC-GC Eur.*, 2010, **23**, 242.
- [9] K. Hartonen, M.-L. Riekkola, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 2008, **27**, 1.
- [10] W. Hu, K. Hasebe, D.M. Reynolds, H. Haraguchi, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **353**, 143.
- [11] J. Layne, *J. Chromatogr. A*, 2002, **957**, 149.
- [12] B. Buszewski, J. Schmid, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 1991, **552**, 415.
- [13] B. Buszewski, M. Jezierska-Świtła, S. Kowalska, *J. Chromatogr. B*, 2003, **792**, 279.
- [14] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 731.
- [15] S. Bocian, M. Paca, B. Buszewski, *Analyst*, 2013, **138**, 5221.
- [16] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 1997, **779**, 29.
- [17] J. Nawrocki, B. Buszewski, *J. Chromatogr.*, 1988, **449**, 1.
- [18] B. Buszewski, M. Jezierska, M. Wełniak, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A*, 1999, **845**, 433.
- [19] B. Buszewski, M. Jezierska, B. Ostrowska-Gumkowska, *Mater. Chem. Phys.*, 2001, **72**, 30.
- [20] S.V. Galushko, *Chromatographia*, 1993, **36**, 39.
- [21] S. Bocian, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2015, **990**, 198.
- [22] A. Taillardat-Bertschinger, P.-A. Carrupt, F. Barbato, B. Testa, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 655.
- [23] S. Ong, S. Cai, C. Bernal, D. Rhee, X. Qiu, C. Pidgeon, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 782.
- [24] S. Ong, H. Liu, X. Qiu, G. Bhat, C. Pidgeon, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 755.
- [25] M. De Vrieze, D. Verzele, R. Szucs, P. Sandra, F. Lynen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 6179.
- [26] R. Kaliszan, A. Kaliszan, I.W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 505.
- [27] F. Barbato, G. di Martino, L. Grumetto, M.I. La Rotonda, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, **22**, 261.
- [28] J. Walczak, S. Bocian, B. Buszewski, *Food Anal. Methods*, 2015, **8**, 661.

- [29] K. Krzemińska, S. Bocian, *Analyst*, 2018, **143**, 1217.
- [30] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Talanta*, 2014, **131**, 684.
- [31] S. Bocian, B. Buszewski, *Talanta*, 2015, **143**, 35.
- [32] R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1273.
- [33] S. Bocian, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 3435.
- [34] R.M. Gadzała-Kopciuch, M. Kluska, M. Welniak, W. Kroszczyński, B. Buszewski, *Polish J. Environ. Studies*, 1999, **8**, 383.
- [35] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1069**, 217.
- [36] J. Horak, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1045**, 43.
- [37] K. Kimata, K. Hosoya, H. Kuroki, N. Tanaka, J.R. Barr, P.C. Mc-Clure, D.G.J. Patterson, E. Jakobsen, A. Bergman, *J. Chromatogr. A*, 1997, **786**, 237.
- [38] B. Buszewski, Z. Suprynowicz, R. Lodkowski, R. Nasuto, K. Szymańska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1983, **28**, 731.
- [39] B. Buszewski, M. Jaćkowska, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.*, 2013, **36**, 156.
- [40] S. Bocian, S. Studzińska, B. Buszewski, *Talanta*, 2014, **127**, 133.
- [41] P. Kubań, P.K. Dasgupta, C. Pohl, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 5462.
- [42] C. Pohl, C. Saini, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1213**, 37.
- [43] M.B. Smith, J. March, *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, Wiley-Interscience Publication, New York 2001.
- [44] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Gawdzik, M. Grochowicz, B. Buszewski, *Matter. Chem. Phys.*, 2011, **130**, 644.
- [45] B. Buszewski, M. Jaćkowska, S. Bocian, P. Kosobucki, B. Gawdzik, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 601.
- [46] M. Jaćkowska, S. Bocian, B. Buszewski, *Analyst*, 2012, **137**, 4610.
- [47] O. Stern, *Z. Elektrochem.*, 1924, **30**, 508.
- [48] D.J. Shaw, *Electrophoresis*, Academic Press, London 1969.
- [49] F. Foret, P. Bocek, *Adv. Electrophoresis*, 1990, **3**, 272.
- [50] K. Salomon, D.S. Burgi, J.C. Helmer, *J. Chromatogr.*, 1991, **559**, 69.
- [51] B. Buszewski, S. Bocian, E. Dziubakiewicz, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 1529.
- [52] S. Bocian, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 2625.
- [53] S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1278**, 89.
- [54] S. Bocian, G. Rychlicki, M. Matyska, J. Pesek, B. Buszewski, *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, **416**, 161.
- [55] B. Buszewski, S. Bocian, G. Rychlicki, M. Matyska, J. Pesek, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1232**, 43.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 czerwca 2018

CHEMIA BIOORTOGONALNA
– NOWA PERSPEKTYWA DLA CHEMII ORGANICZNEJ
BIOORTHOOGONAL CHEMISTRY – NEW PERSPECTIVE
FOR ORGANIC CHEMISTRY

Katarzyna Miszczak

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
e-mail: katarzyna.edyta.miszczak@student.uj.edu.pl

*Praca wyróżniona w konkursie Krakowskiego Oddziału PTChem na konferencji
studenckiej Horyzonty Nauki – Forum prac Dyplomowych 2017*

Abstract

Wprowadzenie

1. Chemia bioortogonalna
 - 1.1. Ogólny mechanizm ligacji
 - 1.2. Reakcja Staudingera
 - 1.2.1. Ligacja Staudingera
 - 1.2.2. Inne przykłady reakcji bioortogonalnych
 2. Reakcje cykloaddycji stosowane w chemii bioortogonalnej
 - 2.1. 1,3-Dipolarna cykloaddycja azydków do alkinów
 - 2.2. Reakcje Dielsa-Aldera
 - 2.2.1. Reakcje Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji
 - 2.2.2. Reakcje Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji
 3. Zastosowanie bioortogonalnych cykloaddycji do obrazowania biocząsteczek i leków
- Uwagi końcowe
- Piśmiennictwo cytowane
-
-



Katarzyna Miszczak – w 2015 r. rozpoczęła studia licencjackie na kierunku chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pracę licencjacką wykonywała w Zespole Chemii Związków Heterocyklicznych i Metaloorganicznych pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Pałasz. Tematyka obecnie prowadzonych badań dotyczy izolacji związków naturalnych z materiału roślinnego oraz reakcji bioortogonalnych.

ABSTRACT

This work is about bioorthogonal chemistry as a chemistry of reactions taking place in the living, in particular human, organism environment. In the search for reactions that can occur under conditions, the focus is mainly on the reactions of molecules that do not occur naturally in the body. Then, to have any application, generally for the purpose of using this reactions to locate the accumulation spots of the selected substance, one molecule is covalently bonded to the biomarker molecule, the second binds to the indicator molecule, which is frequently fluorescein.

Among a numerous examples of reactions that were designed during the short history of bioorthogonal chemistry, there are mainly reactions involving organic azides, which are not naturally present in the human body. An example of such a reaction is the Staudinger ligation. Subsequent modifications include mainly the 1,3-dipolar addition of azides to alkynes, catalyzed by copper(I) ions. The instability and toxicity of this catalyst has forced further innovations in bioorthogonal reactions. One of them is the use of alkynes with high angular stress, which causes a significant reduction in the activation energy of the process, that it is unnecessary to use a catalyst. Another example of the bioorthogonal reactions are Diels-Alder reactions. The interest in these reactions is not diminishing for several reasons. One of them is the fact that as a result of a simple reaction two new carbon-carbon bonds (or others, for the HDA reaction) occur. Furthermore, many of these reactions occur at standard temperature, without additional heating. Moreover, the possibility of numerous modifications of the skeleton and functional groups and the substituents of dienes and dienophils facilitates carrying out these reactions in the aquatic environment. At the end, the article presents examples of the application of cycloaddition reactions in bioorthogonal chemistry.

Keywords: bioorthogonal chemistry, bioorthogonal ligation, Staudinger ligation, 1,3-dipolar cycloaddition, Diels-Alder reactions

Słowa kluczowe: chemia bioortogonalna, bioortogonalna ligacja, ligacja Staudingera, 1,3-dipolarna cykloaddycja, reakcja Dielsa-Aldera

WPROWADZENIE

Wraz z postępowaniem cywilizacji dążenie do coraz to lepszych rozwiązań technologicznych jest wyzwaniem dla różnych dziedzin nauki, które muszą iść zgodnie z duchem czasu. Jest to również wyzwanie dla chemików organicznych zajmujących się syntezą organiczną. Większość reakcji organicznych przeprowadza się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak chlorek metylenu, chloroform, toluen, pirydyna czy też proste alkohole. Każda reakcja jest przeprowadzana w specyficznych warunkach, takich jak odpowiednia temperatura, ciśnienie, obecność lub brak wody, odpowiednie ciśnienie. Nie można także zapomnieć o atmosferze, w jakiej przebiega reakcja – należy uwzględnić dostęp tlenu czy pary wodnej do środowiska reakcji.

Trendem, jaki obserwuje się w XXI wieku w chemii organicznej są poszukiwania reakcji chemicznych, które mogą zachodzić w żywym organizmie niezależnie od procesów biochemicznych tam przebiegających. To one zapoczątkowały ukierunkowanie się części laboratoriów na świecie w stronę badań nad reakcjami zachodzącymi w wodzie jako rozpuszczalniku. Głównym zastosowaniem dla tych reakcji jest ich wykorzystywanie do badania metabolizmu leków lub różnych biocząsteczek oraz zastosowania do określania dystrybucji leków w komórce. Bioortogonalna ligacja ma na celu znakowanie obrazowanych cząsteczek chemicznym reporterem. Reakcje te oprócz wykorzystania wody jako rozpuszczalnika muszą zachodzić przy odpowiedniej wartości pH zbliżonej do warunków fizjologicznych, czyli w zakresie pH 4,5–7,5. Ponadto na przebieg reakcji bioortogonalnych nie powinna mieć wpływu obecność utleniaczy i aktywnych aminokwasów [1]. W tej właśnie dziedzinie pojawiają się duże perspektywy dla chemików, którzy muszą szukać odpowiednich nietoksycznych reagentów oraz tak dobierać warunki reakcji, aby były najbliższe warunkom w organizmie ludzkim czyli tak zwanym warunkom fizjologicznym.

Naukowcy coraz częściej opracowują nowe metody pozwalające na obserwację procesów zachodzących w komórkach organizmów żywych. Znanych jest szereg znaczników, które ułatwiają śledzenie zachodzących procesów. Są to między innymi kodowane cząsteczki reporterowe służące do monitorowania białkowych produktów w organizmie [2]. Przykładem takiego białka jest białko GFP, z języka angielskiego *Green fluorescent protein*. Jest to naturalnie występujące białko wykazujące jasnozieloną fluorescencję przy ekspozycji na światło z zakresu od niebieskiego do ultrafioletowego. W 2008 roku Martin Chalfi, Osam Shimomura i Roger Tsien otrzymali nagrodę Nobla za odkrycie i badania przeprowadzone na nim. To odkrycie jeszcze bardziej wpłynęło na rozwój chemii bioortogonalnej. Rozpoczęto badania nad przyłączaniem związków organicznych do białek i badania mechanizmów procesów białkowych. Dzięki temu powstał nowy dział w chemii organicznej i biologii opisywany jako chemia bioortogonalna, która ma łączyć syntezę organiczną z badaniami komórkowymi danych szlaków metabolicznych.

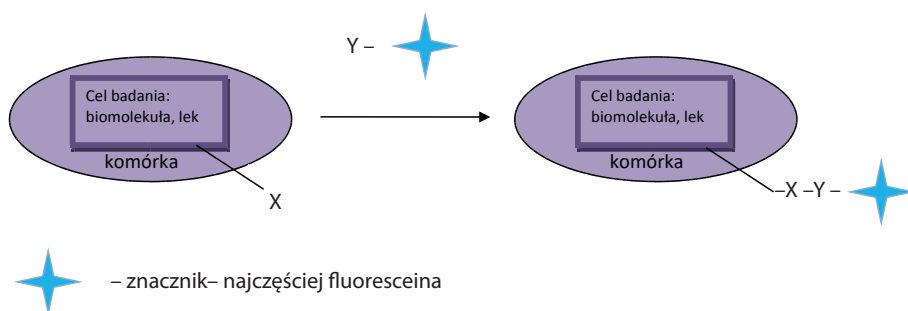
1. CHEMIA BIOORTOGONALNA

Termin chemia bioortogonalna pojawił się po raz pierwszy w pracy Carolyn R. Bertozzi w 2003. Chemia bioortogonalna obejmuje reakcje, które nie zakłócają reakcji biologicznych zachodzących w organizmie [3]. Przede wszystkim reakcje te muszą zachodzić w środowisku wodnym, ponieważ każdy organizm składa się w większości z wody. Substraty muszą reagować ze sobą szybko i selektywnie w warunkach fizjologicznych i nie oddziaływać z różnymi substancjami znajdującymi się w organizmie.

Celem chemii bioortogonalnej jest znakowanie cząsteczek chemicznym reporterem, który jest bioortogonalny i specyficzny dla reakcji bioortogonalnej a tym samym specyficzny dla organizmu żywego. W chemii bioortogonalnej klasyczna kolba reakcyjna została zastąpiona komórką biologiczną, a reakcje bioortogonalne są cennymi narzędziami służącymi do badania procesów metabolizmu leków lub biocząsteczek.

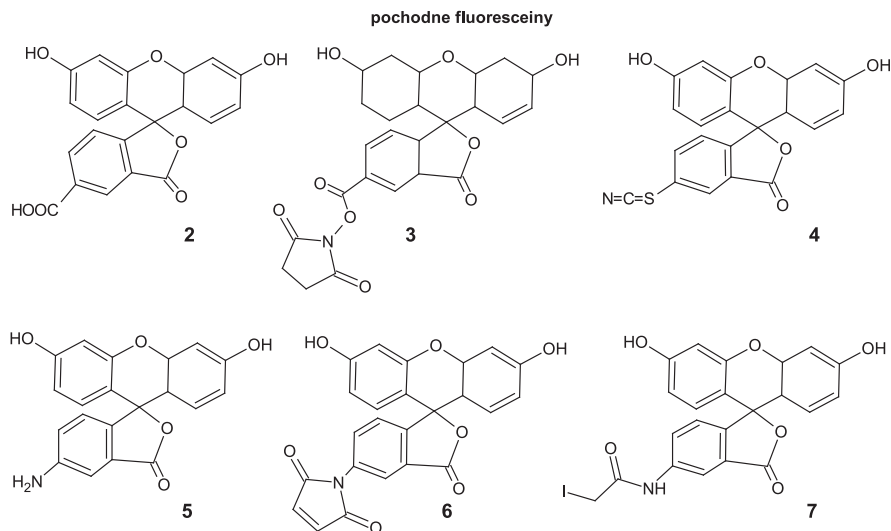
1.1. OGÓLNY MECHANIZM LIGACJI

Mechanizm reakcji bioortogonalnej można sprowadzić do kilku etapów. Po pierwsze musi istnieć związek, który jest specyficzny i nie reaguje z innymi związkami znajdującymi się w komórce biologicznej. Ponadto, taki związek powinien mieć odpowiednie grupy funkcyjne, poprzez które może być utworzone wiązanie z barwnikiem – najczęściej jest to fluoresceina (Schemat 1). Badany obiekt łączy się z drugim reagentem. W wyniku przeprowadzonej reakcji bioortogonalnej badany obiekt zostaje połączony ze znacznikiem. Dzięki takiemu nowemu związkowi możemy śledzić metabolizm cząsteczki oraz miejsce jej akumulacji.



Schemat 1. Ogólny schemat ligacji w chemii bioortogonalnej

Scheme 1. General scheme of ligation in bioorthogonal chemistry

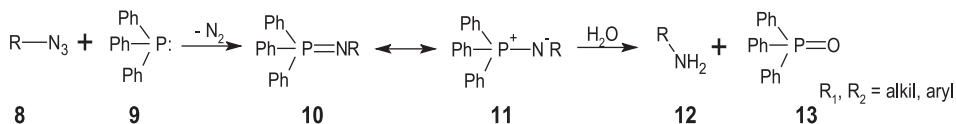


Rysunek 1. Fluoresceina i różne reaktywne pochodne fluoresceiny
 Figure 1. Fluorescein and various reactive derivatives of fluorescein

Aby przyłączyć znacznik do jednego z reagentów, w chemii bioortogonalnej wykorzystuje się aktywne pochodne fluoresceiny (Rys. 1). Pochodne **2**, **3** i **4** reagują ze związkami posiadającymi grupę aminową. Pochodna **5** ulega z łatwością reakcjom, w których drugim reagentem jest reaktywna pochodna kwasu karboksylowego. Ostatnie dwie struktury **6** i **7** reagują ze związkami posiadającymi grupy tiolowe [4].

1.2. REAKCJA STAUDINGERA

Pierwszym przykładem reakcji, która po modyfikacjach została zastosowana w chemii bioortogonalnej jest reakcja przeprowadzona w 1919 roku przez Hermanna Staudingera. Jest to reakcja azydku **8** z tryfenylofosfiną **9** z utworzeniem pierwszorzędowej aminy **12** (Schemat 2) [5].



Schemat 2. Reakcja Staudingera, jako przykład pierwszej reakcji bioortogonalnej
 Scheme 2. Reaction Staudinger, as an example of the first bioorthogonal reaction

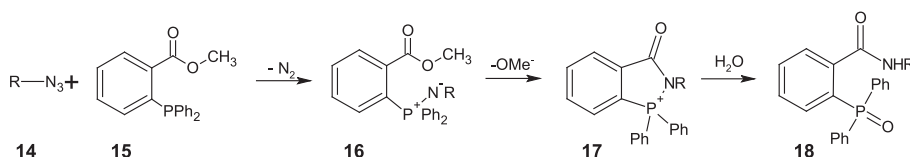
Jak widać na Schemacie 2 następuje atak nukleofilowy atomu fosforu tryfenylofosfiny **9** na atom azotu w azydku **8** z utworzeniem iminofosforanu **10** i wydzielaniem cząsteczki azotu. Utworzona imina **10** istnieje również w innej formie

rezonansowej – aza-ylidu **11**. Pod wpływem wody ulega on hydrolizie do pierwszorzędowej aminy **12** oraz tlenku trifenylfosfiny **13** (Schemat 2). Pomimo szerokiego zakresu stosowalności klasycznej reakcji Staudingera niska stabilność aza-ylidu **11** mogącego ulegać hydrolizie, jak również wrażliwości związków fosforu(III) na wilgoć w powietrzu ograniczyły zastosowanie tej wersji reakcji w wodnych układach biologicznych.

Reakcje bioortogonalne powinny zachodzić pomiędzy związkami, które nie występują w organizmie człowieka, dlatego bardzo dobrym przykładem tego typu reakcji jest reakcja przedstawiona na powyższym schemacie. Zastosowany azydek nie występuje w komórkach, ponadto grupa $-N_3$ jest stabilna w warunkach fizjologicznych oraz jest małą grupą, którą można łatwo połączyć z większą białkową. Trifenylfosfina także nie występuje w komórkach organizmu oraz jest niereaktywna z innymi związkami biologicznymi, dlatego również jest dobrym przykładem cząsteczki do zastosowania w chemii bioortogonalnej.

1.2.1. Ligacja Staudingera

Zastosowanie reakcji chemicznych w komórkach biologicznych wymaga, aby powstające połączenia były stabilne w warunkach fizjologicznych. Dlatego zaproponowano modyfikację reakcji Staudingera, a dokonała tego Carolyn Bertozzi. Zastąpiła trifenylfosfinę związkiem podobnym do pierwotnego ale posiadającym tzw. elektrofilową pułapkę. Schemat 3 obrazuje ligację Staudingera [6].



Schemat 3. Ligacja Staudingera zmodyfikowana przez C.R. Bertozzi

Scheme 3. Ligation Staudinger modified by C.R. Bertozzi

Elektrofilową pułapkę stanowi grupa estrowa znajdująca się w pozycji *ortho* w podstawniku arylovym. Atom azotu aza-ylidu **16** atakuje grupę karbonylową estru, zapobiegając hydrolizie ylidu poprzez utworzenie związku zawierającego pięcioczłonowy pierścień. Hydroliza wiązania P-N prowadzi do utworzenia amidu **18** zawierającego tlenek fosfiny. Aby zademonstrować zastosowanie tej reakcji jako bioortogonalnego narzędzia, Bertozzi użyła fluorescencyjny azydek pochodną glikanów i fosfiny z przyłączoną do niej biotyną [6].

Schemat 3 ukazuje jak niewielka zmiana wprowadzona do jednego substratu powoduje powstawanie zupełnie innej klasy związków. W klasycznej reakcji Staudingera powstawała amina pierwszorzędowa, natomiast w ligacji Staudingera otrzymuje się amid.

1.2.2. Inne przykłady reakcji bioortogonalnych

Kolejnymi przykładami bioortogonalnej ligacji są reakcje przedstawione w Tabeli 1. Komentarze zawierają uwagi odnośnie zastosowania danej metody jako reakcji bioortogonalnej. Każda z tych reakcji posiada jakieś ograniczenia ale pomimo to stosowana jest do bioortogonalnej ligacji, ponieważ nie znaleziono dotychczas dla danego przypadku obrazowania lepszego „narzędzia”. Oprócz ligacji Staudingera do reakcji bioortogonalnych zaliczamy kondensację związków organicznych takich jak alifatyczne ketony czy aldehydy, a także cyjanobenzotriazole.

Tabela 1. Wybrane reakcje, które znalazły zastosowanie w chemii bioortogonalnej

Table 1. Selected reactions that are used in bioorthogonal chemistry

Typ reakcji	Reagent 1	Reagent 2	Komentarz
kondensacja aldehydów/ketonów		H_2N-O-R	addukty są podatne na hydrolizę; jako katalizator stosuje się anilinę
			reakcja prowadzi do bardziej stabilnych wiązań C-C
Ligacja Staudingera	$R-N_3$		fosfiny są podatne na utlenianie
kondensacja cyjanobenzotriazoli			możliwe uboczne reakcje z wolnymi tiolami

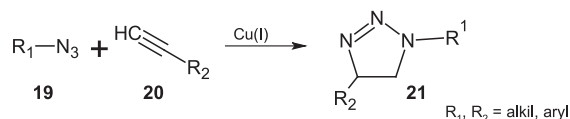
Oprócz przedstawionych powyżej przykładów reakcji bioortogonalnych w obecnym czasie zwrócono szczególną uwagę na reakcje cykloaddycji.

2. REAKCJE CYKLOADDYCJI STOSOWANE W CHEMII BIOORTOGONALNEJ

2.1. 1,3-DIPOLARNA CYKLOADDYCJA AZYDKÓW DO ALKINÓW

Badania nad 1,3-dipolarną cykloaddycją prowadził w latach 60. XX wieku Ralf Huisgen [7]. Jest to reakcja stosowana do regioselektywnej i stereoselektywnej syntezy pięciocłonowych pierścieni heterocyklicznych [8].

1,3-dipolem mogą być związki zawierające jako atom centralny azot np.: ylidy, nitryle, iminy nitrylu, tlenki nitrylu, azydki, ylidy azometinowe, nitrony. Dipolarofilami są najczęściej alkeny i alkiny lub ich heteroanalogi [9].

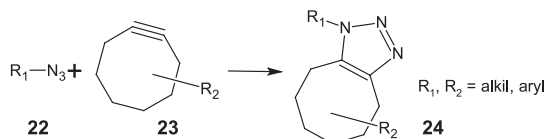


Schemat 4. Reakcja 1,3-dipolarnej addycji azydków do alkinów z użyciem katalitycznych ilości soli miedzi(I)
 Scheme 4. 1,3-Dipolar cycloaddition of azides and alkynes with catalytic amounts of Cu(I) salts

Schemat 4 przedstawia reakcję azydku **19** jako 1,3-dipola z alkinem **20** jako dipolarofilem, w wyniku której otrzymuje się pięcioczłonowy pierścień triazolu **21**. Ten typ reakcji został opisany przez Huisgena w 1976 roku [10].

Omawiana reakcja zazwyczaj jest prowadzona w podwyższonej temperaturze. Dlatego Meldal i Sharpless niezależnie opracowali metodę katalizowania reakcji wykorzystując jony miedzi(I). Odkryli oni, że jony miedzi(I) znacząco wpływają na szybkość powyższej reakcji i nazwano tą reakcję „*copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*” a dla uproszczenia przyjęto skrót CuAAC (Schemat 4). Reakcja ta jest przykładem tak zwanych reakcji „*click*”, [10, 11]. Niestety reakcje CuAAC nie mogą być używane w chemii bioortogonalnej, ponieważ jony miedzi(I) są szkodliwe dla organizmów żywych.

Pracując nad zastosowaniem reakcji azydków i alkinów w chemii bioortogonalnej chemicy zaproponowali modyfikację pozwalającą na przeprowadzenie reakcji bez użycia toksycznych jonów miedzi(I). Zaproponowano zastosowanie do reakcji z azydkami cyklicznych alkinów posiadających w pierścieniu siedem lub osiem atomów węgla (Schemat 5).

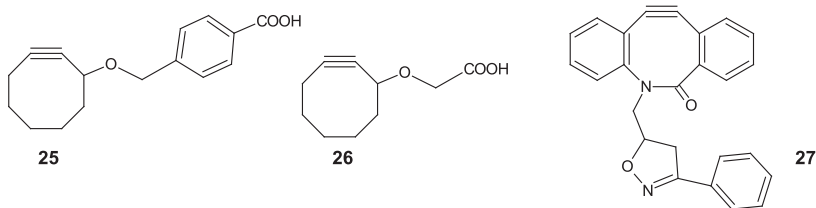


Schemat 5. Reakcje cykloaddycji azydków i pochodnych cyclooktynu promowanych napięciem kątowym pierścienia cyclooktynu

Scheme 5. Cycloaddition reaction of azides and cyclooctyne derivatives promoted by strain of cyclooctyne ring

Schemat 5 to reakcja azydku **22** z cyclooktynem **23** w wyniku, której powstają 1,2,3-triazole **24**. W pierścieniu cyclooktynu występuje duże naprężenie kątowe, które stanowi siłę napędową reakcji bez potrzeby użycia szkodliwej dla komórek biologicznych jonów miedzi(I). Tę reakcję nazwano „*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*” – skrót SPAAC [12]. W układzie cyclooktynu na atomach węgla połączonych wiązaniem potrójnym występuje hybrydyzacja sp² co wymusza geometrię liniową i kąty 180° w tym fragmencie cząsteczki. Cząsteczka cyclooktynu jest cykliczna, następuje odkształcenie od liniowości i pojawia się naprężenie kątowe. Po zajściu reakcji następuje zmniejszenie naprężenia kątowego dzięki zmianie hybrydyzacji atomów węgla z sp² na sp³. Stosując takie substraty obniżamy energię aktywa-

cji reakcji, która wymagała użycia jonów miedzi(I) jako katalizatora. Azydek **22** jak i cyklooktyn **23** nie reagują z żadnymi biocząsteczkami występującymi w komórce a zatem są chemoselektywne. Ponadto w komórce są wyjątkowymi molekułami, ponieważ w żywym organizmie nie znajdziemy podobnych do nich związków. To pozwoliło na wprowadzenie tej reakcji do grona kilkunastu ligacji należących do „narzędzi w skrzynce z narzędziami” jaką dysponuje chemia bioortogonalna. Jednakowoż naukowcy natrafili na pewien problem; okazało się że cyklooktyny słabo rozpuszczają się w wodzie. W nawiązaniu do tego problemu, wprowadzane są różnego rodzaju modyfikacje cyklooktynu aby zwiększyć rozpuszczalność (Rys. 2).

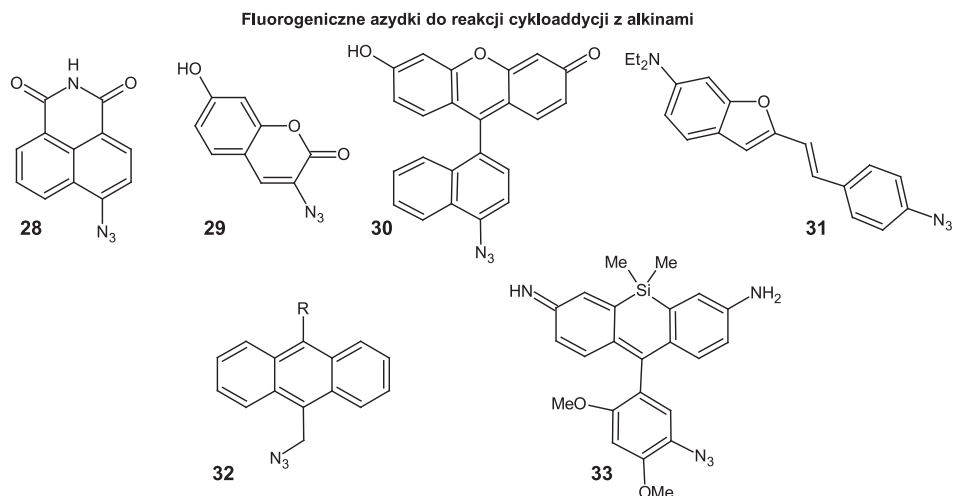


Rysunek 2. Wybrane trzy związki stosowane w cykloaddycji, uszeregowane wraz ze wzrostem rozpuszczalności w środowisku wodnym

Figure 2. Three selected compounds used in cycloaddition, ranked by increasing solubility in the aquatic environment

Na Rysunku 2 pokazano trzy związki wykorzystywane w reakcji SPAAC według rosnącej rozpuszczalności w warunkach fizjologicznych. Więcej przykładów takich związków można znaleźć w artykule zamieszczonym w czasopiśmie *Topics in Current Chemistry* [12].

Aby umożliwić wizualizację biomolekuł w organizmie żywym w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków i alkinów wykorzystuje się gotowe małowymagające fluorogeniczne substraty. Na Rysunku 3 ukazane są odpowiednie azydki **28–33**, jak kilka przykładów alkinów **34–37**. Przedstawione reagenty wykazują fluorescencję, dzięki czemu możemy śledzić przebieg danej reakcji zachodzącej w komórce biologicznej [12].



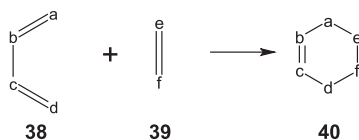
R = alkil, aryl
TAMRA = 5-karboksytetrametylorodamina

Rysunek 3. Fluorogeniczne substraty do 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów

Figure 3. Fluorogenic substrats for 1,3-dipolar cycloaddition azides with alkynes

2.2. REAKCJE DIELSA-ALDERA

Reakcje Dielsa-Aldera (DA) zostały opisane w 1928 roku przez dwóch chemików: Otto Dielsa i Kurta Aldera, którzy otrzymali nagrodę Nobla w 1950 roku za to odkrycie. Reakcja ta jest jednym z bardziej ekonomicznych przekształceń stosowanych w chemii organicznej. W wyniku jednej przemiany powstają dwa nowe wiązania węgiel-węgiel. Jest jedną z głównych reakcji prowadzącą do otrzymania połączeń karbocyklicznych jak i heterocyklicznych. Nazywa się ją także reakcją *one step*, ponieważ zachodzi jednoetapowo [14].

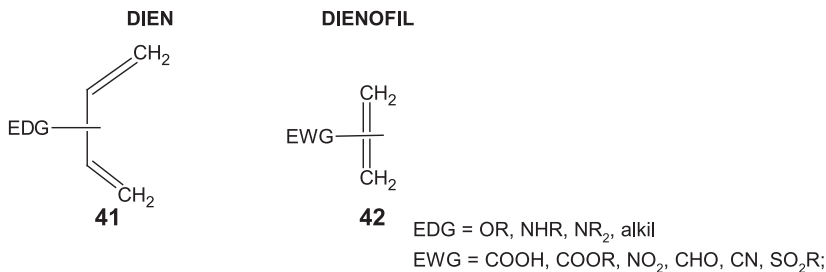


Schemat 6. Ogólny schemat reakcji Dielsa-Aldera
 Scheme 6. General scheme of Diels-Alder reaction

Polega na cykloaddycji podstawionego dienu **38** do alkenu **39** z utworzeniem pochodnych cykloheksenu **40**. Reakcja DA jest cennym narzędziem syntetycznym ponieważ charakteryzuje się wysoką regio-, diastereo- jak i w niektórych przypadkach enancjoselektywnością. Reakcja cykloaddycji DA jest także stereospecyficzna. Dzięki temu stereochemia dienofila zostaje niezmieniona. Zatem z dienofila o konfiguracji *cis* lub *trans* otrzymuje się odpowiednio *cis* lub *trans* diastereoizomery jako produkty tej reakcji [14].

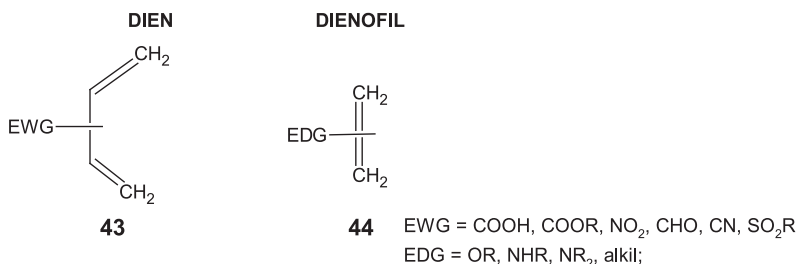
Molekularny opis reakcji DA – cykloaddycji $[4\pi+2\pi]$, opiera się na nakładaniu orbitali granicznych HOMO i LUMO substratów. Znane są dwa typy reakcji DA. Pierwszy to reakcja klasyczna, czyli z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym. Drugą z kolei nazywa się reakcją z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym.

W klasycznej reakcji DA dien powinien posiadać podstawniki elektronodonorowe – EDG z ang. *elektron donating group* oraz konformację *s-cis*. Z kolei dienofil powinien być wyposażony w grupę elektroakceptorową – EWG z ang. *elektron withdrawing group* [15] (Rys. 4).



Rysunek 4. Dieny i dienofile wykorzystywane w klasycznej reakcji Dielsa-Aldera
 Figure 4. Diens and dienofiles used in the classic Diels-Alder reaction

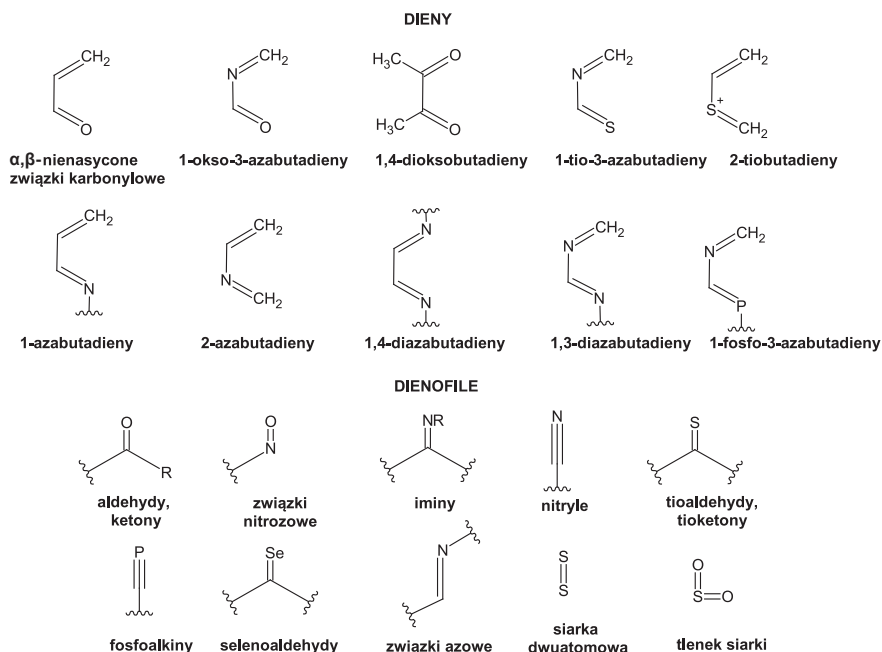
Reakcja z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym jest charakterystyczna dla dienów posiadających deficyt ładunku ujemnego, co zapewniają podstawniki elektroakceptorowe, natomiast dienofil musi posiadać grupy elektronodonorowe (Rys. 5).



Rysunek 5. Dieny i dienofile wykorzystywane w reakcji Diels-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym

Figure 5. Diens and a dienofiles used in the inverse-electron-demand Diels-Alder reaction.

W reakcji DA często stosuje się substraty zawierające heteroatomy takie jak azot, tlen czy siarkę. Jest to tak zwana reakcja hetero-Diels-Aldera w skrócie HDA (Rys. 6).



Rysunek 6. Przykładowe dieny i dienofile wykorzystywane w reakcji hetero-Diels-Aldera

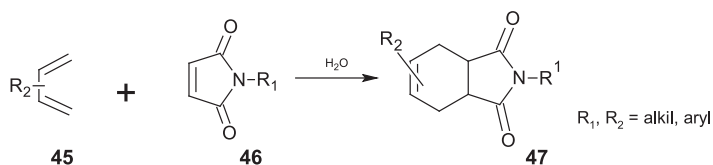
Figure 6. Example of diens and a dienofiles used in the hetero-Diels-Alder reaction

W 1980 roku Ronald Breslow odkrył, że reakcja DA zachodzi znacznie szybciej i z większą *endo/egzo* selektywnością w wodzie w porównaniu z rozpuszczalnikami organicznymi [16]. Reakcje DA zaliczamy do najważniejszych reakcji stosowanych w chemii bioortogonalnej, ponieważ zachodzą one z wysokimi wydajnościami w środowisku wodnym. Substraty stosowane w reakcji DA, są specyficzne, związki

tego typu nie występują w komórkach biologicznych. W związku z tym, dien i dienofil mogą się selektywnie odnaleźć i połączyć.

2.2.1. Reakcje Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji

Często używanym dienofilem w tego typu reakcjach jest imid kwasu bursztynowego **46**, który z łatwością reaguje ze sprzężonymi dienami **45** w łagodnych warunkach z utworzeniem pochodnej **47** (Schemat 7) [1]. Jedynym ograniczeniem tej reakcji jeśli chodzi o jej wykorzystanie w układach biologicznych jest fakt, że imid kwasu bursztynowego może reagować ze znajdującymi się tam związkami takimi jak aminokwasy posiadające nukleofilowe wolne grupy aminowe lub grupy tiohydroksylowe. Nie zmienia to faktu, że reakcja ta znalazła zastosowanie w znakowaniu kwasów nukleinowych i białek [1].

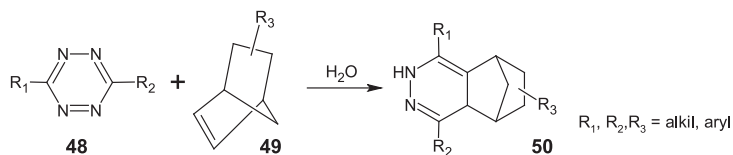


Schemat 7. Reakcja Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym
 Scheme 7. Diels-Alder reaction with normal-electron-demand

Obecnie stosuje się niewiele reakcji DA z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym jako bioortogonalnych cykloadycji z uwagi na substraty, które łatwo mogą reagować ze związkami występującymi w środowisku komórki [1].

2.2.2. Reakcje Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji

W reakcjach DA z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym bardzo często jako dien stosuje się pochodne 1,2,4,5-tetrazyny z powodu, iż ten układ heterodienu jest ubogi elektronowo. 1,2,4,5-Tetrazyna reaguje z reaktywnymi alkenami, takimi jak *trans*-cyklookten, norbornen czy cyklopropen [17]. Reaktywność tych dienofili wynika z naprężenia kąтового w odpowiednich pierścieniach.

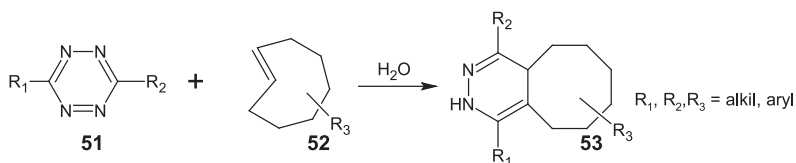


Schemat 8. Reakcja Hetero-Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym – tetrazyny z norbornenem [17]

Scheme 8. Inverse-Electron-Demand Hetero-Diels–Alder reaction of tetrazine with norbornene [17]

W 2008 roku Devaraj i Blackman niezależnie od siebie, opisali bioortogonalne reakcje z udziałem tetrazyny **48** i norbornenu **49** (Schemat 8) [17, 18].

Ponadto opisali także drugą reakcję przedstawioną na Schemacie 9.



Schemat 9. Reakcja Hetero-Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym tetrazyny z *trans*-cyklooktenem [18]

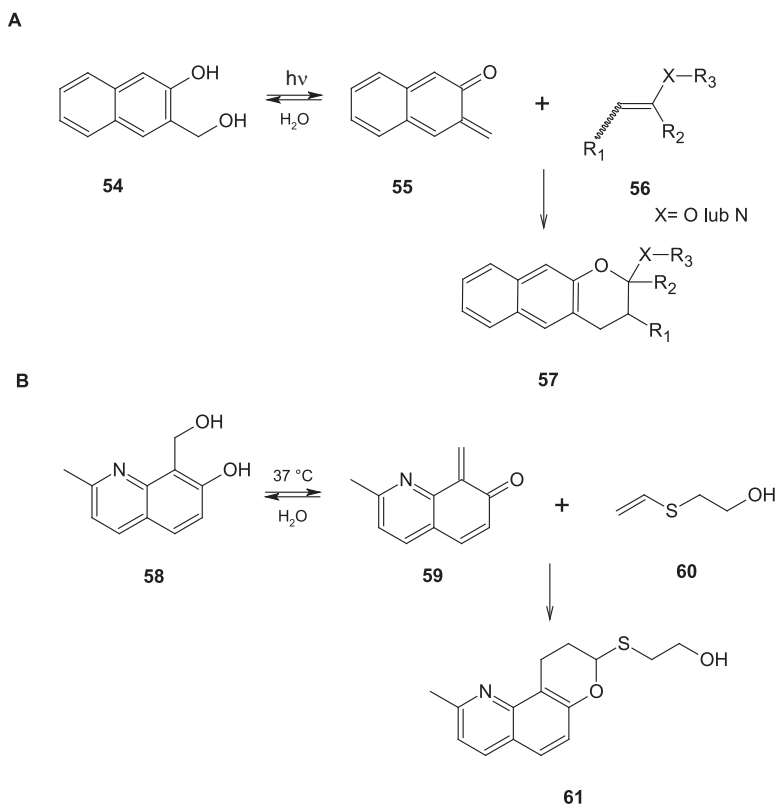
Scheme 9. Inverse-electron-demand Hetero-Diels–Alder reaction of tetrazine with *trans*-cyclooctene [18]

Tetrazyna **51** ulega reakcji DA z *trans*-cyklooktenem **52** w środowisku wodnym (Schemat 9) [18].

Porównując powyższe substraty, należy podkreślić, iż reakcja tetrazyny **48** z norbornenem **49** zachodzi znacznie wolniej niż z *trans*-cyklooktenem **52**, jednak norbornen **49** charakteryzuje się większą stabilnością [19].

Reakcje opisane powyżej zachodzą szybko, jednak duże rozmiary substratów: *trans*-cyklooktenu i norbornenu limitują ich użyteczność w praktycznym zastosowaniu przy znakowaniu badanych obiektów.

Innymi reakcjami HDA, które znalazły zastosowanie w chemii bioortogonalnej są cykloaddycje, w których rolę heterodieniu pełnią 1-oksa-1,3-butadieny a rolę dienofila etery winylowe. Układ 1-oksa-1,3-butadienu znajduje się w strukturze *o*-metylidenonaftochinonu, który to związek szybko i selektywnie reaguje w reakcji HDA z bogatym w elektrony dienofilem (Schemat 10A). Ta reakcja jest wysoce selektywna i przebiega bez zakłóceń w warunkach wodnych. Tioetery winylowe są małymi cząsteczkami stabilnymi chemicznie *in vivo*, dzięki czemu nadają się do zastosowania jako bioortogonalne reportery chemiczne, które można skutecznie sprzęgać z różnymi biomolekułami [20].

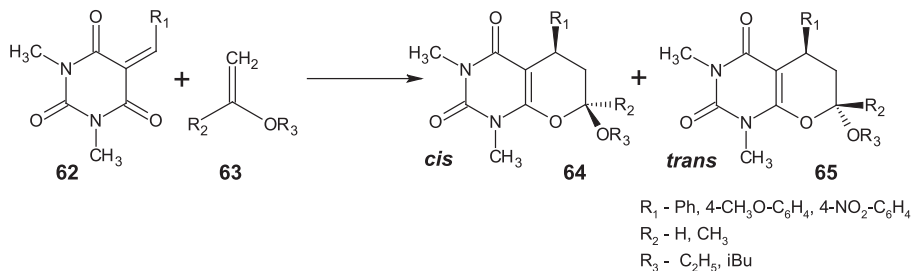


Schemat 10. Reakcja pochodnych 1-oksa-1,3-butadienów z eterami winylowymi

Scheme 10. Reaction of derivatives 1-oxa-1,3-butadienes reaction with vinyl ether

Do utworzenia układu *o*-metylidenaftochinonu **55** niezbędne jest promieniowanie UV co uniemożliwia zastosowanie tej reakcji w chemii bioortogonalnej. W 2013 zostały zmodyfikowane struktury heterodienu **55** i dienofila **56** tak aby spełniały one odpowiednie warunki dla bioortogonalnej cykloaddycji. Zastosowano pochodną *o*-metylidenoquinolinochinonu **59** zawierającą atom azotu. Dzięki obecności atomu elektroujemnego pierwiastka w strukturze dienu znacznie zwiększyła się jego reaktywność oraz hydrofilowość. Natomiast drugim substratem był tioeter winylowy **60**, który charakteryzuje się małymi rozmiarami jak i stabilnością chemiczną oraz tym, iż jest dienofilem bogatszym w elektrony (Schemat 10B) niż wcześniej zastosowany eter winylowy. Reakcja przedstawiona na Schemacie 10B przebiegała w wodzie oraz w temperaturze 37°C . Warto zauważyć iż *o*-metylidenoquinolilnochinon **59** został wytworzony bez użycia katalizatora czy też promieniowania UV. Autorzy pracy zbadali stabilność tioeteru winylowego w warunkach fizjologicznych, między innymi w obecności utleniaczy jak także reaktywnych aminokwasów takich jak cysteina, lizyna [20].

W obecnym czasie w wielu laboratoriach poszukuje się nowych „narzędzi bioortogonalnych” spełniających wszystkie warunki bioortogonalności.



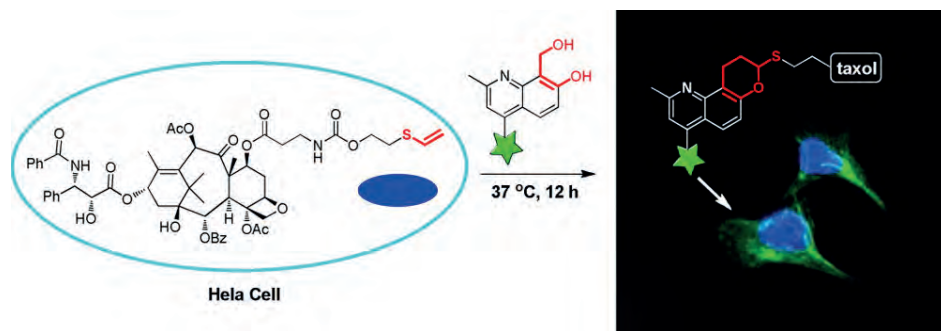
Schemat 11. Reakcja hetero-Diels-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym jako potencjalna reakcja bioortogonalna

Scheme 11. Inverse-Electron-Demand Hetero-Diels–Alder reaction as potential bioorthogonal reaction

Na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego prowadzone są badania mające prowadzić do znalezienia kolejnych bioortogonalnych cykloaddycji 1-oksa-1,3-butadienów i eterów winylowych. Spośród różnych badanych dotychczas reakcji wybrano cykloaddycje 5-arylidenopochodnych kwasów barbiturowych **62** i eterów winylowych **63** (Schemat 11). Najpierw reakcje te przeprowadzono w chlorku metylenu jako rozpuszczalniku [21]. Reakcje te zachodziły w krótkim czasie (1-5 godz.) w temperaturze pokojowej i z wysokimi wydajnościami. Prowadziły do otrzymania dwóch diastereoizomerów *cis* **64** i *trans* **65** pirano[2,3-*d*]pirymidyny. W kolejnych badaniach sprawdzono, że reakcje te mogą być prowadzone w wodzie w temperaturze pokojowej [22]. Po wykazaniu, że reakcje spełniają podstawowe warunki bioortogonalności, sprawdzono stabilność heterodienów w warunkach fizjologicznych. W obecnym momencie trwają prace nad przyłączeniem pochodnej fluoresceiny do heterodieniu oraz wytworzeniem wiązania pomiędzy eterem tiowinylowym i badanym obiektem.

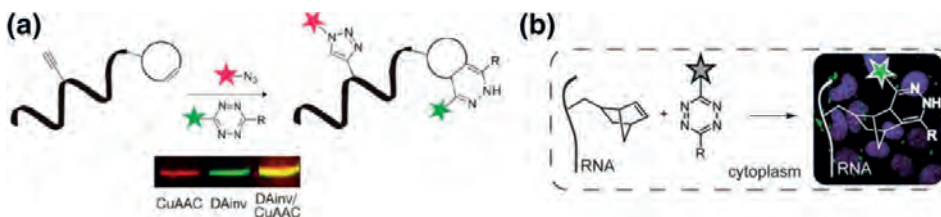
3. ZASTOSOWANIE BIOORTOGONALNYCH CYKLOADDYCJI DO OBRAZOWANIA BIOCZĄSTECZEK I LEKÓW

Ciekawym przykładem zastosowania reakcji cykloaddycji 1-oksa-1,3-butadienów i alkenów do bioortogonalnej ligacji jest obrazowanie taxolu znanego w Polsce jako paklitaksel. Taxol jest substancją aktywną znajdującą się w korze cisu krótkolistnego, wykazujący działanie cytotoksyczne w komórkach HeLa. Li i współpracownicy zastosowali reakcję 1-oksabutadienów jako bioortogonalną reakcję, do znakowania białek jak i obrazowania taxolu w żywych komórkach [20]. Na Rysunku 7 przedstawiono obraz jaki otrzymano w mikroskopie konfokalnym świadczący o utworzonej bioortogonalnej ligacji pomiędzy taxolem i fluoresceiną [19].



Rysunek 7. Reakcja 1-oks-1,3-butadienu w obrazowaniu taxolu w komórkach HeLa. Rysunek zaczerpnięto z *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996 za zgodą American Chemical Society
 Figure 7. Cycloaddition of 1-oxa-1,3-butadienes imaging taxol in HeLa cells. Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996. Copyright American Chemical Society

Kwasy nukleinowe są biologicznymi makrocząsteczkami, które odpowiedzialne są za materiał genetyczny, i odgrywają istotną rolę w kodowaniu, przesyłaniu, wyrażaniu i regulowaniu informacji genetycznej. Kilka przykładów modyfikacji kwasu nukleinowego za pomocą reakcji Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym zostało wykazanych przez grupę Jäschke [23–25]. Na Rysunku 8(a) przedstawiono przykład podwójnej ligacji. Widać jak tetrazyna reaguje z norbornenem, a w tym samym czasie alkin bierze udział w ligacji z fluorogenicznym azydkiem.

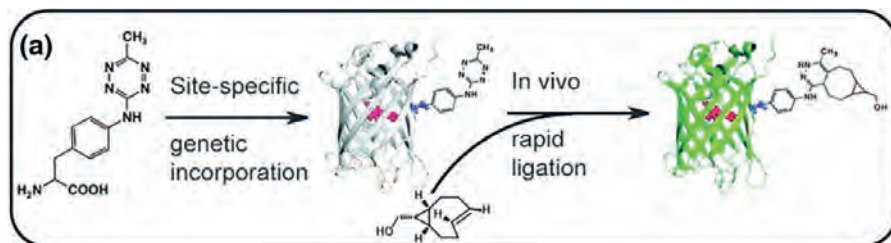


Rysunek 8. a – Modyfikacja DNA poprzez ligację tetrazyny i azydkiem. b – Obrazowanie żywej komórki z syntetycznym RNA za pomocą tetrazyny w fluorogenicznej próbie. Rysunek zaczerpnięto z *Top. Curr. Chem.*, 2016, **3**, 374 za zgodą Springer Nature
 Figure 8. a – DNA post-modification by tetrazine and azide ligation. b – Live cell synthetic RNA target image using tetrazine fluorogenic probe. Reprinted with permission from *Top. Curr. Chem.*, 2016, **3**, 374. Copyright Springer Nature

Ostatnio grupa Schorra wytworzyła syntetyczne oligonukleotydy RNA ze znacznikiem norbornenowym, które mogą być znakowane sondą fluorogeniczną tetrazyny (Rys. 8b) w komórkach ssaków przy użyciu tej samej strategii co wcześniej opisana reakcja [24]. Wykorzystanie reakcji z fluorogenicznymi sondami jest potężną techniką obrazowania kwasów nukleinowych.

Ważnym także aspektem zastosowań jest obrazowanie białek za pomocą narzędzi chemii bioortogonalnej. Niedawno opisano jak obrazować w wysokiej

rozdzielczości tkanki odpowiadające za ekspansję genów [27]. Białka w różnych lokalizacjach komórkowych mogą być znakowane przez ligację tetrazyny z fluoro-genicznymi znacznikami. Metoda ta służy do obrazowania mikroskopowego z rekonstrukcją optyczną. Badania dostarczają informacji o strukturze białek na powierzchni i wewnątrz badanego układu.



Rysunek 9. Reakcja nie fluoryzującego GFP z pochodną tetrazyny, powodującą fluorescencję GFP Rysunek zaczerpnięto z Top. Curr. Chem., 2016, 3, 374za zgodą Springer Nature

Figure 9. Reaction of inactive GFP with tetrazine derivative causing turn-on GFP. Reprinted with permission from Top. Curr. Chem., 2016, 3, 374. Copyright Springer Nature

UWAGI KOŃCOWE

Chemia bioortogonalna to prężnie rozwijająca się w XXI wieku dziedzina łącząca chemię organiczną z biologią. W niniejszej publikacji starano się ukazać krótką jednak zarazem ciężką drogę chemików organiczków jaką przeszli w poszukiwaniu bioortogonalnych ligacji. Pokazano różne rodzaje reakcji jakie mogą być zastosowane w chemii bioortogonalnej. Zwrócono uwagę na dominującą rolę reakcji cykloadycji w chemii bioortogonalnej. Szczególnie reakcje 1,3-dipolarnej cykloadycji i reakcje D-A są używane do bioortogonalnej ligacji. Niektóre z omawianych ligacji znalazły zastosowanie do znakowania kwasów nukleinowych, białek, lipidów, glikanów i bioaktywnych małych molekuł leków.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Carell, M. Vrabel, Top. Curr. Chem., 2016, 374, 1.
- [2] R.Y. Tsien, Annu., Rev. Biochem., 1998, 67, 509.
- [3] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Angew. Chem. Int., 2009, 48, 6974.
- [4] W. Russ Algar, P. Dawson, I.L. Mednitz, *Chemoselective and bioorthogonal ligation reactions, concepts and applications*, Wiley-VCH, 2017, 14.
- [5] H. Staudinger, J. Meyer, Helv. Chim. Acta, 1919, 2, 635.
- [6] E. Saxon, C.R. Bertozzi, Science, 2000, 287, 2007.
- [7] R. Huisgen, Angew. Chem., 1963, 13, 604.
- [8] D.M. Patterson, L.A. Nazarova, J.A. Prescher, Chem. Biol., 2014, 9, 592.
- [9] V.V. Rostovtsev, G.L. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 2596.

- [10] R. Huisgen, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 403.
- [11] W.C. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057.
- [12] J. Dommerholt, F.P.J.T. Rutjes, F.L. van Delft, *Top. Curr. Chem.*, 2016, **16**, 374.
- [13] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 14.
- [14] J. McMurry, *Chemia organiczna*, T. 3, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, str. 515.
- [15] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Chemia organiczna*, T. 3, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2010, str. 137.
- [16] D.S. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7816.
- [17] N.K. Devaraj, R. Weissleder, S.A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 2297.
- [18] M.L. Blackman, M. Royzen, J.M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518.
- [19] R. Rossin, S.M. van den Bosch, W. Ten Hoeve, M. Carvelli, R.M. Versteegen, *Bioconj. Chem.*, 2013, **24**, 1210.
- [20] Q. Li, T. Dong, X. Liu, X. Lei, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996.
- [21] A. Pałasz, *Monatsh. Chem.*, 2008, **139**, 1397.
- [22] A. Pałasz, *Synthesis*, 2010, **23**, 4021.
- [23] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8846.
- [24] J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconj. Chem.* 2012, **23**, 1382.
- [25] J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12536.
- [26] A. M. Pyka, C. Domnick, F. Braun, *Bioconj. Chem.*, 2014, **25**, 1438.
- [27] C. Uttamapinant, J. D. Howe, K. Lang, V. Beránek, L. Davis, M. Mahesh, N. P. Barry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 4602.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 sierpnia 2018

NOWICZOK(I) I SUBSTANCJE A

NOVICHOK AGENTS AND A SUBSTANCES

Marcin Kloske

*Wojskowa Akademia Techniczna, 00-908 Warszawa
ul. W. Urbanowicza 2
e-mail: mkloske@gmail.com*

Abstract

Wstęp

1. Broń masowego rażenia
2. Broń chemiczna
3. Bojowe zastosowanie broni chemicznej
4. Bojowe środki trujące
5. Fosforoorganiczne bojowe środki trujące (FOST) klasyczne
6. Toksyczność FOST
7. Zbrojenia niekonwencjonalne w ZSRS i Rosji a rozbrojenie chemiczne
 - 7.1. Bojowe środki trujące IV generacji
 - 7.2. Program Foliant
 - 7.3. Otrzymywanie Nowiczoków (substancji A)
 - 7.4. Struktura i właściwości Nowiczoków
 - 7.5. Działanie toksyczne Nowiczoka
 - 7.6. Aspekty prawne dotyczące Nowiczoka
 - 7.7. Wykrywanie fosforoorganicznych bojowych środków trujących
 - 7.8. Likwidacja skażeń FOST

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Marcin Kloske urodził się w 1971 roku. Studiował chemię na Wydziale Inżynierii, Chemii i Fizyki Technicznej w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień naukowy doktora uzyskał w 2003 roku, a tematem jego rozprawy doktorskiej było badanie właściwości adsorpcyjnych uporządkowanych nanoporowatych materiałów krzemionkowych. Jego główne zainteresowania naukowe skupiają się na projektowaniu i otrzymywaniu nowych rodzajów adsorbentów, ze szczególnym uwzględnieniem mikro- i mezoporowatych adsorbentów węglowych i krzemionkowych. Jest podpułkownikiem Wojska Polskiego w korpusie osobowym wojsk chemicznych. Jest autorem i współautorem ok. 20 artykułów naukowych.

ABSTRACT

When we hear the slogan 'chemical weapons', we are usually reminded of a photograph of marching geese, like the blind Ententa soldiers who were darkened after the Ypres chemical attack in Breugel's painting. After the end of World War I, the unconventional arms race began and it was not certain that it had ended with the collapse of the Union of Soviet Socialist Republics (USSR) and the subsequent signing of the Chemical Weapons Convention (CWC) in 1993. Today, we know that Russia's introduction of the CWC into its legal system has in no way disrupted the development of a new, fourth generation of chemical warfare agents (FGA or NTA - Non-Traditional Agents), culminating in the development of Group A substances, the popular media substances known as Novichok. The range of confirmed and openly available data is not large and the rest of the information is a compilation of various, sometimes contradictory, information. The article is an attempt to organize an open resource of knowledge and bring Novichok closer to a wider audience.

Keywords: Novichok, A-class chemical warfare agents, chemical warfare, organo-phosphorus chemical warfare agents

Słowa kluczowe: Nowiczok, substancje grupy A, broń chemiczna, fosforoorganiczne bojowe środki trujące

WSTĘP

Kiedy słyszymy hasło „broń chemiczna”, zazwyczaj przypomina się nam zdjęcie maszerujących gęścio, niczym ślepcy z obrazu Breugla ociemniałych żołnierzy Ententy po ataku chemicznym pod Ypres. Po zakończeniu I wojny światowej wyścig zbrojeń niekonwencjonalnych rozpoczął się i nie było pewności, że zakończył się wraz z rozpadem Związku Socjalistycznych Republik Sowieckich (ZSRS) i późniejszym podpisaniem Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej w 1993 roku. Dzisiaj wiemy, że wprowadzenie przez Rosję Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej do jej systemu prawnego, w żaden sposób nie zakłóciło prac nad nową, czwartą generacją bojowych środków chemicznych (ang. *Fourth Generation Agents* – FGA; bądź NTA - ang. *Non-Traditional Agents*), a jej zwieńczeniem było opracowanie substancji grupy A, czyli popularnych w mediach substancji określanych nazwą Nowiczok. Zakres potwierdzonych i dostępnych w sposób jawny i otwarty danych nie jest wielki, a cała reszta informacji to kompilacja różnych niekiedy wzajemnie wykluczających się informacji. Artykuł stanowi próbę uporządkowania jawnego zasobu wiedzy i przybliżenia Nowiczoka szerszemu kręgowi odbiorców, po tym jak na naszych oczach, zamach na Siergieja Skripała rzucił nowe światło, na broń masowego rażenia w XXI wieku, międzynarodowe porozumienia rozbrojeniowe i na skuteczność ich mechanizmów kontroli, w tym wypadku Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej [1]. Nie ulega wątpliwości, że prawdziwym bohaterem został Nowiczok, który jest tajemniczą substancją chemiczną. Tylko niewielki krąg zainteresowanych pasjonatów chemii i wojskowych specjalistów z korpusu osobowego obrony przed bronią masowego rażenia potrafiło dokonać selekcji i odróżnić informacje od zwykłego szumu medialnego. Na wstępie należy dodać, że Nowiczok to nie jedna substancja chemiczna, ale cała rodzina związków chemicznych [2]. Niestety zakres dostępnej wiedzy jest ograniczony odpowiednimi przepisami o ochronie informacji niejawnych, które skutecznie chronią powyższe kwestie zarówno w Rosji, USA jak i w innych państwach. Niemniej jednak wytrwałe poszukiwanie wiedzy zawsze da rezultat, nawet bez zagładania za drzwiami niezliczonych kancelarii tajnych.

Nowiczoki to substancje chemiczne przeznaczone do zastosowania, jako bojowe środki trujące [3–6], które wraz ze środkami przenoszenia na obiekt ataku stanowią broń chemiczną [7]. Ta broń wraz z bronią jądrową, radiologiczną i biologiczną jest nazywana bronią masowego rażenia (BMR). Ta definicja posłuży za początek rozważań na temat zagrożenia dla ludzkości ze strony broni masowego rażenia w ogóle, a w szczególności bojowymi środkami trującymi (BST) – konkretnie całej rodziny substancji nazywanych Nowiczokami, a które w nomenklaturze wojskowej określa się nazwą kodową – substancje A [5, 6].

1. BROŃ MASOWEGO RAŻENIA

Terminem broń masowego rażenia (ang. *Weapons of Mass Destruction*, WMD) określa się niekonwencjonalne środki bojowe o potencjalnej sile rażenia umożliwiającej spowodowanie masowych zgonów i zniszczeń w zaatakowanej populacji i / lub na atakowanym obszarze. Broń masowego rażenia wykazuje również destrukcyjne oddziaływanie na środowisko naturalne, w którym jest umiejscowiony przeciwnik i jego środki do prowadzenia walki zbrojnej. Broń masowego rażenia, ze szczególnym uwzględnieniem broni jądrowej, która nie jest tematem niniejszego artykułu, to współcześnie najgroźniejszy ze środków do prowadzenia walki zbrojnej. Broń ta może być użyta przez siły zbrojne państw nią dysponujących, a także, co budzi szczególny niepokój społeczności międzynarodowej, przez podmioty pozapaństwowe, w tym ponadpaństwowe organizacje terrorystyczne. Proliferacja (rozprzestrzenianie) broni masowego rażenia jest obecnie jednym z największych zagrożeń dla bezpieczeństwa międzynarodowego.

Nazwa broń masowego rażenia wskazuje, że może ona być przyczyną zniszczeń na wielką skalę, znacznie większą niż w przypadku ataków konwencjonalnych. W szczególności uwaga ta dotyczy broni atomowej (w wąskim rozumieniu, tzn. wykorzystującej energię reakcji rozpadu lub syntezy jądrowej), prowadzącej, oprócz długotrwałych następstw w postaci skażenia radioaktywnego, do natychmiastowych i masowych zniszczeń. Również wykorzystanie pozostałych rodzajów BMR, a przynajmniej niektórych ze środków do nich zaliczanych, przy odpowiednim przeprowadzeniu ataku i optymalnych warunkach zewnętrznych (np. pogodowych) mogłoby oznaczać tysiące ofiar śmiertelnych oraz, podobnie jak w przypadku broni jądrowej, skażenie zaatakowanego terytorium. Jeden z rodzajów broni masowego rażenia, a konkretnie broń chemiczna będzie przedmiotem dalszych rozważań.

2. BROŃ CHEMICZNA

Broń chemiczna nie jest nowym rodzajem broni, gdyż używana jest od początków istnienia ludzkości. Pierwsze historyczne dane dotyczące użycia substancji chemicznych na polu walki pochodzą sprzed ponad 4000 lat. Wówczas na wojnach toczących się w starożytnych Indiach używano toksycznych dymów powodujących senność, które możemy zakwalifikować do pierwszych na świecie środków oddziałujących na psychikę ówczesnych uczestników walki [6].

Rozwój i użycie broni chemicznej, na największą skalę, miało miejsce podczas I Wojny Światowej. Tę wojnę uważa się za czas, w którym w arsenałach szeregu państw pojawiła się broń masowego rażenia, w jej współczesnym, zgodnym z przyjętą uprzednio definicją, rozumieniu. Zgodnie, z tym, w ujęciu szczegółowym, termin broń chemiczna oznacza niżej wymienione, występujące razem lub oddzielnie [1, 4, 5]:

1. toksyczne związki chemiczne określane jako bojowe środki trujące i ich prekursorzy;
2. amunicję i urządzenia specjalnie zaprojektowane dla spowodowania śmierci lub innej szkody poprzez toksyczne właściwości związków chemicznych – BST uwalnianych w rezultacie zastosowania takiej amunicji i urządzeń;
3. wszelki sprzęt specjalnie zaprojektowany do użycia w bezpośrednim związku z zastosowaniem amunicji i urządzeń określonych powyżej.

Dla uproszczenia można założyć, że broń chemiczna to substancja chemiczna i środek służący do jej dostarczenia do celu. Z tym wiąże się kryterium ogólne służące klasyfikacji amunicji chemicznej. Jeżeli amunicja przenosi do celu bojowy środek trujący to mówimy o amunicji unitarnej. W przypadku wypełnienia amunicji prekursorami bojowego środka trującego, z których jest on syntezowany w wyniku reakcji chemicznej, podczas pokonywania drogi do celu, mówimy o amunicji binarnej. Amunicja binarna w dużym uproszczeniu składa się z pojemnika podzielonego na dwie części, w których umieszczone są mało toksyczne substancje chemiczne będące substratami (prekursorami) bojowych środków trujących. Proces syntezy BST w binarnej amunicji chemicznej trwa w trakcie dostarczania jej do celu. W celu wymieszania substratów w pojemniku mogą być zainstalowane np. mieszkadła poruszane silnikiem elektrycznym, które ułatwiają przereagowanie prekursorów. Tego typu amunicja ma postać pocisków artyleryjskich, głowic raketowych, bomb lotniczych, itp. Od 1969 do początku lat dziewięćdziesiątych tego typu amunicja elaborowana FOST (sarinem, VX) znajdowała się także w wyposażeniu armii Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej i innych adwersarzy po stronie wolnych narodów. Prekursory BST są z reguły znacznie mniej niebezpieczne niż same bojowe środki trujące i zwykle trwalsze. Dlatego zastosowanie tego typu technologii znacznie ułatwia posługiwanie się amunicją chemiczną i umożliwia wydłużenie okresu ich przydatności do bojowego zastosowania. Istnieje jednak istotna niedogodność podczas stosowania amunicji binarnej, polegająca na tym, że niewłaściwe dobranie technologii może powodować otrzymanie BST o nie do końca pożądanym właściwościach fizykochemicznych [6].

Amunicję chemiczną i przyrządy do wytwarzania w środowisku pola walki postaci użytkowej bojowych środków trujących, z wojskowego punktu widzenia, klasyfikuje się według różnych kryteriów. Najczęściej do kryteriów tych należą: krotność użycia, sposób dyspersji bojowego środka trującego, rodzaj środka przenoszenia BST do celu, czy zasada działania. I tak, ze względu na krotność użycia wyróżniamy amunicję chemiczną jednokrotnego użycia (bomby, głowice raket, pociski artyleryjskie i fugasy) i wielokrotnego użycia (generatory aerozoli i przyrządy wylewcze). Ze względu na sposób dyspersji BST wyróżnia się amunicję i przyrządy wywarzające parę, aerozol lub krople środka trującego, a ze względu na zasadę działania – na środki przenoszenia broni chemicznej do celu odpowiednio: wybuchowe i nie wybuchowe.

Według poglądów wojskowych broń chemiczna jest przeznaczona do rażenia wojsk, utrudnienia wykorzystania terenu, uzbrojenia i sprzętu bojowego oraz technicznych środków materiałowych służących do prowadzenia walki zbrojnej.

3. BOJOWE ZASTOSOWANIE BRONI CHEMICZNEJ

W Wojsku Polskim przygotowanie do przetrwania ataku BMR, określa się jako realizację przedsięwzięć obrony przed bronią masowego rażenia. I opiera się ono na wiedzy na temat zasad jej użycia. Broń chemiczna według poglądów specjalistów zajmujących się obroną przed bronią masowego rażenia może zostać użyta kilkoma sposobami. Tak więc broń chemiczna, a w szczególności bojowe środki trujące służące do eliminacji siły żywej przeciwnika są projektowane w taki sposób żeby [8]:

- a) ulegały technologicznie łatwemu do realizacji rozproszeniu w dawkach toksycznych na terenie zajęтым przez przeciwnika;
- b) utrzymywały się przez czas wystarczająco długi dla skutecznego porażenia celów;
- c) powodowały śmierć lub obezwładnienie celów;
- d) były podatne na znajdujące się w wyposażeniu sił zbrojnych dysponenta broni chemicznej (czyli strony stosującej tę broń) środki do likwidacji skażeń w celu usuwania zagrożenia dla wojsk (i ludności cywilnej) po opanowaniu obszaru stosowania.

Użycie broni chemicznej jest możliwe według kilku metod (schematów) postępowania, które wymagają odmiennego przygotowania bojowych środków trujących przez dysponenta broni chemicznej, a są one następujące:

1. Strategiczne albo obszarowe zastosowanie broni chemicznej podczas którego:
 - a) Strona atakująca przygotowuje uzbrojenie zdolne do przenoszenia jej na znaczne odległości od własnych sił żywych, bezpośrednio w głąb terenu zajętego przez przeciwnika (na głębokie zaplecze obszaru prowadzenia walki zbrojnej przez wojska znajdujące się w styczności). W tym celu bojowe środki trujące są przenoszone przez: głowice rakiet, pociski artyleryjskie lub bomby lotnicze. Zwykle celem ataku jest spowodowanie chaosu na terytorium przeciwnika, więc gęstość rozproszenia trucizn jest minimalna. Zadaniem jest sprowadzenie na nieprzygotowaną ludność przeciwnika zagrożenia, które przyczyni się do powstania paniki i dezorganizacji rytmu życia państwa oraz zaangażowanie znaczących sił i środków do usuwania skutków jej zastosowania.
 - b) Strona broniąca się w sposób klasyczny umacnia swoje linie obrony zaporami złożonymi ze środków minersko-zaporowych, z których część jest przygotowana do rozpylenia znacznej ilości bojowych środków trujących. Celem zastosowania tego rodzaju tzw. zapór inżynierii

ryjno-chemicznych jest obezwładnienie całych związków taktycznych przeciwnika. Strona pozostająca w defensywie oczekuje, że napastnik jest przygotowany do realizacji zadań w warunkach zagrożenia i po wystąpieniu skażeń. Dlatego uprzednio zgromadzona i przygotowana do bojowego użycia ilość i rodzaj BST musi zapewnić przełamanie środków ochronnych zastosowanych przez prowadzącego natarcie. Z tego powodu przygotowuje się wyłącznie substancje silnie toksyczne, o dużej trwałości w środowisku i odporne na środki służące do ich neutralizacji.

2. Taktyczne zastosowanie broni chemicznej, podobnie jak w przypadku strategicznego, wymaga przeniesienia ładunków wypełnionych bojowymi środkami trującymi na znaczną odległość od własnych wojsk. Mniejsze obszary mogą być skutecznie atakowane przez zwykłe (proste i nieskomplikowane) samoloty wyposażone w instalacje do rozpylania pestycydów. Jednak w tym przypadku aplikowane bojowe środki trujące powinny spowodować maksymalną liczbę zgonów w szeregach przygotowanego przeciwnika (tzw. strat bezpowrotnych) oraz ulegać szybkiej neutralizacji w środowisku pola walki. Jest to wymaganie związane z koniecznością szybkiego opanowania (zajęcia) terenu przeciwnika – przez wojska dysponenta broni chemicznej, niemalże natychmiast po wyeliminowaniu siły żywej przeciwnika, wobec której ją zastosowano.
3. Użycie broni chemicznej w pomieszczeniach to niezwykle haniebny, niegodny moralnie i pozbawiony wszelkiego humanitaryzmu sposób jej zastosowania. W przeszłości posłużono się nim w celu eksterminacji znacznych grup ludności, przede wszystkim na terenie Europy w czasie II Wojny Światowej. Zastosowano wówczas trucizny o dużej skuteczności, łatwo rozpylane i szybko neutralizowane m.in. wskutek reakcji z wodą. Zapewniało to możliwość ograniczenia narażenia obsługi komór gazowych na działanie stężeń resztkowych bojowych środków trujących. Użycie bojowych środków trujących w pomieszczeniach, do celów terrorystycznych, jest stosowane przy oczekiwaniu skutków w postaci maksymalnie dużej liczby ofiar ataku, przy jednoczesnym użyciu minimalnych ilości BST. W tym przypadku dokonuje się wyboru środka trującego, który powinien uniemożliwiać lub poważnie dezorganizować prowadzenie akcji ratunkowej wobec porażonych i rannych np. w rezultacie jednoczesnego zastosowania klasycznych materiałów wybuchowych. Z powyższego wynika, że zastosowane będą wówczas substancje chemiczne o największej trwałości.

4. BOJOWE ŚRODKI TRUJĄCE

Podstawowym składnikiem broni chemicznej są bojowe środki trujące, czyli toksyczne związki chemiczne, które ze względu na swoje właściwości fizyczne i che-

miczne nadają się do militarnego wykorzystania. Dysponent broni chemicznej oczekuje, że umożliwią one eliminację siły żywej przeciwnika poprzez spowodowanie zgonu lub trwałego okaleczenia wyłączającego z walki.

Przy rozważaniach dotyczących możliwości zastosowania konkretnej substancji chemicznej, jako składnika broni chemicznej należy rozważyć szereg właściwości fizykochemicznych, które pozwolą na spełnienie wymagań stawianych tego typu substancjom chemicznym. Właściwości te powinny też spełniać szereg wymagań taktyczno-technicznych. Należy do nich wysoka toksyczność, szybkie albo utajone działanie, brak cech organoleptycznych, łatwa przenikalność przez materiały stosowane w środkach ochrony, odporność na wpływ czynników atmosferycznych i chemicznych środków odkażających. Takie substancje chemiczne powinny być odporne na detonację, podwyższoną temperaturę, długotrwałe magazynowanie i powinny być trudno wykrywalne [4–7].

Bojowe środki trujące – opisane zarówno w międzynarodowych porozumieniach rozbrojeniowych jak i w specjalistycznej literaturze przedmiotu, z zastrzeżeniem dotyczącym poznanych dotychczas – charakteryzują się śmiertelnym lub co najmniej wysoce szkodliwym działaniem na ludzi, zwierzęta i / lub uprawy roślin. Stanowią one jak wspomniano uprzednio podstawowy składnik broni chemicznej. Celem wojskowym zastosowania BST jest skażenie: atmosfery i / lub terenu, techniki bojowej, obiektów przemysłowych, szlaków komunikacyjnych, budynków, upraw itp. Daje to możliwość ograniczenia swobody ruchów przeciwnika w terenie i wymuszonego wykorzystania określonych obszarów (rejonów) do realizacji zadań w czasie walki zbrojnej. BST są najczęściej cieciami i ciałami stałymi, rzadziej gazami, a w stanie bojowym występują w postaci par i aerozoli. Pary ciekłych środków trujących są na ogół cięższe od powietrza. Prężność par, lotność, temperatury wrzenia i krzepnięcia BST są bardzo zróżnicowane. Większość środków trujących dobrze rozpuszcza się w tłuszczach (olejach, smarach) oraz w rozpuszczalnikach organicznych (alkoholach, dichloroetanem, benzenie). W wodzie rozpuszczają się słabo z kilkoma wyjątkami (m.in.: sarin, cyjanowodor, fluorooctany). Pod względem chemicznym prawie wszystkie BST są związkami organicznymi, z nielicznymi wyjątkami [6].

BST należą do różnych klas związków chemicznych, z czego wynika ich zróżnicowana reaktywność chemiczna. Przeważnie są to substancje mało reaktywne, odporne na hydrolizę i powoli reagujące z substancjami do likwidacji skażeń – potocznie, lecz niezgodnie z współczesną nomenklaturą wojskową, nazywanymi odkażalnikami. Właściwości chemiczne środków trujących decydują o sposobach ich bojowego zastosowania na polu walki, wykrywania, odkażania, a także wpływają na mechanizm ich toksycznego działania.

Z powyższych rozważań wynika, że nie wszystkie trucizny mogą być wykorzystane jako BST. Zatrucie żywego organizmu następuje po wnikięciu środka trującego do jego wnętrza. Drogami wnikania (tzw. wrotami skażenia) mogą być: układ oddechowy, skóra, błony śluzowe, przewód pokarmowy i otwarte rany.

Właściwości toksyczne związków chemicznych są związane z budową ich cząsteczek, a w szczególności z występowaniem określonych, aktywnych grup funkcyjnych, tzw. ugrupowań toksyforowych. W wyniku reakcji chemicznej zachodzącej pomiędzy związkami budującymi żywy organizm, a środkami trującymi, dochodzi do powstawania zaburzeń niektórych procesów biochemicznych, na zewnątrz objawiających się, jako obraz zatrucia.

O skuteczności działania środka trującego decyduje dawka. Znane są różne dawki. LD_{50} (ang. *Lethal Dose*, LD; łac. *Dosis Letalis*, DL), jest średnią dawką śmiertelną, powodującą zgon 50% zatrutych. ID_{50} (ang. *Incapacitating Dose*) – to średnia dawka powodująca niezdolność do walki (zdolność bojową traci 50% porażonych). PD_{50} (ang. *Primary Dose*) – to średnia dawka progowa (objawy zatrucia pojawiają się u 50% osób znajdujących się w strefie działania środka trującego) [9].

Mechanizm toksycznego działania zależy od rodzaju BST i w wielu przypadkach nie jest dokładnie znany. Objawy zatrucia, jako zewnętrzna reakcja porażonego organizmu, są uzależnione od rodzaju BST i stanowią kryterium ich toksykologicznej klasyfikacji. Według tej klasyfikacji BST dzieli się na [4–8]:

- a) środki działające na układ nerwowy, tzw. paralityczno-drgawkowe, należą do nich związki fosforoorganiczne: sarin, soman, V gazy, substancje A;
- b) środki parzące: iperyt siarkowy, iperyt azotowy, luizyty;
- c) środki ogólnotrujące: cyjanowodór, chlorocyjan;
- d) środki duszące: fosgen, dwufosgen;
- e) środki łzawiące i drażniące: chloroacetofenon, adamsyt;
- f) środki psychotoksyczne;
- g) toksyny.

Podział BST umożliwia określenie środków i sposobów służących do leczenia porażonych, a także ułatwia prace nad sposobami ochrony i obrony przed nimi.

Powyższa klasyfikacja nie jest w wielu przypadkach jednoznaczna, ponieważ niektóre BST charakteryzują się kompleksowym oddziaływaniem toksycznym na organizm człowieka np.: iperyty i luizyty oprócz działania parzącego wykazują działanie ogólnotrujące. Z kolei środki łzawiące i drażniące są nieco mniej trujące i służą do utrudnienia prowadzenia walki zbrojnej lub jedynie chwilowego obezwładnienia przeciwnika. Tak więc środki łzawiące i drażniące powodują szybkie podrażnienie ośrodków czuciowych i powodują uciążliwe efekty fizjologiczne, które zanikają szybko po ustaniu narażenia. W niskich stężeniach powodują silne pieczenie oczu i silne łzawienie. W większych stężeniach powodują podrażnienie skóry i układu oddechowego. Mogą wywoływać nudności i wymioty. Istnieją duże podobieństwa ich działania do środków stosowanych w czasie pokoju, w celu egzekwowania prawa. Środki te drażnią układ oddechowy, powodują łzawienie, pieczenie oczu, gwałtowny kaszel, kichanie, nudności i uczucie ogólnego dyskomfortu. I w tym przypadku, w odniesieniu do zdrowych ludzi objawy narażenia ustępują po kilkudziesięciu minutach, nie pozostawiając trwałych obrażeń.

Z wojskowego punktu widzenia BST klasyfikuje się przyjmując za podstawę ich właściwości bojowe. Ze względu na charakter porażenia siły żywej przeciwnika wyszczególnia się: uśmiercające (letalne) BST, które powodują zatrucie śmiertelne lub wymagające długotrwałego, specjalistycznego leczenia porażonych (sarin, VX, substancje A, fosgen, cyjanowodór); obezwładniające BST, powodujące przejściową niezdolność do walki w okresie kilku godzin do kilku dni (psychotoksyczne BST); nękające BST, które utrudniają przeciwnikowi prowadzenie działań bojowych zmuszając go do użycia środków ochrony przed skażeniami, nie stwarzając praktycznie niebezpieczeństwa zatruć śmiertelnych.

Powyższy podział nie jest precyzyjny, ponieważ charakter porażenia pozostaje w ścisłym związku z wchłoniętą dawką. I tak np. iperyty przy wyższym stężeniu lub wyższej gęstości skażenia mogą powodować porażenie śmiertelne, natomiast niskie stężenia sarinu lub cyjanowodoru mogą powodować jedynie okresowe obezwładnienie siły żywej. Ze względu na czas wystąpienia objawów porażenia BST dzieli się na: szybko działające, których skutek działania występuje natychmiast lub najwyżej po kilku minutach od wchłonięcia BST (sarin, VX, cyjanowodór, drażniące BST); wolnodziałające, których objawy działania występują po tzw. okresie utajonego działania (fosgen, iperyty, niektóre psychotoksyczne BST) [9].

Niezwykle ważną właściwością BST jest czas ich toksycznego działania w terenie. Z tego punktu widzenia wyróżnia się: nietrwałe BST, utrzymujące się w terenie kilka do kilkudziesięciu minut (fosgen, cyjanowodór, sarin w warunkach letnich); trwałe BST, które zachowują działanie rażące przez okres od kilku godzin do kilku tygodni (VX, prawdopodobnie substancje A, soman, iperyty). Czas rażącego działania zależy od warunków meteorologicznych.

W armiach państw NATO bojowe środki trujące dzieli się na następujące grupy:

- I. etatowe – środki trujące produkowane wyłącznie do celów militarnych i wówczas będące w wyposażeniu wojsk (VX, sarin, iperyt siarkowy, adam-syt, chloroacetofenon, CS, BZ i inne);
- II. rezerwowe, czyli środki trujące, które produkuje się na skalę przemysłową do celów niewojskowych np. jako półprodukty w przemyśle chemicznym (fosgen, cyjanowodór, chlorocyjan, niektóre związki arsenu);
- III. warunkowo etatowe, czyli substancje, które produkuje się w niewielkich ilościach ze względu na wysoki koszt produkcji, bądź których produkcja przemysłowa nie jest jeszcze możliwa (niektóre toksyny i środki psychotoksyczne, dywersyjne BST).

Rezerwowe i warunkowo-etatowe BST określa się w terminologii wojskowej jako potencjalne BST.

5. FOSFOROORGANICZNE BOJOWE ŚRODKI TRUJĄCE (FOST) KLASYCZNE

To bez wątpienia najbardziej śmiertelne bojowe środki trujące spośród substancji chemicznych wytwarzanych na skalę przemysłową. Ich produkcja rozpoczęła się jeszcze podczas II wojny światowej, a sumaryczna masa zapasów w arsenałach przypuszczalnie osiągnęła podczas zimnej wojny około 50 000 ton i była to ilość wystarczająca do wielokrotnego uśmiercenia całej populacji ludzkiej. Fosforoorganiczny ST o nazwie tabun był podczas II Wojny Światowej produkowany przez Anorgana GmbH w Dyhrenfurth, obecnie Rokita w Brzegu Dolnym. Przy jego produkcji, jako więzień, zatrudniony był dr Andrzej Waksmundzki, później profesor, wybitny chemik analityk. Substancje fosforoorganiczne ulegają w środowisku szybkemu rozkładowi, jednak produkty ich hydrolizy również są toksyczne, co wynika z ich przynależności do grupy neurotoksyn, czyli substancji umożliwiających zablokowanie czynności układu nerwowego organizmu żywego. Z powodu objawów zatrucia określa się je mianem substancji (gazów) paraliżujących. Do grupy fosforoorganicznych bojowych środków trujących należy zaliczyć także Nowiczoki, czyli wszystkie substancje o kodowej nazwie A. Pojawiły się one w arsenale Związku Socjalistycznych Republik Sowieckich (ZSRS) około roku 1988 [4-5].

Wśród fosforoorganicznych bojowych środków trujących (tzw. *klasycznych gazów paraliżujących*) wyróżnia się dwie główne grupy: związki G (*G-gazy*) i związki V (*V-gazy*).

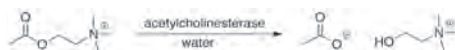
Związki V charakteryzują, w stosunku do związków grupy G, wyższe temperatury wrzenia i mniejsza lotność, co powoduje ich większą trwałość w środowisku pola walki. Uznawane są za szczególnie niebezpieczne z powodu toksyczności kontaktowej, jednak gdy występują w postaci gazowej są co najmniej dwa razy silniej trujące niż np. sarin. Z tego wynika, że nawet najmniejsza ilość związku chemicznego z grupy V-gazów w powietrzu jest ekstremalnie niebezpieczna. Nie są one pomimo nazwy gazami – mają postać cieczy w temperaturze otoczenia. Mogą być wchłaniane przez każdą część ciała oraz penetrują zwykłe tkaniny odzieżowe. Ponadto efekt toksyczny podlega kumulacji, więc powtarzająca się ekspozycja na niskie dawki może doprowadzić do zatrucia. Podanie człowiekowi kilku miligramów trucizny z tej grupy może spowodować zgon w czasie kilku minut, a mniejsze dawki są zdolne do częściowego porażenia żywego organizmu, co stanowi zagrożenie dla zdrowia, a w dłuższym czasie nawet dla życia.

Najbardziej znane przypadki ciężkiego rozstroju zdrowia po przyjęciu znikomych dawek trucizn fosforoorganicznych dotyczą, według niektórych niepotwierdzonych (lub budzących wątpliwości) źródeł, tzw. syndromu wojny w Zatoce Perskiej. Syndrom ten obejmuje szereg nieuleczalnych schorzeń neurologicznych oraz nowotworowych, które przypisuje się długotrwałemu narażeniu na małe dawki FOST. Dziesiątki tysięcy weteranów ucierpiało po narażeniu na FOST spowodowanym przypadkowymi emisjami podczas ich unieszkodliwiania i niszczenia podczas wyburzania składów broni chemicznej. Fosforoorganiczne bojowe środki trujące są

znacznie bardziej trujące niż inne bojowe środki trujące, nawet w niskich dawkach, w tym podprogowych, o czym w dalszej części niniejszego artykułu.

6. TOKSYCZNOŚĆ FOST

Wszystkie fosforoorganiczne bojowe środki trujące, zarówno typu V jak i G, wywołują taki sam efekt toksyczny. W organizmie żywym enzym acetylocholinoesteraza (AChE) przyłącza się do neuroprzekaźnika – acetylocholino (ACh) i powoduje jego hydrolizę, co pozwala na odblokowanie punktu receptorowego neuronu:



Po intoksykacji cząsteczka gazu paraliżującego przyłącza się do AChE i blokuje jego centrum aktywne, a więc możliwość katalizowania reakcji rozkładu ACh. W efekcie ACh nie ulega hydrolizie, a jej nadmierne nagromadzenie się powoduje nadpobudliwość organów (narządów i tkanek) organizmu, które są stymulowane przez neurony kontrolowane przez acetylocholinę. Ludzie zatruci FOST wykazują następujące objawy: zwężenie źrenic (miozę), katar, ucisk w klatce piersiowej, zaburzenie widzenia, nudności, wymioty, skurcze, ślinotok, potliwość, senność, rozkojarzenie, trudności z oddychaniem, duszność, drżenie, oszołomienie, konwulsje i śpiączka [10].

Cząsteczki FOST po kontakcie z oczami powodują zwężenie źrenic, jako bezpośredni miejscowy objaw narażenia na substancję zdolną do zablokowania AChE we krwi, czyli miozę. Taka reakcja często występuje razem z uciskiem w klatce piersiowej i katarzem. W przypadku braku kontaktu FOST z oczami mioza jest ostatnim przed zgonem objawem narażenia na niego. Narażenie na toksyczne dawki gazów paraliżujących może spowodować gwałtowne wydzielanie śluzu w oskrzelach, łzawienie, wypróżnianie jelit, obfite pocenie się, zwężenie źrenic, skurcz oskrzeli i jelit, częstoskurcz serca, drżenie i skurcze mięśni, osłabienie, paraliż, utratę świadomości, konwulsje, zanik akcji oddechowej i śmierć. Narażenie na FOST wywołuje, w bezpośredniej zależności od wchłoniętej do organizmu dawki, trzy typy reakcji toksycznych w związku z zaburzeniem aktywności acetylocholinoesterazy: muskarynowa, nikotynowa i centralnego układu nerwowego; które można opisać następująco [9]:

1. Reakcja muskarynowa (muskarynowy efekt toksyczny) ma miejsce w układzie nerwowym przywspółczulnym, co powoduje w zależności od wchłoniętej dawki odpowiednio: zapalenie spojówek, zwężenie źrenic, utratę akomodacji oczu, wysięk z nosa, gwałtowne wydzielanie śluzu w oskrzelach, skurcz oskrzeli, utratę apetytu, wymioty, skurcze jelit, pocenie się, biegunkę, ślinotok, bradykardię, spadek ciśnienia krwi.
2. Nikotynowa reakcja zachodzi w układzie nerwowym współczulnym i somatycznym, co powoduje drżenie i paraliż mięśni.

3. Reakcja centralnego układu nerwowego objawia się charakterystycznym stanem *splątania* (amencji), utratą refleksu, stanami lękowymi, zaburzeniami mowy, drażliwością, zapominalstwem, depresją, brakiem rozsądku, zmęczeniem, bezsennością, ustaniem akcji oddechowej i śmiercią.

Narażenie żołnierzy i ogółu populacji, w czasie działań zbrojnych na niskie stężenia substancji fosforoorganicznych może prowadzić do chronicznych chorób neurologicznych, a w szczególności do występowania odłożonych w czasie (opóźnionych) neuropatii. Można je zaobserwować też, w czasie pokoju, jako np.: skutki narażenia na duże dawki lipidofilowych pestycydów stosowanych w agrotechnice.

Nie tylko FOST, ale także pozostałe substancje fosforoorganiczne zostały zidentyfikowane, jako powodujące opóźnione zatrucia neurologiczne, objawiające się w postaci *ataksji* (odruchów mimowolnych), neuropatii (osłabienie motoryki ciała) i paraliżu. Opisano je, jako zespół chorobowy znany pod nazwą późna neuropatia indukowana organofosforanami (ang. *organophosphate-induced delayed neuropathy*, OPIDN). Symptomatologia OPIDN obejmuje zaburzenia ruchowe (niedowłady) i czuciowe (parestezje), zwłaszcza w obrębie kończyn dolnych. Są one związane z postępującymi zmianami zwyrodnieniowymi w nerwach czuciowych i ruchowych wskutek upośledzenia transportu aksonalnego a ich objawy występują po upływie kilku tygodni od zatrucia. Powrót do zdrowia może trwać lata i jest często niepełny.

Dodatkowo odnotowano różnorodne dysfunkcje ośrodkowego układu nerwowego, dla których brak jednolitego wspólnego terminu. Czasem określa się je mianem chronicznej neurotoksyczności po zatruciu pestycydami fosforoorganicznymi (*organophosphorus ester – induced chronic neurotoxicity*, OPICN), która charakteryzuje się występowaniem różnorodnych zaburzeń, zwłaszcza w sferze emocjonalnej (labilność emocjonalna, stany depresyjne, drażliwość) i poznawczej (upośledzenie pamięci, kłopoty z koncentracją uwagi) [11]. Istnieje podobieństwo symptomatologii OPICN do symptomatologii zespołu stresu pourazowego (*posttraumatic stress disorder*, PTSD). Zaburzenia te utrzymują się przez lata, a ich mechanizm pozostaje nieznan, jednakże wydaje się, że OPICN jest następstwem interakcji trucizn fosforoorganicznych z AChE [11].

Do reaktywacji AChE stosowane są: atropina i związki należące do grupy oksymów: chlorek pralidoksymu, chlorek obidoksymu, chlorek azoksymu. Oksymy przywracają funkcjonowanie AChE przez usunięcie grupy fosforylującej serynę w centrum aktywnym enzymu.

7. ZBROJENIA NIEKONWENCJONALNE W ZSRS I ROSJI A ROZBROJENIE CHEMICZNE

Początki sowieckich prac nad zastosowaniem trucizn do zwalczania przeciwników politycznych są powiązane z tajnymi służbami. Służby te realizowały projekty określane, jako: Laboratorium 1, Laboratorium 12 i Komórka. Laboratoria te były jednostkami badawczymi w strukturze organów bezpieczeństwa państwowego ZSRS

i stanowiły część działu operacyjnego, zajmującego się badaniami nad truciznami, a ich wpływ na ludzi i sposoby ich zastosowania przetestowano na więźniach.

Kompleksowe badania nad bronią chemiczną w ZSRS zapoczątkowała współpraca z Republiką Weimarską w latach 20. ubiegłego stulecia. Ówczesne Niemcy łamiąc ograniczenia traktatu wersalskiego w zakresie zbrojeń zawarły porozumienia, na mocy których wybudowano tajne ośrodki naukowe - badawcze i komplementarne do nich poligonowe ośrodki szkolenia, a więc odpowiednio: chemiczne, pancerne i lotnicze [6].

W 1924 r. rozpoczęto budowę niemiecko-sowieckiego centrum broni chemicznej Tomka. Został on uruchomiony w 1926 r., w 1928 r. powstała miejscowość Tomka. Po wycofaniu się Niemców ze współpracy w 1933 roku nadal kontynuowano prace nad rozwojem broni chemicznej. W czasach zimnej wojny liczba mieszkańców miasta osiągała 12 000÷15 000, a personelu wojskowego nawet do 60 000.

Po II wojnie światowej działały dwa ośrodki broni chemicznej: Szychany-1 pracujące oficjalnie dla Państwowego Instytutu Technologii Syntezy Organicznej podlegającego Ministerstwu Przemysłu i Szychany-2, gdzie działało laboratorium badawcze i poligon doświadczalny broni chemicznej. Te zamknięte miasta, nazywane również Wolsk-17 i Wolsk-18, znajdowały się w odległości około 4 km od siebie. W 1992 roku w obu tych lokalizacjach dokonywano oficjalnie zniszczenia broni chemicznej, jednak w 1997 roku prezydent Borys Jelcyn ogłosił je miastami zamkniętymi, utajniając charakter prowadzonej tam działalności - co wzbudziło oczywiste, w takim wypadku podejrzania i zainteresowanie Zachodu.

Szychany-1, obok Nowoczeboksarska i Wołgogradu, były głównymi ośrodkami badawczymi broni chemicznej w ZSRR, podczas gdy Szychany-2 i Turkus w Kazachstanie były najważniejszymi poligonami doświadczalnymi. W ośrodku Szychany-2 według oficjalnych doniesień strony rosyjskiej aktualnie prowadzone są *jedynie* badania nad sposobami wykrywania i sposobami ochrony przed bojowymi środkami trującymi. Nad zagadnieniami tymi pracuje bardzo intensywnie także rosyjska Akademia Wojsk Chemicznych (ros. *Военная академия радиационной, химической и биологической защиты имени Маршала Советского Союза С. К. Тимошенко*).

W mieście Szychany-1 i -2 znajdują się m.in.: Naukowo-Badawczy Instytut Radiacji i Obrony Chemicznej i Biologicznej NII RChBZ (ros. *НИИ РХБЗ, Научно-исследовательский институт Радиационной Химической и Биологической Защиты*), 1 Mobilna Brygada RChBZ (RChBZ to specjalny rodzaj wojsk w Siłach Zbrojnych Federacji Rosyjskiej, przeznaczony do ich ochrony przed bronią masowego rażenia), baza serwisowa RChBZ, szychanski poligon testów chemicznych, szpital wojskowy i poliklinika. Wiele poszlak wskazuje na tę lokalizację, jako miejsce badań poligonowych Nowiczoków.

Zakończenie zimnej wojny i rozpad ZSRS dawał nadzieję na utrwalenie światowego pokoju, która powoli, ale systematycznie zanika. Pod koniec XX wieku rozpoczął się proces rozbrojenia i zmniejszania zasobów broni masowego rażenia. Z

państw posiadających broń chemiczną największy arsenał posiadał Związek Socjalistycznych Republik Sowieckich. Kraj ten zadeklarował posiadanie 40 000 ton broni chemicznej, która była w przeszłości rozmieszczona w 8 obiektach: Gorny (obwód Saratowo, około 2,9% deklarowanych zapasów masowych), Kambarka i Kiznerze (Republika Udmurdzka, z odpowiednio: 15,9% i 14,2%), Leonidowka (obwód Penza z 17,2%), Maradikowski (obwód Kirow z 17,4%), Poczeb (obwód Briańsk z 18,8%) i Szczaczije (obwód Kurgan – 13,6%). Około 7500 ton deklarowanych zapasów, które były zmagazynowane w Gornym i w Kambarce, stanowiły gazy parzące (iperyt siarkowy, mieszanina iperytu siarkowego i luizytu). Pozostałe zapasy zawierały trzy fosforoorganiczne bojowe środki trujące: głównie sarin, a także soman i V-gaz, którymi napełniono w przybliżeniu około 4 do 4,5 milionów sztuk amunicji chemicznej różnego rodzaju.

Rozbrojenie Rosji przez zniszczenie broni chemicznej i neutralizację posiadanych zasobów broni chemicznej wymagało nie tylko zaangażowania zasobów państwa rosyjskiego, ale i pomocy międzynarodowej. Rosja niszczyła zasoby BST stosując technologię opartą na procesie neutralizacji opracowanym m.in. przez Państwowy Instytut Badawczy Chemii Organicznej i Technologii (ros. *Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии* -- ФГУП ГосНИИОХТ / GosNIIOKiT), co jest istotne z punktu widzenia dalszych rozważań dotyczących Nowiczoków [2].

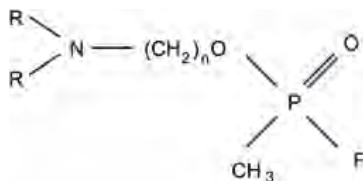
Rosja wywiązała się ze swoich zobowiązań traktatowych, niszcząc 1% swoich środków chemicznych w terminie określonym w konwencji o zakazie broni chemicznej na rok 2002, ale zwróciła się o pomoc techniczną i finansową oraz przedłużenie terminów w kolejnych latach, w tym w 2004 i 2007 r., oficjalnie ze względu na środowiskowe wyzwania związane z procesem niszczenia środków chemicznych. Ta procedura przedłużenia, określona w traktacie, została zastosowana także przez inne kraje, w tym Stany Zjednoczone. Przedłużony termin całkowitego zniszczenia (kwiecień 2012 r.) nie został także dotrzymany. Do października 2011 r. Rosja zniszczyła 57% swoich zapasów. W dniu 27 września 2017 r. Organizacja ds. Zakazu Broni Chemicznej (ang. *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*, OPCW) ogłosiła, że Rosja zniszczyła całe swoje zapasy broni chemicznej.

7.1. BOJOWE ŚRODKI TRUJĄCE IV GENERACJI

Do I generacji BST zalicza się: fosgen, difosgen, chloropikryna, cyjanowodór, chlorek cyjanu, iperyt siarkowy, iperyt azotowy i luizyty. Do II generacji BST należą: tabun, sarin, soman. III generację BST tworzą: VX, VR i estry Tammelina.

Biorąc pod uwagę struktury cząsteczek związków chemicznych określanych jako Nowiczoki, można przypuszczać, że są one owocem twórczego rozwinięcia prac zapoczątkowanych w latach 50. ubiegłego stulecia. Pomysł opracowania tych nowych, bardzo toksycznych fosforoorganicznych środków o działaniu paralityczno-drgawkowym miał się pojawić w Związku Sowieckim po II Wojnie Światowej. W tym czasie

odkryto związki serii V i tzw. estry Tammelina, czyli (O-(N,N-dialkiloaminoalkilo)-metylofluorofosfoniany), tj. związki chemiczne o ogólnej strukturze przedstawionej poniżej, gdzie odpowiednio: R- to: CH_3 -, C_2H_5 -, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ -; z kolei n zawiera się w przedziale od 1 do 5 (najczęściej $n = 2$).



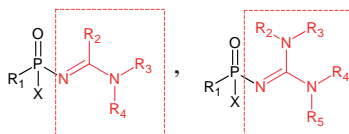
Ich odkrywcą w latach 50. XX wieku był Lars-Erik Tammelin w ramach programu badań nad potencjalnymi fosforoorganicznymi bojowymi środkami trującymi. Powtórzenie rezultatów uzyskanych na Zachodzie, pozwoliło na podjęcie niezakłóconych prac nad IV generacją BST.

Według doniesień Związek Sowiecki i Rosja, która kontynuowała program zbrojeń niekonwencjonalnych, podjęły działania dotyczące opracowania bojowych środków trujących IV generacji. Zadania postawione przez najwyższe władze przed naukowcami były ambitne, ale co należy przyznać, możliwe do osiągnięcia. Substancje należące do IV generacji BST powinny [5, 6]:

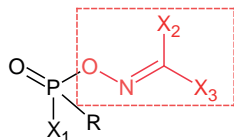
1. być niewykrywalne przy użyciu standardowych urządzeń do wykrywania substancji chemicznych armii państw NATO, znajdujących się w ich wyposażeniu w lat 70. i 80. ubiegłego stulecia;
2. umożliwiać przeniknięcie do wnętrza organizmu żołnierza strony przeciwnej pomimo zastosowania indywidualnych środków ochrony przed skażeniami, w postaci filtracyjnej maski przeciwgazowej i specjalnej odzieży ochronnej;
3. być bezpieczniejsze niż poprzednie generacje BST podczas: składowania i przygotowania do bojowego zastosowania;
4. nie występować w odpowiednich wykazach (także prekursorów) Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej.

Te wymagania są prawdopodobnie spełniane przez grupę fosforoorganicznych związków chemicznych nazywanych ogólnie Nowiczok, mogą być stosowane w amunicji chemicznej.

Nowe rodzaje fosforoorganicznych bojowych środków trujących IV generacji zostały prawdopodobnie opracowane jako fluorofosfoniany i fluorofosforany zawierające fragmenty amidyny i guanidyny przedstawione we wzorach:



amidyna – po lewej stronie i guanidyna - po prawej stronie. We wzorach zastosowano następujące oznaczenia: X = F lub S-alkil, R₁ = O-alkil (pochodna fosforanu) lub alkil (pochodna fosfinianu); R₂, R₃, R₄, R₅ = H, alkil, fenyl, -CN. Inną strukturą Nowiczoka może zawierać fragment formaldoksymu (oksymu formaldehydu):



gdzie:

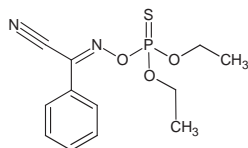
X₁ to F;

X₂ – dowolny fluorowec, -CF₂NO₂, -CN;

X₃ – dowolny fluorowec, -CN;

R – O-alkil (pochodna fosforanu) lub alkil (pochodna fosfinianu).

Ze względu na zastosowanie pochodnych formaldoksymu należy wspomnieć, że pod koniec XX wieku, niemiecka firma Bayer, opracowała fosforoorganiczny pestycyd o nazwie handlowej Phoxim:, którego użycie w rolnictwie zostało zakazane w 2007 r., ze względu na silne właściwości toksyczne.



Związki chemiczne mające powyższe wzory zostały opracowane w ramach programu Foliant.

7.2. PROGRAM FOLIANT

Tajny program badawczy dotyczący broni chemicznej o kryptonimie FOLIANT rozpoczął się około roku 1967 i był kontynuowany w późniejszych latach. Jego celem był rozwój sowieckiej broni chemicznej.

Istnieją pewne poszlaki świadczące, że na opracowanie Nowiczoków w ramach programu FOLIANT, istotny wpływ mogła mieć dezinformacja operacyjna tajnych służb USA wobec ZSRS, dotycząca tajnego amerykańskiego programu zbrojeń niekonwencjonalnych, w wyniku którego rzekomo otrzymano nowy BST z rodziny FOST o nazwie kodowej GJ. Wtedy w ZSRS podjęto prace mające na celu powtórzenie wyników naukowców zachodnich. Dopiero w latach 70. XX wieku po uwolnieniu odpowiednich zasobów naukowo-technicznych kompleksu przemysłowego (chemicznego) przystąpiono do prac nad IV generacją BST. Tak został rozpoczęty na przełomie lat 1973–1974 (według innych źródeł dopiero w latach 80.) [6] pro-

gram FOLIANT, którego celem było opracowanie na potrzeby armii wysokotok-sycznych środków w postaci broni unitarnej i binarnej, o wspomnianych uprzednio właściwościach, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich otrzymywania z substancji nieobjętych nadzorem międzynarodowym [6]. Według doniesień literaturowych [2, 6] niektóre z substancji określanych nazwą Nowiczok mogą być stosowane w amunicji binarnej.

Pierwszy jawnie dostępny artykuł na ten temat ukazał się w tygodniku Moskowskie Nowosti (ros. *Московские новости*) w 1992 roku, autorstwa dwóch chemików Lwa Fiodorowa i Vila (Wilhelma) Mirzajanowa [6]. Publikacja ukazała się w przededniu podpisania przez Rosję konwencji o zakazie broni chemicznej, a jej treść była intrygująca, bowiem według autorów rosyjski Komplex Militarno-Chemiczny wykorzystywał środki otrzymane z Zachodu, w celu realizacji porozumień rozbrojeniowych; na budowę nowego, znacząco zmodernizowanego potencjału do prowadzenia wojny chemicznej. Autorzy ujawnili swoje informacje rzekomo z troski o środowisko, bowiem ze względu na charakter wykonywanej pracy dokonywali pomiarów poziomów stężeń substancji szkodliwych, zarówno w obiektach, jak i poza obiektami związanymi z programem zbrojeń chemicznych, aby potwierdzić, że obce agencje wywiadowcze nie wykryją śladów produkcji i innej zabronionej działalności. Fiodorow i Mirzajanow stwierdzili, że poziomy stężeń środowiskowych śmiertelnych substancji były osiemdziesiąt razy wyższe niż maksymalne bezpieczne stężenie. Rosyjskie władze potwierdziły istnienie Nowiczoków, pośrednio, poprzez aresztowanie i wniesienie oskarżeń o zdradę stanu przeciwko autorom.

Według zeznań biegłych, którymi byli trzej naukowcy *odpowiednio przygotowani*, przez istniejący nadal Komitet Bezpieczeństwa Państwowego (KGB ros. *Комитет государственной безопасности*, КГБ); Nowiczok i inne substancje chemiczne rzeczywiście zostały wyprodukowane, a to prowadziło wprost do konkluzji, że enuncjacje autorów były zdradą stanu. Leonid Rink, który twierdził, że prowadził badania doktoranckie na temat Nowiczoków; pośrednio potwierdził, że struktury opisane przez Fiodorowa i Mirzajanowa były prawidłowe [6]. Co istotne sam Leonid Rink został skazany w Rosji w 1994 roku za nielegalną sprzedaż powyższej substancji, a to być może właśnie ta próbka dała możliwość *operacyjnego* potwierdzenia źródła pochodzenia substancji użytej do ataku na Skripalów [4–6].

Z bliżej nieznanymi do dzisiaj przyczyn, tylko Mirzajanow został aresztowany 22.X.1992 r. i wysłany do więzienia lefortowskiego, prawdopodobnie za potwierdzenie, że rosyjska generalicja kłamała – i nadal kłamie w kwestii rozbrojenia chemicznego. Co istotne dla sprawy i badań nad sposobami ochrony przed bronią chemiczną, Mirzajanow mieszka obecnie w USA, gdzie w 2008 roku wydał autobiograficzną książkę [2].

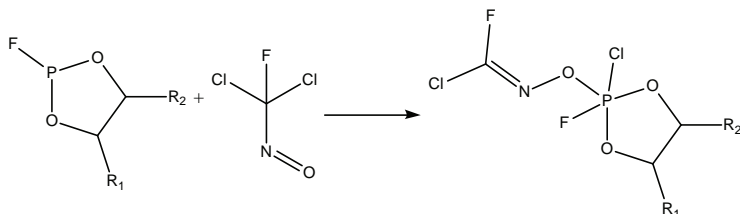
W latach 90. niemiecka Federalna Służba Wywiadowcza (niem. *Bundesnachrichtendienst*, BND) otrzymała próbkę Nowiczoka od rosyjskiego naukowca *nieujawnionego z nazwiska*, która następnie została przeanalizowana w Szwecji, według doniesień agencji Reutera z 18.V.2018 roku [12]. Wzór chemiczny i właści-

wości substancji zostały niejawnie przekazane *wybranym zachodnim* krajom NATO, które używały jej niewielkich ilości do badań sprzętu: ochrony przed skażeniami, wykrywania, likwidacji skażeń i testów medycznych środków ochrony przed skażeniami. O Nowiczoku wspomniano w zgłoszonym w 2008 r. patencie na leczenie zatruc związkami fosforoorganicznymi. Badania prowadzone w tym zakresie przez Uniwersytet Maryland w Baltimore były współfinansowane przez armię amerykańską [5].

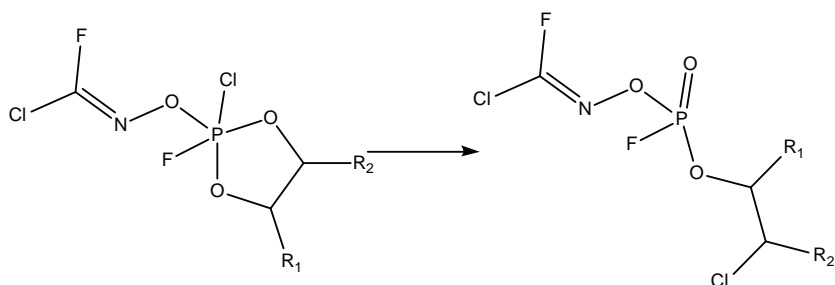
W dostępnej literaturze nie ma zgodności w kwestii nazewnictwa środków trujących znanych jako Nowiczok. Biorąc pod uwagę, że związki te miały być używane w amunicji binarnej, w publikacjach stosuje się nazwę Nowiczok dla poszczególnych składników (prekursorów), jak również dla samych środków paralityczno-drgawkowych. Przeważnie terminu Nowiczoki używa się zarówno w nazewnictwie (nomenklaturze): środków paralityczno-drgawkowych tej grupy, jak i binarnej broni chemicznej (całego układu, w którym środek paralityczno-drgawkowy ma dopiero powstać). Ma to odzwierciedlenie w nazewnictwie prekursorów mających w nazwie pojedyncze cyfry (np. Nowiczok-5 i Nowiczok-7), a także symbole (m.in. Nowiczok# i Nowiczok??). Produkty ich reakcji określane są symbolem „A” z trzycyfrową liczbą (stąd nazwa „związki serii A”). Poszczególni autorzy różnią się w stosowaniu nazw kodowych poszczególnych BST z grupy Nowiczoków [2, 4–6]. W 2018 roku pojawiło się również określenie „związki serii N” (ang. *N-series agents*). Nowiczoki określa się jako bojowe środki trujące czwartej generacji [4–6].

7.3. OTRZYMYWANIE NOWICZOKÓW (SUBSTANCJI A)

Możliwy schemat przebiegu reakcji syntezy Nowiczoków o symbolach kodowych: A-230, A-232 i A-234 opisuje Hoenig [4]. W pierwszym etapie reakcji syntezy powstaje cykliczny ester oksymu, w którym atom fosforu jest pięciowiązalny.

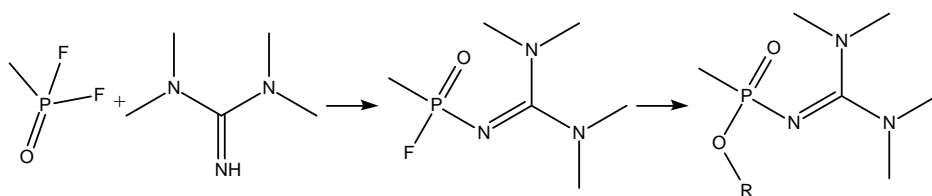


W temperaturze poniżej zera związek ten jest stabilny, jednak podczas ogrzewania następuje otwarcie pierścienia z przeniesieniem atomu chloru i powstaje odpowiedni Nowiczok:

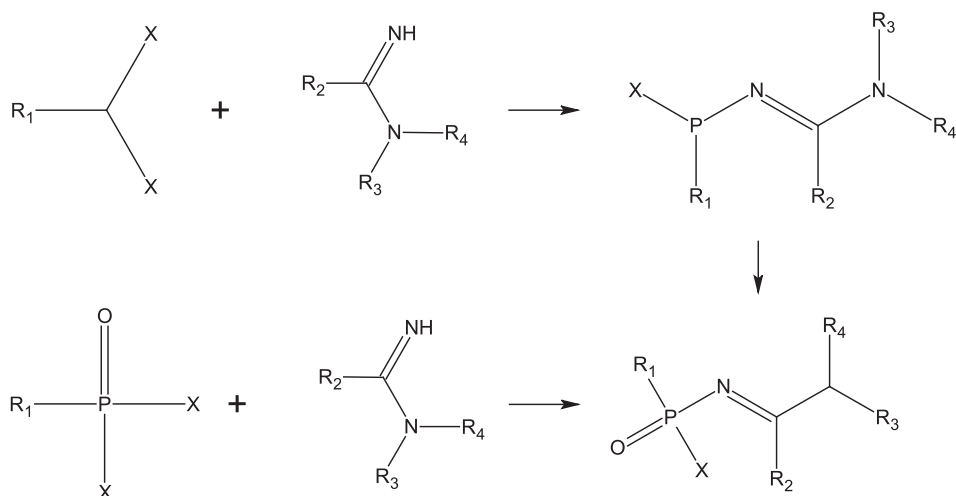


Wydajność tej reakcji wynosi około 30–60%.

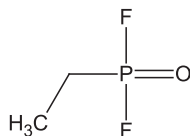
Inny możliwy mechanizm procesu syntezy Nowiczoków opisano w artykule [13], w którym grupa irańskich naukowców wykonała analizę spektrometryczną kilku związków. Podstawowym związkiem opisanym w pracy był analog związku opisanego przez Mirzajanowa jako Nowiczok A-242 (w porównaniu do A-242 miał on podstawniki metylowe zamiast etylowych przy atomach azotu). Otrzymany został poprzez zmieszanie roztworu difluorku metylofosfonowego w dichlorometanie z roztworem tetrametyloguanidyny w trietyloaminie i dichlorometanie. Całość była mieszana przez 30 minut w temperaturze 0–5°C, a powstały osad odfiltrowano. Scharakteryzowano również kilka pochodnych tego związku, w których zamiast atomu fluoru podstawione były grupy *O*-alkilowe (metylowa, etylowa, izopropylowa) i *O*-arylowe (fenyłowa i 2,5-dimetylofenyłowa). Zostały one otrzymane poprzez wkraplanie roztworu wcześniej opisanego związku w dichlorometanie do uprzednio przygotowanego roztworu odpowiedniego alkoholu i wodoru sodu w tym samym rozpuszczalniku, z jednoczesnym mieszaniem przez 2 godziny w temperaturze 0–5°C. Powstały osad był następnie odfiltrowany.



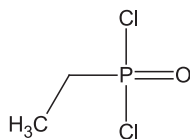
Ogólny schemat reakcji syntezy Nowiczoków można opisać jako reakcje z substratami, w których fosfor występuje na stopniu utlenienia III i V:



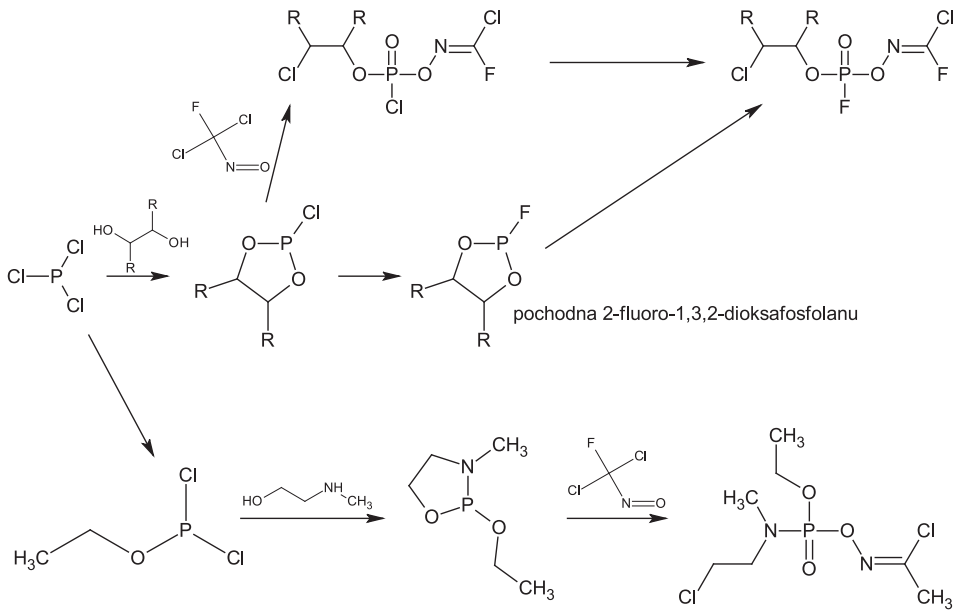
W tym schemacie zastosowano następujące symbole: dla fosforu na III stopniu utlenienia X = Cl, F; R₁ = alkil, fenyl, dialkiloamina; R₃, R₄ = alkil, -CN; dla fosforu na V stopniu utlenienia jeżeli R₁ = metyl; X = F; to prekursorem jest difluorek metylofosfonowy (DF):



natomiast jeżeli R₁ = metyl; X = Cl; to prekursorem jest dichlorek metylofosfonowy (DC).



Inne możliwości przeprowadzenia reakcji syntezy przedstawiono na ogólnym schemacie (R = H, alkil):

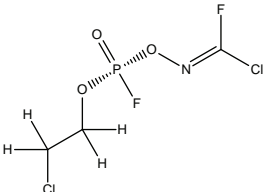


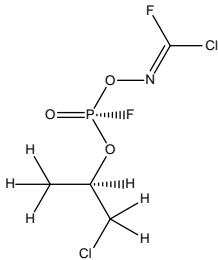
7.4. STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI NOWICZOKÓW

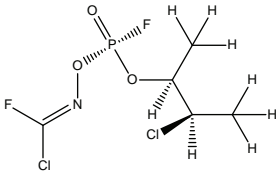
W literaturze nie ma wielu informacji dotyczących stabilności bądź trwałości chemicznej związków z tej grupy. Wiedza na temat sposobów syntezy Nowiczoków nigdy nie została bezpośrednio potwierdzona [4–6]. Podobnie jak w przypadku wzorów strukturalnych, z których jedynie znane są tylko niektóre. I nawet te znane nie są potwierdzone. Związki te różnią się od typowych środków paralityczno-drgawkowych m.in. brakiem wiązania P-C [1]. Tym samym nie uwzględniono tego typu związków chemicznych w Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej i nie podlega on weryfikacji przez OPCW. Nowiczoki mają ugrupowanie $-O-N=C(-X)-Y$ (gdzie X i Y mogą być atomami chloru, bromu, fluoru, ale także pseudohalogenem, np. grupą $-CN$) [5]. Hoenig podaje kilka takich struktur zarówno dla nowiczoków, jak i dla ich prekursorów (będących przypuszczeniami na podstawie struktur nowiczoków i dostępnych w literaturze możliwych dróg syntezy) [4]. W publikacji Ellisona znajduje się kilkadziesiąt możliwych struktur nowiczoków i ich prekursorów [5]. Leszek Konopski wskazuje na możliwą strukturę, w której atom fluoru związany z atomem fosforu zastąpiony jest ugrupowaniem dialkiloamidowym (analogicznym do obecnego w tabunie) [6]. Podaje również, że prowadzone były badania nad związkami posiadającymi podstawniki $Cl-C\equiv C-$ czy $N\equiv C-C\equiv C-$ (zamiast $Cl-CR_1H-CR_2H-$), jak również różne atomy halogenów bądź pseudohalogeny. Inni autorzy opisują strukturę, w której do centralnego atomu fosforu przyłączona jest podstawiona grupa imidoamidowa [3].

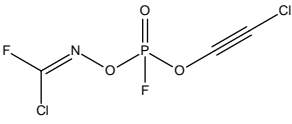
Dostępne źródła literaturowe dostarczają opisu grupy substancji chemicznych, co do których przypuszcza się, że wchodzi one w skład rodziny Nowiczoków.

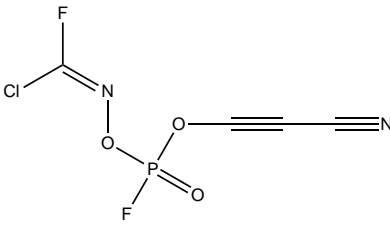
Ponadto występują różnice pomiędzy Mirzajanowem [2] i innymi autorami [4-6]. W następującym zestawieniu opisano przykłady najbardziej znanych przedstawicieli Nowiczoków.

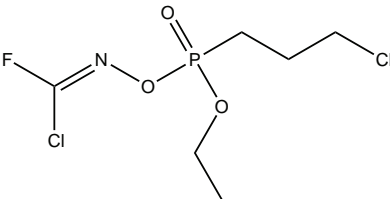
1.  – $C_3H_4Cl_2F_2NO_3P$; chlorek fluorek {[2-chloroetoksy]fluorofosfinylo]oksy}karbonoimidowy (Nr CAS 26102-97-6; Mmol = 241,9). Według Hoeniga – w sprzeczności z danymi podanymi przez Mirzajanowa [2] – jest to Nowiczok o symbolu kodowym A-230 [4] i stanowi produkt reakcji dwóch substratów oznaczonych symbolami: Nowiczok-# i Nowiczok-?? [4].

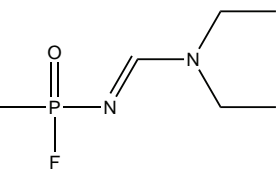
2.  – $C_4H_6Cl_2F_2NO_3P$; chlorek fluorek {[2-chloro-1-metyloetoksy]fluorofosfinylo]oksy}karbonoimidowy (Nr CAS 26102-98-7; Mmol = 256,0). Według Hoeniga [4] jest to Nowiczok A-232 i stanowi produkt reakcji pomiędzy Nowiczokiem-# i Nowiczokiem-5. Ma on niską temperaturę krzepnięcia, czyli występuje w stanie ciekłym w niskich temperaturach. Ma on być 5 do 8 razy bardziej toksyczny od VX, a zatrucie nim ma być trudne w leczeniu. Jego produkcja może być prowadzona w cywilnych fabrykach chemicznych (np. nawozów sztucznych) ze składników, które w większości nie są umieszczone w wykazach Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej.

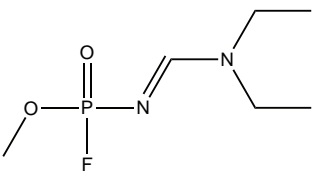
3.  – $C_5H_8Cl_2F_2NO_3P$; chlorek fluorek {[2-chloro-1-metylopropoksy]fluorofosfinylo]oksy}karbonoimidowy (Nr CAS 26102-99-8; Mmol = 270,0). Jest to Nowiczok A-234 i stanowi produkt reakcji pomiędzy Nowiczokiem-5 i Nowiczokiem-7, a jego lotność ma być zbliżona do lotności somanu, przy dziesięciokrotnie wyższej toksyczności.

4.  – $C_3Cl_2F_2NO_3P$; chlorek fluorek {[2-chloroetyloksy]fluorofosfinylo]oksy}karbonoimidowy ($M_{mol} = 237,9$). Możliwe są analogiczne struktury tego związku z innymi halogenami i/lub pseudohalogenami.

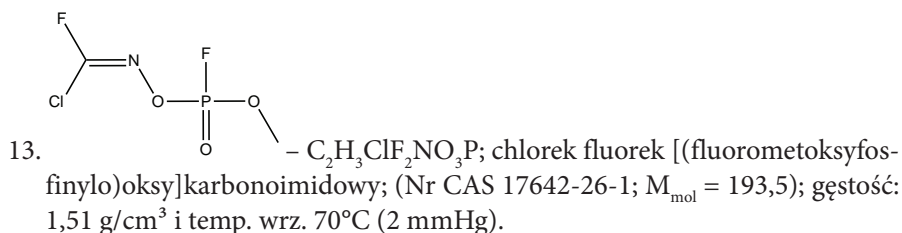
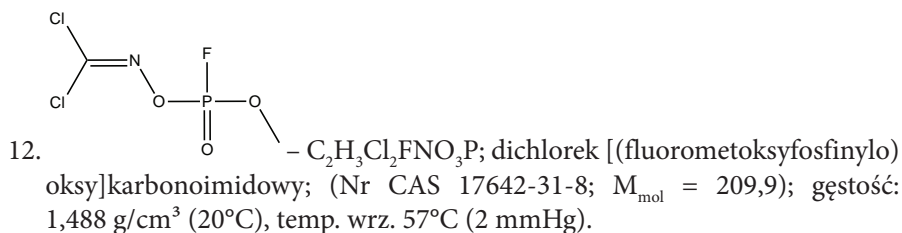
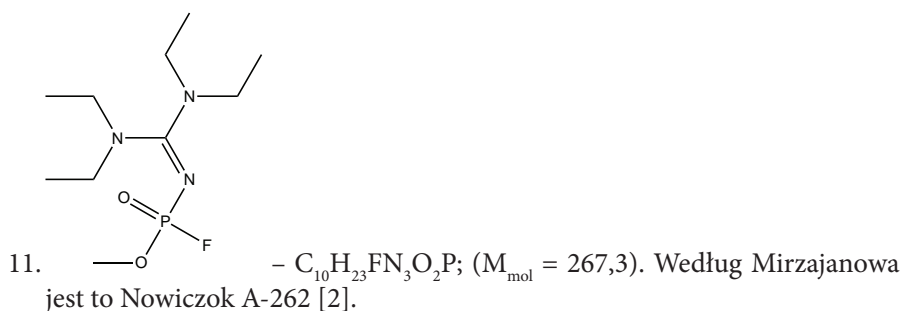
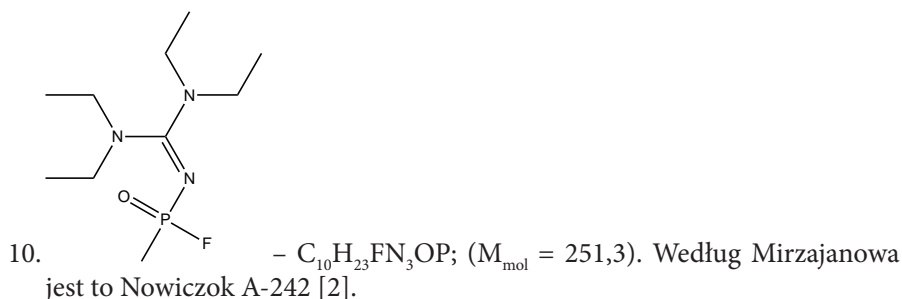
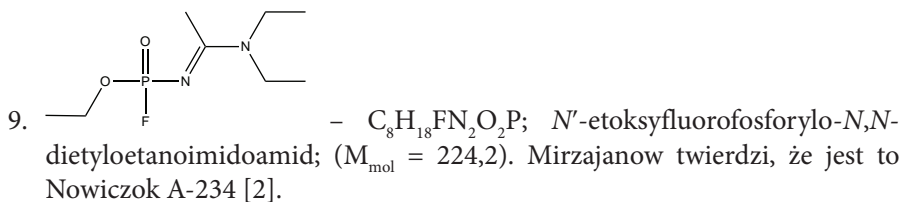
5.  – $C_5H_2ClF_2NO_3P$; chlorek fluorek {[cyanoetyloksy]fluorofosfinylo]oksy}karbonoimidowy ($M_{mol} = 228,5$); możliwe są analogiczne struktury z innymi halogenami i/lub pseudohalogenami.

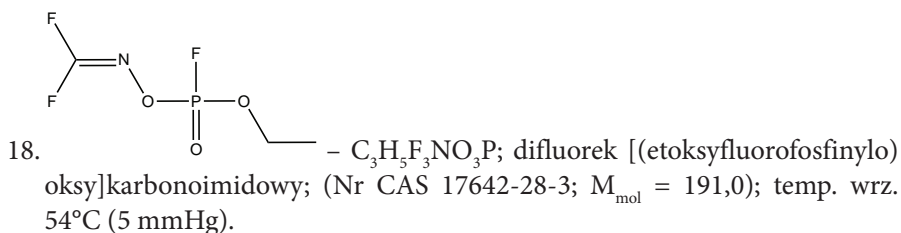
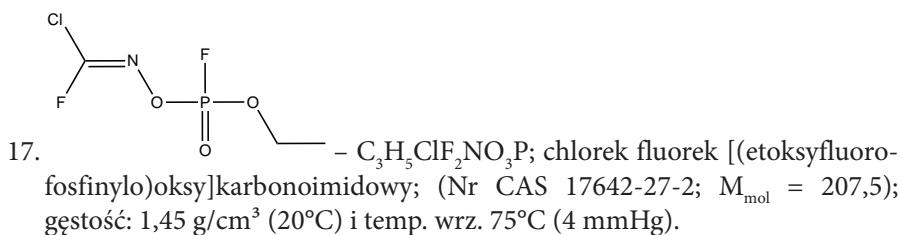
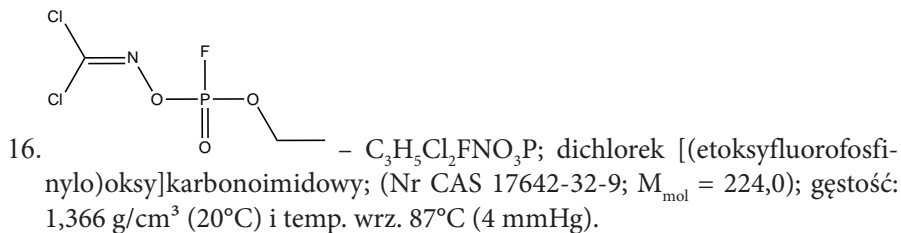
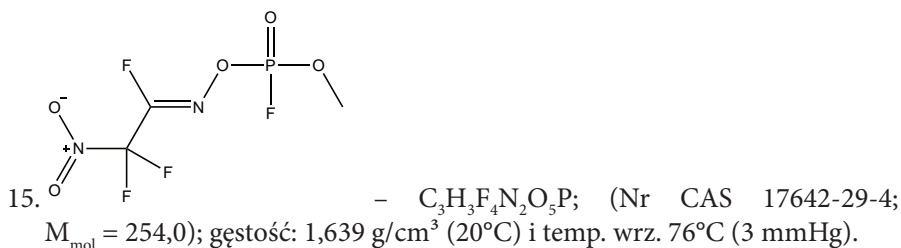
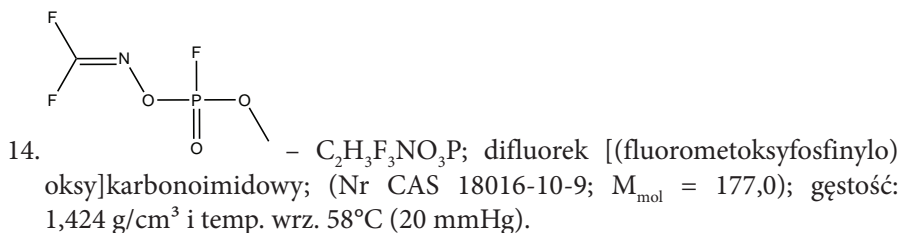
6.  – $C_6H_{12}ClFN_2O_3P$; chlorek fluorek *N*-[[2-chloroetylo(metylo)amino]-etoksyfosforylo]oksymetanoimidolu ($M_{mol} = 281,0$); struktura z grupą chlorodialkiloamidową, podobną do występującej w tabunie.

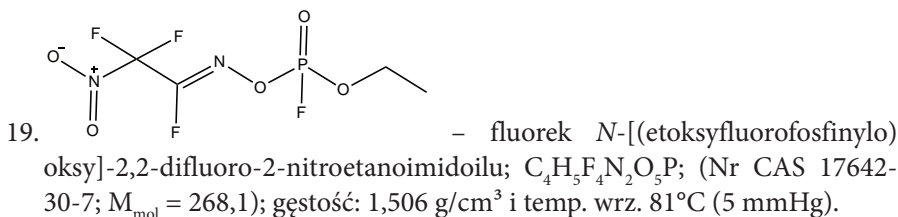
7.  – $C_7H_{16}FN_2OP$; ($M_{mol} = 194,2$); a jego toksyczność ma być 5 do nawet 8 razy większa niż VR (rosyjski odpowiednik VX). W przeciwieństwie do Hoeniga [4], według Mirzajanowa [2] jest to Nowiczok A-230.

8.  – $C_7H_{16}FN_2O_2P$; *N'*-metoksyfluorofosforylo-*N,N*-dietyloetanoimidoamid; ($M_{mol} = 210,2$). Jego toksyczność jest porów-

nywalna z VR, jednak ma on być bardziej lotny od VR i A-230 oraz mniej odporny zarówno na wilgoć jak i na niskie temperatury. Według Mirzajanowa jest to Nowiczok A-232 [2].

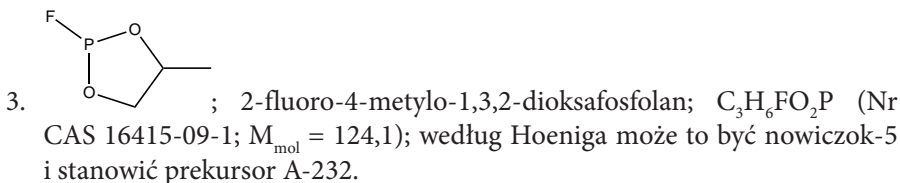
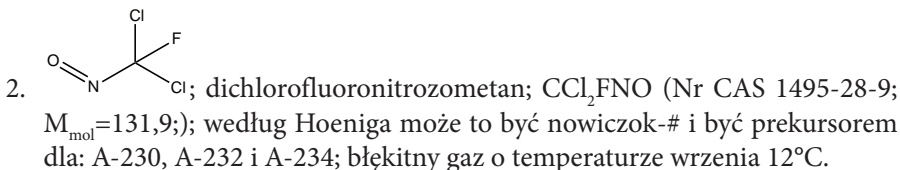
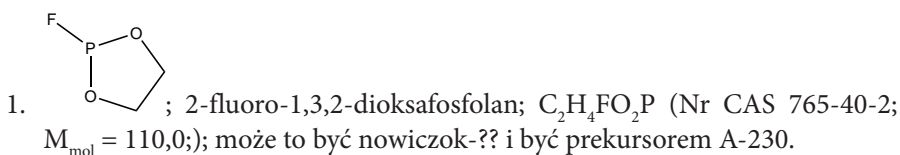


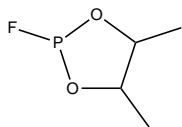




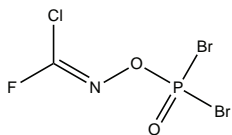
Chociaż pierwsze informacje o Nowiczokach pojawiły się stosunkowo dość dawno za sprawą wspomnianych uprzednio Fiodorowa i Mirzajanowa [6], to nadal skala niejednoznaczności informacji i margines ich błędu połączony z możliwością *celowej* dezinformacji jest bardzo wysoki. Ich doniesienia, jak również informacje dwóch innych dysydentów, tj.: Władimira Uglewa i Andrieja Żelazniakowa [6] oraz dane dostępne w literaturze i w Internecie na ten temat są niedokładne i o niepewnej wiarygodności, a czasami sprzeczne bądź nieprawdziwe. Większość dostępnych informacji o Nowiczokach pochodzi głównie od Mirzajanowa. Są one niepotwierdzone przez niezależne i wiarygodne źródła, a część jego wypowiedzi była podważana przez innych autorów. Podobnie jest z informacjami na temat prekursorów. Jak wspomniano Rosjanie nigdy nie ujawnili stanu posiadania ani zakresu prac nad Nowiczokami i to zarówno podczas rozmów dwustronnych ze Stanami Zjednoczonymi, jak też przystępując do Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej. Dementowali również wszelkie informacje dotyczące Nowiczoków, które były podawane przez Mirzajanowa bądź inne osoby. Także kwestia ewentualnych prekursorów nigdy nie została potwierdzona i / lub zanegowana przez źródła rosyjskie.

Przyjmuje się, że dla Nowiczoków 1÷19 prekursorami są następujące związki chemiczne [4, 5]:

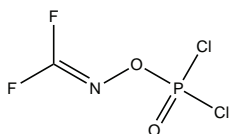




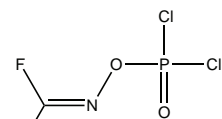
4. ; 2-fluoro-4,5-metylo-1,3,2-dioksafosfolan; $C_4H_8FO_2P$ (Nr CAS 19952-57-9; $M_{mol} = 138,1$); według Hoeniga może to być nowiczok-7 i stanowić prekursor A-234.



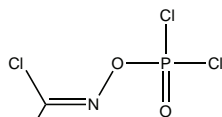
5. ; chlorek fluorek [(dibromofosfinylo)oksy]karbonoimidowy; CBr_2ClFNO_2P (Nr CAS 18262-26-5; $M_{mol} = 303,3$); gęstość: $2,203 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 60°C (0,1 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



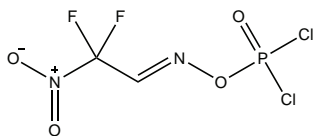
6. ; difluorek [(dichlorofosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $CCl_2F_2NO_2P$ (Nr CAS 18262-24-3; $M_{mol} = 197,9$); gęstość: $1,636 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 65°C (20 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



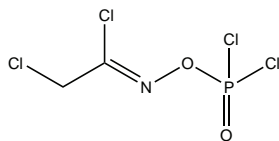
7. ; chlorek fluorek [(dichlorofosfinylo)oksy]karbonoimidowy; CCl_3FNO_2P (Nr CAS 18425-23-5; $M_{mol} = 214,4$); gęstość: $1,708 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 61°C (6 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



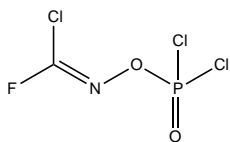
8. ; dichlorek [(dichlorofosfinylo)oksy]karbonoimidowy; CCl_4NO_2P (Nr CAS 17642-35-2; $M_{mol} = 230,8$); gęstość: $1,736 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 75°C (5 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



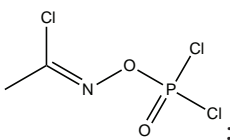
9. ; fluorek *N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]-2,2-difluoro-2-nitroetanoimidu; $C_2Cl_2F_3N_2O_4P$ (Nr CAS 18262-25-4; $M_{mol} = 274,9$); gęstość: $1,747 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 65°C (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



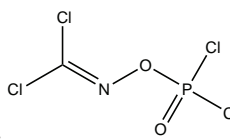
10. ; chlorek 2-chloro-*N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]etanoimidoylu; $C_2H_2Cl_4NO_2P$ (Nr CAS 111203-62-4; $M_{mol} = 244,8$); temp. wrz. $99^\circ C$ (2 mmHg) i słabo rozpuszczalny w wodzie.



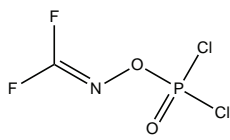
11. ; chlorek fluorek [(chlorometoksyfosfinylo)oksy]karbonimidowy; $C_2H_3Cl_2FNO_3P$ (Nr CAS 17650-48-5; $M_{mol} = 209,9$); gęstość: $1,579 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. $95^\circ C$ (6 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



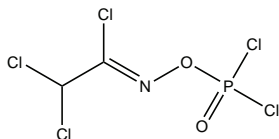
12. ; chlorek *N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]etanoimidoylu; $C_2H_3Cl_3NO_2P$ (Nr CAS 120932-13-0; $M_{mol} = 210,4$); temp. wrz. $71^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



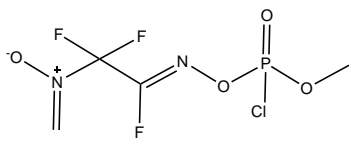
13. ; dichlorek [(chlorometoksyfosfinylo)oksy]karbonimidowy; $C_2H_3Cl_3NO_3P$ (Nr CAS 17642-33-0; $M_{mol} = 226,4$); gęstość: $1,583 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. $82^\circ C$ (1 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

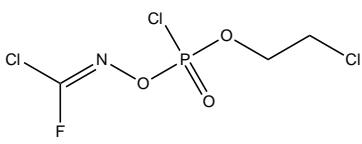


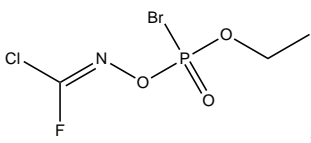
14. ; difluorek [(chlorometoksyfosfinylo)oksy]karbonimidowy; $C_2H_3ClF_2NO_3P$ (Nr CAS 18262-30-1; $M_{mol} = 193,5$); gęstość: $1,549 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. $59^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

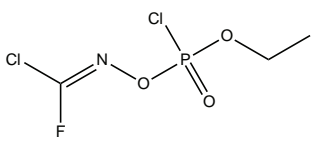


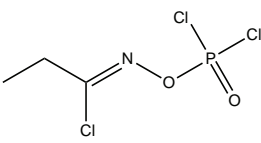
15. ; chlorek 2,2-dichloro-*N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]etanoimidoylu; $C_2HCl_5NO_2P$ (Nr CAS 114700-94-6; $M_{mol} = 279,3$); temp. wrz. $94^\circ C$ (1,5 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

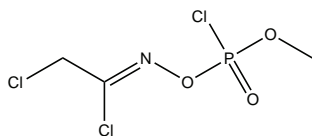
16.  ; fluorek *N*-[(chlorometoksyfosfinylo)oksy]-2,2-difluoro-2-nitroetanoimidou; $C_3H_3ClF_3N_2O_5P$ (Nr CAS 18262-33-4; $M_{mol} = 270,5$); gęstość: $1,627 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 87°C (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

17.  ; chlorek fluorek [(chloro-2-chloroetoksyfosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_3H_4Cl_3FNO_3P$ (Nr CAS 23233-25-2; $M_{mol} = 258,4$); gęstość: $1,598 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 73°C (0,01 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

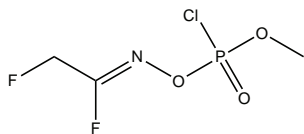
18.  ; chlorek fluorek [(bromoetoksyfosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_3H_5BrClFNO_3P$ (Nr CAS 17642-25-0; $M_{mol} = 268,4$); gęstość: $1,697 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 101°C (1 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

19.  ; chlorek fluorek [(chloroetoksyfosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_3H_5Cl_2FNO_3P$ (Nr CAS 18262-27-6; $M_{mol} = 224,0$); gęstość: $1,449 \text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 77°C (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

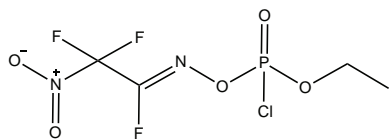
20.  ; chlorek *N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]propanoimidou; $C_3H_5Cl_3NO_2P$ (Nr CAS 121951-54-0; $M_{mol} = 224,4$); temp. wrz. 67°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



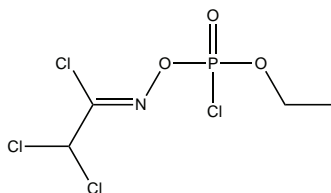
21. ; chlorek 2-chloro-*N*-[(chlorometyloksyfosfinylo)oksy]etanoimidoilu; $C_3H_5Cl_3NO_3P$ (Nr CAS 114700-91-3; $M_{\text{mol}} = 240,4$); temp. wrz. 118°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



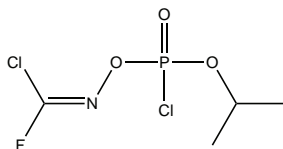
22. ; difluorek [(chloroetoksyfosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_3H_5ClF_2NO_3P$ (Nr CAS 18262-31-2; $M_{\text{mol}} = 207,5$); gęstość: $1,405\text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 65°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



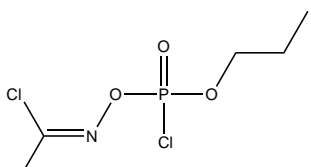
23. ; fluorek *N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]-2,2-difluoro-2-nitroetanoimidoilu; $C_4H_5ClF_3N_2O_5P$ (Nr CAS 18262-34-5; $M_{\text{mol}} = 284,5$); gęstość: $1,514\text{ g/cm}^3$ i temp. wrz. 73°C (0,1 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

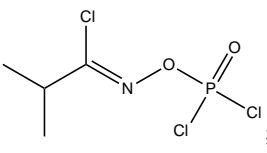


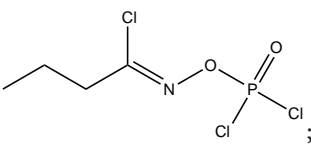
24. ; chlorek 2,2-dichloro-*N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]etanoimidoilu; $C_4H_6Cl_4NO_3P$ (Nr CAS 114700-93-5; $M_{\text{mol}} = 288,9$); temp. wrz. 112°C (1,5 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

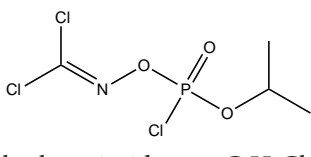


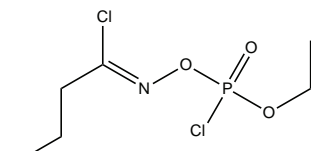
25. ; chlorek fluorek [(chloroizopropylfosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_4H_7Cl_2FNO_3P$ (Nr CAS 18262-28-7; $M_{\text{mol}} = 238,0$); gęstość: $1,369\text{ g/cm}^3$; temp. wrz. 64°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

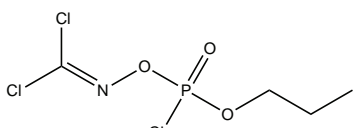
26.  ; chlorek fluorek [(chloropropylofosfinylo)oksy] karbonoimidowy; $C_4H_7Cl_2FNO_3P$ (Nr CAS 18262-29-8; $M_{mol}=238,0$); gęstość: $1,348 \text{ g/cm}^3$; temp. wrz. 100°C (10 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

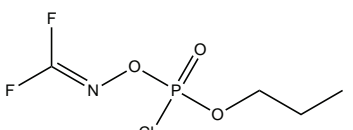
27.  ; chlorek *N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]-2-metylopropanoimidu; $C_4H_7Cl_3NO_2P$ (Nr CAS 121951-56-2; $M_{mol} = 238,4$); temp. wrz. 68°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

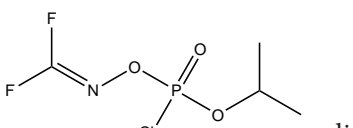
28.  ; chlorek *N*-[(dichlorofosfinylo)oksy]butanimidu; $C_4H_7Cl_3NO_2P$ (Nr CAS 121951-55-1; $M_{mol} = 238,4$); temp. wrz. 82°C (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

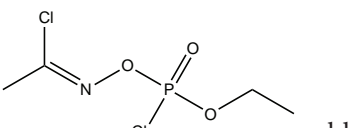
29.  ; dichlorek [(chloroizopropylofosfinylo)oksy] karbonoimidowy; $C_4H_7Cl_3NO_3P$ (Nr CAS 17642-34-1; $M_{mol} = 254,4$); gęstość: $1,40 \text{ g/cm}^3$; temp. wrz. 90°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

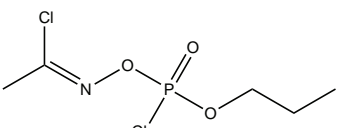
30.  ; chlorek 2-chloro-*N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]etanoimidu; $C_4H_7Cl_3NO_3P$ (Nr CAS 114700-92-4; $M_{mol} = 254,4$); temp. wrz. 123°C (1,5 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

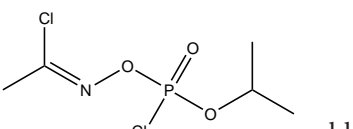
31.  ; dichlorek [(chloropropoksyfosfinylo)oksy] karbonoimidowy; $C_4H_7Cl_3NO_3P$ (Nr CAS 37990-97-9; $M_{mol} = 254,4$); słabo rozpuszczalny w wodzie.

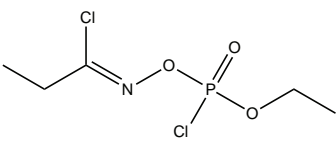
32.  ; difluorek [(chloropropoksyfosfinylo)oksy] karbonoimidowy; $C_4H_7ClF_2NO_3P$ (Nr CAS 37990-84-4; $M_{mol} = 221,5$); słabo rozpuszczalny w wodzie.

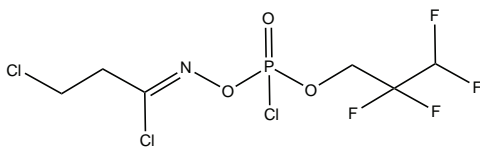
33.  ; difluorek [(chloroizopropoksyfosfinylo)oksy] karbonoimidowy; $C_4H_7ClF_2NO_3P$ (Nr CAS 18262-32-3; $M_{mol} = 221,5$); gęstość: $1,3720 \text{ g/cm}^3$; temp. wrz. 61°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

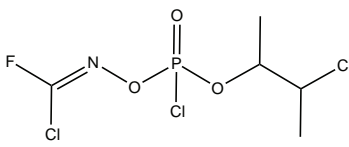
34.  ; chlorek *N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]etanoimidoiu; $C_4H_8Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 114700-90-2; $M_{mol} = 220,0$); temp. wrz. 96°C (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

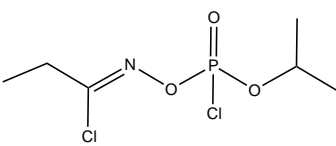
35.  ; chlorek *N*-[(chloropropoksyfosfinylo)oksy]etanoimidoiu; $C_5H_{10}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 129003-90-3; $M_{mol} = 234,0$); temp. wrz. 105°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

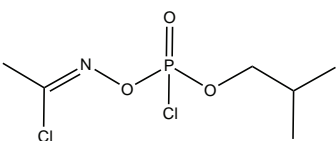
36.  ; chlorek *N*-{[chloro-(1-metyloetoksy)fosfinylo]oksy}etanoimidoiu; $C_5H_{10}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-16-8; $M_{mol} = 234,0$); temp. wrz. 99°C (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

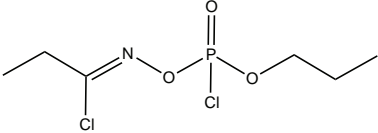
37.  ; chlorek *N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]propanoimidoilu; $C_5H_{10}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-18-0; $M_{mol} = 234,0$); temp. wrz. $104^\circ C$ (2,5 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

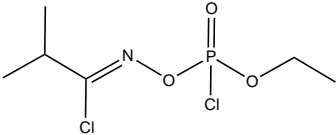
38.  ; chlorek 2-chloro-*N*-{[chloro-(2,2,3,3-tetrafluoropropoksy)fosfinylo]oksy}etanoimidoilu; $C_5H_5Cl_3F_4NO_3P$ (Nr CAS 114967-39-4; $M_{mol} = 340,4$); temp. wrz. $118^\circ C$ (3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

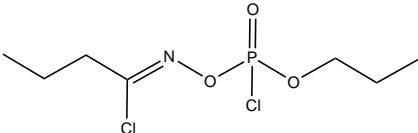
39.  ; chlorek fluorek [(2-chloro-1-metylopropylofosfinylo)oksy]karbonoimidowy; $C_5H_8Cl_3FNO_3P$ (Nr CAS 24946-19-8; $M_{mol} = 286,5$); gęstość: $1,4811 \text{ g/cm}^3$; temp. wrz. $84^\circ C$ (0,3 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

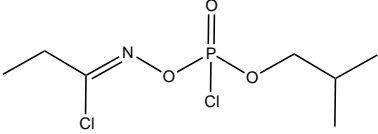
40.  ; chlorek *N*-{[chloro-(1-metyloetoksy)fosfinylo]oksy}propanoimidoilu; $C_6H_{12}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-20-4; $M_{mol} = 248,0$); temp. wrz. $97^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

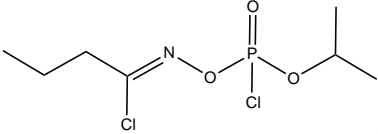
41.  ; chlorek *N*-{[chloro-(2-metylopropoksy)fosfinylo]oksy}etanoimidoilu; $C_6H_{12}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-17-9; $M_{mol} = 248,0$); temp. wrz. $108^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

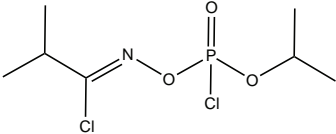
42.  ; chlorek *N*-[(chloropropoksyfosfinylo)oksy]propanoimidoilu; $C_6H_{12}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-19-1; $M_{mol} = 248,0$); temp. wrz. $102^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

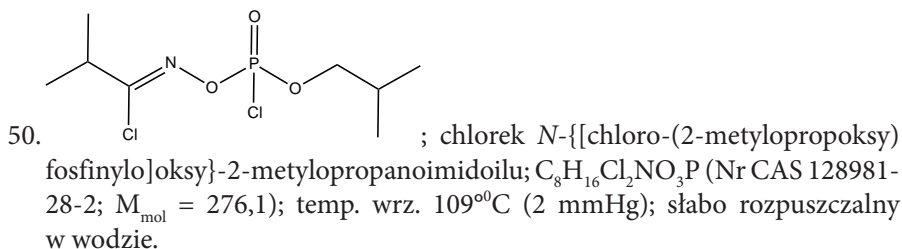
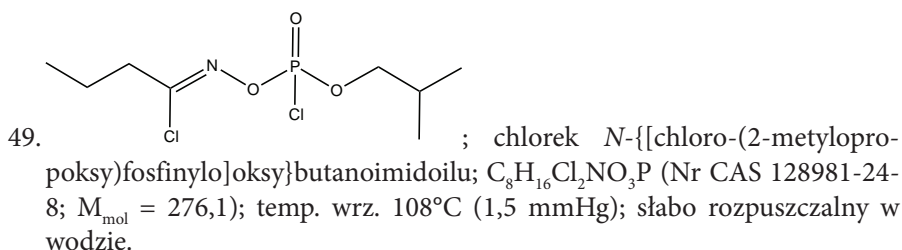
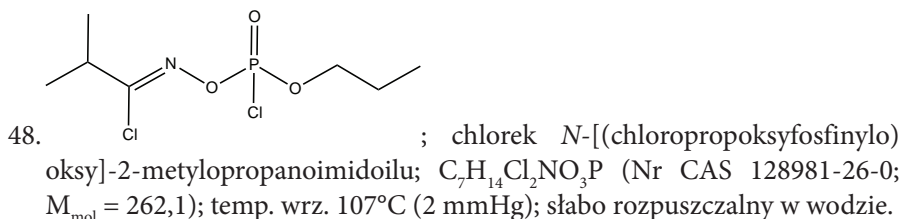
43.  ; chlorek *N*-[(chloroetoksyfosfinylo)oksy]-2-metylopropanoimidoilu; $C_6H_{12}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-25-9; $M_{mol} = 248,0$); temp. wrz. $97^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

44.  ; chlorek *N*-[(chloropropoksyfosfinylo)oksy]butanoimidoilu; $C_7H_{14}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-22-6; $M_{mol} = 262,1$); temp. wrz. $108^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

45.  ; chlorek *N*-{[chloro-(2-metylopropoksy)fosfinylo]oksy}propanoimidoilu; $C_7H_{14}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-21-5; $M_{mol} = 262,1$); temp. wrz. $109^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

46.  ; chlorek *N*-{[chloro-(1-metyloetoksy)fosfinylo]oksy}butanoimidoilu; $C_7H_{14}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-23-7; $M_{mol} = 262,1$); temp. wrz. $105^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.

47.  ; chlorek *N*-{[chloro-(1-metyloetoksy)fosfinylo]oksy}-2-metylopropanoimidoilu; $C_7H_{14}Cl_2NO_3P$ (Nr CAS 128981-27-1; $M_{mol} = 262,1$); temp. wrz. $101^\circ C$ (2 mmHg); słabo rozpuszczalny w wodzie.



Pierwszym nowiczokiem przyjętym jako etatowy BST, w armii sowieckiej w 1988 roku miał być A-230, produkowany w zakładach w Wolsku 12. W Wolsku produkowane miały być również A-232 i jego prekursor nowiczok-5. Prawdopodobnie nie spełniały one wymagań formułowanych przez sowieckie siły zbrojne. Dlatego, pomimo wyjątkowej toksyczności A-232, nie został uwzględniony jako etatowy, warunkowo etatowy lub rezerwowy BST. Trzecim nowiczokiem miał być A-234 [3]. Mirzajanow podawał również informacje o innych Nowiczokach: substancji 33 i substancji 84. O drugim z nich nie ma żadnych informacji, natomiast pierwszy – według Mirzajanowa – miał być produkowany w Nowoczeboksarsku w ilości ok. 15 tysięcy ton. Mógł on stanowić przyczynę syndromu wojny w Zatoce Perskiej, w wyniku użycia go przez Irak w czasie I wojny w Zatoce Perskiej. Ta hipoteza nie znajduje jednak potwierdzenia. Mirzajanow wskazał również, że substancja 84 i A-232 miały być testowane w ośrodku badawczym w Nukus w Karakałpacji, dokąd miały być dostarczane z fabryki w Wołgogradzie [2].

Nowiczoki miały być produkowane aż do wczesnych lat 90. i zostać zniszczone w latach 1994–1995 na poligonie w Szychanach, choć Mirzajanow nie był pewien, czy zniszczono cały zapas tych środków [2]. Według Władimira Petrenki, rosyjskiego żołnierza, w tym samym miejscu, w 1982 roku, miały odbywać się testy broni

chemicznej (uważa on, że był to nowiczok A-232), które były przeprowadzane na kilkudziesięciu żołnierzach, w tym na nim samym [6].

7.5. DZIAŁANIE TOKSYCZNE NOWICZOKA

Bez wglądu do dokumentacji medycznej konkretnego przypadku zatrucia jak w przypadku Siergieja i Julii Skripal oraz kolejnych ofiar, którymi każdorazowo byli jednocześnie mężczyzna i kobieta; trudno jest dokonać dokładnego opisu toksycznego działania Nowiczoka. Nie istnieją żadne *oficjalne i jawnie dostępne* informacje o działaniu toksycznym Nowiczoków, natomiast według niepotwierdzonych informacji z różnych źródeł, niektóre nowiczoki mogą być kilkukrotnie bardziej toksyczne od znanych środków paralityczno-drgawkowych (np. od Vx, VX i VR). Ogólne objawy zatrucia Nowiczokami mogą być podobne do opisanych uprzednio objawów przy zatruciach innymi FOST [5–8].

Najbardziej prawdopodobny mechanizm działania Nowiczoków ma polegać nie tylko na inhibicji acetylocholinoesterazy (AChE), ale również na wywoływaniu nieodwracalnej neuropatii, przez co leczenie tradycyjnymi odtrutkami na środki paralityczno-drgawkowe może być mało lub w ogóle nieskuteczne. Nie istnieją również dane dotyczące możliwych środków ochrony indywidualnej bądź metod likwidacji skażeń. Z uwagi na podobieństwo Nowiczoków do innych środków paralityczno-drgawkowych przypuszcza się, że mogą one rozkładać się pod wpływem wysokiego pH. Daje to podstawę do zastosowania jako substancji do likwidacji skażeń (odkaźników) roztworów zasadowych. Powinny one zawierać 10% wodnych roztworów wodorotlenku sodu lub węglanu sodu, podchlorynów, zasadowych roztworów nadtlenu, np. roztworu wodorowęglanu sodu, etanolu i 30–50% nadtlenu wodoru. Badania nad Nowiczokami w kontekście obrony przed bronią masowego rażenia prowadzone są prawdopodobnie w Stanach Zjednoczonych i innych krajach (zwłaszcza anglosaskich), choć brak jednoznaczne go potwierdzenia tego.

7.6. ASPEKTY PRAWNE DOTYCZĄCE NOWICZOKÓW

Nowiczoki nie są uwzględnione w żadnym z wykazów Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej. Pomimo tego, że wykazy Konwencji mogą być uaktualniane, do tej pory nie zdecydowano się na wpisanie do nich Nowiczoków. Wymienia się przy tym co najmniej dwa powody tego stanu. Pierwszym jest fakt, że Rosja nigdy nie przyznała się do ich opracowania i produkcji, a z drugiej strony istnieje obawa, że uwzględnienie Nowiczoków w Konwencji spowodowałoby ujawnienie ich dokładnej struktury chemicznej, przez co mogłyby zostać wyprodukowane przez inne państwa czy organizacje terrorystyczne. Drugi to punkt widzenia legalistów, którzy wskazują, że pomimo braku wyraźnego wymienienia Nowiczoków w wykazach konwencji, mogą być one uznane za broń chemiczną w rozumieniu tej Konwencji

na podstawie tzw. kryterium celu ogólnego (ang. *general-purpose criterion*). Pojęcie to nie jest wymienione w samej konwencji, jednak jest powszechnie akceptowane i wynika z samych jej zapisów, według których bronią chemiczną jest każda toksyczna substancja stosowana do celów innych niż dozwolone przez konwencję.

7.7. WYKRYWANIE FOSFOROORGANICZNYCH BOJOWYCH ŚRODKÓW TRUJĄCYCH

Wykrywanie za pomocą rurek wskaźnikowych jest jedną z najstarszych polowych metod wykrywania bojowych środków trujących. Jest to metoda specyficzna oraz na tyle prosta i skuteczna, że żadna poważna armia na świecie nie zrezygnowała z niej w całości, na rzecz nowoczesnych metod analizy instrumentalnej. W Siłach Zbrojnych RP stosowano i stosuje się nadal przyrząd do rozpoznania skażeń chemicznych PChR-54M, którego działanie jest oparte na specyficznych reakcjach środków trujących z niektórymi związkami chemicznymi. Rurki wskaźnikowe służą do wykrywania środków trujących w powietrzu oraz w produktach sypkich. Są to rurki szklane, wewnątrz których znajduje się substancja wypełniająca lub / i szklana ampulka z odczynnikiem. Po obłamaniu końców rurek, a w niektórych rurkach po zgnieceniu ampulki w zależności od wykrywanego środka trującego, umieszcza się je w kolektorze i przepompowuje przez nieskażone powietrze za pomocą ręcznej pompki kolektorowej. W kolektorze można umieścić od jednej do pięciu rurek. W komplecie przyrządu znajdują się 4 kasety, w których mieści się po 10 rurek wskaźnikowych o jednakowym oznakowaniu. Oznakowaniem rurki jest kolorowy pierścień umieszczony na jej górnej części. Do wykrywania iperytu stosuje się rurki oznaczone jednym żółtym pierścieniem, do fosgenu, difosgenu, kwasu pruskiego i chlorocyjanu – rurki oznaczone trzema zielonymi pierścieniami, a do wykrywania bardzo małych skażeń środków trujących typu FOST – rurki oznaczone jednym czerwonym pierścieniem i czerwoną kropką. W celu wykrycia BST w warunkach dużego zadymienia używa się filtra przeciwdymnego, w razie występowania w powietrzu substancji o odczynie kwaśnym kołpaczka ochronnego, przy niskich temperaturach ocieplacza, a przy bezpośrednim zbliżeniu pompki do badanego obiektu bez obawy o jej skażenie – kapturka ochronnego.

Najważniejszy element analityczny, czyli rurka wskaźnikowa wykonana jest ze szkła, a jej wnętrze wypełnia materiał porowaty – adsorbent służący do adsorpcji par bojowych środków trujących. Jest nim najczęściej żel krzemionkowy, na którym następuje zatężenie wykrywanej substancji do takich ilości, przy których może już zachodzić reakcja chemiczna dająca pożądany sygnał (efekt) analityczny, którym w przypadku rurki wskaźnikowej jest zmiana barwy sorbentu. Procedura stosowania rurek wskaźnikowych polega na przepuszczeniu zarówno czystego powietrza, jak i powietrza zawierającego bojowy środek trujący. Na tym etapie ma miejsce zatrzymanie BST w rurce, ponieważ cząsteczki par łatwiej kondensujących się substancji chemicznych znacznie silniej adsorbują się na powierzchni sorbentu niż

cząsteczki gazów wchodzących w skład czystego (niezanieczyszczonego bojowym środkiem trującym) powietrza.

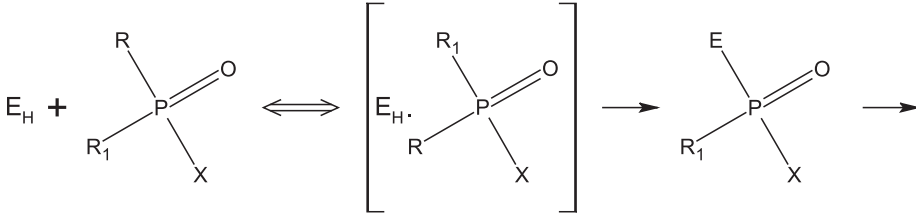
Ilość powietrza, które należy przepuścić przez rurkę wskaźnikową zależy bezpośrednio od rodzaju wykrywanego BST. Przepuszczanie większych ilości powietrza jest konieczne szczególnie w przypadku substancji wysokotoksycznych, gdy czułość reakcji analitycznej jest stosunkowo mała. Zewnętrzna budowa rurek wskaźnikowych zależy od rodzaju zastosowanej pompki. Odczynniki chemiczne dające reakcje barwne z bojowymi środkami trującymi, mogą być w zależności od rodzaju *substancji wykrywającej* osadzone bezpośrednio na sorbencie, albo znajdować się w zatopionych ampułkach szklanych. Ampułki te rozbija się specjalnym przebijakiem przed i / lub po przepuszczeniu skażonego powietrza przez rurkę wskaźnikową dedykowaną dla konkretnych bojowych środków trujących. Wykorzystując prostą zależność pomiędzy intensywnością powstałego zabarwienia od stężenia bojowego środka trującego, można ocenić jego stężenie przez porównanie z barwnym wzorcem.

Do wykrywania fosforoorganicznych bojowych środków trujących w Wojsku Polskim nadal stosuje się opracowane jeszcze na potrzeby armii państw Układu Warszawskiego rurki wskaźnikowe, które umożliwiają wykrywanie wszystkich środków paralityczno-drgawkowych, a więc także (prawdopodobnie) substancji A, w wyniku specyficznej reakcji chemicznej, której czułość umożliwiała wykrywanie FOST w stężeniach bardzo niskich, rzędu od około $5 \cdot 10^{-7}$ do około $5 \cdot 10^{-5}$ mg/dm³. W rurce wskaźnikowej do wykrywania FOST umieszczono dwie ampułki szklane. Górna ampłka rurki wskaźnikowej zawierała roztwór esterazy cholinowej E_H w roztworze buforowym Na₂B₄O₇·10H₂O, a dolna ampłka zawierała roztwór jodku butyrylotiocholiny i czerwieni metylowej.

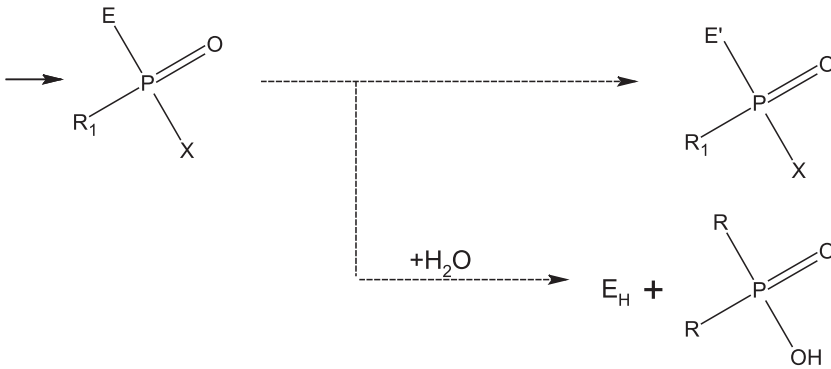
W czasie *pracy bojowej* stosowane są dwie rurki wskaźnikowe. Pierwsza to *robocza rurka wskaźnikowa*, przez którą przepompowuje się powietrze i druga, *wskaźnikowa rurka odniesienia*, przez którą w czasie pomiaru nie przepompowuje się powietrza. Podczas przepompowywania powietrza przez *roboczą rurkę wskaźnikową*, pary FOST adsorbują się na wypełnieniu – żelu krzemionkowym. W ten sposób w układzie reakcyjnym znajdują się zaadsorbowane FOST i jodek butyrylotiocholiny, pomiędzy którymi przebiega dwuetapowa biochemiczna reakcja enzymatyczna i czerwień metylowa, której zmiana barwy dostarcza informacji analitycznej.

Mechanizm pierwszego etapu biochemicznej reakcji enzymatycznej podczas wykrywania FOST, polega na inhibicji acetylocholinoesterazy. Powstaje przejściowo odwracalny kompleksowy związek chemiczny enzymu, który następnie ulega wewnętrznej reakcji z wydzieleniem fragmentu fluorowcowodorowego, np.: HF, HCN i wytworzeniem enzymu sfosforylowanego w jego centrum aktywnym. W wyniku dalszej reakcji chemicznej – wewnętrznej transfosforylacji białkowa część enzymu zostaje nieodwracalnie zmieniona, tworząc cząsteczkę pozbawioną centrum aktywnego. Dodatkowo niewielka ilość sfosforylowanego enzymu może

ulec reakcji hydrolizy, uwalniając aktywny enzym E_H i cząsteczkę zhydrolizowanego inhibitora – odpowiedniego FOST.

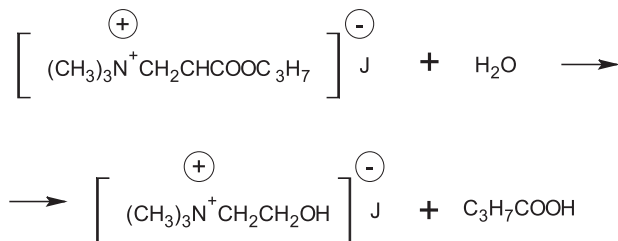


Jednak taki kierunek reakcji stanowi znikomą małą część reakcji opisanej uprzednio. W drugim etapie reakcji pozostała aktywna część z ogólnej początkowej ilości enzymu powoduje hydrolizę jodku butyrylotiocholiny.



Po pewnym czasie ilość zhydrolizowanego substratu (jodku butyrylotiocholiny) będzie mniejsza, niż w przypadku, gdy cała ilość enzymu hydrolizuje substrat, co ma przecież miejsce we *wskaźnikowej rurce odniesienia*, gdzie FOST nie unieczynił pewnej ilości E_H ; i odpowiednio wewnątrz *roboczej rurki wskaźnikowej*, tylko w przypadku gdy w powietrzu nie występował FOST.

Szybkość pojawienia się produktów reakcji hydrolizy w tym procesie jest miarą aktywności enzymu. Ilość wprowadzonego inhibitora, czyli FOST wpływa bezpośrednio na aktywność enzymu i jest do niej odwrotnie proporcjonalna, czyli im wyższe jest stężenie FOST w powietrzu, tym odpowiednio mniejsza jest szybkość pojawienia się produktów hydrolizy jodku butyrylotiocholiny.



W wyniku powstawania kwasu masłowego czerwień fenolowa zmienia zabarwienie z koloru malinowo-różowego na żółty. Podsumowując jeżeli we *wskaźnikowej rurce odniesienia* barwna reakcja biochemiczna spowoduje zmianę zabarwienia wypełniacza, z czerwonego na żółte, szybciej niż w *roboczej rurce wskaźnikowej*, wskazuje to na obecność w powietrzu FOST.

Inne współcześnie stosowane metody wykrywania i identyfikacji bojowych środków trujących, to metody analizy instrumentalnej, wśród których dominującą rolę odgrywa chromatografia gazowa, spektrometria ruchliwości jonów i fotometria płomieniowa [14–16].

7.8. LIKWIDACJA SKAŻEŃ FOST

Charakterystyczną cechą dotychczas poznanych fosforoorganicznych związków trujących jest obecność cząstkowego ładunku dodatniego na atomie fosforu. Jego wielkość jest ściśle związana z rodzajem przyłączonych podstawników. Polaryzacja wiązań predestynuje te związki do reagowania zarówno z odczynnikami nukleofilowymi jak i elektrofilowymi. Wymiana fluoru podczas likwidacji skażeń umożliwia otrzymanie produktów o mniejszej toksyczności, dlatego reakcje nukleofilowego podstawienia odgrywają istotną rolę w niszczeniu FOST [17–19].

PODSUMOWANIE

Sprawa rozbrojenia chemicznego i nierozprzestrzeniania broni chemicznej jest jednym z podstawowych warunków zwiększenia poziomu bezpieczeństwa społeczeństw na całym świecie.

Nowiczok i możliwość jego zastosowania bojowego, z pewnością zaburza wzajemne zaufanie państw i narodów. Nie jest przecież przypadkiem, że w zasadzie cała populacja jednomyślnie popiera całkowity zakaz broni chemicznej i jej eliminację na całym świecie. Wynika to z przekonania, że stosowanie broni chemicznej, w tym używanie wszelkich toksycznych substancji chemicznych jako broni, przez kogokolwiek – podmiot państwowy lub niepaństwowy – gdziekolwiek i w jakichkolwiek okolicznościach jest odrażające i musi być kategorycznie potępione.

Z tego wynika kolejny wniosek, że stosowanie broni chemicznej jest nieakceptowalne, stanowi naruszenie prawa międzynarodowego i może zostać uznane za zbrodnię wojenną lub zbrodnię przeciwko ludzkości oraz że nie można dopuścić do bezkarności, a osoby odpowiedzialne za takie czyny muszą zostać pociągnięte do odpowiedzialności.

Nowiczoki stanowią wyzwanie dla całej ludzkości. Bardzo niepokojące jest to, że te substancje toksyczne nie są ujęte w wykazach Konwencji o Zakazie Broni Chemicznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] KONWENCJA o zakazie prowadzenia badań, produkcji, składowania i użycia broni chemicznej oraz o zniszczeniu jej zapasów, sporządzona w Paryżu dnia 13 stycznia 1993 r. (Dz. U. z dnia 30 lipca 1999 r.).
- [2] Vil S. Mirzajanov, *State Secrets: An Insider's Chronicle of the Russian Chemical Weapons Program*, Outskirts Press, 2008.
- [3] *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R.C. Gupta (Red.), Wyd. 2, London: Academic Press, 2015.
- [4] S.L. Hoenig, *Compendium of Chemical Warfare Agents*, Springer, New York 2007.
- [5] D.H. Ellison, *Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents*, Wyd. 2, CRC Press, Boca Raton 2008.
- [6] L. Konopski, *Historia broni chemicznej*, Bellona, Warszawa 2009.
- [7] J. Błądek, *Broń chemiczna i toksyczne środki przemysłowe*, WAT, Warszawa 2011.
- [8] E. Croddy, J. Hart, *Broń chemiczna i biologiczna. Raport dla obywatela*, WNT, Warszawa 2003.
- [9] *Toksykologia współczesna*, W. Seńczuk (Red.), PZWL, Warszawa 2012.
- [10] F. Sidell, *Medical aspects of chemical and biological warfare*, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, 1997.
- [11] A. Donia, M. Bahie, J. Occup. Health Saf. Aust., 2005, **21(5)**, 408.
- [12] West's knowledge of Novichok came from sample secured in 1990s: report, Agencja Reutersa, [dostęp: 2018-07-04]. Dostępny w Internecie: <https://www.reuters.com/article/us-britain-russia-chemicalweapons-german/wests-knowledge-of-novichok-came-from-sample-secured-in-1990s-report-idUSKCN1IH2HC>.
- [13] S. E. Hosseini, H. Saeidian, A. Amozadeh, M. T. Naseri, M. Babri, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2016, **30(24)**, 2585.
- [14] Z. Witkiewicz, E. Śliwka, S. Neffe, *TrAC*, 2016, **85**, 21 .
- [15] Z. Witkiewicz, E. Śliwka, S. Neffe, J. Quagliano, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2018, **48**, 337 .
- [16] M.A. Mäkinen, O.A. Anttalainen, *Anal. Chem.*, **82(23)**, 9594.
- [17] B. Singh, G.K. Prasad, K.S. Pandey, R.K. Danikhel, R. Vijayaraghavan, *Def. Sci. J.*, 2010, **60(4)**, 428.
- [18] K. Ganesan, S.K. Raza, R. Vijayaraghavan, *J. Pharm. Bioall. Sci.*, 2010, **2**, 166.
- [19] K. Kim, O.G. Tsay, D.A. Atwood, D.G. Churchill, *Chem. Rev.*, 2011, **111(9)**, 5345.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 maja 2018

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
MODYFIKOWANYCH NUKLEOZYDÓW. CZĘŚĆ III**

BIOLOGICAL ACTIVITY OF MODIFIED
NUCLEOSIDES. PART III

Maurycy Szlenkier

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: mszlenk@ibch.poznan.pl; maurycy.szlenkier@gmail.com*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Aktywność biologiczna nukleozydów o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3'
2. Aktywność biologiczna pozostałych nukleozydów posiadających modyfikacje w części cukrowej

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Maurycy K. Szlenkier w roku 2009 ukończył jednolite studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku biotechnologia. W 2008 r. uczestniczył w stażu w Departamencie Biogeochemii Izotopowej Centrum Badań Środowiskowych im. Helmholtza w Lipsku. Od 2010 r. do 2016 r. był uczestnikiem Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, następnie został zatrudniony w Zakładzie Chemii Nukleozydów i Nukleotydów IChB PAN. Pracę doktorską z zakresu chemii nukleozydów wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Boryskiego. Specjalność – synteza pochodnych nukleozydów. Zainteresowania naukowe: chemia bioorganiczna, chemia medyczna, modelowanie molekularne, CADD – *computer asisted drug design*.

ABSTRACT

Part III of the review devoted to biological activities of nucleoside derivatives presents a further description of analogues modified in the sugar residue with particular focus on those with altered configuration in the 2' or 3' position, e.g. cytarabine – an old anticancer chemotherapy agent used to treat acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, and non-Hodgkin's lymphomas; fludarabine – derivative of vidarabine used as a drug in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, and non-Hodgkin lymphomas; clofarabine – approved by the FDA in 2004, a new-generation second-line drug for recurrent acute myeloid leukemia; and fialuridine – examined as a potential therapeutic for the treatment of HBV infection, however, clinical trials ended tragically. In the last section of the review derivatives with other modifications in the sugar moiety are described – carbocyclic and acyclic analogues, L-nucleosides and 5'-modified nucleosides. Among others, very important modified nucleosides are listed e.g. acyclovir, ganciclovir, DHPA, tenofovir, cyclopentenylcytosine, entecavir, carbovir, abacavir, lamivudine, telbivudine and sinefungin VA. All parts together make a possibly complete and concise review, including the latest reports, the most important groups of modified nucleosides, and should be considered as a whole. In the context of the activities description, there are references to the important molecular targets, mechanisms of action, pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxicity, resistance, *in vitro* and *in vivo* tests or prodrug strategies, which can be a starting point for further study for chemists interested in medicinal chemistry.

Keywords: modified nucleosides, biological activity, molecular targets, mechanism of action

Słowa kluczowe: nukleozydy modyfikowane, aktywność biologiczna, cele molekularne, mechanizm działania

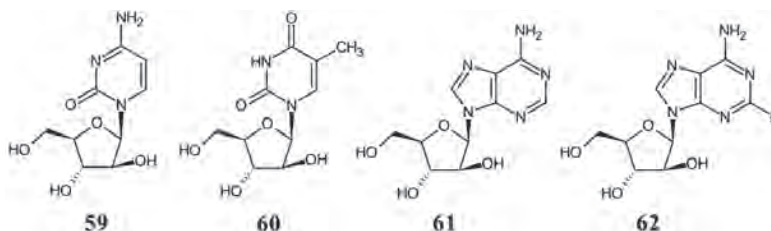
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3TC	- lamiwudyna
ACV	- acyklowir
AIDS	- zespół nabytego niedoboru odporności
AZT	- 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
AZT-TP	- trifosforan AZT
CC ₅₀	- stężenie cytotoksyczne
CDG	- karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna
CMV	- <i>Cytomegalovirus</i>
dCK	- kinaza 2'-deoksycytydynowa
ddC	- dideoksycytydyna
DHBV	- <i>Duck Hepatitis B virus</i>
DHPA	- dihydroksypropyloadenina
EBV	- <i>Epstein-Barr virus</i>
EC ₅₀	- stężenie efektywne
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HCV	- <i>Hepatitis C virus</i>
HCMV	- <i>Human Cytomegalovirus</i>
HIV-RT	- odwrotna transkryptaza wirusa HIV
HSV-1	- <i>Herpes simplex virus type 1</i>
HSV-2	- <i>Herpes simplex virus type 2</i>
HSV-dTK	- wirusowa kinaza 2'-deoksytymidynowa wirusa HSV
IC ₅₀	- stężenie inhibitorowe
NRTI	- nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy
NT	- transporter nukleozydowy
Pol γ	- mitochondrialna polimeraza gamma
RNR	- reduktaza rybonukleotydomowa
SAH	- S-adenozylhomocysteina
VSV	- <i>Vesicular stomatitis virus</i>
VZV	- <i>Varicella zoster virus</i>
VV	- <i>Vaccina virus</i>

WPROWADZENIE

W części III przeglądu aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych przedstawiono ciąg dalszy opisu analogów modyfikowanych w części cukrowej ze szczególnym uwzględnieniem tych posiadających zmienioną konfigurację w pozycji 2' lub 3' np. cytarabina, fludarabina, klofarabina i fialurydyna. Przedstawiono także całą listę pochodnych posiadających inne modyfikacje w części cukrowej należących do grup nukleozydów karbocyklicznych, acyklicznych, 5'-modyfikowanych, spiro- oraz L-nukleozydów. Wszystkie części mają stanowić razem możliwie kompletny, zwięzły, obejmujący najnowsze doniesienia przegląd najważniejszych modyfikowanych nukleozydów aktywnych biologicznie i należy traktować je jako całość. W kontekście opisu aktywności pojawiają się odniesienia do najważniejszych celów molekularnych analogów nukleozydowych, mechanizmów działania, farmakodynamiki, farmakokinetyki, toksyczności, oporności, badań *in vitro* oraz *in vivo* czy strategii prolekowych, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej lektury dla chemików interesujących się chemią medyczną.

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NUKLEOZYDÓW O ZMIENIONEJ KONFIGURACJI W POZYCJACH 2' I 3'



Rysunek 1.1. Struktury wybranych nukleozydów arabinofuranosylowych
Figure 1.1. Structures of selected arabinofuranosyl nucleosides

Wśród aktywnych pochodnych nukleozydowych o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3' można wymienić 1-β-D-arabinofuranosylocytozynę (cytarabina, araC, **59**, Rys. 1.1.) [1], 1-β-D-arabinofuranosylotyminę (araT, **60**) [2], 9-β-D-arabinofuranosyloadeninę (widarabina, araA, **61**) [3] i 9-(β-D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadeninę (fludarabina, FA, **62**) [4]. Cytarabina (np. Cytosar-U®) została otrzymana po raz pierwszy w roku 1959 przez Walwicka i in. Już w 1969 roku została dopuszczona do leczenia przez FDA. Od tamtej pory jest stosowana głównie w leczeniu białaczki szpikowej, ostrej białaczki limfoblastycznej i chłoniaków w kombinacji z innymi lekami. Z powodu niskiej ustnej biodostępności, podaje się ją w formie wlewów dożylnych. Jest typowym cytostatykiem, który powoduje poważne efekty uboczne. Mechanizm działania polega na wewnątrzkomórkowej

aktywacji poprzez fosforylacje do trifosforanu, który zaburza syntezę DNA w fazie S cyklu komórkowego. Cytarabina posiada również właściwości przeciwwirusowe, zwłaszcza wobec herpeswirusów. Jednak ze względu na swoją toksyczność nie jest wykorzystywana w leczeniu infekcji. Również araT (**60**), otrzymana po raz pierwszy w latach pięćdziesiątych XX wieku, wykazuje aktywność przeciw herpeswirusom takim jak EBV, HSV-1 i SVV (*simian varicella virus*) [5–7]. Jest to o tyle ciekawe, że araT nie wykazuje takiej toksyczności jak araC (**59**), choć nie jest jej pozbawiona. Cytarabina jak większość pochodnych nukleozydowych dostaje się do wnętrza komórki dzięki transporterom nukleozydowym (NT). Istnieje ciekawa praca opisująca wpływ dłuższego traktowania linii komórkowej ludzkich limfatycznych komórek H9 roztworem araC (0,5 μ M) na powstawanie oporności zależnej od NT oraz dCK (kinaza 2'-deoksytydynowa odpowiedzialna za fosforylację araC do araCMP) [8]. Otrzymana w ten sposób linia H9-araC wykazała ponad 600-krotnie zwiększoną oporność względem araC oraz zwiększoną oporność na inne analogi jak ddC (**32**), 3TC (lamiwudyna, **63**, Rys. 2.6.) i fludarabina (**62**). W porównaniu do linii H9 stwierdzono, że w linii H9-araC ilość skumulowanej araC-TP była mniejsza niż 1%, aktywność dCK spadła do 31,4%, zmalała wyraźnie ilość membranowego transportera ENT1 oraz białka Sp1 – czynnika regulującego transkrypcję genu kodującego dCK. AraC nie jest jedynym analogiem nukleozydowym, wobec którego obserwuje się wywoływanie oporności NT-zależnej.

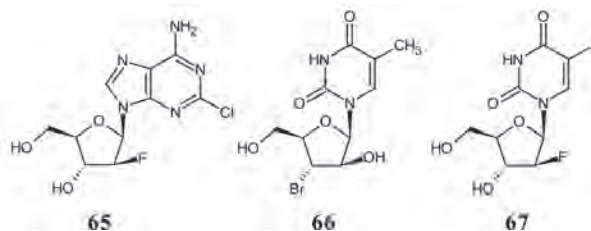
Widarabina (araA, **61**) z kolei jest aktywna wobec wirusów HSV i VZV. Zsyntezowano ją po raz pierwszy w 1960 r. w zespole Bakera [9], choć była pomyślana jako związek przeciwnowotworowy, to znalazła jednak zastosowanie w terapii antywirusowej. Po raz pierwszy jej aktywność wobec herpeswirusów została zgłoszona w 1964 r. przez Privat de Garilhe i de Rudder [10]. Znalazła ona zastosowanie w leczeniu do czasu wprowadzenia mniej toksycznych leków. Jedna publikacja sugeruje również, że aktywność widarabiny nie ogranicza się tylko do wirusów DNA, ponieważ zaobserwowano jej aktywność wobec wirusa Gross MLV (wirus mysiej białaczki) należącego do retrowirusów [11]. Mechanizm działania jest analogiczny – aktywną formą jest powstający w komórce w wyniku działań odpowiednich kinaz trifosforan (araA-TP), który jest inhibitorem kompetycyjnym wirusowej polimerazy DNA i zaburza syntezę wirusowego DNA. Niestety zaburza również syntezę ludzkiego DNA. Selektywność przeciwwirusowa opiera się na szybszej fosforylacji araA przez wirusowe kinazy tymidynowe (HSV i VZV) niż przez ludzką dTK. Odnotowano synergistyczny efekt araA w terapii HSV w połączeniu z acyklowirem (**64**, ACV, Rys. 2.1.) [12]. Znane są również właściwości inhibitorowe araA-TP wobec reduktazy rybonukleotydowej (RNR), co może powodować samowzmocnienie efektu cytostatycznego i przeciwwirusowego. AraA jest podatna na działanie deaminazy adenzynowej, która przekształca ją w raczej nieaktywny arabinozyd hipoksantyny. Aby wydłużyć czas półtrwania widarabiny, możliwe jest zastosowanie któregoś z inhibitorów tego enzymu. W 1969 r. Montgomery i Hewson z *Southern Research Institute* (USA) otrzymali pochodną 2-fluorową – fludarabinę (**62**), która nie ulega deaminacji.

Fludarabina (**62**) znalazła zastosowanie jako lek w terapii przewlekłej białaczki limfocytowej i chłoniaków nie-Hodgkina. Tak samo jak widarabina oddziałuje z RNR i polimerazą α w fazie S cyklu komórkowego. Zaburza pulę komórkowych deoksynukleotydów (inhibicja RNR), syntezę i naprawę DNA (inhibicja polimeraz), indukuje apoptozę i zaburza proces metylacji DNA poprzez inhibicję hydrolazy SAH oraz w pewnym stopniu C-5 DNA metylotransferazy ($EC_{50} = 47 \mu\text{M}$) [13, 14]. Co więcej, FA jest inhibitorem primazy DNA [15]. Można ją więc zakwalifikować do grupy leków wielocelowych [16]. Jest typowym cytostatykiem, który powoduje poważne efekty uboczne: limfopenię, a co za tym idzie również wzmoczoną podatność na infekcje i zakażenia oportunistyczne, wywołuje gorączkę, niewydolność nerek, zaburzenia widzenia, krwimocz, wymioty, biegunkę i inne. Stwierdzono również działanie teratogenne.

Podawanie dożylnie monofosforanu fludarabiny (FAMP, Fludara®) pozwala ograniczyć przenikanie jej do tkanek, co daje pewną selektywność względem komórek krwi. W osoczu FAMP jest hydrolizowany do FA przez ekto-5'-nukleotyduzę usytuowaną na zewnętrznej powierzchni błon komórkowych, która następnie jest transportowana przez NT takie jak ENT1, CNT2 do wnętrza komórek [17], gdzie ponownie ulega fosforylacji do form aktywnych. W badaniach *in vitro* w hodowli ludzkich białaczkowych limfoblastów (CCRF-CEM) określono poziom inhibicji syntezy DNA oraz przeżywalności komórek na poziomie $IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ [18]. W badaniach na żywych mysich modelach zaszczepionych komórkami mysiej białaczki L1210 wykazano, że podanie fludarabiny zwiększyło medianę długości życia o 125% względem nieleczonych jednostek i zanotowano 4 na 15 przypadków wyleczenia [19]. Spośród wielu badań na pacjentach z przewlekłą białaczką limfocytową można podać dane z *M. D. Anderson Cancer Center* (USA) – w przypadku użycia FAMP jako leku I rzutu uzyskano 79% odsetek odpowiedzi na leczenie [20]. Znane są też doniesienia o synergistycznym efekcie łączenia FAMP z innymi terapeutykami. Fludarabina okazała się być podatna na enzymatyczne rozerwanie wiązania glikozydowego przez PNPazę (fosforylaza nukleozydów purynowych szlaku ratunkowego) dając 2-fluoroadeninę, która przy wykorzystaniu komórkowych enzymów jest przeprowadzana do wysoce toksycznego trifosforanu 2-fluoroadenozyny. Zespół naukowców z *Southern Research Institute* (USA) po wieloletnich poszukiwaniach metodą prób i błędów znalazł pochodną, która przy zachowaniu aktywności FA wykazała zdecydowanie większą odporność na hydrolyczne i fosforolityczne rozerwanie wiązania glikozydowego, a w przypadku jego rozerwania powstaje 2-chloroadenina, która jest dużo mniej toksyczna – pochodną tą jest klofarabina (**65**) [21].

Klofarabina (**65**, m.in. Clolar®, 9-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranozylo)-2-chloroadenina, Rys. 1.2.) jest zaaprobowanym przez FDA w 2004 r. w trybie warunkowym lekiem II rzutu w przypadku nawracającej ostrej białaczki szpikowej (ACC) u pacjentów w wieku 1–21 lat. Można ją traktować jako wypadkową dwóch struktur – fludarabiny (**62**) oraz kładrybiny (**53**). Podobnie jak fludarabina, klofarabina po fosforylacji (etapem limitującym jest fosforylacja do difosforanu) przez

kinazy komórkowe zaburza proces syntezy DNA na drodze inhibicji reduktazy rybonukleotydowej (RNR), polimerazy α oraz terminację elongacji biosyntezowanej nici DNA po inkorporacji monofosforanu klofarabiny [22]. Selektywność działania opiera się na wzmożonej aktywności dCK w komórkach nowotworowych. Efekt biologiczny ulega samowzmocnieniu, ponieważ ubytek właściwych dNTP ze względu na inhibicję RNR powoduje częstsze wbudowanie monofosforanu klofarabiny do DNA. Klofarabina (**65**) nie wykazuje silnej aktywności wobec mitochondrialnej Pol γ , za to powoduje uwalnianie z mitochondrium cytochromu c oraz innych czynników indukujących apoptozę (AIF, APAF1, kaspaza 9). Za transport klofarabiny do komórki odpowiada podobna grupa NT jak w przypadku FA (**62**) i na drodze ich modyfikacji może pojawiać się oporność, choć w przypadku **65** możliwy jest w pewnym stopniu bierny transport transblonowy. W kontekście klofarabiny pojawia się również problem aktywności transporterów typu ABC (ang. *ATP-binding cassette*), które są znane z usuwania pochodnych nukleotydowych z komórki, choć akurat w tym przypadku uważa się, że transporter ABCG2 eksportuje klofarabinę, a nie jej monofosforan. Równoległe zastosowanie inhibitora tego transportera w terapii nowotworów posiadających ABCG2 może zwiększyć aktywność **65** [23, 24].

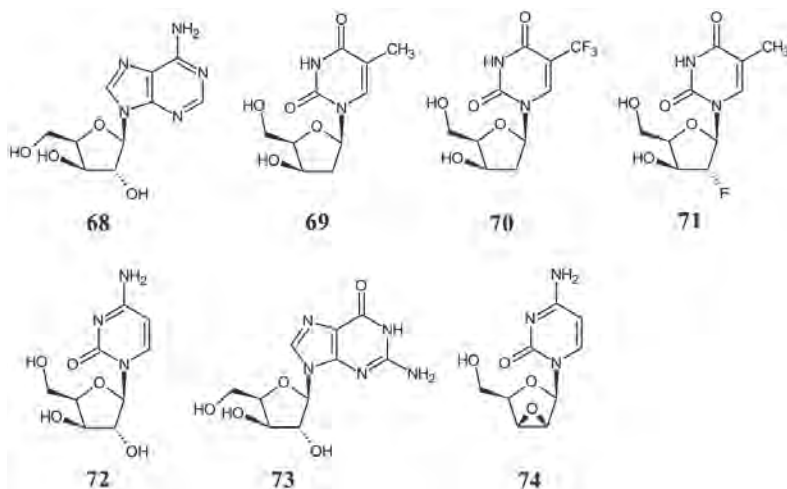


Rysunek 1.2. Struktury klofarabiny, 1-(3'-bromo-β-D-arabinofuranosyl)tyminy oraz fialurydyny
Figure 1.2. Structures of clofarabine, 1-(3'-bromo-β-D-arabinofuranosyl)thymine and fialuridyne

Inną pochodną arabinofuranosylową o istotnej aktywności jest 1-(3'-deoksy-3'-bromo-β-D-arabinofuranosyl)tymina (**66**). W testach przeciwko *Mycobacterium tuberculosis* wykazała $IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi H37Ra oraz $IC_{50} = 1\text{--}2 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi opornemu na ryfampicynę i izoniazyd (H37Rv) przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100\text{--}200 \mu\text{g/mL}$ [25]. *M. tuberculosis* wywołuje gruźlicę, która jest ciągle powszechną i niebezpieczną chorobą zwłaszcza w krajach trzeciego świata oraz w przypadku osób o obniżonej odporności. Co roku z jej powodu umiera ponad milion ludzi na świecie. W 2015 roku znajdowała się na dziewiątej pozycji najczęstszych przyczyn zgonów w rankingu WHO (ang. *World Health Organization*).

Z pośród pochodnych arabinofuranosylowych należy wymienić jeszcze jeden słynny analog – fialurydynę (**67**, 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-jodouracyl, FIAU, Rys. 1.2.). Choć w tym przypadku jest to zła sława. Fialurydyna była badana jako potencjalny terapeutyk w leczeniu infekcji HBV. Pomimo korzystnych wyników badań *in vitro* oraz *in vivo* w układach zwierzęcych na eta-

pie przedklinicznym [26], podczas badań klinicznych przeprowadzonych w 1993 r. w NIH (*National Institute of Health*, USA) doszło do tragedii i 5 pacjentów z 15 zmarło z powodu silnej hepatotoksyczności [27]. Pozostałych dwóch wymagało przeszczepu wątroby. Po fakcie stwierdzono, że FIAU jest rozpoznawane i inkorporowane przez ssacze polimerazy DNA (α , γ , δ), dodatkowo stwierdzono silną aktywność inhibitorową FIAU-TP (trifosforan FIAU) wobec mitochondrialnej Pol γ na poziomie $K_i = 0,04 \mu\text{M}$, co każe się zastanowić nad jakością przeprowadzonych badań przedklinicznych [28]. Można też ubolewać, że prowadzący badania kliniczne nie potraktowali z dostateczną uwagą wcześniejszych doniesień o cytotoksyczności FIAU w badaniach poświęconych aktywności wobec HCMV i wyjątkowo szybkiej fosforylacji tej pochodnej przez mitochondrialną kinazę tymidynową, co mogło prowadzić to silnej kumulacji FIAU-TP właśnie w mitochondriach [29, 30].



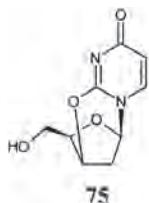
Rysunek 1.3. Struktury wybranych pochodnych β -D-ksylofuranosylowych (68-73) i 2',3'-anhydro- β -D-liksofuranosylcytozyny (74)

Figure 1.3. Structures of selected β -D-xylofuranosyl derivatives (68-73) and 2',3'-anhydro- β -D-lyxofuranosylcytosine (74)

Niektóre analogi arabinofuranosylowe nukleozydów, jak opisano powyżej, posiadają bardzo ciekawe aktywności. Czy podobnie jest z pochodnymi ksylofuranosylowymi? Wiele takich analogów zostało zsyntezowanych i część z nich rzeczywiście posiada pewne aktywności, choć ta grupa nie doczekała się przedstawiciela stosowanego w leczeniu. W 1965 r. Ellis i in. [31] po raz pierwszy zgłosili aktywność przeciwnowotworową 9- β -D-ksylofuranosyloadeniny (ksylo-A, **68**, Rys. 1.3.), co dało asumpt do uznania ksylo-A za strukturę wartą dalszej pracy. Zostało to potwierdzone w kolejnych badaniach np. wobec linii komórkowej białaczki L1210, czy wobec komórek B-mix K-44/6, czyli szczyrzych komórek transformowanych RSV (*Rous sarcoma virus* – wirus mięsaka Rousa). Istotną aktywność przeciwwirusową *in vitro* **68** wykazała również wobec wirusów takich jak

wirus afrykańskiego pomoru świń należącego do Asfiwirusów (ASFV) oraz HSV-1 ($EC_{50} = 4,6 \text{ mg/mL}$) [32]. Problemem w stosowaniu ksylo-A okazała się jej szybka deaminacja w komórce przez deaminazę adozynową. Próba zniwelowania tego zjawiska poprzez modyfikację puryny w pozycji 8 nie przyniosła pozytywnych wyników.

Wirus HBV jest jeszcze bardziej rozpowszechniony niż HCV i szacuje się, że zarażonych na świecie jest ok. 2 mld ludzi [33]. W 2010 roku pojawiła się publikacja badająca przydatność różnych pochodnych o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3' wobec infekcji DHBV i HBV [34]. Z przebadanych związków zasługującą na odnotowanie aktywność przeciw DHBV wykazały związki **69**, **70** i **71** w przedziale $EC_{50} = 3,84\text{--}4,13 \text{ }\mu\text{M}$ ($CC_{50} > 600 \text{ }\mu\text{M}$ dla komórek Huh-7 – linia komórek ludzkiego raka wątroby). Niestety wobec ludzkiego HBV okazały się być umiarkowanie aktywne z EC_{50} na poziomie $19,23\text{--}33,7 \text{ }\mu\text{M}$. W 1986 r. G. Gosselin i in. [35] przeprowadzili przesiewowe badania na aktywność przeciwwirusową podstawowych analogów ksylofuranazyliowych posiadających naturalne zasady azotowe wobec wirusów: HSV, VV, VSV, Polio, Coxsackie, Reowirusa 1 i Rinowirusa 9. W badaniu tym zaobserwowano umiarkowane aktywności ksylo-A, ksylo-C (**72**) i ksylo-G (**73**) wobec wirusów DNA jak HSV czy VV na poziomie $IC_{50} = 20\text{--}40 \text{ mg/mL}$. Ksylo-A wykazała także aktywność przeciw Rinowirusowi 9 będącemu wirusem RNA.



Rysunek 1.4. Struktura 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyny

Figure 1.4. The structure of 2,3'-anhydro-2'-deoxyuridine

W 1988 roku Webb i in. zgłosili aktywność 2,3'-anhydro- β -D-liksofuranazyliocytozyny (**74**) przeciwko wirusowi HIV [36]. Związek ten już przy stężeniu $0,5\text{--}1 \text{ }\mu\text{M}$ wykazał dużą zdolność ochrony zakażonych komórek zwiększając kilkukrotnie liczbę żywych komórek. Jednak przy stężeniu $5 \text{ }\mu\text{M}$ można było zauważyć wyraźny efekt cytotoksyczny. W 2010 roku pojawiła się za to praca pokazująca, że stanowiące często etap pośredni w syntezie pochodnych nukleozydowych modyfikowanych w części cukrowej związki 2,3'-anhydrocykliczne również mogą posiadać ciekawe aktywności. Wśród przebadanych pochodnych najlepszą aktywność wykazała 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydina (**75**, Rys. 1.4.) z $EC_{50} = 2,5\text{--}5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ przeciw wirusowi DHBV i $EC_{50} = 5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ przeciw HBV przy $CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ [37].

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POZOSTAŁYCH NUKLEOZYDÓW POSIADAJĄCYCH MODYFIKACJE W CZĘŚCI CUKROWEJ

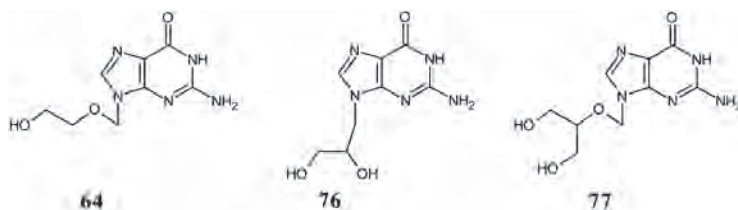
Aktywności nukleozydów posiadających modyfikacje w pozycjach 2' i 3' rybozy zostały szeroko omówione w II części przeglądu i w poprzednim rozdziale tej części. W tym miejscu zostaną przedstawione pokrótce inne modyfikacje części cukrowej. W tej kategorii związków na pierwszy plan wychodzą nukleozydy acykliczne, w których pierścień cukrowy został zastąpiony przez podstawnik (2-hydroksyetyloksy) metylowy (np. acyklowir, ACV, Zovirax®, 64, Rys. 2.1.) lub 2,3-dihydroksypropylowy (np. 9-(2,3-dihydroksypropylo)adenina, DHPA, 76). W pierwszej grupie została zachowana część odpowiadająca atomom C1', C4', O4' i C5', a w drugiej grupie została zachowana część z układem 2',3'-*cis*-diolowym. ACV i DHPA są szczególnymi przypadkami pochodnych z grupy *seco*, które posiadają przerwany pierścień cukrowy w jednej z pięciu pozycji np. 1',2' lub 2',3'. ACV można traktować, jako pochodną *triseco* z przerwanyimi trzema wiązaniami w pozycjach 1',2'; 2',3' i 3',4' [38].

Pochodne typu DHPA (76), nieposiadające sąsiadującego z wiązaniem glikozydowym atomu tlenu są formalnie alkilowymi pochodnymi zasad azotowych i otrzymuje się je w reakcjach alkilowania. Umieszczono je w tym rozdziale ze względów historycznych, bo tak do tej pory często były klasyfikowane. W przypadku pochodnych typu ACV (64) obecność atomu tlenu imitującego atom tlenu rybozy powoduje podobieństwo tych związków do nukleozydów również pod względem chemicznym. Możliwe jest otrzymanie takich pochodnych na drodze transpurynacji [39]. Mechanizm tej reakcji zakłada powstawanie acyklicznego kationu pseudocukrowego. Dlatego można takie związki klasyfikować jako pochodne nukleozydowe lub pseudonukleozydowe.

ACV po raz pierwszy opisany został przez Schaeffera i Elion w 1977 r. [40]. Prócz syntezy przedstawiono również pierwsze wyniki badań aktywności przeciw-wirusowej. Za swą pracę nad ACV i jego pochodnymi Elion otrzymała w 1988 roku nagrodę Nobla. ACV wykazuje wysoką i selektywną aktywność zwłaszcza przeciw herpeswirusom (HSV-1, HSV-2). Wartości IC_{50} przeciw różnym szczepom wynoszą 0,01–0,1 $\mu\text{g/mL}$. ACV po przedostaniu się do wnętrza komórki ulega fosforylacji przez wirusową kinazę deoksytymidynową HSV-dTK do postaci monofosforanu [41]. Następnie ulega fosforylacji przez ludzką kinazę GMP (guanozynomonofosforanu) do difosforanu i komórkowe kinazy NDP (nukleozydodifosforanowe) do trifosforanu. Trifosforan zostaje rozpoznany przez wirusową polimerazę DNA i wbudowany do wirusowego łańcucha nukleinowego. ACV nie jest substratem dla komórkowych kinaz, dlatego fosforylacja zachodzi tylko w zainfekowanych komórkach. ACV wykazuje aktywność również przeciw wirusowi VZV oraz umiarkowaną aktywność przeciw wirusowi CMV.

ACV wykorzystano jako strukturę liderową w dalszych poszukiwaniach, w wyniku których uzyskano m.in. gancyklowir (GCV, 9-(1,3-dihydroksy-2-propoksymetylo)guanina, Cytovene®, 77) [42–45]. GCV okazał się być aktywny przeciw

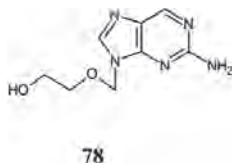
wirusom HSV-1 i 2, CMV, VZV a także EBV (wirus Epsteina-Barra). Co ciekawe, GCV jest także aktywny wobec zmutowanych, nieposiadających własnej kinazy tymidynowej szczepów HSV TK⁻, wobec których ACV nie jest aktywny. Zamiana guaniny na adeninę w strukturze ACV dała obniżenie aktywności, a wstawienie w to miejsce zasad pirymidynowych dało związki nieaktywne.



Rysunek 2.1. Nukleozydy acykliczne

Figure 2.1. Acyclic nucleosides

Inne modyfikacje części zasadowej mają na celu poprawę rozpuszczalności i poprawę parametrów wchłaniania przy podaniu doustnym. Przykładem takiej modyfikacji może być 6-deoksyacyklowir (**78**, Rys. 2.2.) [46], który w komórce zostaje utleniony przez oksydazę ksantynową do postaci ACV. Pozwala to na sześciokrotne zwiększenie stężenia ACV w organizmie.



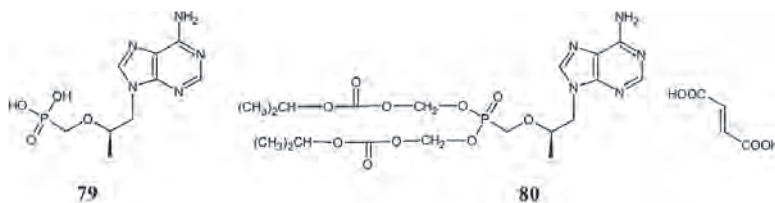
Rysunek 2.2. Struktura 6-deoksyacyklowiru

Figure 2.2. Structure of 6-deoxyacyclovir

Ważnym nukleozydem acyklicznym jest wspomniany wcześniej DHPA (**76**) [47], którego enancjomer o konfiguracji *S* jest tym aktywnym. Wykazuje on szerokie spektrum aktywności przeciw wirusom (+)RNA, (-)RNA, dsRNA (dwuniciowe RNA), a także w mniejszym stopniu przeciw wirusom DNA. Mechanizm działania jest mechanizmem typowym dla analogów adeninowych. Stanowi on inhibitor dla hydrolazy *S*-adenozylhomocysteiny (SAH). Inhibicja tego enzymu powoduje kumulowanie się w komórce *S*-adenozylhomocysteiny, która z kolei utrudnia m.in. metylację terminalnej guanozyny w strukturze *cap* mRNA i zakłóca dojrzewanie wirusowego RNA.

Tenofowir (**79** PMPA, [(*R*)-9-(2-fosfonylmetoksypropylo)adenina, Rys. 2.3.) również zalicza się do analogów acyklicznych, choć w tym przypadku uważa się go za izosteryczny i izoelektryczny analog acyklonukleotydy. Należy on do acyklicznych fosfonianów nukleozydowych, których prekursorem w syntezie jest DHPA. Jest to bardzo ciekawa grupa związków przeciwwirusowych zsyntezowanych przez zespół Holý'ego [48]. Są stosowane w leczeniu wielu różnych zakażeń wirusowych

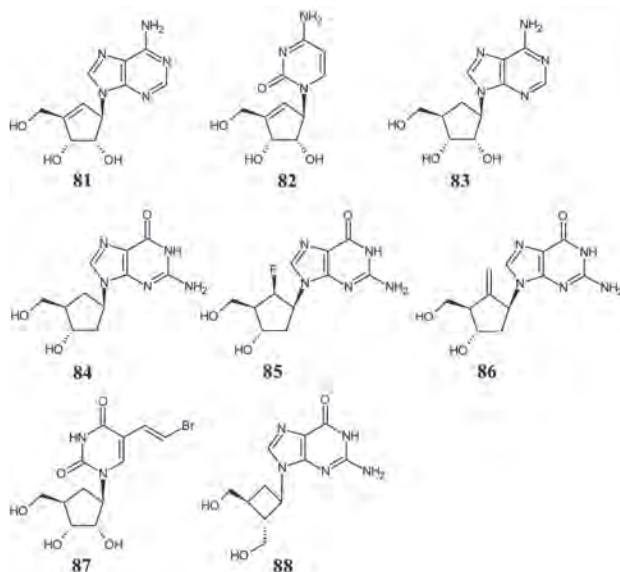
np. HCMV u pacjentów chorych na AIDS. Został dopuszczony do terapii przeciw wirusowi HIV w 2001 roku, a także przeciw wirusowi HBV w roku 2008. Ze względu na lepsze wchłanianie stosowany jest w postaci proleku – dizoproksylu tenofowiru, w którym grupa fosforanowa jest dodatkowo zestryfikowana dwiema resztami izopropylksoykarbonyloksymetylowymi. Po wnikięciu do komórki diester ten rozkłada się do aktywnego biologicznie tenofowiru. Forma doustna jest solą fumaranową dizoproksylu tenofowiru (TDF, **80**, Viread®). Z karty charakterystyki produktu leczniczego można wyczytać, że Viread jest stosowany w leczeniu dzieci zakażonych wirusem HIV-1 w wieku od 6 do 12 lat z opornością na NRTI lub przy zbyt dużej toksyczności leków pierwszego rzutu. Tenofowir może być stosowany w profilaktyce zakażeń w grupie wysokiego ryzyka.



Rysunek 2.3. Struktury tenofowiru i TDF

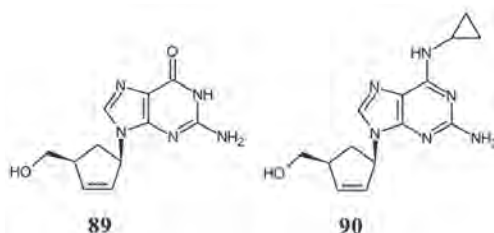
Figure 2.3. Structures of tenofovir and TDF

Prócz nukleozydów acyklicznych, znane są również nukleozydy karbocykliczne oraz L-nukleozydy, które także posiadają ciekawe właściwości biologiczne [49]. Należąca do nukleozydów karbocyklicznych neplanocyna A (**81**, Rys. 2.4.) [50] jest również inhibitorem hydrolazy SAH z $IC_{95} = 0,2 \mu\text{M}$. Neplanocyna A w komórce jest łatwo metabolizowana do nieaktywnej formy inozynowej przez deaminazę adenozykową, dlatego podjęto próby jej modyfikacji aby zwiększyć czas półtrwania w komórce, a także zmniejszyć jej cytotoksyczność poprzez utrudnienie fosforylacji przez kinazę adenozykową. IC_{50} neplanocyny względem wirusów VV, VSV, Reowirusa 1, Junin (wirus argentyńskiej gorączki krwotocznej, JUNV), CMV mieściło się w przedziale 0,3–7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [51, 52]. Badania prowadzono w komórkach $E_6\text{SM}$ (linia komórkowa ludzkich embrionalnych fibroblastów), HeLa (linia komórek raka szyjki macicy), Vero (linia komórek nabłonka nerki koczkodana) i HEL (linia komórek białaczki erytroblastycznej). Cytozynowy analog neplanocyny o nazwie zwyczajowej cyklopentynylocytozyna **82** (CPE-C) [53, 54], prócz aktywności przeciwwirusowej wobec ponad 20 różnych wirusów posiada również aktywność przeciwnowotworową inhibując w postaci trifosforanowej syntetazę trifosforanu cytydyny (CTP), która w komórkach nowotworowych ma zwiększoną aktywność. Jednak stwierdzona w I fazie badań klinicznych kardiotoxyczność opóźnia wprowadzenie go do leczenia. Arysteromycyna (**83**) [55, 56] to kolejny purynowy nukleozyd karbocykliczny, który również należy do grupy inhibitorów hydrolazy SAH, wykazuje właściwości sercowo-naczyniowe prawdopodobnie jako agonista receptora adenozynowego A2 [57] i stanowi strukturę liderową dla wielu aktywnych związków.



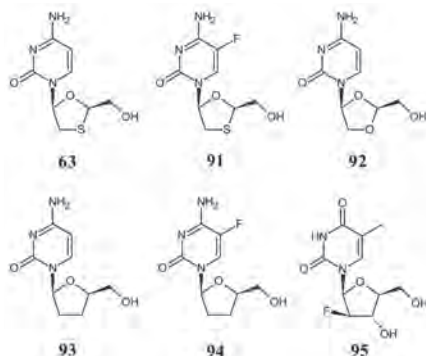
Rysunek 2.4. Nukleozydy karbocykliczne
Figure 2.4. Carbocyclic nucleosides

Karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna (CDG, **84**) [58] należy do inhibitorów replikacji wirusowego DNA. Posiada szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej np. wobec HSV, HCMV i HBV. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania CDG przeciw HSV badano poziom inkorporacji jej monofosforanu do komórkowego i wirusowego DNA. Okazało się, że trifosforan CDG jest lepszym substratem dla wirusowej polimerazy i działa jako inhibitor kompetycyjny, ale nie działa jako terminator elongacji łańcucha DNA [59]. CDG wykorzystano jako strukturę liderową i tak zgłoszono kolejne aktywne analogi. 6'-Fluoro-CDG (**85**) [60] okazała się być kilkukrotnie skuteczniejsza od ACV *in vitro* przeciw HSV-1 i 2, a entekawir (BMS-200475, **86**) [61] wykazał bardzo wysoką aktywność przeciw HBV ($EC_{50} = 0,003 \mu\text{M}$) przy cytotoksyczności zależnej od linii komórkowej 21-120 μM . Nie sposób wymienić wszystkich analogów karbocyklicznych, które zostały zsyntezowane i przebadane biologicznie, ale trzeba wspomnieć także o C-BVDU (**87**) [62] oraz C-oksetanocynie G (**88**) [63], które są karbocyklicznymi wariantami aktywnych nukleozydów i przedstawicielami dwóch grup związków. C-BVDU wykazuje porównywalną aktywność do BVDU (**3**), a przy okazji jest odporny na hydrolityczne działanie fosforylasy urydynowej i deoksytymidynowej, a C-oksetanocyna G wykazuje również ciekawe aktywności jak związek liderowy, jednak jest bezpieczniejsza w użyciu i może stanowić obiecujące rozwiązanie terapeutyczne w leczeniu infekcji HSV i HCMV. Związek **88** wykazuje również aktywność anti-HIV, jednak słabszą od znanych ddA (dideoksyadenozyna, **30**) i ddG (dideoksyguanozyna, **31**), które zostały omówione w części II.



Rysunek 2.5. Karbowir i abakawir
Figure 2.5. Carbovir and abacavir

Ostatnią grupę związków karbocyklicznych, o której trzeba wspomnieć, stanowią karbowir (**89**, Rys. 2.5.) i jego pochodne. Karbowir wytypowano jako strukturę aktywną w wyniku dużego programu badań przesiewowych zrealizowanych w *National Cancer Institute* (USA) [64]]. Okazał się być odpornym na hydrolizę i zdolnym do hamowania infekcyjności i replikacji wirusa HIV w limfocytach T na poziomie stężenia 200–400 krotnie niższym od poziomu cytotoksycznego. W trzech różnych liniach komórkowych wykazał aktywność w zakresie $IC_{50} = 0,12\text{--}0,31\ \mu\text{M}$ (enancjomer (-)). AZT (**1**) i ddC (**32**) w tych samych testach osiągały aktywność o dwa rzędy lepsze, prócz linii komórkowej JM (Jurkat, linia komórkowa nieśmiertelnych T-limfocytów). Badania enzymatyczne wykazały właściwości inhibitorowe trifosforanu (-)karbowiru wobec HIV1-RT na poziomie (K_i) równym AZT-TP. Znalezione również sposób na przedłużenie czasu półtrwania związku w organizmie, inhibując pierwszy etap metabolizmu przez użycie mieszaniny dwóch izomerów, a to drugi izomer (+) okazał się być tym chętniej utlenianym przez komórkowe dehydrogenazy przy niewiele mniejszej aktywności anti-HIV. Choć związek okazał się być bardzo dobrym środkiem przeciw wirusowi HIV, jednak pewne wady w biodostępności, jak niska absorpcja przy podaniu ustnym, niska przenikalność przez barierę krew-mózg oraz cytotoksyczność zatrzymały rozwój do produktu leczniczego. Wprowadzono liczne modyfikacje do struktury karbowiru w celu poprawy tych cech, ale z różnym skutkiem. Badania kliniczne pomyślnie przeszedł abakawir (**90**). Choć wstępne pomiary aktywności nie były doskonałe, jednak związek okazał się być dobrym kandydatem pod względem farmakokinetycznym i pod względem toksyczności [65]. W USA został dopuszczony do użycia już w 1998 roku.

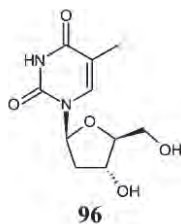


Rysunek 2.6. Struktury wybranych L-nukleozydów

Figure 2.6. L-nucleoside analogs

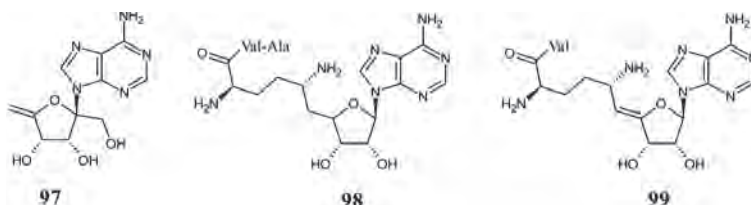
Kolejną grupą związków modyfikowanych w części cukrowej, którą trzeba opisać w tym rozdziale są analogi L-nukleozydów. Nie dziwi fakt, że od początku poszukiwań leków zajmowano się analogami D-enancjomerów nukleozydów, które występują naturalnie i można się było spodziewać, że to one będą wchodzić w interakcje w organizmach żywych. Zmiana nastąpiła na początku lat dziewięćdziesiątych ub.w. gdy pojawiły się pierwsze doniesienia o aktywnościach anty-HBV i anty-HIV nienaturalnych β -L-nukleozydów. Prekursorem okazała się być β -L-2'-deoksy-3'-tiacytydina (3TC, lamiwudyna, **63**, Rys. 2.6.) [66]]. Pierwotnie uzyskano mieszaninę racemiczną, która poddana badaniom biologicznym wykazała bardzo dobrą aktywność przeciw wirusowi HIV (1 i 2) na poziomie $EC_{50} = 0,02-0,06 \mu M$. Później uzyskano oba enancjomery osobno i wykazano, że bardziej aktywnym oraz mniej toksycznym jest enancjomer L ($EC_{50} = 0,018 \mu M$). Podobną charakterystykę aktywności uzyskano przeciw wirusowi HBV. W komórce ulegają fosforylacji do trifosforanu dzięki kinazom komórkowym i blokują aktywność wirusowej HIV1-RT i HBV-Pol (polimeraza wirusa HBV) o aktywności RT, konkurując z naturalnym substratem. Enancjomer L wykazuje wysoką selektywność, podczas gdy enancjomer D wykazywał pewne powinowactwo do polimeraz gospodarza. Lamiwudyna doczekała się wprowadzenia do terapii przeciw wirusowi HIV i stała się strukturą liderową w dalszych poszukiwaniach. Tak uzyskano β -L-FTC (emtricytabina, **91**) [67], β -L-diokso-C (troksacytabina, **92**) [68], β -L-ddC (**93**, L-dideoksycytydina), β -L-FddC (**94**, β -L-5-fluoro-2',3'-dideoksycytydina) [69] i β -L-FMAU (**95**, 1-(2'-deoksy-2'-fluoro- β -L-arabinofuranozylo)-5-metylouracyl) [70]. Trifosforany związków **93** i **94** wykazały zdolność do selektywnej inhibicji HIV-RT z wartościami stałej inhibicji K_i niewiele gorszymi od 3TC-TP, choć dużo gorszymi od AZT-TP. Stwierdzono, że działają jako terminatory elongacji wirusowego DNA. Oba nukleozydy **93** i **94** okazały się być również bardzo aktywne przeciw HBV *in vitro* na poziomie $ED_{50} = 0,01 \mu M$. Oba wykazały zerową aktywność wobec mitochondrialnej polimerazy γ , co jest bardzo dobrym wynikiem, ponieważ uważa się, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za cytotoksyczność NRTI w leczeniu

AIDS jest właśnie inhibicja Pol γ oraz inkorporacja NRTI do mitochondrialnego DNA w komórce gospodarza [71]. Na przykład ddC (**32**) wykazuje aktywność inhibitorową wobec Pol γ na poziomie $K_i = 0,022 \mu\text{M}$ *in vitro* oraz silną aktywność terminatorową. Aktywność β -L-FTC (**91**) *in vitro* względem wirusa HIV charakteryzowała się wartością $EC_{50} = 0,0013 \mu\text{M}$ przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ w dwóch różnych liniach komórkowych. Jest to doskonały rezultat i nie dziwi, że dopuszczono ją do leczenia w 2006 roku. Analog β -L-FMAU (**95**) wykazał za to dobrą aktywność przeciw wirusowi HBV na poziomie $EC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ przy zerowej cytotoksyczności [49].



Rysunek 2.7. Struktura telbivudyny
Figure 2.7. Structure of telbivudine

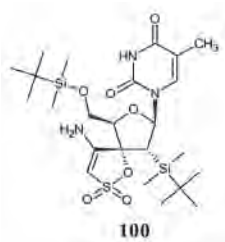
Innym ważnym przedstawicielem L-nukleozydów jest telbivudyna (β -L-2'-deoksytymidyna, **96**, Rys. 2.7.). Już w 1992 roku opisano, że telbivudyna ulega skutecznej fosforylacji przez kinazę tymidynową wirusa HSV-1 i hamuje jego wzrost [72]. Jednak dopiero prace związane z aktywnością przeciw wirusowi HBV nadały znaczenie temu związkowi ($EC_{50} = 0,19 \pm 0,09 \mu\text{M}$) [73]. Związek jest produkowany przez Novartis i dostępny w handlu w UE pod nazwą handlową Sebivo®.



Rysunek 2.8. Przykłady nukleozydów modyfikowanych w pozycji 5'
Figure 2.8. Examples of nucleosides modified in the 5'-position

Nakoniec przeglądu wypada zasygnalizować jeszcze istnienie innych grup modyfikowanych nukleozydów poprzez podanie kilku przykładów. Angustmycyna A (**97**, Rys. 2.8.) aktywna wobec bakterii gram (+) [74] jest analogiem modyfikowanym w pozycji 5' i 1'. Związki z tej grupy są najczęściej aktywne wobec enzymów biorących udział w reakcjach transmetylowania np. hydrolazy SAH. Sinefungina VA (**98**), 4',5'-didehydrosinefungina V (**99**) wykazują ciekawe aktywności przeciw pasożytom z gatunku świdrowców *Trypanosoma brucei* na poziomie $IC_{50} = 0,0026-0,15 \mu\text{g/mL}$ przy braku toksyczności przeciwko linii komórkowej MRC-5 (linia komórek fibro-

blastów tkanki płucnej). Podgatunki *Trypanosoma br. gambiense* i *Trypanosoma br. rhodesiense* są odpowiedzialne za śpiączkę afrykańską przenoszoną przez muchy tse-tse [75]. Analogi posiadające podstawnik 3'-spiro są specyficznymi inhibitorami HIV-1 RT. Nie są aktywne wobec innych retrowirusów. Wiążą się z niesubstratowym miejscem enzymu. Aby związek był aktywny musi posiadać w pozycjach 2' i 5' grupę *t*-butylodimetylosililową oraz konfigurację rybozy. Przykładem takiego związku jest TSAO-T (**100**, Rys. 2.9.) [76]. Wprowadzenie podstawnika alkilowego w pozycji N-3 tyminy znacznie obniża cytotoksyczność związku bez szkody dla aktywności.



Rysunek 2.9. Struktura 3'-spironukleozydu TSAO-T
Figure 2.9. Structure of 3'-spironucleoside – TSAO-T

UWAGI KOŃCOWE

Zainteresowanie chemią pochodnych nukleozydów oraz ich aktywnościami biologicznymi nie ustaje. XXI wiek to ciąg dalszy sukcesów tej grupy związków, co widać po wspomnianym odkryciu aktywności immucyliny-A wobec wirusa Ebola, opracowaniu i dopuszczeniu do leczenia sofosbuwiru (pronukleotyd), klofarabiny, azacytydyny, trifluorotymidyny, tenofowiru, telbiwudyny, lamiwudyny czy wprowadzeniu terapii HAART. Przynajmniej 32 pochodne nukleozydowe i pronukleotydy są obecnie w trakcie badań klinicznych, zarówno te znane od lat np. rybawiryna lub kordycepina, jak i zupełnie innowacyjne np. RX-3117 – karbocykliczna pochodna cytydyny lub MB-07133 – nowa pronukleotydydowa pochodna cytarabiny [77]. Trudno przewidzieć, czy pod względem chemicznym można oczekiwać nowych typów modyfikacji nukleozydów, skoro od czasów sir Alexandra Todda otrzymano dziesiątki tysięcy różnych analogów i pomysłowość chemików powoli się wyczerpuje. Poszukiwania będą raczej przypominać proces dochodzenia do struktury klofarabiny na drodze żmudnej pracy tworzenia dziesiątków wariantów i łączenia znanych rozwiązań strukturalnych. Jednak z całą pewnością będą powstawały lepsze metody syntezy – szybsze, tańsze, wydajniejsze, bardziej ekologiczne czy racjonalizujące aspekt technologiczny. Kolejne doniesienia o nowych aktywnościach będą stymulować ten proces. Niewątpliwie w ostatnich dwóch dekadach znaczenia nabrały pronukleotydydowe strategie prolekowe np. wspomniane *cycloSal*, *ProTide* i *SATE*, których celem jest obejście limitujących etapów fosforylacji w komórce przy

zapewnieniu właściwej biodostępności. Reasumując, można oczekiwać kolejnych sukcesów chemii nukleozydów w leczeniu wielu ciężkich chorób wirusowych i nowotworowych.

PODZIĘKOWANIA

Praca została napisana w Zakładzie Chemii Nukleozydów i Nukleotydów IChB PAN w Poznaniu, którego kierownikiem jest prof. Jerzy Boryski, dzięki wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu KNOW oraz ze środków statutowych IChB PAN.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W.A. Creasy, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 1975, **38**, 232.
- [2] G.A. Gentry, J.F. Aswell, *Virology*, 1975, **65**, 1, 294.
- [3] T.W. North, S.S. Cohen, *Pharmacol. Ther.*, 1979, **4**, 81.
- [4] J.A. Montgomery, K. Hewson, *J. Med. Chem.*, 1969, **12**, 498.
- [5] L.B. Allen, H.C. Schröder, H.G. Löbering, A. Maidhof, W.E. Müller, *Chemotherapy*, 1987, **33**, 272.
- [6] T. Ooka, A. Calender, M. De Turenne, J. Daillie, *J. Virol.*, 1983, **46**, 187.
- [7] K.F. Soike, G. Baskin, C. Cantrell, P. Gerone, *Antiviral Res.*, 1984, **4**, 245.
- [8] M. Sarkar, T. Han, V. Damaraju, P. Carpenter, C.E. Cass, R.P. Agarwal, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, **70**, 426.
- [9] W.W. Lee, A. Benitez, L. Goodman, B.R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 2648.
- [10] M. Privat de Garilhe, J. de Rudder, *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **259**, 2725.
- [11] W.M. Shannon, L. Westbrook, F.M. Schabel, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1974, **145**, 542.
- [12] M. Suzuki, T. Okuda, K. Shiraki, *Antiviral Res.*, 2006, **72**, 2, 157.
- [13] L. Li, M.J. Keating, W. Plunkett, L.Y. Yang, *Mol. Pharmacol.*, 1997, **52**, 798.
- [14] D. Wyczechowska, K. Fabianowska-Majewska, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 219.
- [15] G.M. Carbone, C.V. Catapano, D.J. Fernandes, *Biochem. Pharmacol.*, 2001, **1**, 101.
- [16] P. Bojanowski, P.F. Lipiński, P. Czekąła, D. Plewczyński, *Biul. Wyd. Farm. WUM* 2013, **1**, 1.
- [17] T. Robak, A. Korycka, E. Lech-Maranda, P. Robak, *Molecules*, 2009, **14**, 1183.
- [18] L.W. Dow, D.E. Bell, L. Poulakos, A. Fridland, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 1405.
- [19] R.W. Brockman, Y.-C. Cheng, F.M. Schabel, J.A. Montgomery, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 3610.
- [20] M.J. Keating, P. McLaughlin, W. Plunkett, L.E. Robertson, S. O'Brien, *Ann. Oncol.*, 1994, **5**, Sup. 2, S79.
- [21] P.L. Bonate, L. Arthaud, W.R. Jr Cantrell, K. Stephenson, J.A. 3rd Secrist, S. Weitman, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**, 855.
- [22] W.B. Parker, S.C. Shaddix, C.H. Chang, E.L. White, L.M. Rose, R.W. Brockman, A.T. Shortnacy, J.A. Montgomery, J.A. 3rd Secrist, L.L. Jr. Bennett, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 2386.
- [23] K. Lotfi, E. Månsson, T. Spasokoukotskaja, B. Pettersson, J. Liliemark, *Clin. Cancer Res.*, 1999, **5**, 2438.
- [24] S. Nagai, K. Takenaka, D. Nachagari, C. Rose, K. Domoney, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 1781.
- [25] N. Shakya, M.C. Srivastav, N. Desroches, B. Agrawal, D.Y. Kunitomo, R. Kumar, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 4130.
- [26] I. Fourel, J. Li, O. Hantz, C. Jacquet, J.J. Fox, C. Trépo, *J. Med. Virol.*, 1992, **37**, 122.

- [27] R. McKenzie, M.W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, A.M. Di Bisceglie, N. Engl. J. Med., 1995, **333**, 1099.
- [28] W. Lewis, R.R. Meyer, J.F. Simpson, J.M. Colacino, F.W. Perrino, Biochem., 1994, **33**, 14620.
- [29] Y.C. Cheng, G. Dutschman, J.J. Fox, K.A. Watanabe, H. Machida, Antimicrob. Agents Chemother., 1981, **20**, 420.
- [30] J.M. Colacino, C. Lopez, Antimicrob. Agents Chemother., 1983, **24**, 505.
- [31] D.B. Ellis, G.A. LePage, Mol. Pharmacol., 1965, **1**, 231.
- [32] J. Jansons, Y. Maurinsh, M. Lidaks, Nucleosides Nucleotides, 1995, **14**, 1709.
- [33] D. Lavanchy, J. Viral. Hepat., 2004, **11**, 97.
- [34] N.C. Srivastav, N. Shakya, M. Mak, B. Agrawal, D.L. Tyrell, R. Kumar, J. Med. Chem., 2010, **53**, 7156.
- [35] G. Gosselin, M.C. Bergogne, J. De Rudder, E. De Clercq, J.L. Imbach, J. Med. Chem., 1986, **29**, 203.
- [36] T.R. Webb, H. Mitsuya, S. Broder, J. Med. Chem., 1988, **31**, 1475.
- [37] N.C. Srivastav, M. Mak, B. Agrawal, D.L.J. Tyrrell, R. Kumar, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, **20**, 6790.
- [38] E.S.H. El Ashry, Y. El Kilany, Adv. Heterocycl. Chem., 1997, **69**, 129.
- [39] J. Boryski, J. Chem. Soc., Perkin Trans 2, 1997, 649.
- [40] G.B. Elion, P.A. Furman, J.A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, H.J. Schaeffer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1977, **74**, 5716.
- [41] E. De Clercq, J. Neyts, Handb. Exp. Pharmacol., 2009, **189**, 53.
- [42] K.K. Ogilvie, U.O. Cheriyan, B.K. Radatus, K.O. Smith, K.K. Galloway, W.L. Kennell, Can. J. Chem., 1982, **60**, 3005.
- [43] A.K. Field, M.E. Davies, C. DeWitt, H.C. Perry, R. Liou, J. Germershausen, J.D. Karkas, W.T. Ashton, D.B. Johnston, R.L. Tolman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, **80**, 4139.
- [44] D.F. Smee, J.C. Martin, J.P.H. Verheyden, T.R. Matthews, Antimicrob. Agents Chemother., 1983, **23**, 676.
- [45] V.R. Freitas, D.F. Smee, M. Chernow, R. Boehme, T.R. Matthews, Antimicrob. Agents Chemother., 1985, **28**, 240.
- [46] T.A. Krenitsky, W.W. Hall, P. De Miranda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, **81**, 3209.
- [47] E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, A. Holý, Science, 1978, **200**, 563.
- [48] E. De Clercq, *Antiviral agents*, Elsevier, San Diego, 2013.
- [49] L.A. Agrofoglio, S.R. Challand, *Acyclic, Carbocyclic and L-nucleosides*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998.
- [50] R. Borchardt, B. Keller, U. Patel-Thrombe, J. Biol. Chem., 1984, **259**, 4353.
- [51] E. De Clercq, Antimicrob. Agents. Chemother., 1985, **28**, 84.
- [52] S. Shuto, T. Obara, Y. Saito, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, A. Matsuda, J. Med. Chem., 1996, **39**, 2392.
- [53] E. De Clercq, J. Murase, V. Marquez, Biochem. Pharmacol., 1991, **41**, 1821.
- [54] V.E. Marquez, M.I. Lim, S.P. Treanor, J. Plowman, M.A. Priest, A. Markovac, M.S. Khan, B. Kaskar, J.S. Driscoll, J. Med. Chem., 1988, **31**, 1687.
- [55] M. Hasobe, H. Liang, D.B. Ault-Riche, D.R. Borcharding, M.S. Wolfe, R.T. Borchardt, Antivir. Chem. Chemother., 1993, **4**, 245.
- [56] E. De Clercq, Nucleos. Nucleot. Nucl., 2005, **24**, 1395.
- [57] E.W. Dunham, R. Vince, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1986, **238**, 954.
- [58] Y.F. Shealy, C.A. O'Dell, W.M. Shannon, G.J. Arnett, J. Med. Chem., 1984, **27**, 1416.
- [59] W.B. Parker, S.C. Shaddix, P.W. Allan, G. Arnett, L.M. Rose, W.M. Shannon, Y.F. Shealy, J.A. Montgomery, J.A. 3rd Secrist, L.L. Jr. Bennett, Mol. Pharmacol., 1992, **41**, 245.

- [60] A.D. Borthwick, B.E. Kirk, K. Biggadike, A.M. Exall, S. Butt, S.M. Roberts, D.J. Knight, J.A.V. Coates, D.M. Ryan, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 907.
- [61] G.S. Bisacchi, S.T. Chao, C. Bachard, J.P. Daris, S. Innaimo, G.A. Jacobs, O. Kocy, P. Lapointe, A. Martel, Z. Merchant, W.A. Slusarchyk, J.E. Sundeen, M.G. Young, R. Colonna, R. Zahler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 127.
- [62] J. Balzarini, E. De Clercq, H. Baumgartner, E. Bodenteich, H. Griengl, *Mol. Pharmacol.*, 1990, **37**, 395.
- [63] Y. Nishiyama, N. Yamamoto, K. Takahash, N. Shimada, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 1053.
- [64] R. Vince, M. Hua, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 17.
- [65] S.M. Daluge, S.S. Good, M.B. Faletto, W.H. Miller, M.H. St. Clair, L.R. Boone, M. Tisdale, N.R. Parry, J.E. Reardon, R.E. Dornsife, D.R. Averett, T.A. Krenitsky, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, **41**, 1082.
- [66] J.A.V. Coates, N. Cammack, H.J. Jenkinson, I.M. Mutton, B.A. Pearson, R. Storer, J.M. Cameron, C.R. Penn, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 202.
- [67] R.F. Schinazi, A. McMillan, D. Cannon, R. Mathis, R.M. Lloyd, A. Peck, J.P. Sommadossi, M. St Clair, J. Wilson, P.A. Furman, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **26**, 2423.
- [68] C.K. Chu, S. Ahn, H. Kim, J.W. Beach, A.J. Alves, L.S. Jeong, Q. Islam, P. Van Roey, R.F. Schinazi, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 3791.
- [69] G. Gosselin, R.F. Schinazi, J.P. Sommadossi, C. Mathé, M.C. Bergogne, A.M. Aubertin, A. Kirn, J.L. Imbach, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1292.
- [70] C.K. Chu, T. Ma, K. Shanmuganathan, C. Wang, Y. Xiang, S.B. Pai, G.Q. Yao, J.P. Sommadossi, Y.C. Cheng, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, **39**, 979.
- [71] W. Lewis, B.J. Day, W.C. Copeland, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**, 812.
- [72] S. Spadari, G. Maga, F. Fochoer, G. Ciarrocchi, R. Manservigi, F. Arcamone, M. Capobianco, A. Carcuro, F. Colonna, A. Garbesi, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 4214.
- [73] M.L. Bryant, E.G. Bridges, L. Placidi, A. Faraj, A.G. Loi, C. Pierra, D. Dukhan, G. Gosselin, J.L. Imbach, B. Hernandez, A. Juodawlkis, B. Tennant, B. Korba, P. Cote, P. Marion, E. Cretton-Scott, R.F. Schinazi, J.P. Sommadossi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 229.
- [74] D. Gotlieb, P.D. Shaw, *Antibiotics I Mechanism of Action*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg GmbH, 1967.
- [75] M. Niitsuma, J. Hashida, M. Iwatsuki, M. Mori, A. Ishiyama, M. Namatame, A. Nishihara-Tsukashima, A. Matsumoto, Y. Takahashi, H. Yamada, K. Otoguro, K. Shiomi, S. Omura, *J. Antibiot.*, 2010, **63**, 673.
- [76] S. Velazquez, A. San-Felix, M.J. Perez-Perez, J. Balzarini, E. De Clercq, M.J. Camarasa, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 3230.
- [77] J. Shelton, X. Lu, J.A. Hollenbaugh, J.H. Cho, F. Amblard, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 14379.

INFORMACJE

PODZIĘKOWANIA ZA WSPARCIE FINANSOWE UDZIELONE „WIADOMOŚCIĄ CHEMICZNYM” W ROKU 2017

Komitet Redakcyjny „Wiadomości Chemicznych” składa najserdeczniejsze słowa podziękowania Rektorowi Uniwersytetu Wrocławskiego, Adamowi Jezierskiemu za wsparcie finansowe udzielone w roku 2017.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

PATRONAT MEDIALNY PUBLIKACJI KSIĄŻKOWYCH
WYDAWNICTWA NAUKOWEGO PWN SA

„Wiadomości Chemiczne” objęły patronatem medialnym ostatnie publikacje książkowe Wydawnictwa Naukowego PWN SA, które mogą być niezwykle interesujące i przydatne dla społeczności polskich chemików:

Arthur Israel-Vogel

Preparatyka organiczna

(z ang. przełożyli: Maria Bukowska, Daniela Buza, Ewa Kołaczkowska, Mariola Koszytkowska-Stawińska, Hanna Krawczyk, Tadeusz Mizerski, Magdalena Popławska, Przemysław Szczeciński)

Renata Jastrząb, Romualda Bregier-Jarzębowskiej, Małgorzata T. Kaczmarek,
Martyny Nowak

Zbiór zadań z podstaw chemii

Grzegorz Wielgosiński, Roman Zarzycki

Technologie i procesy ochrony powietrza

Maria Cieślak-Golonka, Jan Starosta, Anna Trzeciak

Chemia koordynacyjna w zastosowaniach

Wiktor Kubiński

Wybrane metody badania materiałów. Badanie metali i stopów

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek

Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki

Zdzisław Migaszewski, Agnieszka Gałuszka

Geochemia środowiska

Robert J. Whitehurst, Marten Van Oort

Enzymy w technologii spożywczej

Jan F. Rabek

Współczesna wiedza o polimerach. Tom 1. Budowa strukturalna polimerów i metody badawcze

Jan F. Rabek

Współczesna wiedza o polimerach. Tom 2. Polimery naturalne i syntetyczne, otrzymywanie i zastosowania

Praca zbiorowa pod redakcją Anny Swiderskiej-Środy, Witolda Wojkowskiego,
Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego

Świat nanocząstek

Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej
Nanotechnologia w praktyce

Gottfried W. Ehrenstein, Żaneta Brocka-Krzemińska
Materiały polimerowe. Struktura, właściwości, zastosowanie

Witold M. Lewandowski, Robert Aranowski
Technologie ochrony środowiska w przemyśle i energetyce

Praca zbiorowa pod redakcją Zdzisława E. Sikorskiego i H. Staroszczyk
Chemia żywności t.1 Składniki żywności oraz t.2 Biologiczne właściwości składników żywności

John McMurry, z ang. tłumaczyli Henryk Koroniak, Jakub Grajewski,
Katarzyna Koroniak-Szejn, Jan Milecki
Chemia organiczna (tom 1-5)

Takemura Masaharu
Mangowy przewodnik. Biochemia

Schmidt-Szałowski Krzysztof, Krawczyk Krzysztof, Petryk Jan, Sentek Jan
Obliczenia technologiczne w przemyśle chemicznym

Andrzej Żarczyński
Emisje organicznych związków chloru. Źródła, oddziaływanie na środowisko i przeciwdziałanie

Inżynieria metali i ich stopów. Wyd. 2 zm (I w PWN) praca zbiorowa

Ochrona środowiska dla inżynierów, praca zbiorowa

Zygryd Witkiewicz, Waldemar Wardencki
Chromatografia gazowa Wyd. 3 (I w PWN)

Wirusologia
red. nauk. Anna Goździcka-Józefiak

Lubert Stryer
Biochemia Wyd. 5

Witold M. Lewandowski, Robert Aranowski
Technologie ochrony środowiska w przemyśle i energetyce

Praca zbiorowa pod redakcją Zdzisława E. Sikorskiego i H. Staroszczyk
Chemia żywności

t. 1 *Składniki żywności oraz*

t. 2 *Biologiczne właściwości składników żywności*

John McMurry, z ang. tłumaczyli Henryk Koroniak, Jakub Grajewski, Katarzyna Koroniak-Szejn, Jan Milecki
Chemia organiczna (tom 1-5)

W najbliższych numerach czasopisma „Wiadomości Chemiczne” ukażą się recenzje następujących książek objętych planem wydawniczym PWN na rok 2018

Takemura Masaharu
Mangowy przewodnik. Biochemia

Krzysztof Schmidt-Szałowski, Krzysztof Krawczyk, Jan Petryk, Jan Sentek
Obliczenia technologiczne w przemyśle chemicznym

Andrzej Żarczyński
Emisje organicznych związków chloru. Źródła, oddziaływanie na środowisko i przeciwdziałanie

Praca zbiorowa
Inżynieria metali i ich stopów. Wyd. 2 zm. (I w PWN)

Praca zbiorowa
Ochrona środowiska dla inżynierów

Zygfried Witkiewicz, Waldemar Wardencki
Chromatografia gazowa. Wyd. 3 (I w PWN)

red. nauk. Anna Goździcka-Józefiak
Wirusologia

Lubert Stryer
Biochemia. Wyd. 5

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 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 zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduali 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

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 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: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również **za strony drukowane w kolorze** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

- **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),

- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**
- **Tabele, rysunki, fotografie**
Tabele i rysunki **powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście** oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczotki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.
Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).
Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, **każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.**
- **Piśmiennictwo cytowane**
Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.
W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.
[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.
[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.
W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.
[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.
[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999
W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.
[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkował **czarno-białym wydrukiem wersji papierowej**. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przysłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Damian JĘDRZEJOWSKI: Sieci metalo-organiczne jako multifunkcjonalne materiały przyszłości – mechanochemiczne podejście do syntezy	645
Klaudia KAŁWA, Artur MAZUREK: Metody oznaczania barwników spożywczych	667
Szymon BOCIAN, Katarzyna KRZEMIŃSKA: Fazy stacjonarne do chromatografii cieczowej z wbudowanymi grupami polarnymi – synteza i właściwości powierzchniowe	685
Katarzyna MISZCZAK: Chemia bioortogonalna – nowa perspektywa dla chemii organicznej	703
Marcin KŁOSKE: Nowiczok(i) i substancje A	724
Maurycy SZLENKIER: Aktywność biologiczna modyfikowanych nukleozydów. Część III	768
Informacje	789

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Nikoła FAJKIS, Marcin KOŁACZKOWSKI, Monika MARCINKOWSKA: Strategia repozycjonowania, czyli nowe zastosowanie dla starych leków
- Agnieszka PIOTROWSKA-KIRSCHLING, Joanna DRZEŹDŻON, Lech CHMURZYŃSKI, Dagmara JACEWICZ: Wybrane właściwości fizykochemiczne polikarboksylianowych związków kompleksowych kobaltu(II), niklu(II), miedzi(II) i oksowanadu(IV)
- Adrian Krzysztof ANTOSIK: Wpływ montmorylonitu na właściwości reologiczne wodnych dyspersji karboksymetyloskrobi



ALWAYS CURIOUS

IMAGINE THE NEXT 350 YEARS

Ciekawość mamy w genach. Od 1668 r. daje nam ona pewność i optymizm do poznawania niezgłębionych obszarów nauki i technologii. Patrząc w przyszłość potrafimy sobie wyobrazić co przyniesie kolejne 350 lat.

A Ty?

Odwiedź nas na:

MERCK.pl

MERCKgroup.com

sigmaaldrich.com

MERCK