

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Wydział Chemii



# NAUKA I PRZEMYSŁ

## lubelskie spotkania studenckie



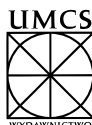
WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

**Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**  
**Wydział Chemii**

# **NAUKA I PRZEMYSŁ**

## **lubelskie spotkania studenckie**

**Praca zbiorowa**  
**pod redakcją prof. dr hab. Doroty Kołodyńskiej**



**WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ**  
**LUBLIN 2021**

**Recenzenci:**

Dr hab. n. farm. Agnieszka Kaczor (prof. UM)  
Dr hab. Renata Jastrząb (prof. UAM)  
Dr hab. Renata Świsłocka (prof. PB)  
Dr hab. n. chem. Emilia Fornal (prof. UM)  
Dr hab. inż. Agata Jakóbiak-Kolon (prof. PŚ)  
Dr hab. Monika Kalinowska (prof. PB)  
Dr hab. n. farm. Barbara Budzyńska (prof. UM)  
Dr hab. n. farm. Monika Pitucha (prof. UM)  
Dr hab. Łukasz Popiołek  
Dr hab. Łukasz Kłapiszewski (prof. PP)  
Dr hab. Anna Sroka-Bartnicka

**Opracowanie redakcyjne i skład:**

Dr hab. Agnieszka Gładysz-Płaska

Wydrukowano z materiałów powierzonych przez Autorów,  
bez opracowania redakcyjnego wykonanego  
przez Wydawnictwo UMCS.

© Wydawnictwo UMCS, Lublin 2021

ISBN 978-83-227-9503-3

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
20-031 Lublin, ul. Idziego Radziszewskiego 11  
tel. 81 537 53 04  
www.wydawnictwo.umcs.eu  
e-mail: sekretariat@wydawnictwo.umcs.lublin.pl

DZIAŁ HANDLOWY  
tel./fax 81 537 53 02, 81 537 53 03  
e-mail: wydawnictwo@umcs.eu  
Księgarnia internetowa: www.wydawnictwo.umcs.eu

Drukarnia: Mazowieckie Centrum Poligrafii Wojciech Hunkiewicz  
ul. Lisi Jar 29, 05-270 Marki

*Szanowni Państwo,  
Drodzy Studenci i Doktoranci,*

Oddajemy w Państwa ręce kolejną już monografię z cyklu „Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie”. Ponownie jak w ubiegłych latach jej celem jest przedstawienie najnowszych osiągnięć naukowych, badawczych i technicznych związanych z ochroną środowiska, medycyną, farmacją i biochemią, chemią kosmetyczną, przemysłem chemicznym oraz chemią rolną. Tematy te są istotne z uwagi na ciągły postęp technologiczny i wprowadzenie nowych rozwiązań w wielu dziedzinach naszego życia.

Wyrażam nadzieję, że będziecie Państwo zadowoleni zarówno z zakresu zagadnień merytorycznych, będących przedmiotem prezentacji i dyskusji, jak również z ich poziomu naukowego. Dobrze zainwestowany czas, wykorzystany na poszerzenie wiedzy to pierwszy krok w kierunku wspólnych dyskusji, nawiązania i zacieśnienia wzajemnej współpracy, co jest bardzo istotne dla nas wszystkich.

Życzę owocnej lektury,

Dorota Kołodyńska





## SPIS TREŚCI

### **R. Sobkiewicz**

Metody immobilizacji enzymów w bioczynnikach elektrochemicznych . . . . . 11

### **S. Garg, A. Swatek, A. Choma, I. Komaniecka**

Analiza właściwości fenotypowych mutantu *Agrobacterium tumefaciens* defektywnego w genie *adhA2XL* w szlaku syntezy VLCFA . . . . . 15

### **A. Pomarańska, J. Kutkowska, A. Pastuszka**

Wpływ wybranych olejków eterycznych na wzrost *E. coli* oraz *S. aureus* . . . . . 19

### **M. Kurzylewska, M. Laban, K. Dworaczek, A. Turska-Szewczuk**

Serotypowanie molekularne jako potencjalne narzędzie w typowaniu bakterii z rodzaju *Aeromonas* . . . . . 23

### **O. Wronikowska, M. Zykubek, Ł. Kurach**

Badania toksyczności *in vitro* - fałszywie dodatnie wyniki testów żywotności komórek na przykładzie mefedronu . . . . . 27

### **K. Lejwoda**

Fototoksyczność leków w badaniach przedklinicznych *in vitro* . . . . . 31

### **M. Maciąg, O. Wronikowska, A. Archala, B. Budzyńska**

Rola modelu *Danio rerio* w badaniach nad schorzeniami ośrodkowego układu nerwowego . . . . . 35

### **A. Borzęcki, P. Kozyra, M. Pitucha**

Badania struktury pochodnych 1,2,4-triazolin-5-tionu w kontekście inhibitorów kinazy tyrozynowej CK1 $\gamma$  . . . . . 39

### **A. Skrok, K. Wlizo, R. Paduch, M. Siwulski, K. Próchniak, A. Wiater**

Ocena aktywności antyoksydacyjnej wodnych frakcji izolowanych z owocników borowika szlachetnego, kozłarza czerwonego, maślaka sitarza oraz podgrzybka brunatnego . . . . . 43

### **O. Koszła, P. Sępnicki, P. Solek, A. Archala, A. Zięba, A.A. Kaczor**

Białka opiekuńcze i ich mechanizm molekularny zaangażowany w funkcje neuroprotektcyjne . . . . . 47

### **P. Sępnicki, O. Koszła, A. Archala, A. Zięba, A.A. Kaczor**

Właściwości strukturalne i farmakologiczne nowych związków o działaniu przeciwpyszotycznym . . . . . 50

**M. Kutyla, M. Trytek**

Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jako wydajny biokatalizator syntezy estrów terpenowych ..... 54

**A. Zięba, P. Stępnicki, O. Koszła, D. Matosiuk, A.A. Kaczor**

Znaczenie inhibicji FAAH w terapii wybranych jednostek chorobowych ..... 58

**W. Piątek, J. Sulej, M. Osńska-Jaroszuk, S. Stefanek**

Biosynteza kwasu laktobionowego: techniki, zastosowanie i perspektywy na przyszłość ..... 62

**G. Juszczyk, Ł. Popiołek**

Aktywność biologiczna pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu ..... 66

**K. Stachowiak, R. Jastrząb**

Badanie reakcji kompleksowania w układzie jony miedzi(ii), urydyna, kwas glukuronowy ..... 70

**J. Frymark, M. Zabizak, R. Jastrząb**

Termodynamiczne i spektroskopowe badania związków kompleksowych kwasu jabłkowego z jonami metali w układach podwójnych ..... 74

**M. Gabryel-Skrodzka, M. Nowak, M. Zabizak, R. Jastrząb**

Reakcje kompleksowania cytydyny z fosfoetyloaminą i jonami miedzi(II) ..... 78

**M. Parcheta, R. Świsłocka**

Badania spektroskopowe i teoretyczne kwasu migdałowego i jego kompleksów z kobaltem i miedzią ..... 82

**D. Vlasyuk, R. Łyszczek, A. Jusza, R. Piramidowicz**

Luminescencyjne właściwości polimeru koordynacyjnego Dy(III) z kwasem 1h-pirazolo-3,5-dikarboksylovym ..... 89

**M. Groszek, R. Łyszczek**

Polimery koordynacyjne na bazie jonów cyrkonu(IV) i wybranych jonów lantanowców(III) ..... 93

**E. Gołębiewska, M. Wyrwas, M. Kalinowska**

Zastosowanie ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami oraz ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w celu izolacji związków o aktywności antyoksydacyjnej z wycieków z jabłek ..... 97

**K. Gryko, M. Zawadzka, M. Kalinowska**

Wpływ procesu fermentacji na wydajność ekstrakcji związków fenolowych z odpadów z przemysłu rolno-spożywczego ..... 102

**M. Adamczyk, M. Grabarczyk**

Procedura oznaczania śladowych ilości indu i tytanu metodą woltamperometrii strippingowej z wykorzystaniem stałej elektrody filmowej . . . . . 107

**M. Grzesiak, P. Mergo**

Szerokopasmowe światłowodowe źródła światła dla zastosowań spektroskopowych . . . . . 111

**J. Kozak, K. Tyszczyk-Rotko**

Czujniki sitodrukowane w jednoczesnej analizie paracetamolu, diklofenaku i tramadolu . . . . . 115

**M. Jędrak, G. Kalisz, J. Matys, I. Stefanowicz-Pięta, A. Sroka-Bartnicka**

Zastosowanie metod fizykochemicznych w analizie materiałów na bazie bioceramiki . . . . . 119

**K. Suśniak, I. Komaniecka, A. Pastuszka, A. Choma**

Zastosowanie techniki MALDI MSI do analizy tkanki kalusa uformowanego na łodydze pomidora pod wpływem infekcji *Agrobacterium tumefaciens* . . . . . 122

**D. Straszak, K. Wojciechowska, P. Głaz, D. Matosiuk**

Znaczenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w badaniach lipofilowości . . 125

**K. Pietrzak, C. Wardak, Sz. Malinowski, N. Krstulović**

Zastosowanie elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej do badania mechanizmu działania nanocząstek tlenków metali w elektrodach jonoselektywnych . . . . . 129

**A. Kozub, A. Stachniuk, A. Sumara, E. Fornal**

Zastosowanie LC-QTOF w profilowaniu lipidomicznym olei roślinnych . . . . . 133

**M. Martyna**

Zastosowanie elektrody z cyklicznie odnawialnego filmu ciekłego amalgamatu srebra (R-AgLAFE) do badania kinetyki i mechanizmu elektroredukcji jonów Bi(III) w obecności 2-tiocytozyny w roztworach o zmiennej aktywności wody . . . . . 137

**A. Krzyszczak, B. Czech**

Możliwości i wyzwania w oznaczaniu pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach środowiskowych . . . . . 141

**M. Krysa, M. Jędrak, J. Matys, D. Kidaj, A. Sroka-Bartnicka**

Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni w ocenie metabolitów roślinnych . . . . 145

<b>A. Sumara, A. Stachniuk, A. Kozub, A. Trzpił, E. Fornal</b> Zastosowanie LC- QTOF- MS w detekcji zafałszowań nierafinowanych, tłoczonych na zimno olejów roślinnych o znaczeniu farmaceutycznym . . . . .	149
<b>G. Kalisz, M. Jędrzek, B. Gieroba, A. Sroka-Bartnicka</b> Analiza spektroskopowa kurdłanu ( $\beta$ -1,3-d-glukanu) . . . . .	153
<b>A. Wesołowska, A. Pastuszka, J. Kutkowska</b> Oznaczanie związków bioaktywnych w oparciu o technikę chromatografii płynem nadkrytycznym . . . . .	157
<b>R. Olchowski, R. Dobrowolski</b> Technika GF AAS jako narzędzie do identyfikacji i charakterystyki nanocząstek metali w próbkach biologicznych i środowiskowych . . . . .	161
<b>H. Nikolaichuk, I.M. Choma</b> Detekcja właściwości bioaktywnych <i>Clitoria ternatea L.</i> za pomocą bioautografii bezpośredniej . . . . .	165
<b>S. Stefanek, W. Piątek, A. Pastuszka, J. Kutkowska</b> Wykorzystanie technik chromatografii w analizie flawonoidów . . . . .	169
<b>M. Medykowska, M. Wiśniewska, K. Szewczuk-Karpisz, R. Panek</b> Wpływ jonów metali ciężkich na strukturę podwójnej warstwy elektrycznej zeolitu NaX i jego kompozytu z węglem NaX-C . . . . .	173
<b>J. Bok-Badura, A. Jakóbiak-Kolon</b> Właściwości fizyczne oraz stabilność hybrydowych sorbentów do usuwania jonów cezu . . . . .	178
J. Bednarczyk, K. Fila, B. Podkościelna Synteza polimerowych mikrosfer z dodatkiem metakrylowej pochodnej tionaftalenu . . . . .	183
<b>K. Młynarczyk, B. Podkościelna</b> Synteza i badania kompozytów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych . . . . .	188
<b>K. Wnuczek, B. Podkościelna, A. Puszka</b> Badanie termiczne polimerowych blend opartych na bisfenolu-A i MMA . . . . .	192
<b>M. Gargol, B. Podkościelna</b> Analiza właściwości mechanicznych blend polimerowych domieszkowanych wybrany polimerem siarkowym . . . . .	196

<b>K. Sowa, B. Podkościelna</b> Synteza kompozytów polimerowych z dodatkiem skrobi .....	200
<b>E. Godek, E. Grządka</b> Wpływ A-Si na stabilność wodnych suspensji montmorylonitu i kationowej celulozy .....	204
<b>J. Krzeszowiak, A. Puszka</b> Zastosowanie poekstrakcyjnego suszu konopnego ( <i>Cannabis sativa</i> ) do otrzymywania kompozytów polimerów termoplastycznych .....	208
<b>A. Biedrzycka, E. Broda, E. Skwarek</b> Zastosowanie hydroksyapatytu z wybranymi podstawionymi kationami z bloków energetycznych s, p, d i f układu okresowego – krótki przegląd .....	213
<b>K. Kucio, B. Charmas</b> Preparatyka i charakterystyka nanokompozytów stosowanych do degradacji zanieczyszczeń organicznych .....	217
<b>M. Zięzio, B. Charmas, M. Raczkiewicz</b> Wpływ atmosfery procesu pirolizy na kreowanie struktury porowatej węgli aktywnych .....	221
<b>B. Charmas, M. Raczkiewicz, M. Zięzio</b> Badanie chemii powierzchni węgli aktywnych z szyszek świerku ( <i>Picea abies</i> ) metodą miareczkowania potencjometrycznego .....	225
<b>M. Gęca, M. Wiśniewska, P. Nowicki</b> Badanie właściwości adsorpcyjnych biowęgli aktywnych w układzie mieszanych adsorbatów: Pb(II), PAA, Triton X-100 .....	229
<b>A. Tomczyk, K. Szewczuk-Karpisz, Z. Sokółowska</b> Biowęgiel modyfikowany kwasem askorbinowym jako efektywny adsorbent tetracykliny .....	234
<b>J. Iwan, A. Gładysz-Płaska, Z. Hubicki, M. Kutyla, M. Trytek</b> Zastosowanie biosorbentu i żywicy jonowymiennej do usuwania jonów toru. ....	238
<b>A. Wołowicz, G. Giza</b> Adsorpcja jako efektywna metoda usuwania zanieczyszczeń .....	243
<b>K. Grąż, E. Grabias</b> Nanocząstki w kosmetykach jako potencjalne źródło zagrożeń dla człowieka i środowiska .....	248

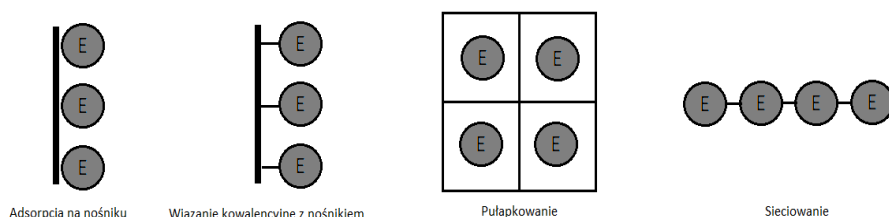
<b>K. Wojciechowska, P. Głaz, D. Straszak, A. Rosińska</b> Zastosowanie chlorofilu w kosmetologii . . . . .	252
<b>D. Pietrasik, K. Rubinowska</b> Spirulina - właściwości i wykorzystanie w kosmetologii . . . . .	256
<b>K. Wójcik, A. Pastuszka, J. Kutkowska</b> Techniki ekstrakcji surowców roślinnych wykorzystywanych w kosmetologii . . . . .	262
<b>K. Kowalska, E. Skwarek, J. Orzel</b> Tatuaż, tusze i igły . . . . .	266
<b>P. Głaz, D. Straszak, K. Wojciechowska, M. Pawlicka, M. Kołodziejczyk</b> Mechanizmy wzrostu włosa oraz substancje aktywne zawarte w produktach kosmetycznych służące do jego stymulacji . . . . .	270
<b>A. Wasilewska</b> Biotesty – narzędzie do szybkiego badania toksyczności próbek środowiskowych . . . . .	273
<b>M. Tchórzewska, W. Płaska</b> Charakterystyka właściwości fizycznych i chemicznych wody wybranych zbiorników śródpolnych płaskowyżu świdnickiego i kotliny zamojskiej . . . . .	277
<b>M. Kołodziejczyk, A. Bogucka-Kocka, M. Pawlicka, P. Głaz</b> Demodekoza - prawdziwe oblicze nużeńców . . . . .	281
<b>M. Pawlicka, A. Filip, M. Kołodziejczyk, P. Głaz</b> Rola witaminy D3 w procesie gojenia ran pooperacyjnych u kobiet po mastektomii . . . . .	284
<b>A. Archala, O. Koszła, M. Maciąg, P. Stępnicki</b> Terapeutyczna rola kurkuminy . . . . .	288
<b>A. Wołowicz, A. Świstowska</b> Metale ciężkie w kosmetykach kolorowych . . . . .	291
<b>A. Grudzińska, A. Pawlak, T. Wróbel</b> Psychodeliki jako przyszłość farmakoterapii w leczeniu zaburzeń psychicznych . . . . .	295
<b>A. Pawlak, A. Grudzińska, A.A. Kaczor</b> Neuroleptyki atypowe w leczeniu schizofrenii – przegląd literatury . . . . .	299

## METODY IMMOBILIZACJI ENZYMÓW W BIOCZUJNIKACH ELEKTROCHEMICZNYCH

**R. SOBKIEWICZ**, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej,  
Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Biosensory elektrochemiczne są coraz powszechniej stosowane do przeprowadzania szybkich analiz analitycznych. Wśród nich przeważają te, w których warstwą receptorową jest immobilizowany enzym. Aby skutecznie osadzić enzym na nośniku i uzyskać czujnik o odpowiednich parametrach analitycznych należy zastosować odpowiednią metodę immobilizacji, pozwalającą na unieruchomienie enzymu na podłożu przy jednoczesnym zachowaniu jego aktywności katalitycznej. W pracy przedstawiono najczęściej wykorzystywane metody takie jak tworzenie wiązań kowalencyjnych między nośnikiem i enzymem, adsorpcja na nośniku, pułapkowanie enzymu i sieciowanie. Metody te w różny sposób modyfikuje się, aby poprawić właściwości bioczuJNIKA lub usprawnić jego produkcję. Jedną z takich modyfikacji jest wykorzystanie zimnej plazmy do otrzymywania warstw receptorowych enzymu.

**Wprowadzenie:** W dynamicznie rozwijających się branżach związanych z medycyną, ochroną środowiska i przemysłem, korzysta się z różnych metod analitycznych opartych na technikach chromatograficznych czy spektrofotometrycznych, które wymagają zastosowania kosztownej aparatury oraz czasochłonnych analiz [1]. Dążenie do opracowania szybszych i łatwiejszych metod analitycznych przyczyniło się do rozwoju m.in. bioczuJNIKÓW elektrochemicznych – urządzeń wykorzystujących reakcje biochemiczne katalizowane przez wyizolowane enzymy, organelle lub całe komórki, do detekcji związków chemicznych na drodze sygnałów elektrycznych. Najpowszechniejsze zastosowanie mają bioczuJNIKI z immobilizowanym enzymem [2]. Poprzez immobilizację enzymu, uzyskuje się lepszą stabilność działania i tolerancję na wyższe temperatury, często kosztem mniejszej aktywności katalitycznej [3]. Opracowano wiele skutecznych metod immobilizacji. Naukowcy stale poddają je pewnym modyfikacjom, aby osiągać jak najlepsze parametry analityczne.



**Rys. 1.** Główne metody immobilizacji enzymu na bioczuJNIKACH.

Tworzenie wiązań kowalencyjnych z nośnikiem jest jedną z najczęstszych metod służąca do unieruchamiania enzymów. Ze względu na stabilny charakter wiązań, stosowana jest w przypadkach, gdy nie można dopuścić do jego uwolnienia do



badanej próbki [4]. Osadzenie enzymu jest nieodwracalne, nie ma możliwości jego eliminacji, w celu ponownego wykorzystania nośnika. Technika ta polega na wytworzeniu wiązań kowalencyjnych między grupami funkcyjnymi nośnika i enzymu. Stosowanymi nośnikami są np. materiały węglowe, złoto lub matryce polimerowe [5]. Przed immobilizacją konieczna jest aktywacja nośnika poprzez dodanie reaktywnych grup funkcyjnych na powierzchnię matrycy lub modyfikacja struktury polimeru, prowadząca do ich utworzenia [4]. W przypadku nośnika takimi grupami mogą być: grupy aminowe, hydroksylowe, karboksylowe, winylosulfonowe, winyloketonowe, oksiranowe, aldehydowe, halogenkowe, tiolowe oraz imidoestrowe. Tworzą one wiązanie kowalencyjne z ugrupowaniami białka, takimi jak: tiolowe cysteiny, fenolowe tyrozyny, imidazolowe histydyny i aminowe lizyny [6]. Negatywnym aspektem metody jest spadek poziomu aktywności enzymu, przez możliwość tworzenia się wiązań między nośnikiem a grupami reszt aminokwasowych, odpowiedzialnych za aktywność katalityczną oraz przez drastyczne warunki, w jakich przebiega reakcja, co powoduje zmiany konformacyjne i częściową denaturację.

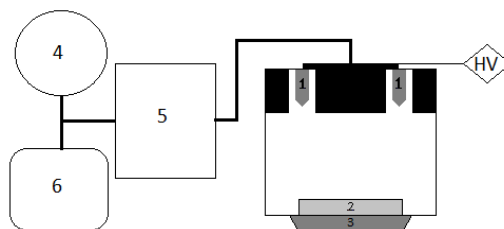
Adsorpcja na nośniku jest to metoda stosunkowo tania i prosta. W przeciwieństwie do poprzedniej techniki opiera się na tworzeniu słabych oddziaływań fizycznych między nośnikiem i immobilizowanym białkiem [7]. Mogą to być siły Van Der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe, wiązania solne lub wiązania jonowe [4]. Niewymagane jest stosowanie reaktywnych odczynników, immobilizacja przebiega w łagodnych warunkach, dzięki czemu nie zachodzą niepożądane zmiany strukturalne w enzymie, prowadzące do znacznego obniżenia jego aktywności katalitycznej [3]. Przyłączenie do matrycy nie jest trwałe, można usunąć enzym z nośnika, wpływając na siłę oddziaływania (poprzez zmianę pH, siły jonowej, temperatury, polarność rozpuszczalnika) [4], dzięki czemu można odzyskać nośnik do ponownego zastosowania. Wspomniana słaba siła wiązań między nośnikiem a białkiem, skutkuje uwalnianiem się enzymu z matrycy bioczuJNIKA do próbki, a także spadek czułości w wyniku stopniowej utraty warstwy receptorowej.

Immobilizacja poprzez uwieszenie enzymu, w przypadku tej techniki, enzym nie jest fizycznie lub chemicznie związany z nośnikiem. Opiera się na okluzji biokatalizatora w stałym materiale, np. w żelu lub usieciowanym polimerze [5, 7]. Enzym zawieszony jest w roztworze monomeru, a następnie inicjuje się proces polimeryzacji, prowadzący do uwieszenia enzymu w strukturze nowopowstałego polimeru na nośniku [7]. Nie następują żadne zmiany w pierwotnej budowie enzymu, jest on odseparowany od otoczenia. Warstwa polimeru jest przepuszczalna tylko dla odpowiednio małych reagentów, dzięki temu biosensor ma lepszą selektywność, a enzym chroniony jest przed zanieczyszczeniami i drobnoustrojami [3]. Produkty powstałe w wyniku katalitycznej reakcji są usuwane z obszaru struktury bioczuJNIKA do badanego roztworu.

Sieciowanie polega na tworzeniu z białek nierozpuszczalnych agregatów wielkocząsteczkowych w roztworach wodnych. Sieciowanie może przebiegać bezpośrednio, poprzez łączenie się cząsteczek białka ze sobą lub za pośrednictwem czynnika sieciującego (np. aldehyd glutarowy) [6]. Innym wariantem metody jest sieciowanie kryształów enzymu (CLEC). Polega na kontrolowanej krystalizacji enzymu, a następnie na tworzeniu agregatu z wykorzystaniem czynnika sieciującego [8]. W porównaniu do tradycyjnego sieciowania CLEC zapewnia większą

odporność chemiczną i mechaniczną, jest to spowodowane tym, że wiązania tworzą stabilną strukturę trójwymiarową, a nie dwuwymiarową – kryształ działa jak matryca. Białko w kryształach jest równomiernie rozłożone, zaś brak interakcji między enzymem a nośnikiem, skutkuje poprawą aktywności enzymu, co przekłada się na dobre parametry analityczne skonstruowanego bioczuJNIKA [8].

Usieciowanie z wykorzystaniem zimnej plazmy jest to skuteczna modyfikacja metody sieciowania polegająca na immobilizacji enzymów w bioczuJNIKACH techniką SPP (*Soft Plasma Polymerization*). Jest to stosunkowo nowa technika, oparta na wykorzystaniu zimnej plazmy nierównowagowej (niskotemperaturowej). Plazma, zwana czwartym stanem skupienia materii, jest zjonizowanym gazem, w skład którego wchodzi elektrony, jony dodatnie, niezjonizowane cząstki obojętne, a także jony ujemne, wolne rodniki, fotony oraz cząstki wzbudzone [9]. Powstaje wskutek doprowadzenia do gazu dostatecznie wysokiej ilości energii, która doprowadza do dysocjacji cząsteczek na elektrony i dodatnio naładowane jony. Wykorzystywana w metodzie niskotemperaturowa plazma nierównowagowa cechuje się tym, że nie jest w pełni zjonizowana, elektrony są obdarzone energią znacznie przewyższającą energię jonów i cząstek niezjonizowanych, a jej temperatura wynosi poniżej 30000 K [9, 10]. Plazma otrzymywana jest pod ciśnieniem atmosferycznym w układzie przedstawionym na rys. 2. Wokół ostro zakończonych elektrod wolframowych, pod wpływem nierównomiernego pola elektrycznego, generowane jest wyładowanie koronowe, które jonizuje cząsteczki gazu nośnego (np. hel, argon) [11]. Wytworzona tak plazma ma postać płomienia o temperaturze nieprzekraczającej 40°C [2], co pozwala na wprowadzenie do niej form biologicznych, bez zniszczenia ich struktury, do którego doprowadziłaby wyższa temperatura.



**Rys.2.** Schemat układu do aplikacji warstwy receptorowej enzymu: 1 – elektrody wolframowe, 2 – nośnik, 3 – uziemienie, 4 – roztwór enzymu, 5 – atomizer, 6 – gaz nośny.

W wyniku zetknięcia się enzymu z formami aktywnymi plazmy (np. elektronami), inicjuje się reakcja polimeryzacji, a następnie jego osadzanie na nośniku (np. węgla szklistym) [10]. Nie tylko nośnik i enzym mają wpływ na parametry skonstruowanego bioczuJNIKA, lecz także warunki, w jakich przeprowadzana jest polimeryzacja w zimnej plazmie. Wartość użytego do generowania wyładowania koronowego oraz prędkość przepływu gazu nośnego mają wpływ na aktywność biologiczną enzymu, a także stopień polimeryzacji i sieciowania, co przekłada się na czułość i czas życia czujnika [11]. Konieczne jest dobranie optymalnych warunków procesu, zależnie od charakterystyki osadzanego enzymu, aby uzyskać biosensor o dobrych parametrach analitycznych. Wykonane w ten sposób czujniki posiadają

zalety bioczuJNIKÓW immobilizowanych metodą usieciowania wykonywanych bardziej czasochłonną metodą „mokrą”, lecz czas ich wykonania został skrócony nawet do kilku minut [10], co pozwala na tańszą i prostszą produkcję.

**Wnioski:** Do konstrukcji bioczuJNIKÓW elektrochemicznych wykorzystujących enzym jako warstwę receptorową, stosuje się wiele różnych metod immobilizacji, które pozwalają na nadanie pożądaných funkcji bioczuJNIKOWI w zależności od właściwości wybranego enzymu i od przeznaczenia biosensora. Wśród opisanych metod korzystnie przedstawia się technika SPP, która jest szybką i przyjazną dla środowiska metodą pozwalającą na efektywne unieruchomienie enzymu przy zachowanie w dużym stopniu jego aktywności katalitycznej.

### **Literatura:**

1. R. Rawal, S. Chawla, P. Malik, C.S. Pundir, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2012) 175.
2. C. Wardak, B. Paczosa-Bator, Sz. Malinowski, *Materials Science & Engineering C*, (2020) 1.
3. Nisha S., Arun Karthick S., Gobi N., *Chemical Science Review and Letters*. (2012) 148.
4. B. M. Brena, F. Batista-Viera, *A Literature Survey*, (2006) 15-30.
5. M. Diaconu, S. C. Litescu, G. L. Radu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2010) 800.
6. K. Tarnowska, E. Gruczyńska, B. Kowalski, *Postępy techniki przetwórstwa spożywczego*, (2008) 72.
7. M. Fernández-Fernández, M. Á. Sanromán, D. Moldes, *Biotechnology Advances*, (2013) 1808.
8. J. Roy, T. E. Abraham, K.S Abhijith, P.V Sujith Kumar, M.S Thakur, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2005) 206.
9. K. Skryplonek, *Inżynieria Przetwórstwa Spożywczego*, (2016) 28.
10. Sz. Malinowski, C. Wardak, J. Jaroszyńska-Wolińska, *Nauka i Przemysł – metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości*, Praca zbiorowa pod redakcją Z. Hubickiego; Wyd. UMCS Lublin, 2018.
11. Sz. Malinowski, C. Wardak, *Praca zbiorowa pod redakcją Z. Hubickiego; Nauka i Przemysł-metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, Wyd. UMCS Lublin, 2018.

## ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI FENOTYPOWYCH MUTANTA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* DEFEKTYWNEGO W GENIE *ADHA2XL* W SZLAKU SYNTEZY VLCFA

S. GARG, A. SWATEK, A. CHOMA, I. KOMANIECKA, UMCS, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

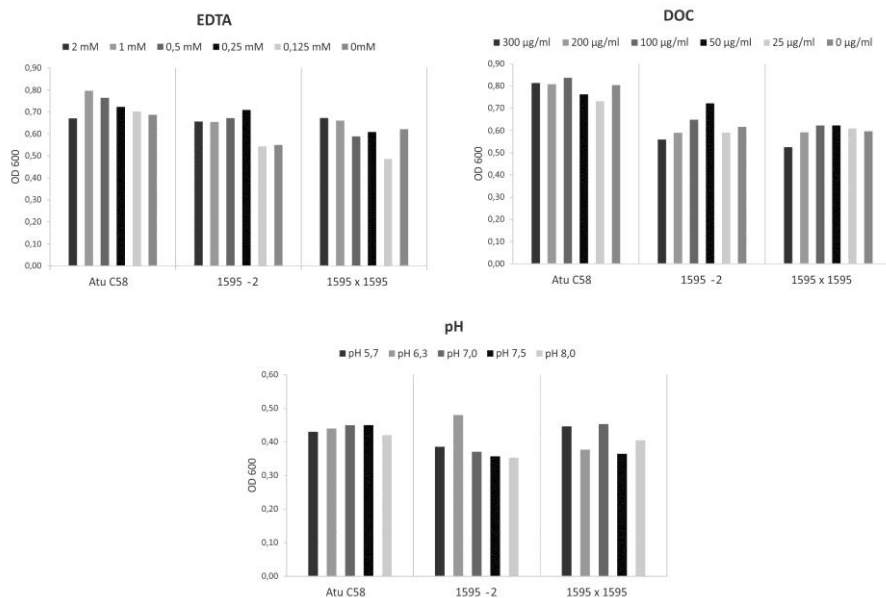
**Abstrakt:** Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (VLCFA) obecne w lipidzie A bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* odgrywają istotną rolę podczas symbiozy z roślinami, jednocześnie zapewniając odpowiednią elastyczność błony zewnętrznej powodując, że bakterie są bardziej odporne na niekorzystne warunki środowiska. Przeprowadzone badania na mutancie w genie *adhA2XL* (wchodzącym w skład regionu kodującego biosyntezę VLCFA) *Agrobacterium tumefaciens* wykazały osłabienie ich żywotności i zdolności adaptacyjnych w porównaniu ze szczepem dzikim.

**Wprowadzenie:** *Agrobacterium tumefaciens* jest patogenem, który odpowiada za indukcję narośli (*crown-gall disease*) na łodygach i korzeniach wielu gatunków roślin dwuliściennych. Jest to Gram-ujemna, tlenowa pałeczka glebowa z rodziny *Rhizobiaceae*. Do tej rodziny należą głównie wiążące azot, bakteryjne symbionty roślin strączkowych [1]. Przyczyną zmian chorobowych roślin w przypadku infekcji *A. tumefaciens* jest przeniesienie części bakteryjnego DNA (tzw. fragmentu T-DNA) i jego integracja z dowolnym miejscem w genomie rośliny [2]. Jak prawie wszystkie bakterie Gram-ujemne *A. tumefaciens* posiada lipopolisacharyd (LPS), który działa jako niezwykle silny stymulator wrodzonej odporności u eukariontów. LPS składa się z trzech części: (1) polisacharydu O-swoistego (synonim: antygen O), (2) olisacharydowego rdzenia (3) lipidu A. Lipid A jest glikolipidem o niejednorodnej strukturze. W większości przypadków jego szkielet cukrowy składa się z disacharydu 2-amino-2-deoksy-D-glukozowego (D-GlcN), ufosforylowanego w pozycjach C-1 i C-4' [3]. Kwasy tłuszczowe związane bezpośrednio z szkieletem lipidu A w pozycjach C-2, C-3, C-2' i C-3', zwane też pierwszorzędowymi kwasami tłuszczowymi to kwasy typu 3-hydroksy, posiadające łańcuch prosty, nasycony i o parzystej liczbie atomów węgla, o długości w zakresie od 12 do 20 atomów węgla. Grupy hydroksylowe tych kwasów są miejscem przyłączenia tak zwanych drugorzędowych podstawników tłuszczowych. Typowymi drugorzędowymi podstawnikami tłuszczowymi lipidu A u ryzobiów są długołańcuchowe hydroksykwasu typu  $\omega$ -1 (VLCFA), zawierające od 26 do 34 atomów węgla [4]. Wszystkie ryzobia posiadające tak zmodyfikowany lipid A mają wysoce konserwatywny klaster genowy znajdujący się pomiędzy genami *acpXL* i *msbB*. Regiony *acpXL*-*msbB* odpowiedzialne za biosyntezę i włączenie VLCFA do lipidu A wykazują znaczną konserwatywność [4]. Przeprowadzone badania LPS bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych wykazały, że VLCFA są obecne w ich formach symbiotycznych. Mutanty ze zmienionym lipidem A (brak VLCFA) w stosunku do szczepów dzikich posiadały osłabioną błonę zewnętrzną i wykazywały zwiększoną wrażliwość na pH, detergenty, antybiotyki peptydowe,

ciśnienie osmotyczne i wysuszenie, a ich zdolność do nawiązywania efektywnej symbiozy była znacznie osłabiona [4][5][6]. Tego typu badań porównawczych nie prowadzono na modelu *Agrobacterium* – bakterii patogennej, taksonomicznie zaliczanej do rodzaju *Rhizobium* (obecnie obowiązująca nazwa to *Rhizobium fabrum*).

**Część eksperymentalna:** Badania prowadzono na mutancie *Agrobacterium tumefaciens* w genie *adhA2XL* (1595-2) i jego komplementancie (1595 x 1595) oraz na szczepie macierzystym (Atu C58). Mutanta i komplementanta otrzymano w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii UMCS. Bakterie hodowano na podłożu TY, zawierającym różne czynniki stresowe: NaCl (3 %; 2 %; 1 %; 0,5 %; 0,25 %), EDTA (2 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM), SDS (2 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM), DOC (300 µg/ml; 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml), polimyksyna B (25 µg/ml; 12 µg/ml; 6 µg/ml; 3 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml), pH (od 5.7 do 8.0). Ponadto, sprawdzono wpływ temperatury (28°C, 32°C, 37°C) na wzrost bakterii. Badania prowadzono na płytkach 24-dołkowych (firmy NEST). Gęstość optyczną hodowli mierzono przy użyciu automatycznego czytnika do płytek typu ELISA (ASYS UVM340, Biogenet) przy długości fali 600 nm. Pomiarów wykonywano po ośmiu godzinach inkubacji (logarytmiczna faza wzrostu bakterii). Przedstawione wyniki to średnia z trzech powtórzeń.

**Wyniki:** Rezultaty wykonanych pomiarów przedstawiono w formie wykresów słupkowych (Rys. 1, 2). Każdy wykres zawiera trzy grupy słupków odpowiadających kolejno: szczepowi macierzystemu (Atu C58), mutantowi (1595-2) i komplementantowi (1595 x 1595). W grupie kolejne słupki odpowiadają stężeniom stresora podanym w legendzie. Na Rys. 1 umieszczono wykresy działania trzech stresorów na wzrost bakterii. Były to: EDTA, DOC i pH. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu zmiany stężenia tych stresorów oraz zmiany pH na wzrost bakterii. Należy podkreślić, że średni wzrost szczepu dzikiego w każdym przypadku był o około 10 % większy niż mutantu i komplementanta, zaś w poszczególnych grupach odchylenia spowodowane zmianą stężenia stresora były statystycznie nieistotne. Na Rys. 2 zgromadzono wyniki analiz tych stresorów, w których zaobserwowano wyraźne różnice w odpowiedzi badanych bakterii. Były to: NaCl, SDS, polimyksyna B oraz temperatura hodowli. W przypadku badania działania NaCl stwierdzono, że szczep dziki toleruje obecność chlorku sodowego do stężenia 1 %. Zwiększenie ilości NaCl (2 % - 3%) powodowało gwałtowne obniżenie wzrostu hodowli. U mutantu zaobserwowano wyraźne spowolnienie wzrostu przy niskich stężeniach NaCl, natomiast wraz ze zwiększeniem stężenia NaCl zaobserwowano intensywny wzrost hodowli. Komplementant zachowywał się podobnie do szczepu dzikiego, jednak tutaj pomiary OD były generalnie o 30 % niższe. Najbardziej zaskakujące obserwacje poczyniono badając wpływa SDS na wzrost bakterii. W tym wypadku we wszystkich szczepach zaobserwowano minimalny wzrost hodowli przy stężeniach SDS w zakresie 0,25 – 0,5 mM. Wyższe i niższe stężenia SDS wyraźnie słabiej hamowały wzrost bakterii.

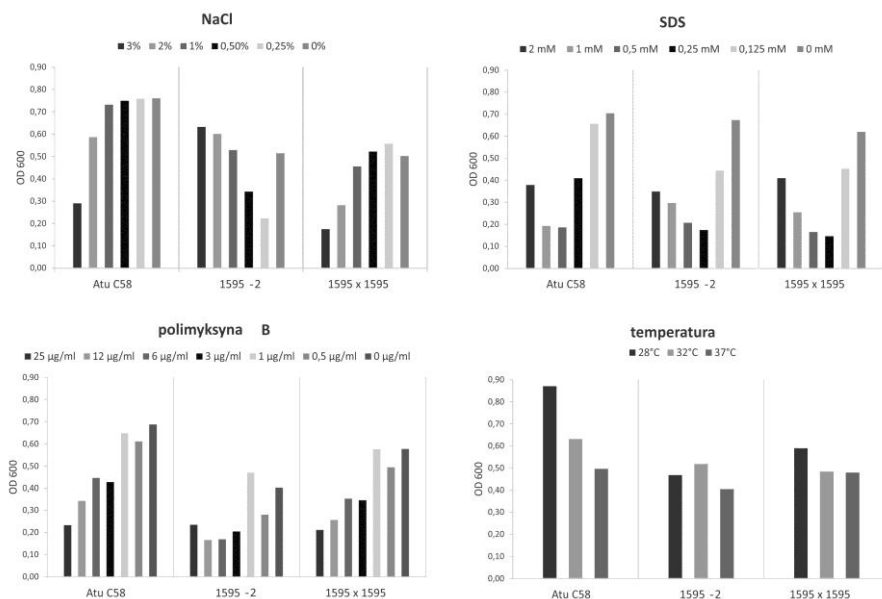


**Rys. 1.** Badanie wpływu różnych stężeń EDTA, DOC oraz wpływu pH na wzrost szczepów: *A. tumefaciens* C58 (Atu C58), mutanta w genie *adhA2XL* (1595-2) oraz jego komplementanta (1595 x 1595).

Polimyksyna B to kationowy polipeptyd, który dezorganizuje funkcjonowanie błon (zarówno OM jak i CM). W przypadku szczepu dzikiego zaobserwowano wyraźny spadek wzrostu hodowli wraz ze wzrostem stężenia antybiotyku w podłożu. Podobnie zachowywał się mutant, z tym, że wartości OD były o około 50 % niższe. Przywrócenie zdolności do syntezy VLCFA u mutanta skutkowało zwiększeniem odporności na polimyksynę B na poziomie porównywalnym ze szczepem dzikim. Temperatura 28°C zapewnia najlepszy wzrost szczepu macierzystego (Atu C58), natomiast zarówno mutant jak i komplementant w tej temperaturze wykazują wyraźnie słabszy wzrost. Bakterie szczepu dzikiego namnażają się wyraźnie wolniej wraz ze wzrostem temperatury (do 37°C). W przypadku mutanta i komplementanta zmiana temperatury hodowli ma nieznaczny wpływ na tempo wzrostu populacji bakterii.

**Wnioski:** Przeprowadzono badania właściwości fizjologicznych bakterii: *Agrobacterium tumefaciens* C58, jego mutanta w genie *adhA2XL* (1595-2) i komplementanta (1595 x 1595). Mutacja powoduje utratę zdolności biosyntezy VLCFA i jego włączania do LPS, co skutkuje reorganizacją struktury przestrzennej błony zewnętrznej i wpływa na metabolizm bakterii. Komplementant powstał poprzez wprowadzenie na plazmidzie aktywnego genu *adhA2XL*. Stwierdzono, że mutant we wszystkich doświadczeniach był bardziej podatny na czynniki stresowe niż szczep macierzysty. Jednocześnie okazało się, że komplementant, który miał przywrócić zdolność do syntezy VLCFA, nie w pełni odzyskał właściwości fizjologiczne szczepu dzikiego. Wśród czynników stresogennych można wyróżnić

dwie grupy. Do pierwszej z nich należy zaliczyć EDTA, DOC i stężenie jonów wodorowych (pH) (Rys. 1). Te czynniki jedynie nieznacznie osłabiały wzrost mutantu i komplementanta. Zmiana ich stężenia nie powodowała praktycznie różnic w odpowiedzi bakterii. Do drugiej grupy stresorów zaliczono NaCl, SDS, polimyksynę B i temperaturę. W tym wypadku wzrost szczepu dzikiego i mutantu i komplementanta wyraźnie się różniły, a równocześnie wzrost bakterii był zależny od stężenia stresora.



**Rys. 2.** Badanie wpływu różnych stężeń NaCl, SDS, polimyksyny B oraz temperatury na wzrost szczepów: *A. tumefaciens* C58 (Atu C58), mutantu w genie *adhA2XL* (1595-2) oraz jego komplementanta (1595 x 1595).

Praca powstała w ramach realizacji projektu OPUS finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr projektu: 2018/31/B/NZ9/01755).

### Literatura:

1. A. Ziemienowicz, *Acta Biochimica Polonica*, 48 (2001) 623.
2. A. Pitzschke, Hirt H., *The EMBO Journal*, 29 (2010) 1021.
3. L. Bruslind, *General Microbiology*, Oregon State University Corvallis, 31. <https://open.oregonstate.edu/generalmicrobiology/>
4. A. Choma, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862 (2017) 196.
5. A. F. Haag i in., *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 17455.
6. S. S. Basu i in., *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 28959.

## WPLYW WYBRANYCH OLEJKÓW ETERYCZNYCH NA WZROST *E. COLI* ORAZ *S. AUREUS*

A. POMARAŃSKA<sup>1</sup>, J. KUTKOWSKA<sup>2</sup>, A. PASTUSZKA<sup>2</sup>, <sup>1</sup>SKN Mikrobiologów BAKCYL, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; <sup>2</sup>UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033, Lublin.

**Abstrakt:** Olejki eteryczne to złożona mieszanina zapachowych lotnych związków organicznych. Posiadają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, owadobójcze i przeciwwirusowe [4]. Mają one ogromny potencjał w dziedzinie biomedycyny, a obecność takich związków, jak aldehydy, fenole, terpeny powoduje, że działają one na różnorodne patogeny [8]. Wykazano, że olejki eteryczne hamują wzrost drobnoustrojów opornych na leki szczepy, które są trudne do leczenia konwencjonalnymi antybiotykami, dlatego też w ostatnich latach rośnie zainteresowanie odkryciem nowych związków o aktywnościach przeciwdrobnoustrojowych [6]. Celem doświadczenia było sprawdzenie aktywności przeciwbakteryjnej olejków eterycznych: pichtowego, lawendowego, goździkowego z pąków i cedrowego, w porównaniu do antybiotyku amoksyliny. W badaniach określono wysoką aktywność olejku goździkowego wobec szczepów *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 z wartościami MIC 4 % (vol/vol). Olejek lawendowy wykazywał słabsze działanie przeciwbakteryjne wartość MIC wynosiły dla *E. coli* 8%, a *S. aureus* 16% (vol/vol). Wzrost *S. aureus* był hamowany również przez olejek cedrowy i pichtowy, wartości MIC odpowiednio 8 i 32%.

**Wprowadzenie:** W ostatnich latach wzrasta oporność bakterii na antybiotyki, które stają się nieskuteczne w leczeniu chorób infekcyjnych. Przyczyną wzrastającej antybiotykooporności, jest coraz większe spożycie jak i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, szczególnie w leczeniu pozaszpitalnym – weterynarii, rolnictwie czy hodowli zwierząt. Skażenie środowiska farmaceutykami spowodowane jest również nieprawidłową utylizacją, jak i usuwaniem ich ze ścieków. Upowszechnienie oraz stosunkowo łatwy dostęp do antybiotyków przyczyniły się do gwałtownego pojawienia się szczepów opornych, a nawet wieloopornych [2]. Oporność związana jest zarówno z nadużywaniem antybiotyków, jak i środków do dezynfekcji, w których substancje antybakteryjne często występują w stężeniach mających działanie statyczne, a nie bakteriobójcze. Rozprzestrzenianie oporności jest związane z występowaniem genów oporności na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy czy transpozony. Mogą one być przekazywane z jednej komórki do drugiej na drodze horyzontalnego transferu genów – koniugacji, transformacji i transdukcji [5]. Wprowadzenie antybiotyków do ekosystemu prowadzi do presji selekcyjnej, a tym samym do adaptacji danej populacji drobnoustrojów. Utrzymująca się tendencja oporności, może doprowadzić do tego, że za kilkanaście lat, zdecydowana większość patogennych bakterii zmutuje, nie będzie dostępny żaden skuteczny antybiotyk, a każde zakażenie bakteryjne będzie stanowić śmiertelne zakażenie dla pacjenta [1]. Wśród patogenów alarmowych wyróżnia się m.in.: MDR (ang. multiple drug resistance) – patogeny odporne na co



najmniej trzy grupy antybiotyków, XDR (ang. extensively drug resistant) – odporne na szeroką gamę leków jak i PDR (ang. Pandrug-resistant) – odporne na wszystkie preparaty ze wszystkich grup antybiotyków. W przypadku patogenów alarmowych typu XDR, do których zaliczane są bakterie Gram-ujemne ostatnim skutecznym lekiem w terapii zakażeń jest kolistyna, lecz z powodu jej nadużywania (sektor rolniczy, hodowle) pojawiła się również i wobec niej oporność [9]. Alternatywną drogą eliminacji lekoopornych szczepów np. *E. coli* mogą stanowić nietoksyczne, biodegradowalne substancje do których możemy zaliczyć między innymi olejki eteryczne, które posiadają szeroką gamę aktywności terapeutycznej. Udowodniono ich działanie m.in. przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe czy przeciwgrzybowe. Stosowane są od dawna przy leczeniu układu oddechowego, pokarmowego czy przy wspomaganiu funkcjonowania układu immunologicznego i nerwowego. Właściwości olejków eterycznych wykorzystywane są powszechnie w medycynie jak i kosmetologii [7]. W skład jednego olejku może wchodzić nawet do kilkudziesięciu związków o różnym stężeniu i właściwościach. Procentowa zawartość poszczególnych komponentów w określonym oleju jest zmienna i zależy od gatunku, odmiany rośliny, warunków środowiskowych jej wzrostu i rozwoju, czy też metody izolacji. W większości olejków można jednak wyróżnić jeden główny składnik, odpowiadający za specyficzny zapach czy właściwości biologiczne jak i farmakologiczne [3]. Narastająca lekooporność mikroorganizmów stanowi wyzwanie dla nowoczesnej medycyny i zmusza do poszukiwania nowych i bardziej skuteczniejszych metod leczenia. Olejki eteryczne, które charakteryzują się szerokim zakresem aktywności biologicznej i farmakologicznej, mogą być alternatywą dla środków obecnie stosowanych w lecznictwie.

**Część eksperymentalna:** Wrażliwość bakterii na olejki eteryczne określano metodą dyfuzyjno-krążkową, a minimalne stężenie hamujące (MIC) oznaczono metodą mikrorozcieńczeń w bulionie wg. zaleceń Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). W badaniach użyto szczepów referencyjnych: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 i olejków eterycznych: olejek pichtowy (*Oleum Pini sibiricum*) z *Abies sibirica*, olejek lawendowy (*Lavandulae aetheroleum*) z *Lavandula L.*, olejek goździkowy z pąków (*Oleum Caryophyllorum*) z *Dianthus L.*, olejek cedrowy (*Juniperus Virginiana Oil*) z *Cedrus Trew.* Na podłoże stałe MH (Mueller-Hinton Agar) posiewano zawiesinę bakteryjną o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda. Następnie na powierzchnię posiewu nakładano jałowe krążki bibułowe (śr. 6 mm) i наносono po 10 µl odpowiedniego olejku. Kontrolę dodatnią stanowił krążek z antybiotykiem – amoksycyliną (10 µg). Płytki inkubowano 24 godz. w 37 °C w warunkach tlenowych. Najniższe stężenia hamującego wzrost (MIC) bakterii oznaczono metodą mikrorozcieńczeń w bulionie wg. CLSI. Do gradientu stężeń badanych olejków eterycznych (64%, 32%, 16%, 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% ) i amoksycyliny (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 µg/ml) w bulionie MH dodano po 20 µl, rozcieńczonych 10-krotnie hodowli bakterii (0,5 McFarlanda). Kontrola dodatnia – zawiesina bakterii w podłożu płynnym MH oraz ujemna pożywka płynna bez bakterii. Po 24 godz. inkubacji w 37 °C w warunkach tlenowych, dokonano odczytu absorbancji OD<sub>600</sub>. Następnie dodano do każdego dołka po 200 µl roztworu rezazuryny.

**Wyniki:** Zastosowana w prezentowanej pracy metoda dyfuzji z krążka jest metoda jakościową opartą na dyfuzji substancji zawartej w krążku bibuły do podłoża. Substancje z krążka dyfundują promieniście, tworząc strefy z gradientem stężeń. Największa koncentracja ma miejsce przy brzegach krążka i spada wraz z odległością od niego. Wielkość strefy zahamowania jest wprost proporcjonalna do stopnia wrażliwości na zastosowaną substancję. Wyniki badań wpływu olejków eterycznych i antybiotyku na wzrost bakterii przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Badanie wrażliwości szczepów bakterii na wybrane olejki eteryczne i antybiotyki.

Substancja hamująca	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Olejek pichtowy	0	12
Olejek lawendowy	10	17
Olejek cydrowy	0	10
Olejek goździkowy z pąków	18	20
Amoksycylina (kontrola)	0	20

Szczep *S. aureus* ATCC 25923, jest bardziej wrażliwy na działanie olejków eterycznych niż *E. coli* ATCC 25922, co może wynikać z odmiennej budowy ściany komórkowej. Zarówno u *S. aureus* jak i *E. coli* najsilniejsze działanie zaobserwowano w przypadku olejku goździkowego z pąków oraz lawendowego. Zastosowanie metody mikrorozcieńczeń w bulionie umożliwiło wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów testowych (MIC). Odczyt gęstości optycznej hodowli bakterii polegał na ocenie spektrofotometrycznej przy długości fali 600 nm (OD<sub>600</sub>). Przy badaniu produktów trudno rozpuszczalnych w wodzie (olejki), odczyt absorbancji mógł interferować wraz z niepełnym stopniem rozproszenia. Dlatego dodatkowo zastosowano barwny indykator wzrostu drobnoustrojów – rezazurynę. Związek ten, przy aktywnym metabolizmie drobnoustrojów ulega zmianie z barwy niebieskiej (rezazuryna) na różową (rezorufina), podnosi tym samym czułość detekcji. Intensywność barwy jest proporcjonalna do populacji danego drobnoustroju. W badaniach określono wysoką aktywność olejku goździkowego wobec obu badanych szczepów z wartościami MIC 4 % (vol/vol). Olejek lawendowy wykazywał słabsze działanie przeciwbakteryjne wartość MIC wynosiły dla *E. coli* 8%, a *S. aureus* 16% (vol/vol). Wzrost *S. aureus* był hamowany również przez olejek cedrowy i pichtowy, wartości MIC odpowiednio 8 i 32%.

**Wnioski:** Uzyskane wyniki można podsumować następująco: olejek goździkowy z *Dianthus L.* wykazuje silniejsze właściwości antybakteryjne w porównaniu do olejku lawendowego otrzymanego z *Lavandula L.*, jednakże nie tak silne jak w przypadku kontroli - antybiotyku amoksycyliny. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną w przypadku obu szczepów wykazał olejek goździkowy (*Oleum Caryophyllorum*). W przypadku *S. aureus*, aktywny okazał się również lejek cedrowy i pichtowy. Uzyskane wyniki uzasadniają, kontynuację badań dotyczących

aktywności innych olejków eterycznych wobec szczepów różnych gatunków bakterii.

### **Literatura**

1. M. Drózd, D. Straszak, G. Widelska, A. Dymek, M. Pitucha, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. (II)*, (2019) 63.
2. J. Godziszewska, D. Guzek, K. Głąbski, A. Wierzbicka, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej (online)*, 70 (2016) 803.
3. S.K. Król, K. Sklicka-Woźniak, M. Kandefor-Szerszeń, A. Stepulak, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej (online)*, 67 (2013) 1000.
4. L. Nissen, A. Zatta, I. Stefanini, S. Grandi, B. Sgorbati, B. Biavati, A. Monti, *Fitoterapia*, 81 (2010) 413.
5. M. Popowska, *Problemy nauk biologicznych*, 314 (2010) 81.
6. A. Salvat, L. Antonnacci, R. Fortunato, *Letters in Applied Microbiology*, 32 (2001) 293.
7. M. Sienkiewicz, D. Kalemba, M. Wasiela, *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 63 (2011) 273.
8. M.K. Swamy, M. Akhtar, U. Sinniah, *Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Hindawi Publishing Corporation Article ID 3012462, 2016.
9. D. Żabicka, E. Literacka, K. Bojarska, *Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków*, 3 (2012) 1.

## SEROTYPOWANIE MOLEKULARNE JAKO POTENCJALNE NARZĘDZIE W TYPOWANIU BAKTERII Z RODZAJU *AEROMONAS*

**M. KURZYLEWSKA, M. LABAN, K. DWORACZEK, A. TURSKA-SZEWCUK**, UMCS, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

**Abstrakt:** Bakterie z rodzaju *Aeromonas*, znane głównie jako patogeny oportunistyczne ryb hodowlanych, charakteryzują się znaczną heterogennością struktur antygenowych i obejmują blisko 100 serogrup uznanych i tymczasowych [1,2]. Serotypowanie określające rodzaj powierzchniowego antygeny O-swoistego u bakterii Gram-ujemnych, wykonywane metodą aglutynacji z użyciem poliklonalnych surowic odpornościowych, jest obciążone błędami wynikającymi z właściwości niektórych szczepów do autoaglutynacji oraz reakcji krzyżowych związanych z obecnością dodatkowych antygenów [3]. Badaniem przyszłości staje się zatem serotypowanie molekularne oparte o dane z analizy bioinformatycznej *in silico* klastrów genów dla biosyntezy antygeny O (OGC), które w połączeniu z poznaną budową strukturalną antygenów O jest obecnie metodą znajdującą zastosowanie w serotypowaniu pałeczek jelitowych *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. [4]. Obecny stan wiedzy umożliwia powiązanie budowy antygenów bakterii *Aeromonas* z organizacją genetyczną regionów OGC warunkujących ich syntezę zaledwie dla kilku wariantów serotypów O. Techniki sekwencjonowania WGS skorelowane z badaniami immunochemicznymi antygenów O swoistych szczepów *Aeromonas* dla serogrup odpowiedzialnych za wywołanie zakażeń zwierząt (w tym ryb) i człowieka umożliwią identyfikację czynników etiologicznych oraz właściwy dobór szczepów do immunoprofilaktyki zakażeń pałeczkami np., ryb hodowlanych.

**Wprowadzenie:** Bakterie z rodzaju *Aeromonas* to Gram-ujemne, fakultatywnie beztlenowe, nie wytwarzające przetrwalników heterotroficzne pałeczki, których powszechnym miejscem bytowania jest środowisko wodne [5]. Najlepiej zostały poznane jako patogeny zwierząt zmiennocieplnych w tym ryb, płazów i gadów, ale także stałocieplnych oraz człowieka, dla którego źródłem zakażenia są zwierzęta, żywność lub zanieczyszczona woda [6]. *Aeromonas* są głównym czynnikiem etiologicznym chorób bakteryjnych u karpia i pstrągów przyczyniając się do znacznych strat ekonomicznych w polskich gospodarstwach rybackich [7]. Infekcje pałeczkami są spowodowane zdolnością mikroorganizmów do produkcji wielu czynników wirulencji, m.in. związanych z budową powierzchniowych osłon bakterii Gram-ujemnych (tj. lipopolisacharyd, LPS), a także toksyn i enzymów wydzielanych na zewnątrz komórki [8]. W ogólnym schemacie budowy LPS można wyróżnić trzy regiony: najbardziej konserwatywny strukturalnie lipid A, oligosacharyd rdzeniowy oraz polisacharyd O-swoisty (łańcuch O-swoisty, antygen O, antygen somatyczny). Naturalną cechą bakterii jest heterogenność cząsteczek LPS w błonie zewnętrznej [9]. W latach czterdziestych XX wieku, opisano pierwsze antygeny O *Escherichia coli* i od tamtej pory różnice w ich budowie są podstawą immunotypowania szczepów i charakterystyki mikroorganizmów pod względem epidemiologicznym [3]. Część węglowodanowa lipopolisacharydu, najbardziej eksponowana na zewnątrz komórki, wykazuje duże zróżnicowanie składników

nawet pomiędzy szczepami danego gatunku, warunkując ich swoistość serologiczną. Jest ona determinowana m. in. rodzajem i sekwencją reszt cukrowych, formą pierścienia (piranoza, furanoza), typem wiązań glikozydowych, jak również liczbą i rodzajem nie cukrowych podstawników np. reszt O- i N-acetylowych, formylowych, fosforanowych, aminokwasów, glicerolu, kwasu mlekowego czy pirogronowego [10,11]. Powyższe modyfikacje wpływają na ogromną różnorodność łańcuchów O-swoistych bakterii. Dotychczas opisano 186 różnych antygenów O dla *E. coli*, 54 dla *Salmonella enterica*, 193 dla *Vibrio cholerae* i około 20 dla *Pseudomonas aeruginosa* [12]. Szczepy *Aeromonas* na podstawie różnic w budowie antygeny O zostały w latach 80. XX wieku wstępnie sklasyfikowane do 44 serogrup, przy użyciu schematu NIH (National Institute of Health Japan), zaproponowanego przez badaczy japońskich Sakazaki i Shimada. Ilość serogrup wzrosła w kolejnych latach do 97, po uwzględnieniu tymczasowych serogrup z obszaru Europy [1,2], a lista ciągle nie jest zamknięta z uwagi na pojawiające się nowe warianty O-antygenów. Ich zmienność stanowi swoisty antygenowy „odcisk palca” dla bakterii, z drugiej strony jest przydatna do identyfikacji szczepów wywołujących zakażenia ryb i do diagnostyki czynników etiologicznych chorób układu pokarmowego u człowieka [9]. Serotypowanie, w celu identyfikacji patogennych szczepów bakteryjnych jest nieocenione w badaniach epidemiologicznych, ponieważ wiele serotypów O jest związanych z określonymi zespołami chorobowymi [3,9]. Powszechnie stosowana konwencjonalna metoda serotypowania techniką aglutynacji z wykorzystaniem termicznie inaktywowanych antygenów i surowic poliklonalnych jest obciążona wadami. Po pierwsze produkcja poliklonalnych surowic odpornościowych wymaga użycia zwierząt doświadczalnych oraz jest czasochłonna i kosztochłonna. Po drugie interpretacja wyników może być utrudniona ze względu na właściwość niektórych szczepów do autoaglutynacji i / lub reaktywności krzyżowe antygenów [3]. Badaniem nowej generacji w typowaniu mikroorganizmów będzie serotypowanie molekularne oparte na analizie danych uzyskanych z sekwencjonowania całych genomów (WGS) [13]. Ważną cechą antygenów O bakterii, wykształconą w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, jako cecha przystosowawcza, jest duża zmienność chemiczna ich budowy, determinowana określonym zestawem genów [3], których analiza wymaga wdrożenia metod molekularnych. Taką możliwość daje sekwencjonowanie całych genomów (WGS), technika coraz częściej znajdująca zastosowanie w badaniach większych regionów DNA, poznanie których organizacji oraz sekwencji nie jest możliwe lub trudne z wykorzystaniem metod opartych na hybrydyzacji czy amplifikacji pojedynczych genów. Co więcej analiza sekwencji nukleotydowej obszarów DNA *in silico* umożliwi projektowanie narzędzi bioinformatycznych do zastosowania w typowaniu mikroorganizmów. np. multipleks PCR opracowany w celu wykrywania genów odpowiedzialnych za syntezę i modyfikację podjednostki O [14]. Serotypowanie molekularne oparte na analizie klastra genów antygeny O (OGC) jest metodą z powodzeniem używaną w serotypowaniu Enterobacteriaceae, *Samonella* spp. i *Shigella* [4]. Geny warunkujące syntezę antygeny O są zazwyczaj zlokalizowane w jednym obszarze genomu i znajdują się między konserwatywnymi genami metabolizmu podstawowego tzw. housekeeping genes. U *Aeromonas* region OGC jest zlokalizowany powyżej genów *acrB* i/lub *oprM*, a jego wielkość mieści się

w zakresie 15000 do 50000 pz oraz zawiera od 15-38 otwartych ramek odczytu (ORF) [15]. Są w nim zlokalizowane głównie trzy grupy genów: geny odpowiedzialne za biosyntezę prekursora nukleotydowego poszczególnych cukrów wchodzących w skład powtarzającej się podjednostki antygeny O, geny dla glikozylotransferaz (GT) oraz geny kodujące białka zaangażowane w składanie i translokację podjednostki O [3, 12,15]. Do tych ostatnich należą geny zaliczane do jednego z trzech mechanizmów: drogi Wzx/Wzy-zależnej, drogi zależnej od transportera ABC oraz drogi syntazozależnej [12,15,16], które występują w klastrze OGC danego szczepu w zależności od tego z jakim rodzajem antygeny mamy do czynienia. [16]. Droga Wzx/Wzy-zależna bierze udział w formowaniu struktur heteropolisacharydowych, natomiast droga zależna od transportera ABC jest wykorzystywana w antygenach zbudowanych z powtarzających się podjednostek tego samego cukru (tzw. homopolimeryczne antygeny O) [4, 12]. Najlepszym potencjalnym narzędziem – celem bioinformatycznym, który znajdzie zastosowanie w serotypowaniu jest klaster genów odpowiedzialny za Wzx/Wzy-zależny transport podjednostki O [3,12]. Uczestniczą tutaj trzy białka: Wzx, Wzy i Wzz. Geny *wzx* kodują flipazę Wzx odpowiedzialną za translokację podjednostek cukrowych przez błonę wewnętrzną do przestrzeni peryplazmatycznej. Białka Wzx charakteryzują się małym podobieństwem w sekwencji aminokwasów, dlatego też obecność genów *wzx* jest uważana za cechę swoistą dla serotypów. Zmienność sekwencji genów *wzx* łączy się z różnorodnością struktur antygeny O, a geny *wzx* mogą być wykorzystywane jako markery genetyczne do ich rozróżniania. W licznych badaniach wykazano jednak, że u *E. coli* flipaza Wzx jest swoista tylko dla pierwszego cukru wchodzącego w skład powtarzającej się podjednostki O-swoistej. Przeczą temu wyniki badań Honga i wsp., którzy wykazali, że u *S. enterica* z grup B, D2 i E, flipaza Wzx wykazuje znaczną swoistość do całej powtarzającej się podjednostki O antygeny. Z kolei, białko Wzy odpowiada za polimeryzację podjednostek oligosacharydowych przyłączanych od końca redukującego rosnącego łańcucha, natomiast jego długość jest regulowana za pośrednictwem białka Wzz. Wykazano, że mutanty z defektem genu *wzy* wytwarzają LPS zbudowany z jednej podjednostki O-swoistej. [12]. Jak dotychczas poznano sekwencje OGC dla 16 serotypów *A. hydrofila* O7, O9, O10, O13, O16, O18, O19, O23, O24, O25, O29, O30, O33, O34, O35, O44 [4,15,17]. Na możliwość wykorzystania różnic w szlaku Wzx/Wzy, mogących stać się podstawą do identyfikacji i klasyfikacji serotypów *Aeromonas* wskazują badania Cao i wsp., którzy zbadali sekwencję nukleotydową OGC 14 izolatów tych bakterii. Badacze zidentyfikowali geny *wzx/wzy* u przedstawicieli 8 serogrup (O9, O16, O19, O24, O25, O29, O30 i O44), a u sześciu pozostałych (O7, O10, O13, O23, O33 i O35) geny *wzm/wzt* (drogi zależnej od transportera ABC). Ustalili także, że homologia genów *wzx* wynosiła 58,1%, a genów *wzy*, *wzm* i *wzt* odpowiednio 69,3%; 61,7% i 56,6%. Warto zwrócić uwagę na to, że różnice w występowaniu tych genów są głównym celem w opracowywaniu narzędzi technik molekularnych służących do identyfikacji i klasyfikacji badanych szczepów do danej serogrupy. Uważa się, że glikozylotransferazy występujące u izolatów należących do tej samej grupy homologicznej posiadają podobne funkcje. Geny glikozylotransferaz występujące u *Aeromonas* są głównie związane z ORF 8 i 10 kodującymi ramnozylotransferazę i mannozylotransferazę oraz z ORF 6, 7 i 11, które są homologiczne do

O-acetylotransferaz wykrywanych także w genomach innych bakterii. Zhang i wsp. w swoich badaniach z wykorzystaniem reakcji PCR wykazali, że występowanie ORF 6 i 7 może być specyficzne dla serogrupy O18 [4,17]. U *Aeromonas* w przeciwieństwie do *E. coli*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. gen *wecA*, który jest odpowiedzialny za syntezę antygeny O i translokację pierwszej reszty cukrowej (GalNAc lub GlcNAc) znajduje się w klastrze OGC, a nie tak jak u wymienionych bakterii poza OGC [4,17]. Acetylowanie reszt cukrowych antygeny O jest jedną z najpowszechniejszych modyfikacji łańcucha O-swoistego. Prowadzi ona do zmian właściwości antygenowych i zwiększa polimorfizm łańcucha [17].

Podsumowując, pierwszym krokiem w badaniach molekularnych jest izolacja i sekwencjonowanie genomowego DNA, następnie na podstawie analizy *in silico* projektowanie starterów specyficznych dla danego serotypu i opartych na sekwencjach DNA genów *wzx/wzy* i *wzm/wzt* (oczekiwany produkt ma wielkość 151-217 pz). Kolejnym krokiem jest przeprowadzenie reakcji multiplex PCR, której produkty zostają poddane hybrydyzacji z wykorzystaniem zaprojektowanych sond molekularnych o długości 18-25 pz. Następnie przy pomocy narzędzi bioinformatycznych należy określić sekwencje DNA genów OGC wybranych serotypów *Aeromonas*, które są specyficzne dla danej serogrupy [15].

**Wnioski:** Wykazano, że technikami nowej generacji, które mogą znaleźć zastosowanie w serotypowaniu bakterii z rodzaju *Aeromonas* są testy molekularne, bazujące na sekwencji klastra genów biosyntezy antygeny O, którą uzyskano w wyniku sekwencjonowania WGS. Metody te są szybsze, bardziej precyzyjne niż dotychczas stosowane serotypowanie konwencjonalne. Wykorzystanie reakcji PCR w celu amplifikacji specyficznych serotypowo regionów DNA wydaje się najwłaściwszą metodą w celu prawidłowego przyporządkowania serotypów.

#### Literatura:

1. R. Sakazaki, T. Shimada, J Med Sci Biol, 37 (1984) 247.
2. A. Kosińska, A. Pękala, Bull Vet Inst Puławy, 54 (2010) 315.
3. Y. Du, H. Li, Z. Yin, et. al. J Microbiol Methods, 153 (2018) 14.
4. N. Jimenes, R. Canals, M. Salo, et al. J Bacteriol, 190 (2008) 4198.
5. D. Kręgiel, A. Rygała, Przemysł Spożywczy, 11 (2008) 46.
6. J. Tomas, ISRN Microbiology, (2012) 1.
7. A. Pękala-Safińska, J Vet Res, 62 (2018) 261.
8. L. Guz, Ann. UMCS, 60 (2005) 95.
9. K. Dworaczek, D. Drzewiecka, A. Pękala-Safińska, A. Turska-Szewczuk, Mar Drugs, 17 (2019) 1.
10. C. Raetz, C. Whitfield, Annu Rev Biochem, 71 (2002) 635.
11. J. Lodowska, D. Wolny, L. Węglarz, Z. Dzierżewicz, Postepy Hig Med Dosw, 61 (2007) 106.
12. E. Krzyżewska, J. Rybka, Postepy Hig Med Dosw, 72 (2018) 573.
13. M. Brzozowska, P. Kwiatkowski, D. Kosik-Bogacka, J. Jursa-Kulesza, Post Mikrobiol, 56 (2017) 353.
14. S. Brengi, Q. Sun, H. Bolaños, et. al., JCM, 57 (2019) 1.
15. H. Cao, M Wang, Q. Wang, et. al., Plos One, 13 (2018): e0203445.
16. M. Kaszowska, Postepy Hig Med Dosw, 58 (2004) 333.
17. Y. Zhang, E. Arakawa, K. Leung, Infect Immun, 70 (2002) 2326.

## **BADANIA TOKSYCZNOŚCI IN VITRO - FAŁSZYWIE DODATNIE WYNIKI TESTÓW ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK NA PRZYKŁADZIE MEFEDRONU**

**O. WRONIKOWSKA<sup>1,2</sup>, M. ZYKUBEK<sup>1</sup>, Ł. KURACH<sup>1</sup>,** <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Samodzielna Pracownia Badań Behavioralnych, Katedra i Zakład Chemii Medycznej ul. Doktora Witolda Chodźki 4a 20-400 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, ul. Doktora Witolda Chodźki 4a, 20-400 Lublin.

**Abstrakt:** Niektóre związki chemiczne mogą zaburzać fizjologiczne procesy komórkowe, co można obserwować i mierzyć przy użyciu szeregu testów oceniających aktywność metaboliczną komórek. W niniejszych badaniach udowodniono, że mefedron może fałszować wyniki w dwóch testach żywotności komórek – teście MTT i teście alamarBlue. Fałszywie dodatnie wyniki spowodowane były reakcją mefedronu z odczynnikami wykorzystywanymi w ww. testach, co zostało potwierdzone spektroskopowo przez pomiar absorbancji. Otrzymane wyniki sugerują, że podczas przeprowadzania testów żywotności komórek, kluczowe jest sprawdzenie interakcji pomiędzy badanym związkiem, a substancjami wykorzystywanymi w użytych testach, oraz skorelowanie otrzymanych wyników z obserwacją mikroskopową.

**Wprowadzenie:** Cytotoksyczność badanej substancji określana jest jako zdolność do zahamowania wzrostu i proliferacji komórek. Jej miarą jest stężenie hamujące, IC<sub>50</sub> (ang. inhibitory concentration), dla którego przemiany metaboliczne lub proliferacja zostają zahamowane w 50% w porównaniu do komórek kontrolnych. W prezentowanych badaniach wykorzystano test MTT oraz test alamarBlue. Test MTT jest oparty na zdolności żywych komórek do redukcji pomarańczowej soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem reakcji. Test alamarBlue pozwala na ocenę aktywności żywych komórek i opiera się na przekształceniu niebieskiej resazuryiny w różową resorufinę. W przypadku obu testów, poziom redukcji jest wprost proporcjonalny do aktywności metabolicznej żywych komórek – w przypadku śmierci komórek nie dochodzi do zmiany barwy [1]. Pomimo iż oba testy z powodzeniem wykorzystywane są do oznaczeń cytotoksyczności, dostępne dane literaturowe sugerują, że w niektórych przypadkach wyniki uzyskane przy użyciu testu MTT i alamarBlue mogą nie odzwierciedlać faktycznego stanu żywotności komórek, co z kolei może prowadzić do nieprawidłowości w ocenie profilu toksykologicznego badanych związków, jak również do błędnego oznaczenia wartości IC<sub>50</sub> [2]. W obliczu szerokiego wykorzystywania wymienionych testów w badaniach toksyczności związków (m.in. psychoaktywnych), identyfikacja takich nieprawidłowości jest kluczowa by uniknąć błędów w interpretacji wyników. Dostępne dane literaturowe sugerują, że pochodne katynonu (np. 3,4-ketechol-PV) wykazują zdolność redukcji MTT [3]. W niniejszej pracy, przedmiotem badań był mefedron, psychoaktywny, syntetyczny związek również będący pochodną katynonu. W prezentowanych badaniach wykazano, że



mefedron może przyczyniać się do uzyskania fałszywie dodatnich wyników żywotności komórek, co z kolei sugeruje, że wszystkie badania wykorzystujące komórkowe testy cytotoksyczności powinny być projektowane w taki sposób, by uniknąć błędnej interpretacji wyników.

**Część eksperymentalna:** W prezentowanych badaniach zostały ocenione interakcje mefedronu z odczynnikami wykorzystywanymi w testach MTT i alamarBlue, a IC<sub>50</sub> wyznaczone zostało przy użyciu zmodyfikowanego testu.

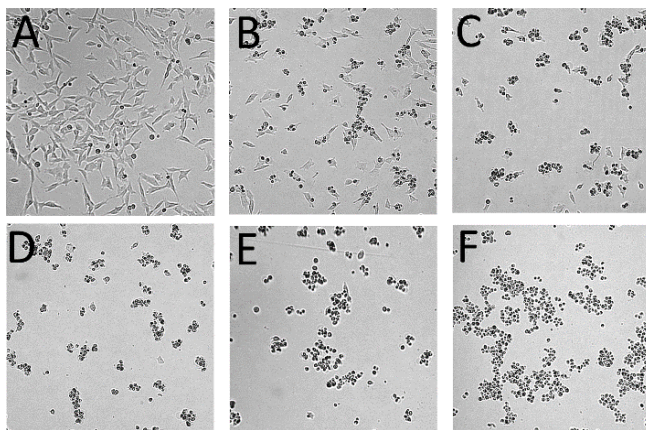
Hodowla komórkowa: Komórki ludzkiej linii neuroblastoma SH-SY5Y były hodowane z wykorzystaniem DMEM z 4,5 g/L glukozy i GlutaMAX™ oraz wzbogacone 10% FBS (v/v), 1% NEAA (v/v), pirogromianem sodu (1 mM), 100 U/ml penicyliną oraz 100 µg streptomycyną. Hodowle komórkowe były utrzymywane w temperaturze 37°C przy wilgotności powietrza 95% i 5% CO<sub>2</sub>. Pasaż był wykonywany co 3 - 4 dni przy użyciu 0,25% trypsyny/EDTA. 24 h przed ekspozycją komórek na badany związek, zostały one wysiane na płytkę 96-dołkową w gęstości 20000 komórek na dołek. Następnie, komórki poddane zostały 24 h ekspozycji na mefedron (0,3 – 5mM) oraz na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dla uzyskania kontroli pozytywnej.

Testy żywotności komórek: AlamarBlue test był przeprowadzony na dwa sposoby. Pierwszy z nich został wykonany zgodnie z instrukcją producenta. Po 24 h ekspozycji na mefedron, do każdego dołka dodano 10 µl odczynnika AlamarBlue. Następnie komórki były inkubowane przez 4 h w 37°C, po czym dokonano pomiaru fluorescencji (wbudzenie 560 nm, emisja 590 nm). W drugim sposobie, po 24 h ekspozycji na mefedron, medium wraz z badanym związkiem zostało usunięte, a każdy dołek przepłukany został roztworem buforu fosforanowego soli fizjologicznej (PBS). Następnie dodano 150 µl medium bez FBS z 10% (v/v) alamarBlue i komórki inkubowano analogicznie jak w sposobie pierwszym. Do przeprowadzenia testu MTT, odczynnik MTT został przygotowany w stężeniu 5 mg/ml w PBS. Analogicznie dodano 10 µl odczynnika. Po 4 godzinnej inkubacji roztwór został usunięty, a powstałe kryształy rozpuszczone w 100 µl DMSO. Absorbancja została zmierzona przy długości fali 562 nm i 620 nm. Wszystkie pomiary wykonano w trzech niezależnych eksperymentach.

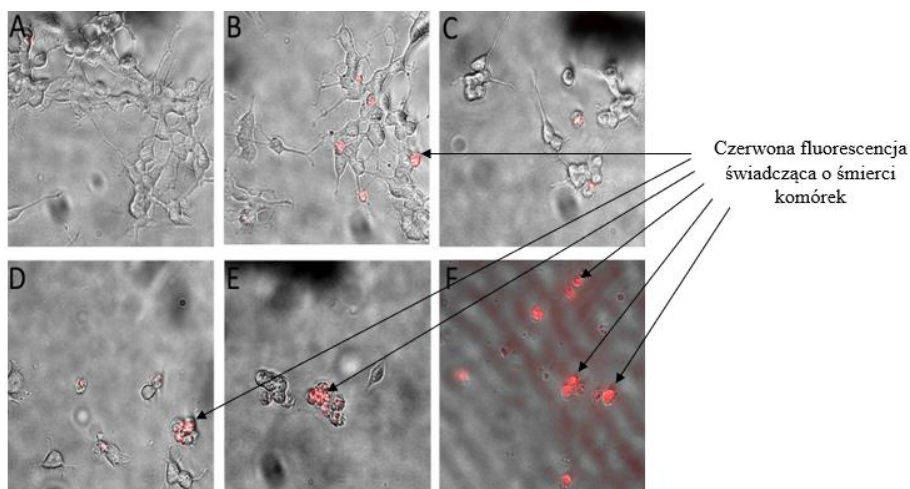
Wizualna ocena żywotności i śmiertelności komórek: Do oceny zmian morfologii komórek oraz wykonania zdjęć po 24 h ekspozycji na mefedron, wykorzystany został analizator żywych komórek JuLIBr. Do potwierdzenia śmierci komórek użyto zestawu do wykrywania nekrozy Annexin V-FITC. Po zakończonej ekspozycji na mefedron, postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Oceny morfologii komórek dokonano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego fluorescencyjnego.

**Wyniki:** Wyniki testów toksyczności mefedronu przeprowadzone na komórkach linii neuroblastoma SH-SY5Y wykazały, że wraz ze wzrostem badanego stężenia mefedronu zaobserwowano znaczący wzrost metabolizmu komórkowego, co powinno bezpośrednio świadczyć o żywotności komórek. Jednakże, obserwacje mikroskopowe nie były spójne z wynikami uzyskani przy użyciu wymienionych testów żywotności komórek (Rys. 1). Pierwsze zmiany morfologiczne komórek zaobserwowano pod mikroskopem już przy najniższym testowanym stężeniu mefedronu – 0,3 mM. W wyższych testowanych stężeniach komórki były martwe,

co zostało potwierdzone również testem barwienia Annexin V-FITC (czerwona fluorescencja komórek nekrotycznych) (Rys.2)



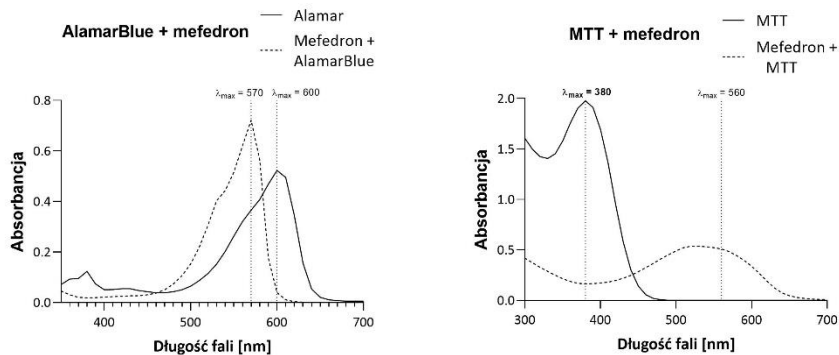
**Rys. 1.** Komórki SH-SY5Y po 24 h ekspozycji na mefedron (A) kontrola negatywna, (B) 0.3 mM, (C) 0.6 mM, (D) 1.25 mM, (E) 2.5 mM, (F) 5 mM.



**Rys. 2.** Komórki SH-SY5Y po 24 h ekspozycji na mefedron (A) kontrola negatywna, (B) 0.3 mM, (C) 0.6 mM, (D) 1.25 mM, (E) 2.5 mM, (F) 5 mM. Czerwona fluorescencja świadczy o śmierci komórek.

Zaobserwowane fałszywie pozytywne wyniki mogły wynikać z reakcji mefedronu z resazuryną (alamarBlue) i solą formazanu (MTT). By potwierdzić tą hipotezę, badanie przeprowadzono ponownie, tym razem bez użycia komórek, a wykorzystując jedynie medium, badany związek i stosowane odczynniki. Reakcja została przeprowadzona w sposób analogiczny jak przeprowadzone wcześniej badanie żywotności komórek – wykorzystano płytki 96-dółkowe oraz identyczne warunki (37°C, 4 h inkubacji). Wybrano stężenie mefedronu 5 mM. Każdą substancję oddzielnie rozpuszczono w PBS, a czysty PBS, w tych samych

objętościach, wykorzystano jako kontrolę. Otrzymane wyniki potwierdziły podejrzaną hipotezę – mefedron spowodował redukcję obu odczynników, co zostało wykazane przez pomiar absorbancji (Rys. 3)



Rys. 3. Pomiary spektrofotometryczne odczynników AlamarBlue i MTT przed i po reakcji z mefedronem.

W celu uzyskania niezafałszowanych wyników, badania przeprowadzono z uwzględnieniem koniecznej zmiany w protokole. Po 24 h ekspozycji komórek na mefedron, zawartość dołków została przepłukana PBS oraz uzupełniona świeżym medium z odczynnikami alamarBlue. Dalsza część procedury została przeprowadzona analogicznie jak wcześniej. Wprowadzenie dodatkowego kroku płukania komórek pozwoliło na uzyskanie wyników testu żywotności komórek spójnych z obrazem mikroskopowym, co pozwoliło na wyznaczenie prawidłowej wartości IC50 mefedronu, która wynosiła 1,3 mM.

**Wnioski:** Niniejsze badania pokazują, że podczas przeprowadzania testów żywotności komórek, kluczowe jest sprawdzenie interakcji pomiędzy badanym związkiem, a substancjami wykorzystywanymi w użytym teście. Ponadto, w celu potwierdzenia wiarygodności wyników, należy przeprowadzić również dodatkowy test oparty na innym mechanizmie działania oraz skorelować otrzymane wyniki z obserwacją mikroskopową.

#### Literatura:

1. T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles i wsp. Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.
2. M. Shoemaker, I. Cohen, M. Campbell, J. Ethnopharmacol, 93 (2004) 381.
3. T. Coccini, S. Vecchio, M. Crevani, U. De Simone, Neurotox Res, 35 (2019) 49.

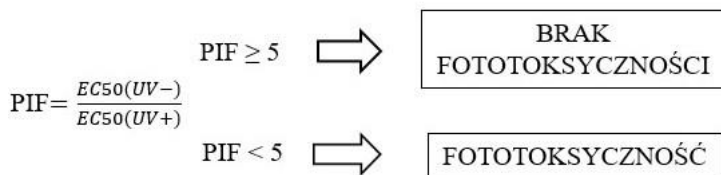
## FOTOTOKSYCZNOŚĆ LEKÓW W BADANIACH PRZEDKLINICZNYCH *IN VITRO*

**K. LEJWODA**, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Chemii Leków, ul. K. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Szkoła Doktorska, ul. Chodźki 7, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** O fototoksyczności leków mówimy, gdy dany lek w obecności promieniowania UV-Vis wykazuje działanie toksyczne na organizm człowieka. Obecnie wszystkie nowe substancje lecznicze przed wprowadzeniem na rynek muszą być poddane testom oceniającym ich potencjał fototoksyczny. Do tych badań należą między innymi badania *in vitro*, np. test wychwytu czerwieni obojętnej (3T3 NRU), testy wykrywające reaktywne formy tlenu, test hemolizy erytrocytów oraz badania prowadzone na modelach sztucznej skóry.

**Wprowadzenie:** Fototoksyczność substancji leczniczych polega na absorpcji promieniowania UV-Vis przez cząsteczkę leku, a następnie uwolnieniu tak zmagazynowanej energii w sposób prowadzący do niekorzystnych zmian w naświetlanych komórkach na skutek działania reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS). Może się to odbywać poprzez różne mechanizmy, tj. w reakcji fotochemicznej typu I transfer elektronu lub protonu prowadzi do powstawania wolnych rodników, natomiast w reakcji fotochemicznej typu II może powstać wzbudzony tlen singletowy, który uczestniczy w oksydacji lipidów błony komórkowej i białek, bądź też indukuje uszkodzenia DNA. Fototoksyczność dotyczy głównie leków stosowanych miejscowo, np. w maściach, kremach czy kroplach do oczu, ponieważ powierzchnie skóry i błon śluzowych są bezpośrednio narażone na działanie światła słonecznego. Do niedawna do badania fototoksyczności leków stosowano głównie testy z udziałem zwierząt. Jednak w obliczu zasady 3R (Replacement, Reduction, Refinement) oraz rozwoju, jaki dokonał się w dziedzinie związanej z metodami alternatywnymi, coraz częściej zaczęto korzystać z dostępnych testów bazujących na modelach *in vitro*. Najważniejszym testem *in vitro* do badania fototoksyczności substancji leczniczych jest test wychwytu czerwieni obojętnej (3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test; 3T3 NRU test). Test ten ma na celu ocenę potencjału fototoksycznego badanej substancji, tzn. istnienia lub braku toksycznego działania tej substancji w połączeniu z ekspozycją na promieniowanie UV-Vis. Badanie fototoksyczności 3T3 NRU *in vitro* opracowano i zwalidowano w ramach wspólnego projektu EU/COLIPA w latach 1992-1997, w celu ustanowienia alternatywy *in vitro* dla różnych stosowanych badań *in vivo* [1]. Aktualnie stanowi na terenie Unii Europejskiej obowiązkową metodę badania działania fototoksycznego. Według wytycznej OECD 101 przed przystąpieniem do badań biologicznych należy określić spektrum absorpcji UV z zakresu widzialnego dla badanej substancji chemicznej. Jeżeli współczynnik molowej ekstynkcji/absorbancji jest mniejszy niż  $10l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ , to dana substancja nie jest fotoreaktywna i nie ma potrzeby jej badać testem 3T3 NRU *in vitro*, ani żadnym innym testem biologicznym na szkodliwe działanie fotochemiczne [2]. Test 3T3 NRU przeprowadza się na mysich fibroblastach (Balb/c 3T3,) porównując wyniki działania cytotoksycznego substancji poddanych

promieniowaniu UVA/Vis do wyników działania cytotoksycznej substancji bez udziału tego promieniowania. Cytotoksyczność wyrażana jest jako zależna od stężenia redukcja wychwyty czerwieni obojętnej (3-amino-7-dimetyloamino-2-metylofenazyny chlorowodoru) 24 godziny po poddaniu działaniu badanej substancji chemicznej i napromienieniu [3]. Kultura komórek Balb/c 3T3 hodowana jest przez 24 godziny w celu utworzenia monowarstw. Następnie po dwie 96-komorowe płytki dla każdego badanego leku są poddawane inkubacji przez 1 godzinę z 8 różnymi stężeniami badanej substancji (maksymalnie do 100 ug/ml). Następnie jedną z dwóch płytek poddaje się niecytotoksycznej dawce promieniowania UVA/Vis równej 5 J/cm<sup>2</sup> (UV+), natomiast drugą płytkę trzyma się w ciemni. (UV-). W obu płytkach pożywkę z badanym lekiem należy zastąpić pożywką do hodowli komórek i inkubować je przez następne 24 godziny. Żywotność komórek określa się metodą wychwyty czerwieni obojętnej (NRU) przez 3 godziny. Dla każdego z ośmiu badanych stężeń określa się względną żywotność komórek, wyrażoną w procentach nienarażonych próbek negatywnych kontroli. W celu określenia fototoksyczności należy porównać odpowiedzi dla stężeń, uzyskane dla próbek napromienionych (UV+) i nie napromienionych (UV-), zazwyczaj na poziomie EC<sub>50</sub>, tzn. stężenia hamującego żywotność komórek o 50 % w porównaniu do próbek niepoddanych działaniu. Uzyskane wyniki ocenia się na podstawie wartości współczynnika fotodrażnienia (PIF) i średniego fotoefektu (MPE). Badana substancja lecznicza wykazuje potencjał fototoksyczny, jeśli PIF ≥ 5 lub MPE ≥ 0,1. Jeżeli PIF < 5 lub MPE < 0,1, to badany lek nie jest fototoksyczny [4].



**Rys.1.** Ocena potencjału fototoksycznego na podstawie PIF (współczynnika fotodrażnienia).

Test wychwyty czerwieni obojętnej nie jest przeznaczony do oceny innego szkodliwego działania, jakie może pojawić się w wyniku łącznego działania leku i światła słonecznego, tj. fotoalergii, fotogenotoksyczności, czy fotokancerogenności. Badanie nie umożliwia także oceny siły działania fototoksycznego. Potencjalne działanie fotoalergizujące lub fotogenotoksyczne można wstępnie ocenić poprzez testy wykrywające reaktywne formy tlenu (ROS) [3]. Dana substancja lecznicza jest fotoreaktywna, gdy wykazuje zdolność do absorpcji fotonów promieniowania o odpowiedniej długości fali. Może to prowadzić do uwalniania reaktywnych form tlenu, np. anionorodnika ponadtlenkowego lub tlenu singletowego. Powodują one uszkodzenia DNA oraz komórek poprzez łączenie się z białkami i lipidami błon komórkowych. Stąd też oznaczenie ROS w próbkach leków narażonych na promieniowanie UV może być pomocne we wstępnym określeniu potencjału fototoksycznego danej substancji. Wykrywanie tlenu singletowego można przeprowadzić poprzez spektrofotometryczny pomiar zmian absorbancji p-nitrozodiemtyloaniliny (RNO) przy długości fali 440 nm. Tlen

singletowy nie reaguje z RNO bezpośrednio, lecz powoduje jej utlenienie na skutek reakcji z imidazolem. Anionorodnik ponadtlenny może być wykrywany poprzez kolorymetryczny pomiar redukcji żółtego błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) do niebieskiego diformazanu przy długości fali 560 nm [3, 5]. Wrażliwość składników błon komórkowych na działanie ROS zostało wykorzystane w teście hemolizy (fotohemolizy) erytrocytów, na podstawie którego można określić potencjał fototoksyczny leków. Czerwone krwinki są poddawane inkubacji z badaną substancją leczniczą i naświetlane promieniowaniem UVA w dawce 20 J/cm<sup>2</sup>. Po naświetleniu są inkubowane w ciemni o temperaturze pokojowej przez 2 h, a następnie w temperaturze 37°C przez kolejną godzinę. Uwolnioną hemoglobinę oznacza się w reakcji z odczynnikami Drabkina (0,03% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0,1% NaHCO<sub>3</sub>, 0,005% KCN). Hemoglobina pod wpływem żelazocyjanku potasu ulega utlenieniu do methemoglobiny. Methemoglobina w reakcji z cyjankiem potasu daje trwały związek, zwany cyjanomethemoglobina. Związek ten charakteryzuje się czerwono-brunatną barwą, a jego maksimum absorpcji mierzy się przy długości fali równej  $\lambda = 540$ . Aktywność fotohemolizyczną oblicza się przy pomocy równania:

$$\text{Fotohemoliza (\%)} = (A - B)/C \times 100$$

A – gęstość optyczna roztworu badanego leku w obecności erytrocytów

B – gęstość optyczna roztworu badanego leku bez obecności erytrocytów

C – gęstość optyczna wszystkich erytrocytów poddanych hemolizie

Wyniki równe 10% lub więcej uznaje się za znaczącą fotohemolizę [5, 6].

Jednym z najbardziej innowacyjnych badań *in vitro* wykorzystywanych w testach fototoksyczności są badania na modelach sztucznej skóry. Modele te w jak największym stopniu muszą naśladować właściwości skóry. Naskórek stworzony w warunkach *in vitro* zachowuje wszystkie funkcje ochronne, a profil lipidowy tych modeli jest niemal identyczny z profilem w warunkach *in vivo* [7]. Jednym z najbardziej wartościowych modeli substytutów skóry stosowanych do oceny działania fototoksycznego na skórę różnych substancji chemicznych, okazała się metoda wykorzystująca hodowle komórkowe i modele tkankowe: EpiSkin®. EpiSkin® stanowi uproszczony model naskórka, ponieważ jego warstwa rogowa jest grubsza i bardziej przepuszczalna w porównaniu z naturalnym naskórkiem. Przygotowanie modelu EpiSkin® polega na pokryciu dna naczynia hodowlanego mieszaniną liofilizowanych kolagenów I i III, imitujących skórę właściwą. Następnie nakładany jest kolagen IV, który stanowi odpowiednik błony podstawnej oraz wysiewa się keratynocyty. Hodowlę jest prowadzona aż do uzyskania ciągłej warstwy komórek wypełniających dno naczynia. Wykazano, że po ok. 7-10 dniach otrzymuje się wysoko zorganizowaną strukturę imitującą żywy naskórek, zbudowany z kolagenu typu IV i VII, integryny, lamininy oraz hemidesmosomów. Badania potwierdziły również obecność w modelu EpiSkin®, takich samych lipidów, jak w naskórku fizjologicznym (m.in. fosfolipidów, ceramidów, glukosfingolipidów, cholesterolu), jednak ich skład charakteryzuje się wyższą zawartością dwu- i trójglicerydów oraz ceramidów [8]. Model EpiSkin® pozwala na określenie występowania fototoksyczności w przypadku danego leku lub jej braku. W tym celu badany lek umieszcza się w sześciu próbkach zrekonstruowanego naskórka (wielkość 0,5 cm<sup>2</sup>). Następnie, przygotowane w ten sposób hodowle komórkowe są inkubowane w temperaturze 37°C przez 24 h, po czym trzy tkanki poddawane są działaniu promieniowania UVA (6 J/cm<sup>2</sup>), a pozostałe trzy są

przechowywane w ciemni w temperaturze pokojowej. Następnie badany lek jest wmywany, a hodowle komórkowe są ponownie inkubowane przez 24 h w temperaturze 37°C. Cała procedura pozwala na określenie żywotności i histologii napromieniowanych i nienapromieniowanych tkanek [9].

**Wnioski:** Przedstawione badania *in vitro* pozwalają na ocenę potencjału fototoksycznego poprzez wykazanie zależności pomiędzy lekiem, promieniowaniem UV a skórą. Dzięki temu można wstępnie ocenić toksyczność badanych substancji leczniczych i częściowo zastąpić testy wykonywane na zwierzętach i na ludziach.

**Literatura:**

1. H. Spielmann, M. Balls, J. Dupuis, *Toxicology in Vitro*, 12 (1998) 305.
2. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris 1996.
3. S. Onoue, Y. Seto, G. Gandy, *Current Drug Safety*, 4 (2009) 123.
4. B. Peters, H.G. Holzthutter, *Altern Lab Anim*, 30 (2002) 415.
5. Kim K., Park H., Lim K.-M., *Toxicol. Res.*, 31 (2015) 97.
6. C. Nam, S. An, E. Lee, *Altern Lab Anim*, 32 (2004) 693.
7. F. Netzlaff, C. Lehr, P. Wertz, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60 (2005) 167.
8. J. Medina, C. Elsaesser, V. Pictarles, *In Vitro & Molecular Toxicology*, 14 (2001) 157.
9. S. Gibbs, *Skin Pharmacology and Physiology*, 22 (2009) 103.

## ROLA MODELU *Danio rerio* W BADANIACH NAD SCHORZENIAMI OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

M. MACIĄG<sup>1,2</sup>, O. WRONIKOWSKA<sup>2</sup>, A. ARCHAŁA<sup>1</sup>, B. BUDZYŃSKA<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Biofarmacji, Al. Raławickie 1, Lublin 20-059, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarski, Samodzielna Pracownia Badań Behawioralnych, Al. Raławickie 1, Lublin 20-059.

**Abstrakt:** *Danio rerio* stanowi pomocne narzędzie w badaniach potencjalnych leków oraz w badaniach genetycznych na wczesnym etapie badań przedklinicznych. Wysoka płodność, łatwe warunki hodowli, niskie koszty badań, a przy tym złożoność modelu sprawiają, że stanowi on pomost pomiędzy łatwymi i opłacalnymi badaniami w warunkach *in vitro*, a znacząco bardziej złożonymi, niemniej jednak dużo bardziej kosztownymi badaniami z wykorzystaniem gryzoni. *Danio rerio* jest szeroko wykorzystywanym modelem do oceny procesów zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym. Duża zgodność genetyczna, fizjologiczna, a w szczególności anatomiczna mózgu *Danio rerio* z ludźmi czyni model ten szczególnie atrakcyjny w badaniach ośrodkowego układu nerwowego. Celem pracy jest omówienie modeli chronicznego stresu, zachowań lękowych oraz interakcji socjalnych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*.

**Wprowadzenie:** Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw fizjologicznych oraz patologicznych procesów zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym wymaga coraz bardziej kompleksowego oraz szczegółowego przeprowadzania badań przedklinicznych. Badania *in silico* oraz *in vitro* stanowią wydajne narzędzia podczas wstępnych testów, jednak nie pozwalają na ocenę złożonych procesów zachodzących w żywym organizmie. Zwierzęce modele doświadczalne opierające się na wykorzystaniu gryzoni są z powodzeniem stosowane w badaniach służących do oceny procesów zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym. Jednak ze względu na wysokie koszty, czasochłonne oraz niskoprzepustowe metody są coraz częściej wypierane przez inne modele badawcze, w tym model danio pręgowanego (*Danio rerio*, ang. zebrafish) [1,2]. *Danio rerio* jest szeroko wykorzystywanym modelem do oceny procesów zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym. Model *Danio rerio* zajmuje szczególną rolę podczas badań wymagających modyfikacji genetycznych oraz podczas poszukiwania nowych kandydatów na leki w trakcie wstępnych badań przesiewowych [2]. Duża zgodność genetyczna, fizjologiczna, a w szczególności anatomiczna mózgu *Danio rerio* z ludźmi czyni model ten szczególnie atrakcyjny w badaniach ośrodkowego układu nerwowego. Co więcej, ostatnie dowody wskazują, że model ten może być z powodzeniem stosowany do oceny zmian zachodzących w mózgu na poziomie molekularnym, odzwierciedlając zmiany zachodzące u innych gatunków [3]. Celem pracy jest omówienie modeli chronicznego stresu, zachowań lękowych oraz interakcji socjalnych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*. Testy te służą do badań



nad mechanizmem opisanych chorób, a także podczas poszukiwania nowych, skuteczniejszych terapii wyżej wymienionych schorzeń.

Model chronicznego stresu z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*

Dotychczas neuropsychiatryczne efekty przewlekłego stresu były oceniane głównie z wykorzystaniem mysich modeli chronicznego stresu. Badania te rozszerzono także na dorosłe osobniki *Danio rerio*, jednak coraz częściej wprowadza się modele, które opierają się na embrionalnej oraz larwalnej postaci *Danio rerio*. Wykorzystanie modelu *Danio rerio* pozwala na poznanie efektów behawioralnych oraz zmian molekularnych w ośrodkowym układzie nerwowym a także daje możliwość przeprowadzenia badań możliwych nowych terapii zaburzeń indukowanych stresem. Chroniczny stres odgrywa szczególną rolę w powstawaniu takich chorób jak choroba Alzheimera, depresja, czy nawet schizofrenia. Dlatego też, wprowadzono liczne testy służące do jego oceny bazując na najbardziej podstawowych, ewolucyjnie stałych zachowaniach wszystkich zwierząt [4, 5]. Podczas oceny poziomu stresu u larw *Danio rerio* posługujemy się w dużej mierze testami opierającymi się na tych samych mechanizmach, które są wykorzystywane podczas testów z wykorzystaniem gryzoni, czy dorosłych ryb *Danio rerio*. Zmniejszona eksploracja, tigmotaksja, czyli przebywanie w pobliżu ścian nowego miejsca oraz zneruchomienie to tylko niektóre z zachowań świadczących o zwiększonym poziomie stresu. Ponadto odpowiedź larw na zmiany oświetlenia pozwala ocenić poziom stresu w odpowiedzi na naprzemienne fazy światło-ciemność. Do oceny tych parametrów służą takie testy jak: test nowego zbiornika (ang. *Novel tank test*), test otwartego pola (ang. *Open field test*) oraz test bazujący na tendencji do tworzenia spójnej ławicy (ang. *Shoaling test*) przez larwy [6, 7]. Odpowiedź na bodźce - stresory zewnętrzne jest obserwowana już u tak młodych osobników jak 10-17-dniowe larwy *Danio rerio*. Do bodźców powodujących nasilenie stresu u larw *Danio rerio* należą:

- 1) stymulacja mechaniczna, poprzez uklucie larwy
- 2) turbulencje, poprzez wymianę medium, w którym znajdują się larwy, a następnie zwiększone napowietrzanie i powtarzanie wielokrotnie
- 3) szok osmotyczny, poprzez narażenie larw na zwiększone ciśnienie osmotyczne
- 4) spadek pH medium w którym znajdują się larwy
- 5) narażenie na zmiany oświetlenia

Podczas oceny wpływu chronicznego stresu na rozwijającą się formę *Danio rerio* można przeprowadzić także pomiary określające rozmiar larw. Dane literaturowe wskazują, że narażenie na przewlekły stres może powodować osłabienie rozwoju morfologicznego larw, a tym samym hamować ich wzrost [6].

Model zachowań lękowych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*

Model *Danio rerio* posiada ugruntowaną pozycję w badaniach behawioralnych oceniających poziom lęku. Badanie, podobnie jak w przypadku poziomu stresu, opiera się na zachowaniach tigmotaktycznych, które obserwowane są już u 5-dniowych ryb. Najczęściej podczas testu larwy umieszcza się wewnątrz dołka płytki wieodołkowej, a następnie dokonuje się pomiaru przebytego dystansu oraz czasu spędzonego przez larwę w wewnętrznej arenie dołka. O przeciwlękowym efekcie (np. badanej substancji) świadczy zahamowanie tigmotaksji, charakteryzujące się wzrostem przebytego dystansu oraz czasu spędzonego w wewnętrznej arenie. W przypadku nasilenia lęku, efekt jest przeciwny. Procedura

badania może zostać wzbogacona o naprzemienne fazy oświetlenia, które działają jako bodziec stresowy na badane ryby [8]. W przypadku dorosłych ryb *Danio rerio* podczas oceny zachowań lękowych wykorzystuje się test otwartego pola, test jasnego i ciemnego pola oraz test unikania drapieżnika (ang. *Predator avoidance*) – naturalnie występującego drapieżnika – ryby *Indian leaf* [9, 10, 11].

Model interakcji socjalnych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*

W tym kontekście model *Danio rerio* jest wykorzystywany do oceny interakcji socjalnych leżących u podstaw wielu procesów związanych z m.in. lękiem, depresją, funkcjami poznawczymi, czy uzależnieniem [12]. Wynika to przede wszystkim z szerokiego wachlarza behawioralnego przejawianego przez ryby *Danio rerio*, a w szczególności naturalnej skłonności do tworzenia spójnej ławicy [9]. Podczas eksperymentów ocenia się czas, który badane 21-dniowe larwy przebywają w pobliżu komory z innymi larwami, w stosunku do czasu spędzanego w pobliżu pustej komory. W ten sposób zostaje oceniony indeks preferencji socjalnej [13].

Charakterystykę wybranych testów behawioralnych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio* przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Porównanie modeli chronicznego stresu, zachowań lękowych oraz interakcji socjalnych z wykorzystaniem larwalnej postaci *Danio rerio*.

Obserwacja	TESTY BEHAVIORALNE		
	MODEL CHRONICZNEGO STRESU	MODEL ZACHOWAŃ LĘKOWYCH	MODEL INTERAKCJI SOCJALNYCH
<b>Ekspozycja oraz wiek larw</b>	Wielokrotna (10 – 17 dniowe larwy)	Jednorazowa lub wielokrotna (5 dniowe larwy)	Jednorazowa (21 dniowe larwy)
<b>Bodziec stresowy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bodziec mechaniczny</li> <li>○ Turbulencje</li> <li>○ Szok osmotyczny</li> <li>○ Spadek pH</li> <li>○ Zmiany oświetlenia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Otwarte pole</li> <li>○ Zmiany oświetlenia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Brak</li> </ul>
<b>Oceniane parametry</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Zmniejszona eksploracja</b></li> <li>○ <b>Tigmotaksja</b>, czyli przebywanie w pobliżu ścian nowego miejsca</li> <li>○ <b>Znieruchomienie</b></li> <li>○ <b>Odległość między badanymi osobnikami</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Tigmotaksja</b> Pomiar przebytego dystansu oraz czasu spędzonego w wewnętrznej arenie dolka</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Indeks preferencji socjalnej</b> Czas, który badane larwy przebywają w pobliżu komory z innymi larwami, w stosunku do czasu spędzanego w pobliżu pustej komory</li> </ul>

**Wnioski:** *Danio rerio* stanowi pomocne narzędzie w badaniach potencjalnych leków oraz w badaniach behawioralnych na wczesnym etapie badań przedklinicznych. Wysoka płodność, łatwe warunki hodowli, niskie koszty badań, a przy tym złożoność modelu sprawiają, że stanowi on pomost pomiędzy łatwymi i opłacalnymi badaniami w warunkach *in vitro*, a znacząco bardziej złożonymi,

niemniej jednak dużo bardziej kosztownymi badaniami z wykorzystaniem gryzoni. W tym kontekście, testy behawioralne opierające się na ocenie przewlekłego stresu, zachowań lękowych oraz interakcji socjalnych mogą przyczynić się do wzbogacenia badań nad patomechanizmem powstawania chorób ośrodkowego nerwowego, a także przyczynić się do poszukiwania nowych kierunków terapii tych schorzeń.

**Literatura:**

1. S. Ali i in., *Birth Defects Research*, 93 (2011) 115.
2. M.B. Ahrens i in., *Current Biology*, 29 (2019) 1138.
3. B. Key oraz C. A. Devine, *Methods in Cell Science*, 25 (2003) 1.
4. S. L. Alderman, N.J. Bernier, *General and Comparative Endocrinology*, 164 (2009) 61.
5. D. L Champagne i in., *Behavioural Brain Research*, 214 (2010) 332.
6. A. Golla i in., *Scientific Reports*, 10 (2020) 10339.
7. S. Ryu oraz R. J. De Marco, *Scientific Reports*, 7 (2017) 7840.
8. M. Maciag i in., *Brain Research Bulletin*, 165 (2020) 139.
9. A. Stewart i in., *Neuropharmacology*, 62 (2012) 135.
10. R.E. Blaser i in., *Behavioural Brain Research*, 208 (2010) 56.
11. R.M. Basnet i in., *Biomedicines*, 7 (2019) 1.
12. S. J. Stednitz i in., *Current Biology* 28 (2018) 2445.
13. J. Landin i in., *Scientific Reports* 10 (2020) 5435.

## BADANIA STRUKTURY POCHODNYCH 1,2,4-TRIAZOLIN-5-TIONU W KONTEKŚCIE INHIBITORÓW KINAZY TYROZYNOWEJ CK1 $\gamma$

A. BORZĘCKI<sup>1</sup>, P. KOZYRA<sup>1</sup>, M. PITUCHA<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Studenckie Koło Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji, Chodźki 4a, 20-093 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Samodzielna Pracownia Radiofarmacji, Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Nowotwory stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów dzisiejszego społeczeństwa, dlatego poszukuje się coraz to nowych leków. Chemia komputerowa umożliwia zwiększenie skuteczności poszukiwania nowych chemioterapeutyków poprzez badanie struktur i ich wzajemną korelację z aktywnością biologiczną. Zbadaliśmy wpływ podstawników pochodnych 1,2,4-triazolu na energię stabilizacji form tautomerycznych, ADME oraz na aktywność biologiczną skierowaną na kinazy tyrozynowej CK1 $\gamma$ . Uzyskane wyniki pozwalają na optymalizację i ukierunkowanie syntez, poprzez wskazanie ugrupowań, które są kluczowe dla mechanizmu działania w odniesieniu do potencjalnych inhibitorów kinazy tyrozynowej CK1 $\gamma$ .

**Wprowadzenie:** Proces wprowadzania leku na rynek jest długotrwały i kosztowny, dlatego naukowcy coraz częściej korzystają z metod chemii komputerowej tzw. podejścia *in silico*. To znacznie ogranicza koszty i pozwala wybrać związek o optymalnych parametrach fizykochemicznych. Optymalizacja wybranej struktury umożliwia określenie oddziaływania z miejscem wiążącym receptora oraz poprawę parametrów farmakokinetycznych. Badanie ilościowej zależności między budową a aktywnością możliwe jest na podstawie analizy QSAR (*quantitative structure-activity relationship*). Pozwala ona na określenie właściwości kluczowych dla aktywności biologicznej danego kandydata na lek [1]. Do opisu właściwości substancji leczniczej stosuje się tzw. deskryptory, które charakteryzują ważne dla aktywności właściwości. Hydrofobowość związku decyduje o zdolności przenikania przez błony biologiczne co ma ogromne znaczenie dla biodostępności. Współczynnik podziału ( $\text{Log}P_{O/W}$ ) umożliwia pomiar hydrofobowości całego związku, a ułamkowy wkład różnych podstawników w hydrofobowość związku opisuje stała hydrofobowości podstawników ( $\pi$ ). Zazwyczaj korelacja pomiędzy aktywnością danego związku a wartościami  $\log P$  jest liniowa. Kolejnym ważnym parametrem są efekty elektronowe, które odpowiadają za jonizację i polarność leku, a tym samym wpływają na jego przenikanie przez błony biologiczne oraz oddziaływania z miejscem aktywnym. Stała Hammetta ( $\sigma$ ) opisuje elektronodonorowe lub elektronoakceptorowe właściwości podstawników znajdujących się w pierścieniu aromatycznym. Ważnym deskrytorem topologiczna powierzchnia polarna (TPSA), która określa polarność związku. Czynniki steryczne, takie jak: objętość, rozmiar i kształt leku wpływają na oddziaływania z miejscem aktywnym. Steryczny czynnik Tafta ( $E_s$ ) umożliwia opis ilościowego wpływu podstawników za pomocą pomiaru stopnia hydrolizy w środowisku kwaśnym. Refrakcja molowa (MR) szacuje objętość zajmowaną przez związek w przestrzeni. Podobnym parametrem jest steryczny parametr Verloopa obliczany komputerowo na

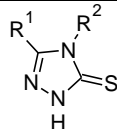
podstawie wartości kątów, długości wiązań oraz możliwych konformacji podstawników. Są to najważniejsze właściwości fizykochemiczne w analizie QSAR [1,2]. W naszej pracy skupiliśmy się na badaniach struktury pochodnych 1,2,4-triazolin-5-tionu w kontekście inhibitorów kinazy tyrozynowej CK1 $\gamma$ . Triazole są obiecującą grupą związków heterocyklicznych, które wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej [10-13]. Jak wiadomo kinazy białkowe cieszą się ogromnym zainteresowaniem naukowców poszukujących nowych substancji leczniczych ze względu na znaczący wpływ na procesy biologiczne komórki oraz kluczową rolę w patogenezie chorób nowotworowych. Kinazy kazeinowe (CK) są jednym z podstawowych elementów sieci regulatorowych i sygnalizacyjnych opartych na fosforylacji białek w komórce eukariotycznej [3]. Udział CK1 w regulacji naprawy DNA, transportu błonowego [4], modulacji ścieżki Wnt /  $\beta$ -kateniny i ścieżki hedgehog podczas rozwoju [5], celularmorfologii [6] oraz regulacji rytmów okołodobowych [7,8] został potwierdzony i opisany w literaturze. A najlepiej udokumentowana jest patologiczna rola CK2 w regulacji procesu nowotworzenia [9]. Pitucha i wsp. zaprojektowali i zsyntetyzowali pochodne 1,2,4-triazolu jak związki o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej [3]. Wykazali oni również obiecującą inhibicyjną aktywność pochodnych 1,2,4-triazolin-5-tionu na kinazę tyrozynową CK1 $\gamma$ . Dlatego celem naszych badań było określenie podstawników warunkujących pożądane właściwości biologiczne.

**Część eksperymentalna:** Związki wygenerowano za pomocą programu Avogadro1.2 i wstępnie zoptymalizowano polem siłowym MMFF94. Następnie za pomocą Orca 4.2.0 obliczono energię Single Point Hartree-Fock dla obu form tautomerycznych. Do wyznaczenia deskryptorów oraz parametrów farmakologicznych związków wykorzystano SwissADME [2].

**Wyniki:** Celem niniejszej pracy były badania strukturalne pochodnych 1,2,4-triazolin-5-tionu w kontekście ich aktywności jako inhibitorów kinazy tyrozynowej CK1 $\gamma$ . Jak wykazano we wcześniejszych badaniach pochodne 1,2,4-triazolu po modyfikacji chemicznej mogą stanowić nową klasę inhibitorów kinazy białkowej CK1 $\gamma$ 3 [3]. Do badań spektroskopowych wytypowano związki przedstawione w Tabeli 1. W związku z możliwością występowania w pochodnych 1,2,4-triazolino-5-tionu tautomerii tiono-tiolowej zbadaliśmy stabilność dwóch form tautomerycznych. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2. Wyzaczyliśmy również parametry MR, TPSA, Log P<sub>o/w</sub> oraz rozpuszczalność w odniesieniu do aktywności IC<sub>50</sub>. Wyniki przedstawiono w Tabeli.3.

**Wnioski:** Biorąc pod uwagę zjawisko tautomerii tiono-tiolowej, preferowana jest forma tionowa. Ponadto, obserwuje się korelację rozpuszczalności, która jest bezpośrednio powiązana, ze współczynnikiem podziału względem aktywności IC<sub>50</sub>. Najaktywniejszy związek posiada grupę pirydylo-4-ylową oraz 4-nitrofenylową.

**Tabela. 1.** Struktury analizowanych pochodnych 1,2,4-triazolu.

		
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>1</b>	pirydyn-2-yl	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>2</b>	pirydyn-3-yl	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>3</b>	pirydyn-4-yl	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>4</b>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
<b>5</b>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>6</b>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>

**Tabela.2.** Wartości energii dla form tautomerycznych.

	forma tionowa	forma tiolowa
1	-1316,0439	-1316,0258
2	-1316,0392	-1316,0203
3	-1316,0381	-1316,0199
4	-1226,729	-1226,7077
5	-1503,3574	-1503,3392
6	-1758,8306	-1758,8137

**Tabela. 3.** Wartości deskryptorów dla podanych związków.

	MR	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Log P <sub>o/w</sub>	Rozp. (mol/l)	IC <sub>50</sub> (μM)* CK1γ3
<b>1</b>	80,8	124,41	2,14	2,88E-05	35±3
<b>2</b>	80,8	124,41	2	2,88E-05	51±4
<b>3</b>	80,8	124,41	2	6,50E-05	176±16
<b>4</b>	102,39	111,52	3,87	1,05E-07	98±8
<b>5</b>	91,83	157,34	2,16	1,54E-06	112±10
<b>6</b>	88,02	111,52	3,09	2,09E-06	55±4

\*wyniki opisane w publikacji [3]

### Literatura:

1. P. Graham, Chemia medyczna, PWN, Warszawa 2019.
2. D.A. Michielin, O. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep, 7 (2017) 42717.
3. M. Pitucha, M. Janeczko, K. Klimek, E. Fornal, M. Wosa, A. Pachuta-Steca, G. Ginalska, A.A. Kaczor, Bioorganic Chemistry 99 (2020) 103806
4. P.D. Lampe, A.F. Lau, Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 (2004) 1171.

5. M.A.Price, *Genes Dev.* 20 (2006) 399.
6. L.C. Robinson, M.M. Menold, S. Garrett, M.R. Culbertson, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 2870.
7. T. Ebisawa, *J. Pharmacol. Sci.*, 103 (2007) 150.
8. Q.J. Meng, L. Logunova, E.S. Maywood, M. Gallego, J. Lebiecki, T.M. Brown, M. Sladek, A.S. Semikhodskii, N.R. Glossop, H.D. Piggins, J.E. Chesham, D.A. Bechtold, S.H. Yoo, J.S. Takahashi, D.M. Virshup, R.P. Boot-Handford, M.H. Hastings, A.S. Loudon, *Neuron* 58 (2008) 78.
9. C.E. Ortega, Y. Seidner, I. Dominguez, *PLoS ONE*, 9 (2014) e115609.
10. G.S. Hassan, S.M. El-Messery, F.A.M. Al-Omary, S.T. Al-Rashood, M.I. Shabayek, Y.S. Abulfadl, E.S.E. Habib, S.M. El-Hallouty, W. Fayad, K.M. Mohamed, B.S. El-Menshawi, H.I. El-Subbagh, *Eur. J. Med. Chem.*, 66 (2013) 135.
11. P. Cikla-Suzgun, N. Kaushik-Basu, A. Basu, P. Arora, T.T. Talele, I. Durmaz, R. Cetin-Atalay, S.G. Kucukguzel, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 30 (2015) 778–785.
12. P.L. Zhao, W.F. Ma, A.N. Duan, M. Zou, Y.C. Yan, W.W. You, S.G. Wu, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 813.
13. A.T.A. Boraei, M.S. Gomaa, E.-S.H. El Ashry, A. Duerkop, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 360.

## OCENA AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ WODNYCH FRAKCJI IZOLOWANYCH Z OWOCNIKÓW BOROWIKA SZLACHETNEGO, KOŻLARZA CZERWONEGO, MAŚLAKA SITARZA ORAZ PODGRZYBKA BRUNATNEGO

A. SKROK<sup>1</sup>, K. WLIZŁO<sup>1</sup>, R. PADUCH<sup>2</sup>, M. SIWULSKI<sup>3</sup>, K. PRÓCHNIAK<sup>1</sup>, A. WIATER<sup>1</sup>, <sup>1</sup>UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, <sup>2</sup>UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, <sup>3</sup>UPP, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Warzywnictwa, ul. Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań.

**Abstrakt:** W pracy badano możliwość wykorzystania wodnych frakcji izolowanych z owocników, jadalnych grzybów leśnych (tj. borowika szlachetnego, koźlarza czerwonego, maślaka sitarza i podgrzybka brunatnego), jako źródła substancji o aktywnościach antyoksydacyjnych. Analizy strukturalne otrzymanych preparatów wykazały zawartość dużych ilości  $\beta$ -glukanów, jako głównego składnika polisacharydowego. Obecność tych polimerów w ekstraktach, przełożyła się na ich wysoką aktywność antyoksydacyjną określoną poprzez pomiar zmiatania wolnych rodników DPPH i redukcji jonów żelaza  $Fe^{3+}$ . Wśród badanych ekstraktów szczególnie aktywny okazała się preparat z borowika szlachetnego i podgrzybka brunatnego.

**Wprowadzenie:** Grzyby są niezwykle różnorodną grupą organizmów liczącą około 140 000 opisanych gatunków. Mają ogromne znaczenie pod względem ich właściwości odżywczych i leczniczych, ponieważ stanowią bogate źródło wielu substancji pokarmowych i związków bioaktywnych. Składniki bioaktywne odpowiadają m.in. za właściwości psychodeliczne, przeciwtleniające, antybakteryjne, antywirusowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, przeciwalergiczne, immunomodulujące i przeciwnowotworowe. Antyoksydanty to grupa związków chemicznych, która ze względu na swoje właściwości odgrywa istotną rolę w diecie człowieka. Są one ważne, ponieważ dzięki swoim mechanizmom redukują ilość tworzących się w organizmie wolnych rodników, odpowiadających za występowanie różnych chorób. Działanie tych związków opiera się na oddawaniu elektronów wolnym rodnikom, nim zostaną one pobrane od innej cząsteczki, np.: DNA, lipidu czy enzymu [1]. W grupie antyoksydantów, szczególne miejsce zajmują polisacharydy, a zwłaszcza  $\beta$ -glukany, izolowane z owocników grzybów jadalnych. Mechanizmy ich działania opierają się głównie na zmiataniu wolnych rodników, hamowaniu procesów peroksydacji lipidów, chelatowaniu jonów oraz zwiększaniu aktywności enzymów SOD, CAT i GP. Szczególnie dużą zdolnością wychwytywania wolnych rodników cechują się (1-6)- $\beta$ -D-glukany, które oddziałują na  $HO\cdot$  i  $O_2\cdot$ . Zdolność cząsteczek polisacharydu do usuwania wolnych rodników może być warunkowana obecnością wodoru w rdzennych podjednostkach polisacharydowych polimeru i rodzajem ich wiązania w bocznych rozgałęzieniach głównego łańcucha. Ponadto zwiększona aktywność antyoksydacyjna  $\beta$ -glukanów może być również spowodowana łatwiejszym

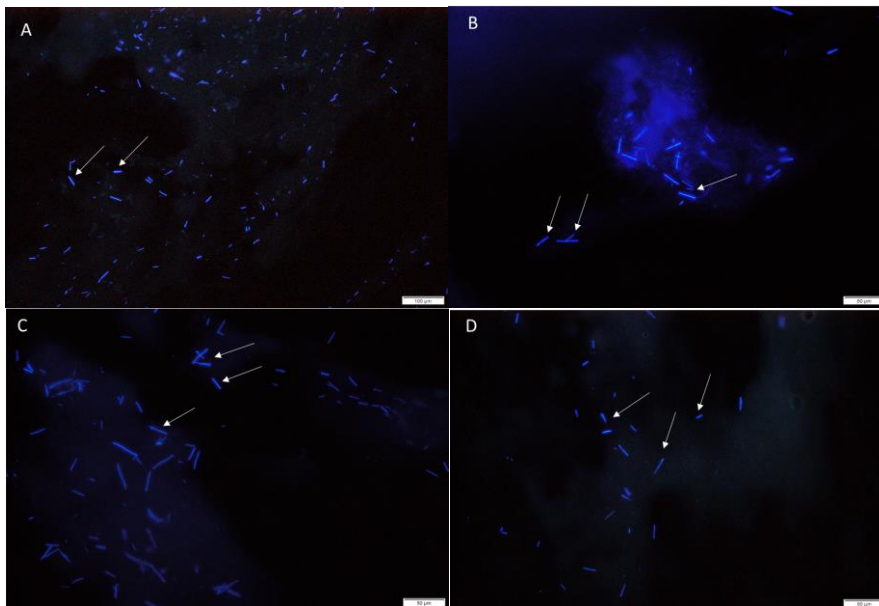


usunięciem anomerycznego wodoru z wewnętrznej jednostki monosacharydowej niż z końca redukującego. Cechy te skutkują zastosowaniem polisacharydów grzybowych (w tym  $\beta$ -glukanów) w produkcji leków i suplementów o działaniu antyoksydacyjnym. Opierają się one na hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów, rozwoju chorób i nowotworów układu pokarmowego, zapalenia jelit czy powstawaniu wrzodów. Ekstrakty uzyskane z grzybów odznaczają się dużą stabilnością i wysokim potencjałem przeciwutleniającym [2]. Celem pracy była ekstrakcja i wstępna charakterystyka strukturalna, rozpuszczalnych w wodzie frakcji, otrzymanych z owocników borowika szlachetnego, koźlarza czerwonego, maślaka sitarza i podgrzybka brunatnego, oraz ocena ich zdolności do wygaszania wolnych rodników tlenowych (DPPH) oraz redukcji jonów żelaza  $Fe^{3+}$  (FRAP).

**Część eksperymentalna:** Do badań wykorzystano owocniki borowika szlachetnego (*Boletus edulis*), koźlarza czerwonego (*Leccinum aurantiacum*), maślaka sitarza (*Suillus bovinus*) oraz podgrzybka brunatnego (*Imleria badia*) zebrane w 2018 roku z naturalnych siedlisk leśnych w okolicach Poznania. Wyizolowane i wysuszone wodne ekstrakty [3] badanych owocników poddano analizom strukturalnym, tj. określono ich skład, profil mas cząsteczkowych składnika cukrowego oraz jego skład monosacharydowy. Ponadto, przy użyciu barwnika Fluorescence Brighter 28 potwierdzono obecność  $\beta$ -glukanów w badanych ekstraktach. Potencjał antyoksydacyjny otrzymanych frakcji określono w oparciu o badanie stopnia redukcji wolnego rodnika DPPH (ang. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*) oraz oznaczanie zdolności redukowania jonów żelaza (FRAP, ang. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter*) [4]. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe z trzech eksperymentów. Analizę wykonano przy użyciu testu ANOVA z następnym testem Dunnetta. Różnice na poziomie  $p \leq 0,05$  oznaczano jako statystycznie istotne.

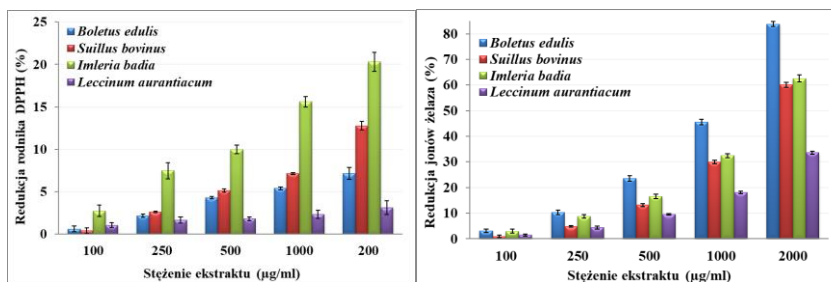
**Wyniki:** Z owocników czterech jadalnych grzybów leśnych, tj. borowika szlachetnego, koźlarza czerwonego, maślaka sitarza oraz podgrzybka brunatnego wyekstrahowano wodne frakcje ścianowe. W otrzymanych ekstraktach oznaczono zawartość węglowodanów oraz białka. Wykazano, że badane ekstrakty składają się głównie z węglowodanów (21-54%), a ilość zawartego w nich białka jest niewielka (2,8-4,7%). W wyniku rozdzielania chromatograficznego HPLC na kolumnie REZEX PolySep™-SEC GFC-P 5000 otrzymano profile polisacharydów zawartych w badanych ekstraktach. Stwierdzono, że w przypadku preparatów otrzymanych z owocników koźlarza czerwonego i maślaka sitarza przeważają polimery o masie cząsteczkowej rzędu 2000 kDa, natomiast we frakcjach otrzymanych z owocników borowika szlachetnego i podgrzybka brunatnego dominują biopolimery cukrowe o masie cząsteczkowej wynoszącej około 60 Da. Analiza składu cukrowego (analiza HPLC z wykorzystaniem kolumny REZEX RCM-Monosaccharide  $Pb^{2+}$ ), polisacharydów obecnych w badanych ekstraktach grzybowych, wykazała obecność pięciu monosacharydów, tj. glukozy, trehalozy, ksylozy, galaktozy oraz mannozy. Przeważającym ilościowo składnikiem cukrowym była glukoza, której ilość w zależności od gatunku grzyba wahała się od 61 do blisko 73%, co świadczy o obecności w analizowanych ekstraktach glukanów jako głównych składników

części cukrowej. Na podstawie barwienia osadów polisacharydowych, specyficznym pod względem wiązań  $\beta$ -glikozydowych, barwnikiem fluorescencyjnym Fluorescence Brighter 28, stwierdzono obecność  $\beta$ -glukanów w badanych ekstraktach (Rys. 1). Obszar luminescencji barwnika był skorelowany z zawartością glukozy w poszczególnych frakcjach. W przypadku borowika szlachetnego i koźlarza czerwonego obszar ten był większy, podobnie jak ilość glukozy zawartej w polisacharydach ścianowych izolowanych z tych grzybów, niż w ekstraktach otrzymanych z owocników podgrzybka brunatnego i maślaka sitarza.



**Rys. 1.** Wybarwione, przy użyciu barwnika Fluorescence Brighter 28, osady polisacharydów ścianowych otrzymanych z owocników borowika szlachetnego (A), koźlarza czerwonego (B), maślaka sitarza (C) oraz podgrzybka brunatnego (D).

Badane ekstrakty, zawierające w swoim składzie  $\beta$ -glukany, posiadały zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH i redukcji jonów żelaza  $Fe^{3+}$  (Rys. 2). Spośród analizowanych preparatów największą aktywność redukcji rodnika DPPH, wykazywał ekstrakt wyizolowany z owocników podgrzybka brunatnego (20,13% przy stężeniu preparatu 2 mg/ml). Natomiast największą aktywność redukcji jonów żelaza, posiadał preparat pochodzący z owocników borowika szlachetnego (83,8% przy stężeniu ekstraktu 2 mg/ml).



**Rys. 2.** Wpływ wodnych ekstraktów izolowanych z owocników borowika szlachetnego (*Boletus edulis*), koźlarza czerwonego (*Leccinum aurantiacum*), maślaka sitarza (*Suillus bovinus*) oraz podgrzybka brunatnego (*Imleria badia*) na zmianę wolnych rodników (DPPH) oraz redukcji jonów żelaza, w stosunku do kontroli (0% redukcji).

**Wnioski:** W podsumowaniu należy podkreślić, że wszystkie analizowane ekstrakty zawierały  $\beta$ -glukany jako składnik polisacharydowy, co zapewne wpływało na ich aktywność antyoksydacyjną. Najlepsze właściwości antyoksydacyjne, oznaczone metodą DPPH, posiadał ekstrakt otrzymany z owocników podgrzybka brunatnego. Z kolei zdolnością największej redukcji jonów żelaza, cechował się ekstrakt pochodzący z owocników borowika szlachetnego. Najniższą aktywnością antyoksydacyjną w obu metodach charakteryzował się ekstrakt z koźlarza czerwonego.

#### Literatura:

1. M. Białek, M. Czaundera, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna 2016.
2. M.S. Kozarski, A.S. Klaus, M.P. Niksić, L.J.L.D. Van Griensven, M.M. Vrvic D.M. Jakovljevic, Hemijska Industrija, 68 (2014) 305.
3. A. Skrok, Praca magisterska, UMCS, Lublin 2020.
4. A. Wiater, R. Paduch, S. Trojnar, A. Choma, M. Pleszczyńska, P. Adamczyk, M. Pięt, K. Próchniak, J. Szczodrak, J. Strawa, M. Tomczyk, Plants, 103 (2020) 1.

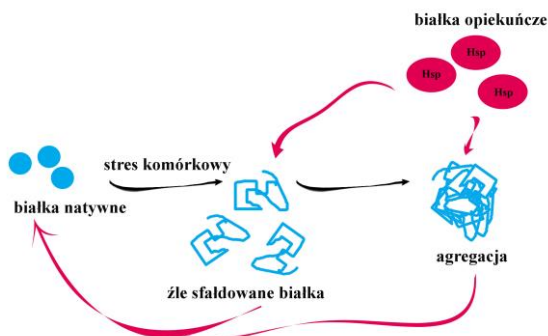
## BIĄŁKA OPIEKUŃCZE I ICH MECHANIZM MOLEKULARNY ZAANGAŻOWANY W FUNKCJE NEUROPROTEKCYJNE

O. KOSZŁA<sup>1</sup>, P. STĘPNICKI<sup>1</sup>, P. SOLEK<sup>2</sup>, A. ARCHAŁA<sup>3</sup>, A. ZIĘBA<sup>1</sup>,  
A.A. KACZOR<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków  
Leczniczych z Pracownią Modelowania Komputerowego, Wydział Farmaceutyczny,  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Doktora Witolda Chodźki 4A, 20-093 Lublin,  
<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii, Instytut Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet  
Rzeszowski, ul. Pigoń 1, 35-310 Rzeszów, <sup>3</sup>Zakład Biofarmacji, Wydział  
Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Doktora Witolda Chodźki 4A,  
20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera czy Parkinsona związane są ze śmiercią komórek nerwowych na skutek agregacji nieprawidłowo sfaldowanych białek. Takie białka powodują powstawanie ciał inkluzyjnych, a ich akumulacja w konsekwencji wywołuje neurotoksyczność. Neurony, reagując na te zdarzenia, wykorzystują mechanizm molekularny białek opiekuńczych, który ułatwia prawidłowe fałdowanie białek, degradację białek źle sfaldowanych oraz zapobiegający ich agregacji. Molekularne szlaki komórkowe regulujące te procesy mogą stać się interesującym celem w terapii zaburzeń neurodegeneracyjnych.

**Wprowadzenie:** Molekularne białka opiekuńcze (ang. *chaperones*) to białka odpowiedzialne za prawidłowe fałdowanie i przemieszczanie się innych białek, jak również odpowiedzialne za wspieranie procesów komórkowych oraz chroniące je przed działaniem czynników stresogennych. Zdolność tych białek do zapobiegania przed niepożądanymi stanami w komórce doprowadziła do nazwania ich białkami opiekuńczymi. Ponadto, w odpowiedzi na szok cieplny dochodzi do wzrostu ekspresji chaperonów, stąd ich oznaczenie jako białka szoku cieplnego (Hsp) [1,2]. Dostępne dane literaturowe wskazują na pięć głównych klas białek opiekuńczych pogrupowanych pod względem ich mas cząsteczkowych do których zaliczamy: Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 oraz niskocząsteczkowe białka opiekuńcze - sHsp [2]. Dostępne dane literaturowe wskazują, że molekularny mechanizm białek szoku cieplnego bierze zasadniczy udział w funkcjach neuroprotektynnych [3]. Badania przedstawiają zależność pomiędzy aktywacją białek szoku cieplnego, a regulacją nieprawidłowego fałdowania białek zaangażowanych w choroby neurodegeneracyjne [4]. Szereg zaburzeń neurodegeneracyjnych charakteryzuje się zmianami konformacyjnymi w białkach, które prowadzą do ich nieprawidłowego fałdowania a w konsekwencji agregacji  $\beta$ -amyloidu w postaci blaszek starczych oraz agregacji białka tau w postaci splątków neurofibrylarnych. Molekularne białka opiekuńcze stanowią pierwszą linię obrony i należą do najsilniejszych supresorów neurodegeneracji, chroniąc przed nieprawidłowym fałdowaniem białek oraz ich agregacją [5]. Jednym z białek opiekuńczych jest białko Hsp60, które jest niezbędne do prawidłowego fałdowania białek mitochondrialnych. Ponadto, pełni funkcję przeżyciową jak i regulującą funkcje śmierci w zależności od cząstek z którymi

oddziałuje oraz rodzaju komórek [6,7]. Rola Hsp60 w chorobach neurodegeneracyjnych nie jest do końca poznana. Jednakże, dane literaturowe wskazują na udział białka Hsp60 głównie w chorobie Alzheimera [8]. Zewnątrzkomórkowe uwalnianie Hsp60 zwiększa produkcję czynników prozapalnych poprzez wiązanie się z receptorem TLR-4 oraz kieruje neurony na drogę śmierci komórkowej, dlatego hamowanie ekspresji Hsp60 odgrywa istotną rolę w mechanizmie ochrony komórek nerwowych [8,9]. Kolejną klasą białek biorących udział w mechanizmie neuroprotekcji są białka Hsp70 [10]. Oprócz ochronnej roli w odpowiedzi na warunki stresowe, białka biorą udział w innych procesach komórkowych, takich jak translacja, translokacja przez błony oraz apoptoza [11]. Dotychczasowe badania wykazały, że wzrost ekspresji Hsp70 hamują agregację beta-amyloidu oraz powoduje jego degradację w wyniku aktywacji odpowiednich enzymów. Co więcej, dane literaturowe potwierdzają, że Hsp70 powoduje wiązanie białka tau z mikrotubulami co przyczynia się do zablokowania jego agregacji. Opisano również znaczący udział Hsp70 w szlaku śmierci komórkowej – apoptozy. Połączenie Hsp70 z kaspazą Apaf-1 zapobiega oligomeryzacji i asocjacji Apaf-1 z prokaspazą-9, powodując hamowanie śmierci neuronów [11,12]. Kolejnym ważnym białkiem opiekuńczym, odgrywającym kluczową rolę w neuroprotekcji jest Hsp90. Jest on znaczącym, molekularnym białkiem zależnym od ATP, który oddziałuje z wieloma współopiekunami. Bierze ono udział nie tylko w prawidłowym fałdowaniu białek a także odpowiada ze ich prawidłowe dojrzewanie, aktywację oraz degradację. Inhibicja Hsp90 prowadzi do wzbudzenia produkcji Hsp70 oraz innych białek opiekuńczych, które powodują dezagregację białek. W układzie nerwowym, zewnątrzkomórkowy Hsp90, powoduje fagocytozę mikrogleju, co prowadzi do degradacji  $\beta$ -amyloidu poprzez aktywację TLR-4 [9,13]. Molekularne białka opiekuńcze do których należy rodzina małych białek szoku cieplnego (sHsp), również odgrywają kluczową rolę ochronną w odpowiedzi na stres. W porównaniu z innymi systemami opiekuńczymi, których działanie jest zależne od ATP, sHsp nie są zdolne do dalszego przetwarzania związanych białek. Jednakże, sHsp mają dużą pojemność wiązania i łączą się wydajnie z innymi białkami, w ten sposób skutecznie zapobiegając procesom agregacji. sHsp stanowią główny składnik komórkowy hamujący oraz regulujący agregację białek jednocześnie powodując usprawnienie procesów dezagregacji w wyniku stresu komórkowego [14].



Rys.1.Schemat

neuroprotekcijnego działania białek opiekuńczych.

Podsumowując, białka opiekuńcze są kluczowymi i podstawowymi czynnikami ochronnymi zaangażowanymi w wiele szlaków komórkowych związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. Dokładne poznanie mechanizmów molekularnych białek opiekuńczych zaangażowanych w funkcje neuroprotekcyjne, może doprowadzić do opracowania skutecznej terapii zaburzeń neurodegeneracyjnych, które są związane z nieprawidłowym fałdowaniem i agregacją białek.

### **Literatura:**

1. J. Buchner, *Journal of Biological Chemistry*, 294 (2019) 2074.
2. N.A.D. Bascos, S.J. Landry, *IJMS*, 20 (2019) 6195.
3. A. Midori, A. Yenari, *Heat Shock Proteins and Neuroprotection*, in: *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, 2002.
4. K. Chaplot, T.S. Jarvela, I. Lindberg, *Secreted Chaperones in Neurodegeneration*, *Front. Aging Neurosci.*, 12 (2020) 268.
5. P.J. Muchowski, J.L. Wacker, *Nat Rev Neurosci.*, 6 (2005) 11.
6. A.M. Merendino, F. Bucchieri, C. Campanella, V. Marcianò, A. Ribbene, S. David, G. Zummo, G. Burgio, D.F.V. Corona, E.C. de Macario, A.J.L. Macario, F. Cappello, *PLoS ONE.*, 5 (2010) e9247.
7. A.M. Czarnicka, C. Campanella, G. Zummo, F. Cappello, *Cancer Biology & Therapy*, 5 (2006) 714.
8. W. Cheng, Y. Li, X. Hou, N. Zhang, J. Ma, F. Ding, F. Li, Z. Miao, Y. Zhang, Q. Qi, G. Li, Y. Shen, J. Liu, W. Huang, Y. Wang, *Molecular Medicine Reports*, 10 (2014) 2172.
9. C. Campanella, A. Pace, C. Caruso Bavisotto, P. Marzullo, A. Marino Gammazza, S. Buscemi, A. Palumbo Piccionello, *Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting*, *IJMS*, 19 (2018) 2603.
10. M.A. Yenari, R.G. Giffard, R.M. Sapolsky, G.K. Steinberg, *Mol Med Today*, 5 (1999) 525.
11. D. Sharma, D.C. Masison, *Protein Pept Lett*, 16 (2009) 571.
12. A. Saleh, S.M. Srinivasula, L. Balkir, P.D. Robbins, E.S. Alnemri, *Nat Cell Biol.* 2 (2000) 476.
13. Y. Lu, S. Ansar, M.L. Michaelis, B.S.J. Blagg, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (2009) 1709.
14. M. Haslbeck, S. Weinkauff, J. Buchner, *Journal of Biological Chemistry*, 294 (2019) 2121.

## **WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE I FARMAKOLOGICZNE NOWYCH ZWIĄZKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWPSTYCHOTYCZNYM**

**P. STĘPNICKI<sup>1</sup>, O. KOSZŁA<sup>1</sup>, A. ARCHAŁA<sup>2</sup>, A. ZIĘBA<sup>1</sup>, A.A. KACZOR<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownią Modelowania Komputerowego, Wydział Farmaceutyczny, Doktora Witolda Chodźki 4A, 20-093 Lublin,

<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny, Doktora Witolda Chodźki 4A, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Leczenie schizofrenii opiera się na redukowaniu jej objawów za pomocą leków przeciwpsychotycznych. Ze względu na złożoność choroby i zaangażowanie w jej rozwój wielu neuroprzekaźników, obecnie poszukuje się leków wielocelowych, które działają jednocześnie na kilka receptorów i dzięki temu są skuteczniejsze od leków selektywnych. Na przestrzeni ostatnich lat pojawia się coraz więcej doniesień na temat nowych związków przeciwpsychotycznych, działających za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G.

**Wprowadzenie:** Leki o działaniu przeciwpsychotycznym stosowane są głównie w leczeniu schizofrenii, która charakteryzowana jest jako zespół zaburzeń psychicznych i która według szacunków dotyczy średnio co setnej osoby [1]. Przyczyny i mechanizm powstawania choroby nadal nie są wystarczająco poznane, wiadomo jednak, że zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym wywołane chorobą dotyczą przede wszystkim neuroprzekaźnictwa dopaminergicznego, glutaminergicznego i serotonergicznego. Z uwagi na powyższe, leczenie schizofrenii polega na redukcji objawów, wśród których wyróżnia się objawy pozytywne, takie jak halucynacje czy omamy, negatywne, np. wycofanie społeczne, osłabienie motywacji, anhedonia, oraz kognitywne, związane z zaburzeniami pamięci i koncentracji. Obecnie dostępne i stosowane w leczeniu schizofrenii leki na ogół wykazują dobrą skuteczność w mitygowaniu objawów pozytywnych, lecz objawy kognitywne i negatywne często są odporne na leczenie dostępnymi neuroleptykami, co skłania do poszukiwań nowych leków, które będą w stanie niwelować wszystkie grupy objawów. Leki przeciwpsychotyczne można podzielić na trzy grupy według ich profilu receptorowego. Leki pierwszej generacji są antagonistami receptora dopaminowego D<sub>2</sub>, leki drugiej generacji wykazują słabsze powinowactwo do tego receptora, a wysokie do receptora serotoninowego 5-HT<sub>2A</sub>, natomiast mechanizmem działania neuroleptyków trzeciej generacji jest głównie częściowy lub stroniczy agonizm w stosunku do receptorów 5-HT<sub>1A</sub> i D<sub>2</sub>. Wpływ na różne grupy receptorów oraz zmniejszone powinowactwo do receptora dopaminowego D<sub>2</sub> powoduje, że leki nowszych generacji są skuteczniejsze w leczeniu wszystkich typów objawów oraz wywołują mniej działań niepożądanych wynikających z blokady receptora D<sub>2</sub>, głównie objawów parkinsonowskich, które są charakterystyczne dla leków pierwszej generacji. Obecnie w chemii medycznej i procesie projektowania leków przeważa koncepcja leków wielocelowych, która polega na opracowaniu cząsteczki wykazującej powinowactwo jednocześnie do wielu celów molekularnych zaangażowanych w rozwój danej choroby. Jest to

istotne w schorzeniach o złożonym patomechanizmie, gdyż pozwala na stosowanie jednego leku zamiast kilku leków działających selektywnie na jeden cel, dzięki czemu unika się interakcji między lekami, a także zmniejszone jest ryzyko wystąpienia działań niepożądanych [2,3]. W ostatnich latach również w poszukiwaniu nowych leków przeciwpsychotycznych do leczenia schizofrenii naukowcy koncentrują się na cząsteczkach wielocelowych, działających na różne receptory GPCR, głównie dopaminowe i serotoninowe. Poniżej przedstawiono przykłady takich związków chemicznych. Kaczor i in. w 2016 r. wykonali wirtualny skrining w oparciu o model homologiczny receptora dopaminowego D<sub>2</sub>, w wyniku którego zidentyfikowano ligandy tego receptora [4]. Spośród nich najbardziej aktywne związki (1, 2, 3, 4 na rys. 1) poddano szczegółowej charakterystyce strukturalnej i farmakologicznej [5-7]. Związki 1 i 4 posiadają układ piperydyny, natomiast związek 3 układ piperazyny, których aminowy atom azotu oddziałuje z kwasem asparaginowym Asp(3.32) w kieszeni wiążącej receptora D<sub>2</sub>, co jest zgodne z modelem farmakoforowym dla antagonistów tego receptora. Co ciekawe, związek 2 nie posiada protonowalnego atomu azotu, a jego sposób oddziaływania z celem molekularnym nie jest jeszcze dokładnie poznany. Powinowactwa zidentyfikowanych związków do określonych receptorów przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Powinowactwo nowych związków o działaniu przeciwpsychotycznym do receptorów GPCR, wyrażone jako K<sub>i</sub> [nM] lub procent inhibicji przy 10 μM. ND – nie określono.

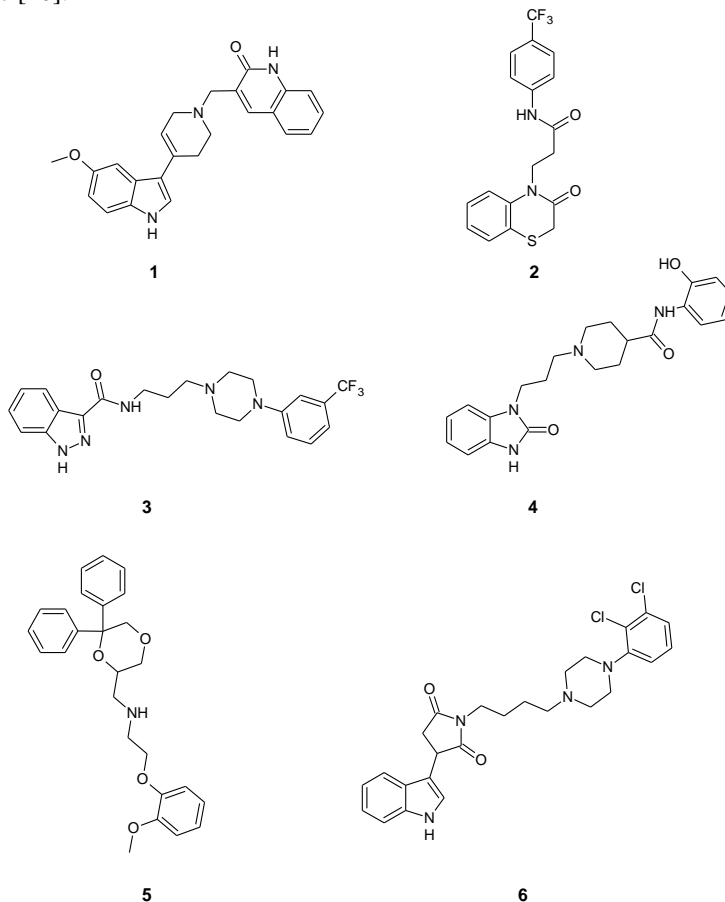
	D <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>7</sub>
1	58,1	1418	614	125	358	ND
2	58,4	2%	0%	13480	6%	ND
3	115	469	551	51,4	151	807
4	1895	2549	9525	9%	516	6607
5	7,91	ND	7,88	9,18	ND	ND
6	182	ND	ND	1,3	ND	ND

W 2019 r. Del Bello i in. odkryli nowe związki a działaniu przeciwpsychotycznym [8], spośród których związek 5 (rys. 1) wykazuje wysokie powinowactwo do receptora dopaminowego D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> a także do receptora serotoninowego 5-HT<sub>1A</sub> (Tabela 1). Związki o takim profilu receptorowym określane są jako stabilizatory systemu dopaminowo-serotoninowego, podobnie jak leki przeciwpsychotyczne trzeciej generacji. Związek 5 posiada w swej budowie drugorzędową aminę, która po sprotonowaniu umożliwia oddziaływanie z aminergicznymi receptorami GPCR.

Wróbel i in. w 2020 r. otrzymali serię związków o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu schizofrenii [9], z których najbardziej obiecująca cząsteczka (6 na rys. 1) posiada wysokie powinowactwo do receptora serotoninowego 5-HT<sub>1A</sub> oraz dopaminowego D<sub>2</sub> (Tabela 1). W jej budowie chemicznej występuje układ 1-butylo-4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyny, który charakterystyczny jest również dla neuroleptyku trzeciej generacji, aripiprazolu. Wspólne elementy strukturalne tych związków znajdują odzwierciedlenie w ich podobnym profilu działania receptorowego. Przywołane powyżej wielocelowe związki o działaniu przeciwpsychotycznym wywołują swój efekt za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G, głównie dopaminowych i serotoninowych, podobnie jak



leki dostępne na rynku. Obecnie co raz więcej starań jest przykładanych do poszukiwania leków przeciwpsychotycznych działających na inne cele molekularne, takie jak receptory NMDA, receptory nikotynowe, fosfodiesterazy czy katechol-O-metylotransferazę, jednak do tej pory nie odniesiono większych sukcesów w tym obszarze [10].



Rys. 1. Nowe wielocelowe związki chemiczne o działaniu przeciwpsychotycznym

### Literatura:

1. P. Stępnicki, M. Kondej, A. A. Kaczor, *Molecules*, 23 (2018) 2087.
2. B. L. Roth, D. J. Sheffler, W. K. Kroeze, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 353.
3. M. Kondej, P. Stępnicki, A. A. Kaczor, *Int J Mol Sci*, 19 (2018) 3105.
4. A. A. Kaczor, A. G. Silva, M. I. Loza, P. Kolb, M. Castro, A. Poso, *ChemMedChem*, 11 (2016) 718.
5. A. A. Kaczor, K. M. Targowska-Duda, B. Budzyńska, G. Biała, A. G. Silva, M. Castro, *Neurochem Int*, 96 (2016) 84.
6. A. A. Kaczor, K. M. Targowska-Duda, P. Stępnicki, A. G. Silva, O. Koszła, E. Kędzińska, A. Grudzińska, M. Kruk-Słomka, G. Biała, M. Castro, *Neurochem Int*, (2021) in press.
7. A. A. Kaczor, K. M. Targowska-Duda, A. G. Silva, M. Kondej, G. Biała, M. Castro, *Biomolecules*, 10 (2020) 348.
8. F. Del Bello, D. Ambrosini, A. Bonifazi, A. H. Newman, T. M. Keck, M. Giannella, G. Giorgioni, A. Piergentili, L. Cappellacci, A. Cilia, S. Franchini, W. Quaglia, *ACS Chem Neurosci*, 10 (2019) 2222.

9. M. Z. Wróbel, A. Chodkowski, M. Marciniak, M. Dawidowski, A. Maksymiuk, A. Siwek, G. Nowak, J. Turło, *Bioorganic Chemistry*, 97 (2020) 103662
10. P. Stepnicki, M. Kondej, O. Koszła, J. Żuk, A. A. Kaczor, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 16 (2021) 101.

## LIOFILIZOWANA GRZYBNIA *CHRYSOSPORIUM PANNORUM* A-1 JAKO WYDAJNY BIOKATALIZATOR SYNTEZY ESTRÓW TERPENOWYCH

**M. KUTYŁA, M. TRYTEK**, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Akademicka 19, 20-033 Lublin.

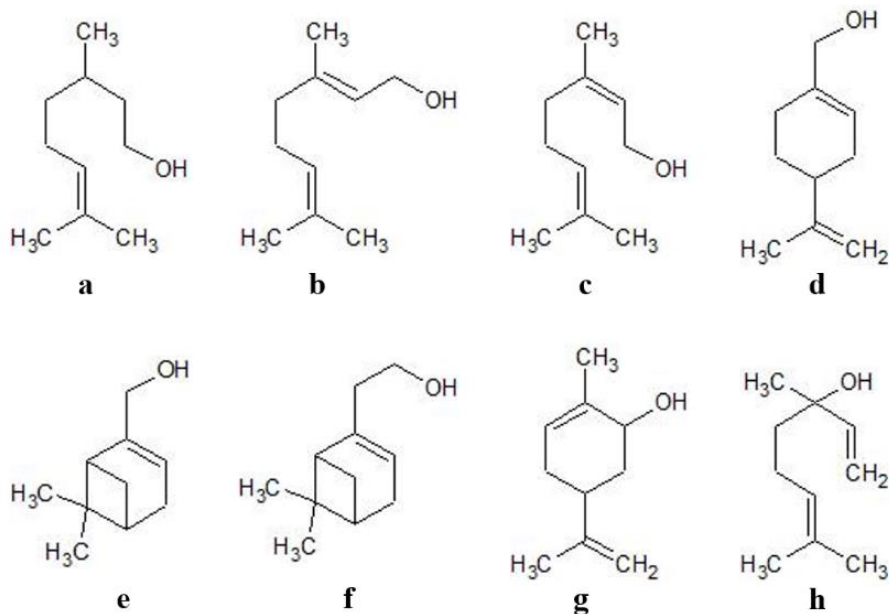
**Abstrakt:** W badaniach nad estryfikacją alkoholi terpenowych wykorzystano liofilizowaną grzybnię psychrotroficznego grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1. Zbadano wpływ struktury alkoholi terpenowych oraz długości łańcucha kwasu karboksylowego na wydajność estryfikacji w heksanie. Najwyższą wydajność reakcji uzyskano dla pierwszorzędowych alkoholi terpenowych (i była ona wyższa dla alkoholi monocyklicznych, nieco niższa dla liniowych, zaś najniższa dla bicyklicznych). Biokatalizator wykazywał śladową aktywność w estryfikacji alkoholu II-rzędowego i zerową w stosunku do alkoholu III-rzędowego. Wraz ze wzrostem długości łańcucha kwasu użytego w estryfikacji wzrasta wydajność biokatalizy.

**Wprowadzenie:** Estry alkoholi terpenowych są cennymi związkami szeroko wykorzystywanymi w przemyśle perfumeryjnym i kosmetycznym [1]. Pomimo, że są to związki naturalnie występujące w olejkach eterycznych roślin, ich duże zapotrzebowanie w przemyśle nie jest zaspokajane przez produkcję z wykorzystaniem naturalnych źródeł [2]. Jest to związane z niskim stężeniem terpenoidów w olejkach oraz naturalną ich hydrolizą zachodzącą w trakcie ekstrakcji [3]. Alternatywną metodą dla wytwarzania „naturalnych” estrów terpenowych jest enzymatyczna estryfikacja alkoholi terpenowych z kwasami karboksylowymi przy użyciu lipaz. Zgodnie z przepisami Unii Europejskiej i Stanów Zjednoczonych, związki wytworzone w ten sposób mogą być określane jako „naturalne”, na równi ze związkami pochodzenia roślinnego [4]. Lipazy (EC 3.1.1.1) to klasa enzymów hydrolitycznych wykorzystywanych jako biokatalizatory w reakcjach hydrolizy, estryfikacji, transestryfikacji, czy epoksydacji. Wykazują wysoką selektywność i specyficzność substratową, a także możliwość utrzymania aktywności katalitycznej w warunkach niewodnych [5,6]. Lipazy bakteryjne i grzybicze, najczęściej wykorzystywane w bioprocessach, są zwykle wydzielane na zewnątrz komórki [7]. Z tego względu konieczne jest zatężenie i oczyszczenie enzymu z płynu pohodowlanego oraz jego immobilizacja w celu wielokrotnego wykorzystania w biokatalizie. Operacje te są zwykle związane z wysokim kosztem uzyskania czystego preparatu i utratą części jego aktywności katalitycznej. Tanim źródłem naturalnie zimmobilizowanego biokatalizatora do reakcji estryfikacji jest wewnątrzkomórkowa lipaza połączona z hydrofobową ścianą komórkową grzyba [8-10].

**Część eksperymentalna:** Reakcje estryfikacji prowadzono w heksanie zawierającym 3% (w/v) biokatalizatora, przy równomolowym, 50 mM stężeniu alkoholu terpenowego i kwasu, w 30°C przez 24 godz., w szczelnie zamkniętych kolbkach Erlenmeyera o 25 ml. Wydajność reakcji określono za pomocą

chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym i wyrażono jako % konwersji molowej alkoholu do estru. W celu uzyskania biokatalizatora do reakcji estryfikacji, przeprowadzono hodowlę psychrotroficznego grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum* A-1 w kolbach Erlenmeyera a' 300 ml zawierających 50 ml płynnego podłoża (oliwa z oliwek 10 g/L, Tween 80 5 g/L, ekstrakt drożdżowy 1 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L,  $\text{CaCO}_3$  5 g/L, pH 6) na wytrząsarce orbitalnej (150 RPM) przez 5 dni w 20°C. Po zakończeniu hodowli, grzybnię oddzielono od płynu pochodowlanego za pomocą filtracji próżniowej oraz przemyto 200 ml wody destylowanej. Przepłukaną i odsączoną grzybnię zmrożono w -20°C przez noc, następnie liofilizowano przez 24 godz. Wysuszoną grzybnię zmielono do postaci jednorodnego proszku i wykorzystywano jako biokatalizator w estryfikacji.

**Wyniki:** W badaniach nad estryfikacją z użyciem lipazy związanej z grzybnią *Ch. pannorum* A-1 wykorzystano alkohole terpenowe o zróżnicowanej strukturze (**Rys. 1.**) oraz kwasy karboksylowe o różnej długości łańcucha węglowego.



**Rys. 1.** Struktury alkoholi terpenowych wykorzystanych w estryfikacji katalizowanej przez zliofilizowaną grzybnię *Ch. pannorum* A-1. **a** – citronellol, **b** – geraniol, **c** – nerol, **d** – alkohol perylowy, **e** – myrtenol, **f** – nopol, **g** – karweol, **h** – linalol.

Zaobserwowano, że wydajność estryfikacji jest ściśle związana ze strukturą przestrzenną alkoholi. Spośród badanych pierwszorzędowych alkoholi terpenowych najwyższą konwersję molową uzyskano dla monocyklicznego alkoholu perylowego oraz alkoholi liniowych (citronellolu, geraniolu i nerolu) (Tab. 1.). W reakcji alkoholi liniowych z krótkołańcuchowymi kwasami (octowym, propionowym i masłowym) na wydajność estryfikacji miała wpływ liczba wiązań podwójnych

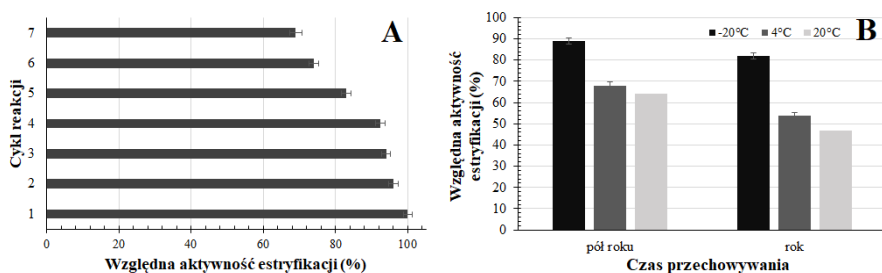
w cząsteczce alkoholu (citronellol – geraniol) oraz izomeria konformacyjna (geraniol – nerol). Najniższą wydajność estryfikacji uzyskano dla alkoholi bicyklicznych – myrtenolu i nopolu, co może świadczyć o zawadzie przestrzennej takich cząsteczek w dostępie do centrum katalitycznego enzymu. W przypadku estryfikacji II-rzędowego karweolu z kwasem octowym wydajność reakcji po 24 godzinach nie przekraczała 1,4%, zaś z kwasem walerianowym 2,5%. Z kolei w estryfikacji III-rzędowego alkoholu – linalolu, liofilizowana grzybnia *Ch. pannorum* A-1 nie wykazywała aktywności z jakimkolwiek kwasem karboksylowym. Generalnie wraz ze wzrostem długości łańcucha nasyconego kwasu obserwowano wzrost wydajności estryfikacji. Może to świadczyć o negatywnym wpływie krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych na stabilność enzymu i inhibicji jego aktywności lipolitycznej. Znany jest efekt inhibicji aktywności katalitycznej lipaz przez kwas octowy, prawdopodobnie w wyniku znacznego zakwaszenia mikrośrodowiska enzymu [11]. W przypadku estryfikacji alkoholi z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi zawierającymi wiązanie podwójne, wykazano, że wydajność jest zależna od struktury użytego alkoholu terpenowego (**Tab. 1**).

**Tabela 1.** Wpływ struktury pierwszorzędowej alkoholu terpenowego oraz długości łańcucha węglowego kwasu karboksylowego na wydajność estryfikacji (%) przy użyciu lipazy związanej z grzybnią *Ch. pannorum* A-1.

Wydajność estryfikacji (%)									
	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>18:3</sub> , Δ <sup>6,9,12</sup>	C <sub>18:1</sub> , Δ <sup>9</sup>
Citronellol	78 ±1,1	86 ±0,9	95 ±0,8	96 ±0,5	97 ±0,6	97 ±0,4	97 ±1,2	80 ±0,3	82 ±0,5
Geraniol	51 ±0,8	71 ±1,2	88 ±1,8	96 ±0,6	96 ±1,7	95 ±0,4	97 ±0,8	0	33 ±0,9
Nerol	34 ±1,2	39 ±2,1	60 ±0,8	87 ±1,1	70 ±0,8	69 ±0,5	47 ±1,5	0	0
Alkohol perylowy	91 ±0,4	92 ±0,8	94 ±0,5	94 ±0,5	95 ±1,1	96 ±0,9	97 ±0,6	67 ±2,3	0
Myrtenol	12 ±0,9	35 ±1,2	58 ±0,7	67 ±0,3	74 ±1,3	75 ±0,5	54 ±0,3	0	12 ±0,9
Nopol	11 ±0,4	23 ±0,9	44 ±0,9	52 ±1,1	49 ±2,1	58 ±0,3	31 ±0,4	0	0

C<sub>2</sub> – kwas octowy; C<sub>3</sub> – kwas propionowy; C<sub>4</sub> – kwas masłowy; C<sub>5</sub> – kwas walerianowy; C<sub>8</sub> – kwas kaprylowy; C<sub>9</sub> – kwas pelargonowy; C<sub>12</sub> – kwas laurynowy; C<sub>18:3</sub>, Δ<sup>6,9,12</sup> – kwas γ-linolenowy; C<sub>18:1</sub>, Δ<sup>9</sup> – kwas oleinowy

W dalszym etapie zbadano możliwość wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora w kilku następujących po sobie cyklach katalitycznych. Zbadano także stabilność liofilizowanej grzybni w trakcie rocznego przechowywania w -20, 4 i 20°C. Wykazano, że lipaza związana z grzybnią *Ch. pannorum* zachowuje nawet 70% swojej początkowej aktywności po siedmiu 24-godz. cyklach biokatalitycznych (Rys. 2A). W wyniku rocznego przechowywania w temperaturze -20°C, biokatalizator stracił 18% swojej wyjściowej aktywności. Istotny spadek aktywności zaobserwowano po półrocznym przechowywaniu grzybni w 4 i 20°C (odpowiednio o 32 i 36%) (Rys. 2B).



**Rys. 2.** Względna aktywność biokatalizatora w 24-godz. cyklach katalitycznych reakcji estryfikacji (A) oraz stabilność grzybnia *Ch. pannorum* A-1 w trakcie półrocznego i rocznego przechowywania w -20, 4 i 20°C (B).

**Wnioski:** Liofilizowana grzybnia *Chrysosporium pannorum* A-1 jest wydajnym i tanim biokatalizatorem syntezy estrów pierwszorzędowych alkoholi terpenowych. Wydajność biokatalizy zależy od struktury alkoholu terpenowego oraz długości łańcucha użytego kwasu karboksylowego. Biokatalizator może być zastosowany w skali preparatywnej, ponieważ wykazuje wysoką aktywność w reakcji estryfikacji w stosunkowo niskiej temperaturze, można użyć go wielokrotnie w następujących po sobie 24-godz. cyklach katalitycznych, a także zachowuje ponad 80% aktywności w trakcie rocznego przechowywania w temp. -20°C.

#### Literatura:

1. L. De Oliveira Felipe, A.M. De Oliveira, J.L. Bicas, Trends in Food Science and Technology, 62 (2017) 141.
2. V.V Costa, K.A. Da Silva Rocha, L.C.A. Oliveira, E.F. Kozhevnikova, I.V. Kozhevnikovc, E.V. Gusevskaya, RSC Advances, 6 (2016) 43217.
3. T. Olsen, F. Kerton, R. Marriott, G. Grogan, Enzyme and Microbial Technology, 39 (2006) 621.
4. C. Gupta, D. Prakash, S.A. Gupta, Journal of Microbiology and Experimentation, 2 (2015) 00034.
5. D.A. Sánchez, G.M. Tonetto, M.L. Ferreira, Biotechnology and Bioengineering, 115 (2018) 6.
6. E. Vanleeuw, S. Winderickx, K. Thevissen, B. Lagrain, M. Dusselier, B.P.A. Cammue, B.F. Sels, ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 7 2019 15828.
7. D. Bharathi, G. Rajalakshmi, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 22 (2019) 101368.
8. F. Molinari, R. Gandolfi, A. Converti, M. Zilli, Enzyme and Microbial Technology, 27 (2000) 626.
9. J.L. Loo, A. Khoramnia, O.M. Lai, K. Long, H.M. Ghazali, Molecules, 19 (2014) 8556.
10. V.L. Colin, M.D. Baigorí, L.M. Pera, Journal of Basic Microbiology, 51 (2011) 236.
11. N. Mhetras, S. Patil, D. Gokhale, Indian Journal of Microbiology, 50 (2010) 432.

## **ZNACZENIE INHIBICJI FAAH W TERAPII WYBRANYCH JEDNOSTEK CHOROBYCH**

**A. ZIĘBA<sup>1</sup>, P. STEPNIKI<sup>1</sup>, O. KOSZŁA<sup>1</sup>, D. MATOSIUK<sup>1</sup>, A.A. KACZOR<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, ul. Chodźki 4a, 20-400 Lublin <sup>2</sup>Szkoła Farmacji, Uniwersytet Wschodniej Finlandii Yliopistonranta 1, P.O. Box 1627, FI-70211 Kuopio, Finlandia.

**Abstrakt:** Do niedawna badaniem wpływu konopi indyjskich na organizm człowieka interesowała się tylko niewielka część naukowców. Odkrycie receptorów układu endokannabinoidowego (ECS) i ich endogennych lipidowych ligandów doprowadziło do znacznego wzrostu zainteresowania tym tematem. Aktualne doniesienia potwierdzają skuteczność endokannabinoidów w leczeniu bezsenności, bólu przewlekłego, chorób zapalnych i neurodegeneracyjnych. Istnieje wiele strategii pozwalających na modulowanie przewodnictwa w ECS. Jedną z nich jest hamowanie aktywności enzymatycznej hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH). FAAH jest białkiem, którego aktywność ściśle koreluje się z rozkładem endogennych ligandów układu, głównie anandamidu (AEA). Niniejsza praca stanowi przegląd informacji dotyczących potencjału terapeutycznego układu endokannabinoidowego, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania inhibitorów FAAH w leczeniu depresji.

**Wprowadzenie:** Uważa się, że rok 1992 był początkiem wzrostu zainteresowania funkcjami układu endokannabinoidowego (ECS). W tym okresie zidentyfikowano anandamid – jeden z najsilniej działających ligandów tego układu [1]. ECS działa za pośrednictwem dwóch głównych typów receptorów: CB<sub>1</sub> oraz CB<sub>2</sub>. Badania strukturalne wykazały, że wspomniane białka zaliczane są do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (7TM, GPCR). Ponadto przeprowadzone analizy anatomiczne potwierdziły, że białka receptorowe tego układu wykazują bardzo zróżnicowany wzór dystrybucji w organizmie. Oznacza to, że podtyp CB<sub>1</sub> jest charakterystyczny głównie dla centralnego układu nerwowego, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych i komórek wątroby, podczas gdy podtyp CB<sub>2</sub> znacznie częściej występuje w obwodowym układzie nerwowym i na komórkach odpornościowych [2,3]. Do endogennych (wytwarzanych w ludzkim organizmie) ligandów układu endokannabinoidowego zaliczamy m.in. anandamid (AEA), 2-arachidonyloglicerol, N-arachidonyldopaminę. Wszystkie wymienione związki zaliczane są do kategorii amidów kwasów tłuszczowych i wydzielane są „na żądanie” z błonowych prekursorów fosfolipidowych [1]. Za metabolizm związków zaliczanych do wspomnianej grupy odpowiedzialne są głównie dwa enzymy: hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) oraz lipaza monoacyloglicerolowa (MAGL) [4]. Badania przeprowadzone na populacji zmodyfikowanych genetycznie gryzoni (pozbawionych enzymu) wykazały, że spośród wymienionych substancji to właśnie FAAH jest najmocniej związany z rozkładem endogennych amidów kwasów tłuszczowych. Brak hydrolazy prowadzi do wzmocnionej odpowiedzi na ligandy, która może przejawiać się jako analgeza, hipotermia oraz katalepsja.

Hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) to integralny enzym błonowy, klasyfikowany jako przedstawiciel rodziny seryno-hydrolaz. Obecność tego białka została odkryta przy okazji dokładnych analiz anandamidu. Pierwsze informacje na temat przestrzennej struktury enzymu opublikowano w 2002 roku (PDB ID:1MT5) [5]. Dalsze badania nad strukturą tego celu molekularnego doprowadziły do odkrycia specyficznego ugrupowania aminokwasowego określanego mianem katalitycznej triady (Ser-241/Ser-217/Lys-142) któremu przypisuje się główny udział w procesie hydrolizy amidów kwasów tłuszczowych [6]. Szczególne znaczenie wspomnianego ugrupowania podkreśla fakt, iż istnienie mutacji w obrębie którejs z wymienionych reszt aminokwasowych znacznie obniża aktywność biologiczną FAAH. Wszystkie zaprezentowane odkrycia naukowe przyczyniły się do rozwoju teorii, zakładającej, że umiejętne blokowanie aktywności enzymatycznej FAAH może stać się ważnym podejściem terapeutycznym, przydatnym w leczeniu wielu jednostek chorobowych. Warto podkreślić, że ten sposób modulowania przekazywania w układzie endokannabinoidowym jest znacznie korzystniejszy od bezpośredniego podawania egzogennych ligandów ECS, ponieważ zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia działań niepożądanych takich jak m.in. zaburzenia pamięci czy halucynacje.

**Część eksperymentalna:** Praca stanowi przegląd aktualnych doniesień naukowych, podsumowujący stan wiedzy nt. wykorzystania inhibitorów enzymu FAAH w farmakoterapii. Ze względu na obszerny zakres danych nie obejmie ona wszystkich zagadnień związanych z tematem. Autorzy skupili się na analizie opublikowanych w ostatnich dwóch dekadach informacji dot. wykorzystania inhibitorów FAAH w leczeniu depresji. Do wyszukiwania powiązanych z tematem publikacji wykorzystano ogólnodostępne bazy naukowe (ScienceDirect, PubMed, Google Scholar).

**Wyniki:** Depresja jest chorobą coraz częściej diagnozowaną w społeczeństwie, zajmuje drugie miejsce wśród zaburzeń będących najczęstszymi przyczynami przedwczesnej śmierci lub uszczerbku na zdrowiu [7], [8]. Mimo tego, że na rynku dostępnych jest wiele preparatów, które mogą być stosowane w terapii depresji, wiele z nich powoduje silne działania niepożądane i może prowadzić do nasilenia objawów choroby (zwłaszcza w początkowym okresie leczenia). Trudności w znalezieniu odpowiednio skutecznego i bezpiecznego leku przydatnego w terapii depresji wynikają ze złożonego patomechanizmu choroby, który może być tłumaczony jako występowanie powodowanych przez stres zaburzeń funkcji podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) [9,10]. W ostatnich latach pojawiły się teorie sugerujące występowanie powiązań pomiędzy nasileniem przekazywania endokannabinoidowego a łagodzeniem objawów depresji i lęku. Udało się również ustalić, że zawartości endokannabinoidów w tkankach chorych na depresję i zespół stresu pourazowego znacznie różnią się od poziomów tych substancji oznaczonych w mózgach zdrowych badanych. Ponadto ekspresja receptorów CB<sub>1</sub> oraz poziom 2-AG są znacznie obniżone w hipokampach pacjentów cierpiących na chroniczny stres, który może być jednym z czynników indukujących wystąpienie choroby [11]. Wszystkie wymienione argumenty sugerują istnienie powiązań pomiędzy nasileniem przekazywania AEA a występowaniem emocjonalnych i hormonalnych



zmian zaangażowanych w patomechanizm depresji. Dodatkowo podczas badań udało się zidentyfikować wariant genetyczny ludzkiej FAAH, który destabilizuje białko enzymatyczne oraz zmniejsza indukowaną hydrolizę anandamidu, przez co nasila przewodnictwo w układzie endokannabinoidowym. Wspomniany polimorfizm enzymatyczny był wielokrotnie korelowany z mniejszą odpornością na lęk, zwiększonym przewodnictwem w obrębie ciała migdałowatego, jak również zmniejszoną aktywacją i przyspieszoną habituacją bodźców informujących o pojawiających się zagrożeniach [12]. Początkowe wyniki badań na gryzoniach dowodziły, że inhibicja FAAH prowadzi do wzmocnienia przewodnictwa AEA, co z kolei przekłada się na zmniejszenie poziomu wskaźników odpowiadających za identyfikację lęku u tej grupy organizmów. Ponadto krótko po odkryciu pierwszego względnie selektywnego inhibitora opisywanego enzymu o nazwie URB-597 ustalono, że hamowanie degradacji anandamidu prowadzi do wystąpienia efektu anksjolitycznego (przeciwlękowego) u szczurów [11,13]. Niestety dokładny mechanizm prowadzący do wystąpienia tej odpowiedzi nie został poznany, jednak obecnie uważa się że przekąźnictwo AEA pomaga odzyskać homeostazę po wystawieniu na działanie czynników stresowych [14]. Podsumowując, wydaje się, że zmniejszenie puli anandamidu prowadzi do rozwoju lęku, podczas gdy zwiększenie puli wolnego anandamidu (poprzez zahamowanie jego rozkładu, inhibicję FAAH) pozwala hamować występowanie lęku u zwierząt doświadczalnych. W tym kontekście przebadano również związek SSR411298, który zaliczany jest do selektywnych i odwracalnych inhibitorów enzymu FAAH. Związek był dobrze tolerowany przez zwierzęta wykorzystane w badaniach klinicznych, jednak brak dostatecznej skuteczności doprowadził do zaniechania jego testów [15,16]. Kolejnym ligandem, który badano pod kątem potencjalnego zastosowania w leczeniu depresji był JNJ-42165279. Wspomniana substancja pełniła rolę wolno dysocjującego selektywnego inhibitora FAAH. Dokładnie przebadana pod kątem zastosowania w depresji, dotarła do II fazy badań klinicznych. Ostatecznie wspomniane badania zostały zawieszono, ze względu na odnotowanie poważnych działań niepożądanych [17].

**Wnioski:** Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają, że zastosowanie inhibitorów FAAH u zwierząt doświadczalnych doprowadziło do zmniejszenia lęku, zniesienia bólu i uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych po wystawieniu na chroniczny stres. Niestety brakuje dowodów, pozwalających na jednoznaczną ocenę wpływu tych związków na organizm człowieka. Wszystkie zebrane w tej pracy informacje potwierdzają, że hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych stanowi interesujący cel molekularny, który może zostać wykorzystany w pracach nad nowymi lekami, w szczególności lekami przeciwdepresyjnymi.

#### **Literatura:**

1. N. Battista, M. Di Tommaso, M. Bari, and M. Maccarrone, *Front. Behav. Neurosci.*, 6 (2012) doi: 10.3389/fnbeh.2012.00009.
2. S. Munro, K. L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Nature*, 365 (1993) 6441, doi: 10.1038/365061a0.
3. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1992016/> (accessed Feb. 26, 2021).
4. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2241751/> (accessed Feb. 24, 2021).

5. R. P. D. Bank, "RCSB PDB - 1MT5: CRYSTAL STRUCTURE OF FATTY ACID AMIDE HYDROLASE." <https://www.rcsb.org/structure/1MT5> (accessed Feb. 25, 2021).
6. M. K. McKinney and B. F. Cravatt, "Evidence for Distinct Roles in Catalysis for Residues of the Serine-Serine-Lysine Catalytic Triad of Fatty Acid Amide Hydrolase," *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 37393–37399, doi: 10.1074/jbc.M303922200.
7. "NFZ o zdrowiu. Depresja." <https://zdrowedane.nfz.gov.pl/course/view.php?id=57> (accessed Feb. 26, 2021).
8. "Depression." <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (accessed Mar. 04, 2021).
9. B. S. Basavarajappa, M. Shivakumar, V. Joshi, and S. Subbanna, "Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders," *J. Neurochem.*, 142 (2017) 624.
10. "Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression | *Acta Pharmacologica Sinica*." <https://www.nature.com/articles/s41401-018-0051-5> (accessed Feb. 26, 2021).
11. S. Kathuria et al., "Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis," *Nat. Med.*, 9 (2003) 76–81, doi: 10.1038/nm803.
12. "The effects of FAAH inhibition on the neural basis of anxiety-related processing in healthy male subjects: a randomized clinical trial - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33335310/> (accessed Mar. 06, 2021).
13. S. Gaetani et al., "Chapter 5 The Endocannabinoid System as A Target for Novel Anxiolytic and Antidepressant Drugs," in *International Review of Neurobiology*, 85 (2009) 57.
14. R. J. Bluett, J. C. Gamble-George, D. J. Hermanson, N. D. Hartley, L. J. Marnett, and S. Patel, *Transl. Psychiatry*, 4 (2014), doi: 10.1038/tp.2014.53.
15. G. Griebel et al., *Sci. Rep.*, 8 (2018), doi: 10.1038/s41598-018-20895-z.
16. R. Nallathambi et al., *Cannabis Cannabinoid Res.*, 3 (2018) 120–135, doi: 10.1089/can.2018.0010.
17. Janssen Research & Development, LLC, "A Phase 2a Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Multi-center Study Investigating the Efficacy, Safety, and Tolerability of JNJ-42165279 in Subjects With Major Depressive Disorder With Anxious Distress," *clinicaltrials.gov*, Clinical trial registration NCT02498392, Jan. 2020. Accessed: Mar. 02, 2021. [Online].

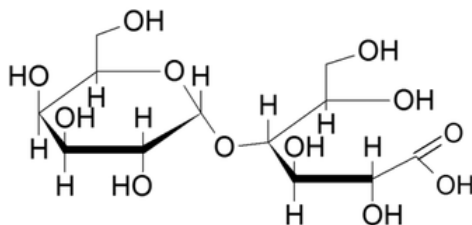
## BIOSYNTeza KWASU LAKTOBIONOWEGO: TECHNIKI, ZASTOSOWANIE I PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

W. PIĄTEK, J. SULEJ, M. OSIŃSKA-JAROSZUK, S. STEFANEK,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział  
Biologii i Biotechnologii, Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Akademicka 19,  
Lublin 20-033.

**Abstrakt:** Kwas laktobionowy (LBA) to kwas oligoaldonowy zbudowany z galaktozy związanej z cząsteczką kwasu glukonowego. Synteza tego związku może odbywać się metodą mikrobiologiczną lub enzymatyczną. W przypadku metod mikrobiologicznych rolę biokatalizatorów pełnią całe mikroorganizmy, takie jak *Pseudomonas taetrolens* czy *Streptococcus lactis*. Natomiast w metodach enzymatycznych wykorzystuje się białka zdolne do utleniania laktozy tj. oksydoreduktazy glukozowo-fruktozowe czy dehydrogenazę celobiozową. Kwas laktobionowy ze względu na właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, chelatujące, stabilizujące, zakwaszające czy nawilżające jest bardzo często stosowany w biotechnologii. W ostatnich latach aplikacyjność LBA cieszy się coraz większym zainteresowaniem w wielu gałęziach przemysłu, w tym w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i chemicznym. Prezentowana praca ma charakter przeglądowy, a jej celem jest przedstawienie dotychczasowej wiedzy na temat biosyntezy kwasu laktobionowego, z użyciem odpowiednich technik biotechnologicznych, jego zastosowania w przemyśle i perspektyw na przyszłość.

**Wprowadzenie:** Węglowodany to organiczne związki chemiczne zaliczane do odnawialnych surowców, które ze względu na swoje właściwości wpisują się w koncepcję „zielonej chemii przyszłości” [1]. Jednym z najważniejszych naturalnych disacharydów jest laktoza. Cukier ten, powszechnie występujący w mleku ssaków, jest głównym źródłem węglowodanów i energii, pełniąc tym samym bardzo ważną rolę w żywieniu. Zastosowanie czystej laktozy w przemyśle, ze względu na niską słodycz i rozpuszczalność oraz nietolerancję przez część populacji, jest znacznie ograniczone. Z tego względu, coraz częściej do celów komercyjnych stosowane są pochodne laktozy. Przykładem związku powstającego w wyniku utleniania laktozy jest kwas laktobionowy, który z powodzeniem znalazł swoje zastosowanie w różnych dziedzinach biotechnologii i przemysłu. LBA jest znany ze swoich silnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych, chelatujących, nawilżających, przeciwutleniających, zakwaszających, a także stabilizujących [2]. Praca ma charakter przeglądowy, a jej celem jest charakterystyka kwasu laktobionowego oraz procesu jego biosyntezy, jak również przedstawienie najnowszych badań i perspektyw dotyczących przyszłości LBA. Kwas laktobionowy (kwas  $\beta$ -D-galaktopiranozylo -(1  $\rightarrow$  4) -D-glukonowy; LBA) należy do rodziny kwasów aldobionowych. Struktura chemiczna LBA, oprócz grup wielofunkcyjnych, obejmuje ugrupowanie galaktozy połączone z cząsteczką kwasu glukonowego, poprzez wiązanie podobne do eteru (Rys.1). Kwas laktobionowy ma masę cząsteczkową równą 358,3 Da z pKa 3,6 [1]. Związek ten występuje w postaci białego, stałego proszku, który jest łatwo rozpuszczalny w wodzie i słabo rozpuszczalny w organicznych rozpuszczalnikach takich jak bezwodny etanol czy

metanol. Dzięki obecności dużej ilości grup hydroksylowych LBA odznacza się wysoką higroskopijnością [3].



Rys. 1. Struktura chemiczna kwasu laktobionowego [4].

Kwas laktobionowy po raz pierwszy został zsyntetyzowany w 1889 roku przez Fischera i Meyera w wyniku utleniania laktozy bromem [3]. Od tego czasu badano różne możliwości otrzymywania LBA, w tym utlenianie chemiczne, elektrochemiczne, biokatalityczne czy heterogeniczne utlenianie katalityczne, które ze względów ekonomicznych nie jest wykorzystywane w przemyśle [1, 4]. Produkcja biokatalityczna kwasu laktobionowego obejmuje utlenianie laktozy za pomocą określonych enzymów lub przy użyciu mikroorganizmów jako biokatalizatorów. Ogólny mechanizm reakcji polega na tworzeniu produktu pośredniego tj. laktobiono- $\sigma$ -laktonu, który jest następnie hydrolizowany do kwasu laktobionowego [6]. Proces ten zachodzi w ściśle dobranych warunkach:

1. temperaturze mieszczącej się w zakresie 25 - 50°C
2. przy określonej wartości pH, która jest utrzymywana na stałym poziomie dzięki dodaniu odpowiedniej zasady (sodu, wapnia lub potasu).

Produktem tego procesu może być kwas laktobionowy, jak również jego sole [4].

Biokatalityczna metoda pozyskiwania LBA została po raz pierwszy przetestowana na gatunku *Pseudomonas*, a dokładniej na *Pseudomonas taetrolens* (wcześniej *Pseudomonas graveolens*), którego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie 75% wydajności [7]. Od tego czasu jeszcze kilka innych mikroorganizmów zostało przebadanych pod kątem produkcji LBA. Zdolność do utleniania laktozy została potwierdzona u gatunków takich jak *Acetobacter orientalis*, *Burkholderia cepacia*, *Halobacterium saccharovororum*, *Paraconiothyrium sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Sporotrichum thermophile* czy *Zymomonas mobilis* [4,5]. Enzymatyczny proces biokatalitycznej produkcji LBA po raz pierwszy został przeprowadzony w 1993 roku i wykazał on wyższą wydajność w porównaniu z procesem mikrobiologicznym [8]. Ze względu na złożoność warunków, które muszą być pod ciągłą kontrolą, a także obecność czynnika redukującego, metoda ta jest bardziej skomplikowana. W wyniku enzymatycznej katalizy wytwarzane są większe ilości LBA, wydajność i produktywność jest wyższa niż w przypadku fermentacji mikrobiologicznej, ale enzymy są mniej stabilne [1]. Produkcja kwasu laktobionowego, z zastosowaniem enzymatycznej konwersji laktozy do LBA, zachodzi na drodze wymiany jonowej z eliminacją kationów, natomiast oczyszczanie powstałego produktu można przeprowadzić za pomocą filtracji, suszenia i zateżania [5]. Enzymy, które mogą być wykorzystane do pozyskiwania kwasu laktobionowego to grupa oksydaz laktozowych, takich jak dehydrogenaza glukozowo-fruktozowa, dehydrogenaza

celobiozowa czy inne oksydazy węglowodanowe [1]. Preparaty enzymatyczne mają zdolność do przekształcania kilku cukrów, zwłaszcza D-glukozy, D-galaktozy, D-mannozy, D-talozy, D-ksylozy, D-rybozy, L-arabinozy, maltozy, celobiozy i D-fruktozy, a także laktozy do LBA [5]. Proces konwersji laktozy do kwasu laktobionowego wymaga tlenu i powoduje powstawanie nadtlenu wodoru jako produktu ubocznego [4]. Enzymem intensywnie badanym przez ostatnie lata, w kontekście syntezy LBA jest dehydrogenaza celobiozowa (CDH). Ten zewnątrzkomórkowy, oksydoredukcyjny hemoflawoenzym produkowany jest przez grzyby rozkładające drewno, należące do typów *Basidiomycota* i *Ascomycota* [9]. Biokatalizator ten jest najczęściej stosowanym enzymem w syntezie kwasu laktobionowego. Oczyszczone CDH może przekształcić laktozę w kwas laktobionowy, ale wydajność tego procesu będzie wystarczająco wysoka dopiero po dodaniu lakazy i mediatora redoks, którym może być np. ABTS (kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)) [1]. Kwas laktobionowy ma ogromny potencjał aplikacyjny i może być wykorzystany w wielu różnych gałęziach przemysłu. Ze względu na swoje właściwości stabilizujące, nawilżające, antyoksydacyjne i przeciwstarzeniowe znalazł on zastosowanie w kosmetologii. W przemyśle chemicznym pełni funkcje stabilizujące oraz chelatujące. W farmacji i medycynie znalazł zastosowanie jako nośnik leków czy genów, czynnik kontrastowy, antykoagulant, środek konserwujący organy w transplantologii, jak również związek wykorzystywany do produkcji biomateriałów. W ostatnich latach stosowanie kwasu laktobionowego cieszy się coraz większym zainteresowaniem w przemyśle spożywczym, a szczególnie przemyśle mleczarskim. LBA może być stosowane jako dodatek do żywności, środek żelujący i solubilizujący, środek słodzący czy zakwaszający, jako składnik bioaktywny, ale także jako czynnik ulepszający produkcję serów [5,10]. Obecnie produkty przemysłowej syntezy kwasu laktobionowego, są stosowane w jogurtach, napojach i suplementach diety dostępnych na rynku japońskim [11]. Ze względu na obowiązujące przepisy dotyczące zastosowania kwasu laktobionowego w żywności, związek ten nie jest dotychczas wykorzystywany w tej gałęzi przemysłu. Spożywanie LBA jest nadal uważane za niebezpieczne ze względu na brak badań i wiedzy na temat jego wpływu na zdrowie [1,5]. W literaturze LBA nie jest klasyfikowany jako związek toksyczny, jednakże priorytetem powinno być zbadanie właściwości cytotoksycznych kwasu laktobionowego, które umożliwiłyby pełne wykorzystanie wszystkich właściwości prozdrowotnych tego związku.

**Wnioski:** Współcześnie konsumenci posiadają coraz większą wiedzę na temat wpływu chemicznych substancji na zdrowie człowieka. Świadomie wybieramy produkty, w skład których wchodzi głównie związki pochodzenia naturalnego. Jedną z takich substancji jest kwas laktobionowy. Związek ten z powodzeniem może zostać wykorzystany w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy farmaceutycznym. Obecnie większość badań dotyczących kwasu laktobionowego skupiona jest na metodach jego pozyskiwania oraz optymalizacji warunków syntezy. Znaczącym utrudnieniem w procesie badawczym jest znikoma ilość informacji dotycząca wpływu spożywanego LBA, na organizm ludzki. Stanowi to duże ograniczenie, ponieważ najnowsze badania pokazują ogromne możliwości wykorzystania tego związku jako dodatku do żywności funkcjonalnej. Niemniej

jednak, bez informacji dotyczących bezpieczeństwa kwasu laktobionowego, nie może on być powszechnie stosowany w tej gałęzi przemysłu.

W świetle przytoczonych informacji niezbędne są dalsze badania dotyczące biosyntezy kwasu laktobionowego, jednakże priorytetem powinno być sprawdzenie wpływu tego związku na organizm człowieka. Obecnie LBA cieszy się dużą popularnością w przemyśle kosmetycznym, chemicznym czy medycynie, jednak dzięki unikalnym właściwościom mógłby on być wykorzystywany również w innych sektorach gospodarczych. LBA to związek o wysokim potencjale biotechnologicznym, wymagający dalszych badań cytotoksycznych, które pozwoliłyby na jego powszechne wykorzystanie, także w przemyśle żywnościowym.

### **Literatura:**

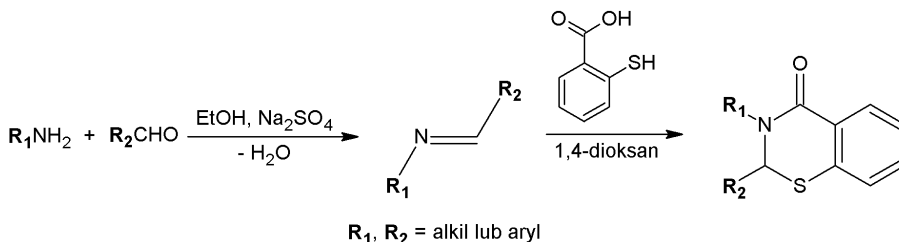
1. N. Minal, S. Balakrishnan, N. N. Chaudhary, A. K. Jain, *International Journal of Fermented Foods*, 6(1) (2017) 25.
2. A. Illanes, C. Guerrero, C. Vera, L. Wilson, R. Conejeros, F. Scott, Academic Press, (2016).
3. E. Fischer, J. Meyer, *American Journal of Pharmacy*, (1889) 425.
4. L. F. Gutiérrez, S. Hamoudi, K. Belkacemi, K. *International Dairy Journal*, 26(2) (2012) 103.
5. T. Cardoso, C. Marques, J. L. A. Dagostin, M. L. Masson, *Journal of Food Science*, 84(7) 2019, 1672.
6. H. Nakano, T. Kiryu, T. Kiso, H. Murakami, *Biocatalysis and Biomolecular Engineering*, (2010) 391.
7. F. H. Stodola, L. B. Lockwood, *Journal of Biological Chemistry*, 171(1) (1947) 213.
8. S. F. Lin, H. M. Hu, T. Inukai, Y. C. Tsai, *Biotechnology Advances*, 11(3) (1993) 417.
9. K. Olszewska, A. Olszewska, J. Rogalski, J. Sulej, (2020). *Postępy Mikrobiologii*, 59(1) (2020) 75.
10. S. Alonso, M. Rendueles, M. Díaz, *Biotechnology Advances*, 31(8) (2013) 1275.
11. C. Marques, J. P. Wojciechowski, T. Cardoso, M. R. Mafra, M. L. Mitterer-Daltoé, M. L. Masson, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64 (2020) 102400.

## AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH 1,3-BENZOTIAZYN-4-ONU

G. JUSZCZYK<sup>1</sup>, L. POPIOLEK<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, ul. W. Chodźki 4A, 20-093 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, ul. W. Chodźki 4A, 20-093 Lublin.

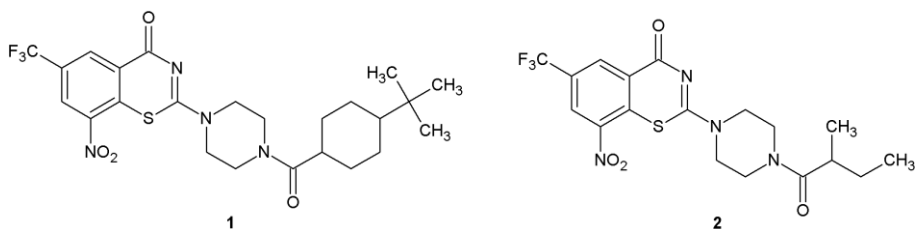
**Abstrakt:** Pochodne 1,3-benzotiazyn-4-onu wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej. Charakteryzują się one działaniem: przeciwnowotworowym, przeciwbakteryjnym, przeciwgruźliczym, przeciwgrzybiczym, przeciwzapalnym oraz przeciwwirusowym. Niniejsza praca stanowi przegląd wybranych najbardziej aktywnych związków działających przeciwgruźliczo i przeciwwirusowo spośród pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu opisanych w literaturze naukowej w ostatnich pięciu latach.

**Wprowadzenie:** W ostatnich latach w literaturze naukowej dotyczącej syntezy i aktywności biologicznej związków organicznych dość często można spotkać informacje o działaniu związków z układem 1,3-benzotiazyn-4-onu. Pochodne tego typu wykazują szerokie spektrum bioaktywności obejmujące działanie: przeciwnowotworowe [1], przeciwbakteryjne [2], przeciwgruźlicze [3-7], przeciwgrzybicze [8], przeciwzapalne [9] oraz przeciwwirusowe [10, 11]. Niniejsza praca stanowi przegląd wybranych najbardziej aktywnych związków działających przeciwgruźliczo i przeciwwirusowo spośród pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu opisanych w literaturze naukowej w ostatnich pięciu latach. Pochodne 1,3-benzotiazyn-4-onu mogą być otrzymywane kilkoma metodami. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się dwuetapową syntezę (Rys. 1.). Pierwszy etap opiera się na reakcji kondensacji aldehydu ze związkiem posiadającym pierwszorzędową grupą aminową. W drugim etapie otrzymany związek pośredni poddaje się cyklizacji kwasem tiosalicylowym [1]. W reakcji kondensacji rozpuszczalnikiem jest alkohol etylowy, a w reakcji cyklizacji bezwodny 1,4-dioksan lub toluen [1].



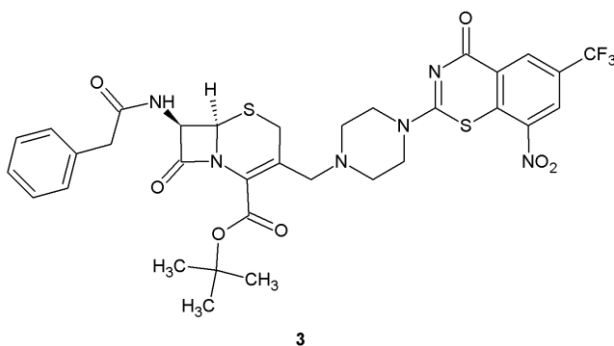
Rys. 1. Przebieg syntezy 2,3-dipodstawionych pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu.

Aktywność przeciwgruźlicza: Gruźlica wywołwana jest przez prątką gruźlicy - *Mycobacterium tuberculosis* [3]. W 2015 roku odpowiadała za śmierć około 1,8 miliona ludzi na świecie [3]. Niepokojącym faktem jest rozwój oporności *M. tuberculosis* wobec obecnie stosowanych leków. Z tego względu naukowcy poszukują nowych potencjalnie aktywnych tuberkulostatyków, które zwalczałyby prątką gruźlicy oraz powodowały małą ilość skutków ubocznych u pacjentów [3]. Peng *et. al.* otrzymali serię 2-podstawionych pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu i ocenili ich aktywność przeciwgruźliczą wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Ra. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się związki 1 i 2 wykazujące minimalne stężenie hamujące (MIC) równe odpowiednio: 0,004  $\mu\text{M}$  (związek 1) i 0,008  $\mu\text{M}$  (związek 2) (Rys. 2.) [4].



Rys. 2. 2-podstawione pochodne 1,3-benzotiazyn-4-onu (1, 2) o działaniu przeciwgruźliczym.

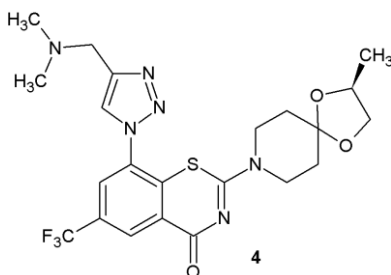
Z kolei Majewski *et al.* przeprowadził syntezę serii związków hybrydowych zbudowanych z połączonych układów 2-(4-piperazyn)podstawionych pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu z pochodnymi 7-feniloacetylocefalosporyny. Otrzymane związki zostały zbadane w kierunku aktywności przeciwgruźliczej wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv. Najsilniej przeciwgruźliczo działającym związkiem była pochodna oznaczona numerem 3 (Rys. 3.). Minimalne stężenie hamujące dla tego związku wynosiło od 1,51 do 2,03  $\mu\text{M}$  w zależności wykorzystanego do badań podłoża namnażającego [5].



Rys. 3. Pochodna 1,3-benzotiazyn-4-onu (3) aktywna wobec *M. tuberculosis* H37Rv.

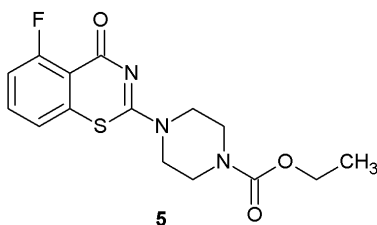
Serię nowych pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu o aktywności przeciwgruźliczej otrzymał także zespół Twari *et al.* Związkiem o najwyższej aktywności hamującej wzrost *M. tuberculosis* H37Rv była pochodna 4 (MIC = 0,87-0,95  $\mu\text{M}$ ) (Rys. 4.) [6].





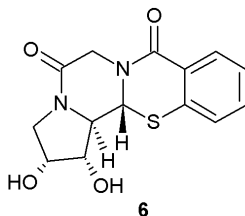
Rys. 4. Pochodna 1,3-benzotiazyn-4-onu (**4**) o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej.

W 2019 roku Nosova *et al.* opublikowali artykuł, w którym opisali syntezę i przeprowadzone badania w kierunku aktywności przeciwgruźliczej nowej serii 2,5-dipodstawionych pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu. Spośród otrzymanych związków szczególną aktywnością wobec szczepu *M. tuberculosis* H37Rv oraz *M. tuberculosis* MDR-TB (szczepu odpornego na rifampicynę i izoniazyd) cechowała się pochodna oznaczona numerem **5** (MIC = 0,7 µg/ml) (Rys. 5.) [7].



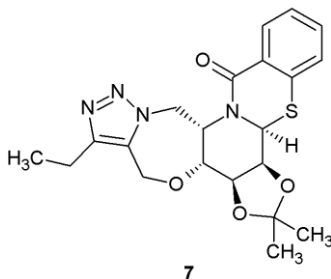
Rys. 5. 5-fluoro-2-(4-etoksykarbonylpiperazin-1-ylo)-1,3-benzotiazyn-4-on (**5**) o aktywności wobec MDR-TB.

Działanie przeciwwirusowe: Przedstawione w literaturze naukowej działanie przeciwwirusowe pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu obejmuje głównie silne działanie hamujące odwrotną transkryptazę (HIV-RT) wirusa HIV. Szczególnie silną aktywność w tym kierunku wykazała seria związków otrzymana i zbadana przez Yin *et al.* Związek **6** wykazał działanie przeciwwirusowe hamujące HIV-RT na poziomie  $IC_{50} = 0,82 \pm 0,27 \mu M$ , silniejsze niż wykorzystana substancja odniesienia AZT (nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy)  $IC_{50} = 20,14 \pm 1,32 \mu M$  (Rys. 6.) [10].



Rys. 6. Pochodna 1,3-benzotiazyn-4-onu (**6**) działająca jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV.

W 2018 roku zespół naukowców Yan *et al.* opublikował badania dotyczące aktywności przeciwwirusowej pochodnych 1,3-benzotiazyn-4-onu. Najwyższą aktywność wobec wirusa HIV większą niż substancja wzorcowa ( $IC_{50} = 19,87 \pm 2,05 \mu M$  dla AZT) wykazała pochodna **7** hamująca odwrotną transkryptazę HIV-RT przy  $IC_{50} = 0,69 \pm 0,09 \mu M$  (Rys. 7.) [11].



Rys. 7. Pochodna 1,3-benzotiazyn-4-on (**7**) o działaniu przeciwwirusowym.

**Wnioski:** Na podstawie przedstawionych wybranych biologicznie aktywnych związków z układem 1,3-benzotiazyn-4-onu można stwierdzić, że tego typu pochodne mogą mieć w przyszłości szerokie zastosowanie praktyczne jak środki lecznicze o działaniu przeciwwirusowym i przeciwwirusowym.

#### Literatura:

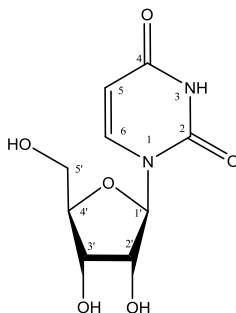
1. M. M. Kamel, I. H. Ali, M. M. Anwar, N. A. Mohamed, A. M. Soliman, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2010) 572.
2. T. Besson, Ch. W. Rees, G. Cottenceau, A.-M. Pons, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (1996) 2343.
3. A. Campaniço, R. Moreira, F. Lopes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150 (2018) 525.
4. C.-T. Peng, C. Gao, N.-Y. Wang, X.-Y. You, L.-D. Zhang, Y.-X. Zhu, Y. Xv, W.-Q. Zuo, K. Ran, H.-X. Deng, Q. Lei, K.-J. Xiao, L.-T. Yu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 (2015) 1373.
5. M. W. Majewski, R. Tiwari, P. A. Miller, S. Cho, S. G. Franzblau, M. J. Miller, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (2016) 2068.
6. R. Tiwari, P. A. Miller, L. R. Chiarelli, G. Mori, M. Šarkan, I. Centárová, S. Cho, K. Mikušová, S. G. Franzblau, A. G. Oliver, M. J. Miller, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7 (2016) 266.
7. E. V. Nosova, O. A. Batanova, G. N. Lipunova, S. K. Kotovskaya, P. A. Slepukhin, M. A. Kravchenko, V. N. Charushin, *Journal of Fluorine Chemistry*, 220 (2019) 69.
8. J. Matysiak, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14 (2006) 2613.
9. A. Zarghi, T. Zebardast, B. Daraie, M. Hedayati, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (2009) 5369.
10. Z. Yin, M. Zhu, S. Wei, J. Shao, Y. Hou, H. Chen, X. Li, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (2016) 1738.
11. L. Yan, Z. Yin, L. Niu, J. Shao, H. Chen, X. Li, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28 (2018) 425.

## BADANIE REAKCJI KOMPLEKSOWANIA W UKŁADZIE JONY MIEDZI(II), URYDYNA, KWAS GLUKURONOWY

**K. STACHOWIAK, R. JASTRZĄB**, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań.

**Abstrakt:** Przedmiotem badań niniejszej pracy są reakcje kompleksowania w układzie potrójnym: jony miedzi(II), urydyna oraz kwas glukuronowy. Przeprowadzono badania potencjometryczne, dzięki którym wykazano występowanie kilku form kompleksowych w badanym układzie. Dla każdej z uzyskanych form określono pH dominacji, ogólne stałe trwałości ( $\log \beta$ ) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ( $\log K_e$ ). W celu określenia sposobu koordynacji w badanych związkach przeprowadzono badania spektroskopowe.

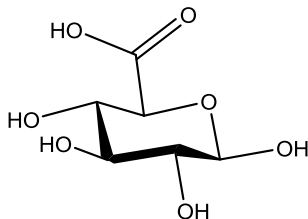
**Wprowadzenie:** Jony miedzi występują w organizmie człowieka w śladowych ilościach, jednak są niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania. Wysokie stężenie Cu(II) można znaleźć w takich produktach jak: ostrygi, suszone owoce, skorupiaki, podroby, czy czekolada [1,2]. Miedź w organizmie człowieka transportowana jest głównie przez krew, gdzie związana jest m.in.: z ceruloplazminą. Wchodzi ona w skład wielu enzymów, takich jak: oksydaza cytochromowa C, peroksydaza, oksydaza lizylova, czy tyrozynaza [3,4]. Niedobór, jaki i nadmiar jonów miedzi w organizmie człowieka może być związany z występowaniem wielu schorzeń i chorób, m.in.: białaczki szpikowej, choroby Hodgkina, przepukliny, tętniaków, czy osteoporozy i anemii [3,5]. Urydyna jest jednym z przedstawicieli nukleozydów pirymidynowych. Zbudowana jest z uracylu, który jest jedną z zasad azotowych oraz pięciowęglowego cukru – rybozy. W organizmie człowieka wykorzystywana jest w syntezie RNA i glikogenu [6]. Jest prekursorem trifosforanu urydyny oraz difosforanu urydyny [7]. Ponadto wchodzi również w skład enzymu – fosforylasy urydynowej, który przekształca urydynę w uracyl [6].



Rys. 1. Wzór strukturalny urydyny.

Kwas glukuronowy jest jednym z przedstawicieli kwasów uronowych, a w swojej budowie zawiera węglowy szkielet cukru oraz grupę karboksylową [8]. Bierze on

udział w procesie detoksyfikacji organizmu [9]. Do jego pochodnych zaliczany jest m.in.: kwas hialuronowy, który jest wykorzystywany w medycynie, farmacji i przemyśle kosmetycznym [10].



Rys. 2. Wzór strukturalny kwasu D-glukuronowego.

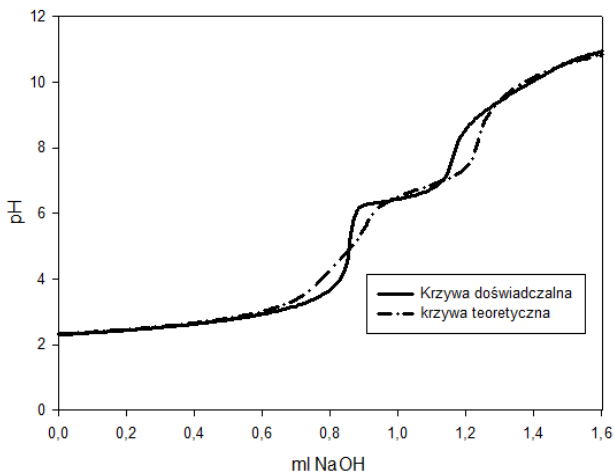
**Część eksperymentalna:** W celu zbadania przebiegu reakcji kompleksowania w układzie potrójnym: jony miedzi(II), urydyna, kwas D-glukuronowy przeprowadzono badania potencjometryczne. Badania prowadzone były w ściśle określonych warunkach siły jonowej i temperatury oraz w atmosferze gazu obojętnego. Przed każdym pomiarem przeprowadzono kalibrację pH-metru wykorzystując dwa roztwory buforowe: wodoroftalan potasu o pH = 4,002 oraz boraks o pH = 9,225, ponadto przeprowadzono kalibrację elektrody. Przygotowano serię próbek dla badanego układu, w których stosunek M:L:L' wyniósł 1:1:1, a stężenie metalu i ligandów w układzie wyniosło 0,001 mol/dm<sup>3</sup>. Układy miareczkowano za pomocą roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1874 mol/dm<sup>3</sup>, w zakresie pH od 2,5 do 11,0. Wyniki badań potencjometrycznych analizowano za pomocą programu komputerowego Hyperquad.

**Wyniki:** Analiza danych z badań miareczkowań potencjometrycznych potwierdziła istnienie w układzie czterech form kompleksowych: Cu(Urd)H(GluA), Cu(Urd)H<sub>2</sub>(GluA), Cu(Urd)(GluA)(OH) oraz Cu(Urd)(GluA)(OH)<sub>3</sub>. Dla otrzymanych form kompleksowych wyznaczono ogólne stałe trwałości (log β) oraz stałe równowag reakcji tworzenia (log K) (Tabela 1).

Tabela 1. Ogólne stałe trwałości, stałe równowag reakcji tworzenia oraz reakcje tworzenia kompleksów w badanym układzie.

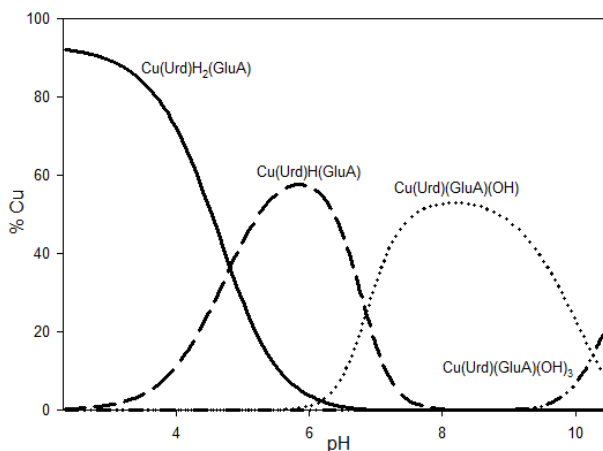
Kompleks	Log β	Reakcja	Log K <sub>e</sub>
Cu(Urd)H <sub>2</sub> (GluA)	21,96(4)	UrdH + GluAH + Cu <sup>2+</sup> ↔ Cu(Urd)H <sub>2</sub> (GluA)	9,56(4)
Cu(Urd)H(GluA)	17,14(9)	UrdH + GluA + Cu <sup>2+</sup> ↔ Cu(Urd)H(GluA) GluAH + Urd + Cu <sup>2+</sup> ↔ Cu(Urd)H(GluA)	7,92(9) 13,96(9)
Cu(Urd)(GluA)(OH)	3,42(7)	Cu(Urd)(OH) + GluA ↔ Cu(Urd)(GluA)(OH) Cu(GluA)(OH) + Urd ↔ Cu(Urd)(GluA)(OH)	7,14(7) 5,77(7)
Cu(Urd)(GluA)(OH) <sub>3</sub>	-17,08(6)	Cu(Urd)(OH) <sub>3</sub> + GluA ↔ Cu(Urd)(GluA)(OH) <sub>3</sub> Cu(Urd)(OH) <sub>2</sub> + GluA + H <sub>2</sub> O ↔ Cu(Urd)(GluA)(OH) <sub>3</sub> Cu(GluA)(OH) <sub>2</sub> + Urd + H <sub>2</sub> O ↔ Cu(Urd)(GluA)(OH) <sub>3</sub>	6,69(4) 9,73(4) 6,36(4)

Poprawność wybranego modelu potwierdzono na podstawie porównania krzywej teoretycznej wygenerowanej komputerowo z krzywą doświadczalną oraz parametrów statystycznych. W związku z tym sporządzono wykres zależności wartości pH od objętości dodawanego titranta (Rys. 3).



**Rys. 3.** Porównanie krzywych dla układu jony miedzi(II)/urydyna/kwas glukuronowy.

Na podstawie uzyskanych wyników wykreślono krzywe dystrybucji form powstających w badanym układzie (Rys. 4). Jak można zauważyć proces kompleksowania rozpoczyna się już przy pH poniżej 2,5 tworzeniem kompleksu  $\text{Cu}(\text{Urd})\text{H}_2(\text{GluA})$ , który wiąże ok. 90% jonów miedzi(II) i osiąga maksimum przy pH ok. 2,5. Kolejną formą powstającą w badanym układzie jest forma  $\text{Cu}(\text{Urd})\text{H}(\text{GluA})$ , która swoje maksimum osiąga przy pH ok. 6,0 i wiąże ok. 60% jonów miedzi(II). Kompleks ten występuje w układzie do pH ok. 8,0. Trzecią formą obecną w roztworze jest forma  $\text{Cu}(\text{Urd})(\text{GluA})(\text{OH})$ , która wiąże 60% jonów miedzi(II) i osiąga swoje maksimum przy pH ok. 8,0. Powyżej pH ok. 9,0 w układzie powstaje kolejny hydroksokompleks  $\text{Cu}(\text{Urd})(\text{GluA})(\text{OH})_3$ . Forma ta wiąże ok. 40% jonów miedzi(II), a swoje maksimum osiąga poza zakresem badania.



**Rys. 4.** Krzywe dystrybucji form kompleksowych powstających w układzie jony miedzi(II)/urydyna/kwas glukuronowy.

**Wnioski:** Na podstawie przeprowadzonych badań potencjometrycznych oraz analizie uzyskanych wyników wyznaczono formy kompleksowe występujące w badanym układzie. Wykazano istnienie czterech form kompleksowych:  $\text{Cu(Urd)H}_2(\text{GluA})$ ,  $\text{Cu(Urd)H(GluA)}$ ,  $\text{Cu(Urd)(GluA)(OH)}$  oraz  $\text{Cu(Urd)(GluA)(OH)}_3$ . Dla każdej z form wyznaczono stałe trwałości oraz stałe równowag reakcji tworzenia. Wykreślono krzywe dystrybucji, a na ich podstawie określono procentowe zawartości jonów miedzi(II) w powstających kompleksach oraz ich pH dominacji.

### Literatura:

1. D.G. Barceloux, *Clinical Toxicology*, 37 (1999) 217.
2. V. Ochoa-Herrera, G. León, Q. Banihani, J. Field, R. Sierra-Alvarez, *Science Of The Total Environment*, (2011) 380.
3. M. Angelova, S. Asenova, V. Nedkova, R. Koleva-Kolarova, *Tarika Journal Of Science*, 9 (2011) 88.
4. T. Kirsipuu, A. Zadoroznaja, J. Smirova, M. Friedemann, T. Plitz, V. Tõugu, P. Palumaa, *Scientific Reports*, 2010, 10:5686.
5. J. Osredkar, N. Sustar, *Journal Of Clinical Toxicology*, (2011) 1.
6. T. Yamamoto, H. Koyama, M. Kurajoh, T. Shoji, Z. Tsutsumi, Z. Moriwaki, *Clinica Chimica Acta*, 412 (2011) 1712.
7. M. Cansev, *Brain Research Reviews*, 52 (2006) 389.
8. G.J. Dutton, *Glucuronic Acid Free and Combined*, Academic Press New York and London, 1966.
9. I. Vina, R. Linde, A. Patetko, P. Sejmonows, *IJRRAS*, 14 (2013) 217.
10. R. Jastrzab, M. Nowak, M. Skrobanska, M. Zabiszak, *Journal Of Coordination Chemistry*, (2016) 1.

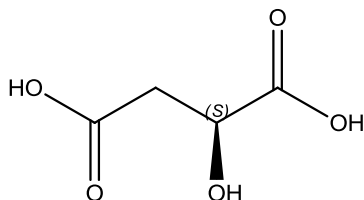
## **TERMODYNAMICZNE I SPEKTROSKOPOWE BADANIA ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH KWASU JABŁKOWEGO Z JONAMI METALI W UKŁADACH PODWÓJNYCH**

**J. FRYMARK, M. ZABISZAK, R. JASTRZĄB**, UAM, Wydział Chemii,  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań.

**Abstrakt:** Badano reakcje kompleksowania w układach podwójnych zawierających jony metali d-elektronowych (miedź, kobalt, nikiel) oraz kwas jabłkowy. Na podstawie badań potencjometrycznych stwierdzono tworzenie się związków kompleksowych monomerycznych i dimerycznych oraz wyznaczono ich ogólne stałe trwałości, wykorzystując komputerową analizę danych. Tworzenie się form kompleksowych potwierdzono poprzez wykorzystanie metod spektroskopowych (UV-Vis, IR, EPR, NMR).

**Wprowadzenie:** Jony metali występujące w organizmach żywych należą zarówno do makro-, jak i mikroelementów. Jony te pełnią kluczową rolę w miejscach aktywnych wielu enzymów, a ich związki kompleksowe są interesujące jako modelowe związki miejsc aktywnych enzymów biologicznych [1–3]. Do jonów odgrywających ważne role biologiczne zaliczane są jony miedzi, kobaltu i niklu. Jony te odgrywają istotną rolę m.in. w transporcie tlenu, prawidłowym funkcjonowaniu enzymów, wzroście komórek, licznych reakcjach enzymatycznych oraz funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego [4]. Jony miedzi występują w takich enzymach jak dysmutaza ponadtlenkowa, oksydaza cytochromowa, ceruloplazmina, które są ważne dla m.in. obrony przed wolnymi rodnikami, oddychania komórkowego, syntezy melaniny [5]. Udowodniono także, że nagromadzenie jonów miedzi może być toksyczne dla zdrowia człowieka i powodować poważne choroby (np. Choroby Huntingtona, Alzheimer, Parkinsona, Wilsona i Merkesa) [6]. Jony kobaltu są niezbędne do syntezy witaminy B<sub>12</sub>, a enzymy zaliczane do witamin B<sub>12</sub> takie jak izomeryazy, metylotransferazy, redukcyjne dehalogenazy biorą udział m.in. w reakcjach syntezy DNA i syntezy kwasów tłuszczowych [7]. Enzymy takie jak ureaza, hydrogenaza, reduktaza metylo-CoM i dehydrogenaza CO, syntaza acetyloCoA (CODH/ACS), w których w centrach aktywnych występują jony niklu odgrywają między innymi kluczową rolę w cyklu węglowym [8]. Kwas jabłkowy to jeden ze związków zaliczanych do kwasów owocowych. Odgrywa on ważną rolę w cyklu Krebsa, gdzie powstaje jako produkt uboczny. W cyklu tym odbywa się utlenienie jabłczanu do szczawiooctanu przy użyciu dehydrogenazy jabłczanowej oraz powstawanie zredukowanej cząsteczki NADH. Proces ten zachodzi w mitochondriach w celu wytworzenia energii zmagazynowanej w ATP. Powstałe jabłczany wspomagają utrzymanie równowagi elektrolitycznej w komórkach. Ponadto kwas jabłkowy jest również powszechnie używany w żywności jako konserwant (E 296) do regulacji kwasowości w przetworach rybnych, emulgowanych sosach, sosach sałatkowych, sałatkach i przetworach warzywnych [9]. Kwas jabłkowy to czterowęglowy kwas dikarboksylowy zawierający w swej budowie grupę hydroksylową (Rys.1). Obecność asymetrycznej grupy hydroksylowej w stosunku do grupy karboksylowej

powoduje, że związek ten może tworzyć chelatowe kompleksy o różnej orientacji jonowo-dipolowej zarówno kompleksy monomeryczne jak również dimeryczne. Kwas jabłkowy należy do związków wykazujących właściwości chiralne, a jedną z najbardziej skutecznych metod pozwalających na badanie związków chiralnych i ich związków kompleksowych jest dichroizm kołowy (CD).

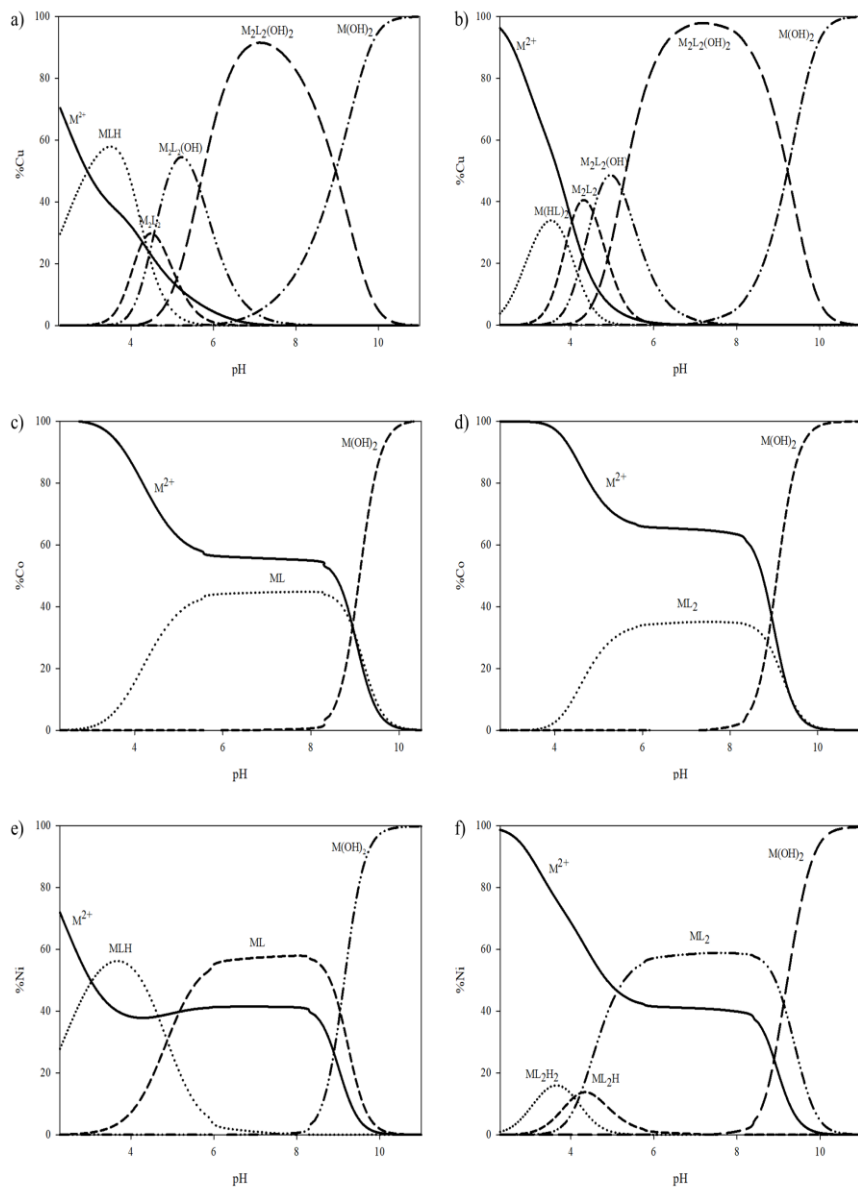


Rys 1. Kwas jabłkowy o konfiguracji L.

**Część eksperymentalna:** Miareczkowanie potencjometryczne wykonano przy użyciu zestawu Titrino 702 Methrom wyposażonego w autobiurete Titrino 702SM z elektrodą szklaną kombinowaną. Przed każdą serią pomiarową wykonano kalibrację pH-metru stosując roztwory buforowe o pH 4,02 i pH 9,22. Stężenia jonów metalu w próbce wynosiły  $0,001 \text{ mol/dm}^3$ , a stosunek molowy jonu metalu do ligandów wynosił 1:1 oraz 1:2. Miareczkowania prowadzono w temperaturze  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  w atmosferze gazu obojętnego (hel 5.0) przy stałej sile jonowej wynoszącej  $\mu = 0,1 \text{ mol/dm}^3$  ( $\text{KNO}_3$ ). Każde miareczkowanie prowadzono w zakresie pH 2,5-11,0 i powtarzano je dwunastokrotnie. Skład i stałe trwałości obliczono wykorzystując komputerową analizę danych potencjometrycznych stosując program HYPERQUAD. Badania UV-Vis wykonano na spektrofotometrze Thermo Fisher Scientific, model Evolution 300. Próbkę do badań zostały przygotowane identycznie jak do miareczkowania potencjometrycznego. Pomiary prowadzono dla próbek przy wartościach pH, w których stężenie danej formy kompleksowej było najwyższe. EPR przeprowadzono w temperaturze  $-196^\circ\text{C}$  (ciekły azot). Stężenie jonów metalu wynosiło  $0,005 \text{ mol/dm}^3$  w mieszaninie woda : glikol (3:1). Badania IR wykonano na spektrofotometrze IFS 113v FT-IR firmy Bruker. Próbkę przygotowano w roztworze  $\text{D}_2\text{O}$  przy stosunku molowym jon metalu:ligand 1:1 oraz 1:2 a stężenia wynosiły  $0,01 \text{ mol/dm}^3$ . Badania  $^{13}\text{C}$  NMR wykonano przy stężeniu liganda  $0,01 \text{ mol/dm}^3$  i 75 krotnie mniejszym stężeniu jonów metalu.

**Wyniki:** W układach podwójnych jon metalu/kwas jabłkowy przy stosunku molowym metalu do ligandu 1:1 oraz 1:2 ustalono tworzenie się związków kompleksowych sprotonowanych, jak i hydroksykompleksów. Ponadto w przypadku układów z jonami miedzi(II) zaobserwowano występowanie form dimerycznych. Dystrybucję form kompleksowych dla badanych układów przedstawiono na rysunku 2. Stałe trwałości związków kompleksowych wyznaczonych na podstawie komputerowej analizy danych potencjometrycznych przedstawiono w tabeli 1. Porównanie krzywej teoretycznej z krzywą eksperymentalną i relatywnie niskie wartości odchylenia standardowego ( $\log\beta$ ) potwierdzają prawidłowość wyboru modelu kompleksowego w badanych układach.





**Rys. 2.** Dystrybucja form kompleksowych w układzie: a) Cu<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:1; b) Cu<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:2; c) Co<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:1; d) Co<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:2; e) Ni<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:1; f) Ni<sup>2+</sup>/kwas jabłkowy 1:2

**Tabela 1.** Ogólne wartości stałych trwałości ( $\log\beta$ ) oraz stałe równowagi reakcji chemicznych ( $\log K_e$ ) dla kompleksów w układach 1:1 oraz 1:2.

	Forma kompleksowa	Stosunek molowy 1:1		Stosunek molowy 1:2	
		$\log\beta$	$\log K_e$	$\log\beta$	$\log K_e$
Cu <sup>2+</sup>	M(HL) <sub>2</sub>			15.29(3)	5.89
	MLH	8.96(3)	4.26		
	M <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	11.37(5)	11.37	11.37(5)	11.37
	M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> (OH)	6.80(5)	9.20	6.80(5)	9.20
	M <sub>2</sub> L <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	1.13(3)	8.10	1.13(3)	8.10
Co <sup>2+</sup>	ML	3.06(2)	3.06		
	ML <sub>2</sub>			5.56(4)	5.56
Ni <sup>2+</sup>	MLH	8.40(5)	3.70		
	ML	3.52(4)	3.52		
	M(HL) <sub>2</sub>			14.72(6)	5.32
	M(HL)(L)			10.64(8)	5.94
	ML <sub>2</sub>			6.40(1)	6.40

**Wnioski:** W badanych układach podwójnych kwasu jabłkowego z jonami pierwiastków d-elektronowych przy różnym stosunku molowym reagentów stwierdzono powstawanie kompleksów, w których oznaczono odmienny typ koordynacji. Dla układów z jonami miedzi (II) stwierdzono tworzenie głównie form dimerycznych. W układach zawierających jony kobaltu(II) oraz jony niklu(II) zaobserwowano tworzenie jedynie form monomerycznych. Ponadto, zwiększone stężenie kwasu jabłkowego w stosunku do jonu metalu skutkuje występowaniem dwóch jego cząsteczek w wewnętrznej sferze koordynacyjnej jonu metalu(II). Analiza otrzymanych wyników pozwala stwierdzić występowanie związków kompleksowych w całym badanym zakresie pH.

### Literatura:

1. D.A. Geierab, M.R. Geiercd, *Toxicol. Environ. Chem.*, 92 (2010) 1025.
2. J. Zhao, K. Peng, Y. Guo, J. Zhang, D. Zhao, S. Chen J. Hu, *J. Coord. Chem.*, 67 (2014) 2344.
3. D. Krajciowa, M. Melnik, E. Havranek, A. Forgacsova, P. Mikus, *J. Coord. Chem.*, 67 (2014) 1493.
4. R.A. Festa, D.J. Thiele, *Curr. Biol.*, 21 (2011) R877.
5. M. Papetti, I.M. Herman. *Am. J. Physiol.*, 282, (2002) C947.
6. Ch. Hureau, *Coord. Chem. Rev.*, 256 (2012) 2164.
7. D. Lindsay, W. Kerr, *Nat. Chem.*, 3 (2011) 494.
8. S.W. Ragsdale, *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 1657.
9. R. Jastrząb, M. Zabiszak, M. Nowak, *Na pograniczu chemii i biologii*, tom XXXIII, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2014.

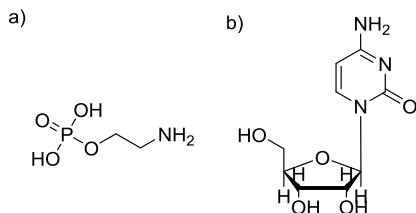
## REAKCJE KOMPLEKSOWANIA CYTYDYNY Z FOSFOETYLOAMINĄ I JONAMI MIEDZI(II)

**M. GABRYEL-SKRODZKA, M. NOWAK, M. ZABISZAK, R. JASTRZĄB,**  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii  
Koordynacyjnej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań.

**Abstrakt:** W poniższej pracy opisano reakcje kompleksowania w układzie potrójnym zawierającym jony miedzi  $\text{Cu}^{2+}$ , fosfoetyloaminę (enP) oraz cytydynę (Cyd). Ogólne stałe trwałości tworzących się w układzie kompleksów zostały wyznaczone na podstawie badań potencjometrycznych połączonych z komputerową analizą danych. Sposób koordynacji w uzyskanych formach kompleksowych określono poprzez szczegółową analizę badań spektroskopowych takich jak UV-Vis, EPR, NMR, oraz FT-IR.

**Wprowadzenie:** Fosfor jest niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu makroelementem budującym w naszym organizmie zęby i kości. Grupa fosforanowa łącząc się z nukleozydami purynowymi i pirymidynowymi tworzy dwa najważniejsze spośród znanych biopolimerów – DNA i RNA. Jony fosforanowe (V) występują również w lipidach błonowych (fosfolipidach) i biorą udział w metabolizmie lipidów i węglowodanów, pomagają w utrzymywaniu równowagi kwasowo-zasadowej oraz są głównym czynnikiem komórkowego cyklu energetycznego [1-3]. Związki zawierające w swojej budowie grupę fosforanową, mogą tworzyć połączenia koordynacyjne z jonami metali. Do najczęściej występujących w organizmie fosforylowanych ligandów zaliczamy nukleotydy. Innymi ważnymi cząsteczkami zawierającymi tę grupę funkcyjną są fosfoseryna, fosfotreonina, fosfoetyloamina i fosfocholina. Fosfoetyloamina (enP) jest produktem pośrednim w syntezie fosfatydyloetanolaminy (PE) – jednego z najpowszechniej występujących fosfolipidów, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych [4,5]. W większości błon eukariotycznych fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina stanowią łącznie około 60–85% frakcji fosfolipidów. Fosfolipidy są także strukturalnymi i funkcjonalnymi składnikami biomembran i odgrywają dynamiczną rolę w procesach regulacyjnych [6-8]. Nukleozydy pirymidynowe zbudowane są z zasady heterocyklicznej (uracylu, tyminy lub cytozyny) połączonej wiązaniem  $\beta$ - $N_1$ -glikozydowym z rybozą lub deoksyrybozą. Cytydyna oraz tymidyna wchodzi w skład DNA natomiast urydyna wchodzi w skład łańcuchów RNA często tworząc sekwencję końcową w mRNA, tzw. „ogon”. Nukleozydy pirymidynowe mogą tworzyć połączenia koordynacyjne z jonami metali głównie poprzez endocykliczny atom azotu N(3). W przypadku cytydyny (Rys.1) endocykliczny atom azotu N(3) wykazuje zdecydowanie niższą zasadowość czyli szybciej ulega deprotonacji, a powstające związki kompleksowe występują już w niższych wartościach pH. Jony miedzi(II) odgrywają niezwykle istotną rolę w organizmach żywych, w tym w organizmie człowieka. Wchodzą one w skład wielu enzymów odpowiedzialnych za kluczowe procesy biochemiczne [9]. W organizmach żywych w szerokim zakresie pH jony miedzi mogą tworzyć kompleksy z różnymi bioligandami, w tym ze związkami fosforylowanymi takimi jak fosfoetyloamina (Rys.1) oraz z nukleozydami czy nukleotydami. Celowym jest zatem badanie połączeń

koordynacyjnych, które pomogą poznać i zrozumieć, w jakim stopniu kompleksowanie wpływa na funkcje pełnione przez bioligandy, w tym ligandy fosforylowane, w organizmach żywych [10,11].



**Rys.1.** Wzory strukturalne a) fosfoetanolaminy b) cytydyny.

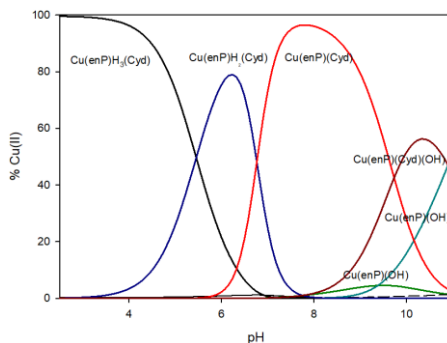
**Część eksperymentalna:** Badania potencjometryczne przeprowadzono dla układu potrójnego zawierającego jony  $\text{Cu}^{2+}$ , fosfoetyloaminę oraz nukleozyd pirymidynowy - cytydynę  $\text{Cu(II)/enP/Cyd}$ . Stosunek molowy jonów metalu do ligandów wynosił 1:1:1. Miareczkowanie potencjometryczne przeprowadzono za pomocą zestawu TITRINO wyposażonego w elektrodę szklaną kombinowaną METROHM. Każdorazowo przed serią pomiarową wykonywano korektę odczytu pehametru kalibrując zestaw na dwa bufony - wodoroftalan potasowy ( $\text{pH}=4,008$ ) oraz boraks ( $\text{pH}=9,225$ ). Badania prowadzono w stałej temperaturze  $20^\circ\text{C}$  ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ), w atmosferze helu, przy stałej sile jonowej  $\mu=0,1\text{M}$  ( $\text{KNO}_3$ ), używając jako titranta wolnego od węglanów roztworu  $\text{NaOH}$ , w zakresie  $\text{pH}=2,5-11,0$ . Wybór modelu oraz określenie stałych trwałości powstałych kompleksów wykonano przy użyciu programu HYPERQUAD 2008, natomiast dystrybucje form wykreślono stosując program HySS. W celu weryfikacji wyników z badań potencjometrycznych korzystano z kryteriów opisanych wcześniej w literaturze [12]. Badania  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR wykonano w roztworach  $\text{D}_2\text{O}$  używając roztworów  $\text{NaOD}$  oraz  $\text{DCl}$  do ustalenia określonych wartości  $\text{pH}$ . Stosunek molowy jonów miedzi do ligandów wynosił 1:75:75, a stężenia ligandów wynosiły  $0,1\text{M}$ . Badania IR, podobnie jak w przypadku badań NMR, wykonano w roztworach  $\text{D}_2\text{O}$ . Badania UV-Vis wykonano dla próbek w roztworach wodnych, w których stężenie jonu metalu wynosiło  $0,02\text{M}$ . Badania EPR przeprowadzono w temperaturze  $-196^\circ\text{C}$ . Stężenie jonów  $\text{Cu}^{2+}$  oraz stężenia ligandów wynosiły  $0,005\text{M}$ , a próbki do badań przygotowywane były w mieszaninie woda : glikol (3:1). Dla badań spektroskopowych (IR, UV-Vis i EPR) stosunek metalu do ligandów wynosił 1:1:1. Pomiar prowadzono dla próbek w wartościach  $\text{pH}$ , w których występuje maksymalne stężenie danego kompleksu.

**Wyniki:** W wyniku analizy komputerowej danych otrzymanych z miareczkowania potencjometrycznego stwierdzono, że w badanym układzie potrójnym zawierających jony miedzi  $\text{Cu}^{2+}$ , fosfoetyloaminę oraz cytydynę, tworzą się kompleksy protonowane typu  $\text{MLH}_3\text{L}^-$ ,  $\text{MLH}_2\text{L}^-$ , kompleks prosty  $\text{MLL}$  oraz hydroksykompleks  $\text{MLL}^-(\text{OH})$  (Tabela 1).

**Tabela 1.** Ogólne stałe trwałości i stałe równowagowe dla kompleksów powstających w układzie potrójnym Cu(II)/enP/Cyd.

Kompleks	logβ	Reakcja	logK
Cu(enP)H <sub>3</sub> (Cyd)	34,11(4)	$\text{Cu}^{2+} + (\text{H}_2\text{enP}) + (\text{HCyd}) \rightleftharpoons \text{Cu(enP)H}_3(\text{Cyd})$	13,51
Cu(enP)H <sub>2</sub> (Cyd)	28,66(3)	$\text{Cu}(\text{HenP}) + (\text{HCyd}) \rightleftharpoons \text{Cu(enP)H}_2(\text{Cyd})$	10,88
Cu(enP)(Cyd)	15,13(3)	$\text{Cu}^{2+} + (\text{enP}) + (\text{Cyd}) \rightleftharpoons \text{Cu(enP)(Cyd)}$	15,13
Cu(enP)(Cyd)(OH)	5,39(4)	$\text{Cu(enP)(Cyd)} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu(enP)(Cyd)(OH)} + \text{H}^+$	4,12

Dla badanego układu wykreślono krzywe dystrybucji form poszczególnych kompleksów (Rys. 2.). Na ich podstawie wyznaczono wartości pH dominacji dla poszczególnych kompleksów, co stanowiło podstawę do dalszych badań spektroskopowych.



**Rys.2.** Diagram dystrybucji form dla układu Cu(II)/enP/Cyd.

Analiza wyników uzyskanych z kilku niezależnych metod spektroskopowych umożliwiła określenie sposobu koordynacji oraz słabych oddziaływań w otrzymanych kompleksach. Parametry spektroskopowe z badań UV-Vis oraz EPR wraz z ustalonymi chromoforami otrzymanych form kompleksowych przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Wartości parametrów spektralnych dla kompleksów w układzie Cu(II)/enP/Cyd.

Kompleks	pH	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon$ [dm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$	chromofor
Cu(enP)H <sub>3</sub> (Cyd)	3,0	798	12.46	2.40	138	{1O}
Cu(enP)H <sub>2</sub> (Cyd)	6,2	746	21.18	2.34	163	{1N, 1O}
Cu(enP)(Cyd)	7,8	665	76.66	2.32	160	{2N, xO}
Cu(enP)(Cyd)(OH)	10,3	645	94.67	-	-	{2N, xO}

Pierwszy z powstających kompleksów, Cu(enP)H<sub>3</sub>(Cyd), dominuje w pH=3,0 wiążąc niemalże całkowitą ilość jonów miedzi(II) obecną w roztworze. Na podstawie badań UV-Vis, EPR i NMR stwierdzono, że chromoforem jest {1O} pochodzący od grupy fosforanowej enP (<sup>31</sup>P NMR Δ-4.99 ppm). Słabe oddziaływania pomiędzy sprotonowaną grupą aminową enP oraz endocyklicznym atomem azotu w pozycji N(3) cytydyny potwierdziły przesunięcia charakterystycznych pasm w widmie IR. Przy pH=6,0 dominującą formą

kompleksową jest  $\text{Cu}(\text{enP})\text{H}_2(\text{Cyd})$ . Na podstawie przesunięć w widmach UV-Vis i EPR ustalono, że w wewnętrznej sferze koordynacyjnej, oprócz atomu tlenu, znajduje się atom azotu. Aktywność grupy fosforanowej enP w kompleksowaniu potwierdza znaczne przesunięcie w widmie  $^{31}\text{P}$  NMR (-7,35 ppm), natomiast udział atomu azotu N(3) cytydyny potwierdziły badania  $^{13}\text{C}$  NMR (C(2) -0.29 ppm, C(4) - 0.10 ppm). Brak aktywności grupy karbonylowej Cyd wykluczono na podstawie braku przesunięć pasma dla niej charakterystycznego w widmie FT-IR.

Przy pH=6, zaczyna tworzyć się kolejna z form kompleksowych  $\text{Cu}(\text{enP})(\text{Cyd})$ , która dominuje w pH równym 8,0. Znaczna zmiana wartości  $\lambda_{\text{max}}$  świadczy o włączeniu do wewnętrznej sfery koordynacyjnej kolejnego atomu azotu. Zmniejszeniu ulega wartość przesunięcia w widmie  $^{31}\text{P}$  NMR dla kompleksu w stosunku do widma wolnego liganda ( $\Delta=-0,95$  ppm), co świadczy o większej efektywności grupy aminowej w stosunku do grupy fosforanowej w procesie kompleksowania jonów miedzi(II). Zmiana wartości  $\lambda_{\text{max}}$  dla  $\text{Cu}(\text{enP})(\text{Cyd})(\text{OH})$  świadczy o włączeniu kolejnego atomu tlenu, pochodzącego od grupy hydroksylowej, do wewnętrznej sfery koordynacyjnej. Przesunięcie w widmie  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\Delta=-0,03$  ppm) świadczy o zaniku aktywności grupy fosforanowej w wyższych wartościach pH w badanym układzie.

**Wnioski:** Dla badanego układu określono powstające, w szerokim zakresie pH, formy związków kompleksowych oraz wyznaczono ich ogólne stałe trwałości i stałe równowagi reakcji tworzenia. Za pomocą metod spektroskopowych określono sposób koordynacji i aranżację przestrzenną dla poszczególnych form kompleksowych. Stwierdzono, że grupa fosforanowa stanowi aktywne centrum metalacji dla jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , zwłaszcza przy niskich wartościach pH. Wraz ze wzrostem zasadowości otoczenia rośnie udział grupy aminowej w procesie kompleksowania. W przypadku cytydyny stwierdzono, że endocykliczny atom azotu N(3) jest głównym miejscem słabych oddziaływań w niskim pH, a wraz ze wzrostem zasadowości otoczenia – głównym miejscem kompleksowania.

Badania finansowane z grantu No. POWR.03.02.00-00-1026/16

#### Literatura:

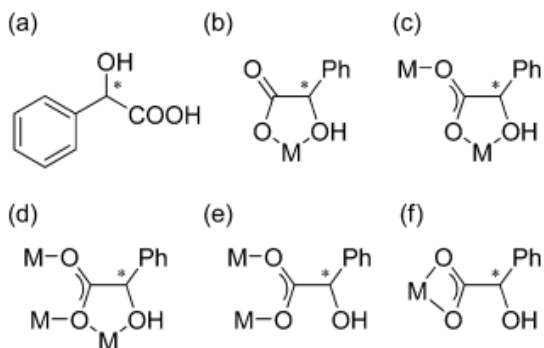
1. R. Jastrzab, L. Lomozik, J. Coord. Chem., 62 (2009) 710.
2. F. Ceccconi, et. al., Polyhedron, 21 (2002) 1481.
3. S.J. Omelon, M.D. Grynpas, Chem. Rev., 108 (2008) 4694.
4. F. Gibellini, T.K. Smith, IUBMB Life, 62 (2010) 414.
5. J. E. Vance, J. Lipid Res., 59 (2018) 923.
6. N. Wellner, et. al., Biochim. Biophys. Acta, 1831 (2013) 652.
7. D. Coulon, et al., Biochimie, 94 (2012) 75.
8. R. Dawaliby, et. al., J. Biol. Chem., 291 (2016) 3658.
9. Di Donato, B. Sarkar, Biochim. Biophys. Acta, 1360 (1997) 3.
10. R. Jastrzab, et. al., Coord. Chem. Rev., 351 (2017) 32.
11. M. Zabiszak, et. al., J. Inorg. Biochem., 198 (2019) 110715.
12. L. Lomozik, M. Jaskólski, A. Wojciechowska, Polish J. Chem., 65 (1991) 1971.

## BADANIA SPEKTROSKOPOWE I TEORETYCZNE KWASU MIGDAŁOWEGO I JEGO KOMPLEKSÓW Z KOBALTEM I MIEDZIĄ

**M. PARCHETA, R. ŚWISŁOCKA**, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45 E, 15-351 Białystok.

**Abstrakt:** W pracy porównano struktury kwasu migdałowego i jego kompleksów z miedzią i kobaltem, za pomocą spektroskopii FT-IR. Wykonano również obliczenia kwantowo-mechaniczne struktury badanych związków oraz widma teoretyczne. Na podstawie obliczeń wyznaczono rozkład ładunku elektronowego w cząsteczkach. W oparciu o długości wiązań wyliczony został indeks aromatyczności HOMA. Wyznaczono kąty między atomami zarówno w kwasie migdałowym jak i omawianych kompleksach, a także wyznaczono energie orbitali HOMO i LUMO. Obliczono również parametry elektronowe tj. chemiczna twardość, miękkość, powinowactwo elektronowe, potencjał jonizacji, elektrofilowość i elektroujemność. Uzyskane wyniki dla kwasu migdałowego odniesiono do wyników otrzymanych dla migdalinianu wapnia i kobaltu, by określić wpływ kompleksowania metalami bloku d na strukturę badanych związków.

**Wprowadzenie:** Kwas migdałowy należy do  $\alpha$ -hydroksykwasów, które charakteryzują się właściwościami optycznymi, wynikającymi z obecności chiralnego atomu węgla, do którego przyłączone są grupy: karboksylowa, hydroksylowa i pierścień aromatyczny [1]. Występuje on w postaci dwóch izomerów optycznych: kwasu D-migdałowego i kwasu L-migdałowego. Po raz pierwszy został odkryty w roku 1909 przez V.K Kriebler oraz J.W. Walkera. W środowisku naturalnym występuje w pestkach moreli, pestkach wiśni, a przede wszystkim w gorzkich migdałach. Kwas ten wykazuje silne właściwości odkażające i antybakteryjne. Często bywa porównywany z najprostszym  $\alpha$ -hydroksykwasem, czyli kwasem glikolowym, jednak ze względu na większą masę cząsteczkową, cząsteczki kwasu migdałowego napotykać większe trudności w przenikaniu przez skórę, dzięki czemu stosowanie tego kwasu jest bezpieczniejsze dla zdrowia [2]. Dzięki szerokiemu rozpowszechnieniu w naturze,  $\alpha$ -hydroksykwasy, takie jak omawiany kwas migdałowy, są stosowane w preparatyce chemicznej jako substancja pomostowa w syntezie rozbudowanych struktur, których składowymi są metal oraz cząsteczki nieposiadające centrum symetrii [3]. Kwas migdałowy stanowi prekursor do syntezy związków chiralnych, których struktura stabilizowana jest wewnątrz – i zewnątrz cząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi, a także oddziaływaniami pierścienia aromatycznego, dzięki czemu produkty syntezy charakteryzują się wysokim uporządkowaniem struktury [4]. Ze względu na obecność wielu centrów koordynacyjnych, np. atomu tlenu grupy karboksylowej i obecność grupy hydroksylowej, istnieje wiele możliwości koordynowania metali przez kwas migdałowy. Na Rys.1 przedstawiono różne sposoby koordynowania metali przez cząsteczkę kwasu migdałowego.



**Rys.1.** Sposoby koordynowania metali przez kwas migdałowy - a: struktura kwasu migdałowego, b-d: koordynacja chelatowa z utworzeniem pięciocząłowego pierścienia z udziałem grupy karboksylowej i hydroksylowej w kompleksowaniu metalu, e- koordynacja metalu z udziałem grupy karboksylowej, f – koordynacja z utworzeniem czterocząłowego pierścienia z centrum metalicznym [5].

**Część eksperymentalna:** Kompleks kwasu migdałowego z kobaltem i miedzią otrzymano przez zmieszanie wodnych roztworów migdalinianu sodu z solą chlorkową kobaltu i miedzi w stosunku stechiometrycznym 2:1. Widma FT-IR<sub>KBr</sub> zarejestrowano na spektrofotometrze TF Alfa marki Bruker z oprogramowaniem OPUS. Próbkę przygotowano w formie pastylek uzyskanych przez prasowanie próbki z bromkiem potasu. Za pomocą spektroskopii FT-IR<sub>KBr</sub> sprawdzono jaki wpływ na strukturę kwasu migdałowego ma kompleksowanie tego ligandu kobaltem(II) i miedzią(II). Obliczono teoretyczne widmo Ramana i IR dla migdalinianu kobaltu i miedzi odniesiono je do wyników eksperymentalnych. Za pomocą oprogramowania Gaussian 09 wykonano optymalizację struktury kwasu migdałowego i jego soli z kobaltem, a następnie wyznaczono kąty między atomami i długości wiązań w cząsteczkach. W oparciu o wyznaczone długości wiązań wyliczono indeksy aromatyczności HOMA dla badanych związków. Obliczony został również rozkład ładunku NBO w cząsteczkach, a także wartości energii orbitali HOMO i LUMO. W oparciu o wartości energii HOMO i LUMO obliczono lukę elektronową oraz miękkość, twardość chemiczną i elektrofilowość. Wszystkie obliczenia prowadzono metodą DFT, z funkcjonałem B3LYP z zastosowaniem bazy LANL2DZ.

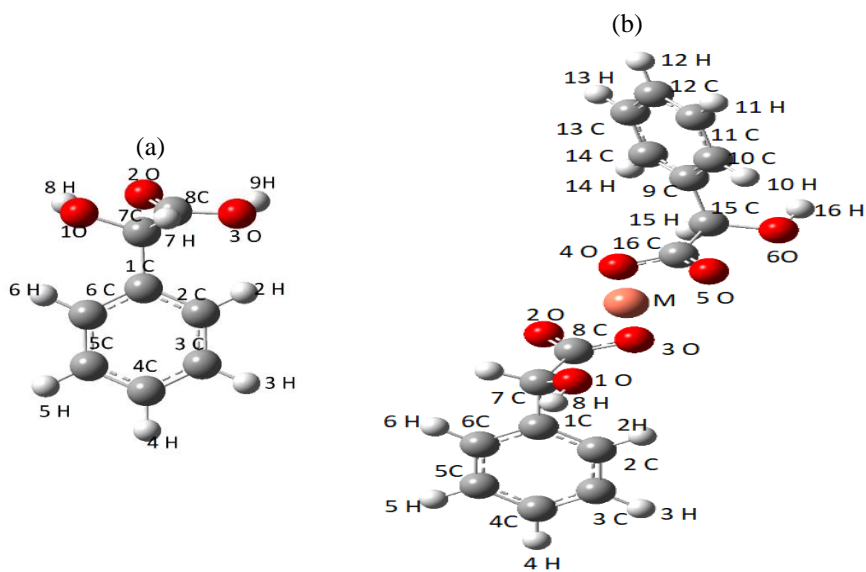
**Wyniki:** Orbitale HOMO soli kwasu migdałowego rozmieszczone są w obrębie pierścienia aromatycznego, natomiast orbitale LUMO zlokalizowane są w obrębie grupy karboksylowej. W przypadku kwasu migdałowego orbitale molekularne HOMO i LUMO rozmieszczone są równomiernie. Wartości energii HOMO dla kwasu migdałowego, migdalinianu kobaltu i migdalinianu miedzi wynoszą odpowiednio: -6,95; -7,19; -7,21 eV, natomiast wartości energii LUMO dla tych związków są odpowiednio równe: -1,22; -3,62; -1,62 eV. Znajomość wartości energii HOMO i LUMO pozwoliła na wyznaczenie parametrów elektronowych przedstawionych w tabeli 1.



**Tabela 1.** Parametry elektronowe kwasu migdałowego i jego kompleksów z miedzią(II) i kobaltem(II).

Związek	Twardość chemiczna [eV]	Miękkość chemiczna [eV]	Elektrofilowość [eV]	Luka elektronowa [eV]	Elektroujemność [eV]	Potencjał jonizacji
Kwas migdałowy	2,87	2,87	2,90	5,74	4,08	6,95
Migdalinian miedzi	1,29	0,78	13,08	2,58	5,81	7,10
Migdalinian kobaltu	1,76	0,57	8,22	3,52	5,38	7,14

Wartość luki elektronowej określa reaktywność związku. Im większa jest wartość luki elektronowej, tym większą reaktywnością charakteryzuje się dany związek chemiczny. Potencjał jonizacji określa zdolność związku do oddawania elektronu. Wraz ze wzrostem potencjału jonizacji, rośnie wartość energii niezbędnej do oderwania elektronu. Porównano również indeksy aromatyczności HOMA, obliczone w oparciu o długości wiązań między atomami węgla w pierścieniu aromatycznym. Numerację atomów przedstawiono na Rys. 2.



**Rys.2.** Numeracja atomów w cząsteczce kwasu migdałowego (a) i jego kompleksów (b).

Wartości długości wiązań i indeksy aromatyczności HOMA zostały przytoczone w tabeli 2.

**Tabela 2.** Wartości długości wiązań między atomami w cząsteczkach badanych związków.

Związek	Położenie wiązania	Długość wiązania [Å]	Indeks aromatyczności HOMA
Kwas migdałowy	1-2	1,41177	0,892
	2-3	1,40635	
	3-4	1,40905	
	4-5	1,40725	
	5-6	1,40826	
	6-1	1,40774	
Migdalinan miedzi	1-2	1,41276	0,880
	2-3	1,40623	
	3-4	1,41102	
	4-5	1,40881	
	5-6	1,40889	
	6-1	1,40919	
Migdalinian kobaltu	1-2	1,40761	0,893
	2-3	1,40821	
	3-4	1,40724	
	4-5	1,40886	
	5-6	1,40642	
	6-1	1,41165	

Obliczono rozkład ładunków NBO dla kwasu migdałowego i jego kompleksów z miedzią(II) i kobaltem(II). W tabeli 3 przedstawiono obliczone wartości ładunków na poszczególnych atomach w cząsteczkach badanych związków.

**Tabela 3.** Rozkład ładunków NBO dla kwasu migdałowego i jego kompleksów.

Kwas migdałowy			Migdalinan miedzi(II)			Migdalinian kobaltu(I)				
atom	Nr. atomu	ładunek	atom	Nr. atomu	ładunek	atom	Nr. atomu	ładunek		
C	1*	-0,065	C	1	9	-0,078	C	1	9	-0,064
	2	-0,221		2	10	-0,216		2	10	-0,214
	3	-0,207		3	11	-0,209		3	11	-0,203
	4	-0,215		4	12	-0,212		4	12	-0,213
	5	-0,204		5	13	-0,211		5	13	-0,203
	6	-0,213		6	14	-0,211		6	14	-0,224
	7	0,041		7	15	0,04		7	15	0,045
	8	0,834		8	16	0,844		8	19	0,821
H	2	0,230	H	2	10	0,237	H	2	10	0,239
	3	0,220		3	11	0,233		3	11	0,222
	4	0,220		4	12	0,232		4	12	0,221
	5	0,221		5	13	0,233		5	13	0,222
	6	0,237		6	16	0,233		6	14	0,734
	7	0,245		7	15	0,242		7	15	0,255
	8	0,498		8	16	0,512		8	16	0,501
	O	1		-0,781	O	1		6	-0,790	O
2		-0,621	2	4		-0,720	2	4	-0,652	
3		-0,733	3	5		-0,703	3	5	-0,673	
			Cu	1,108		Co	0,922			

\*numeracja wg rys. 3.

Położenie pasm w widmach FT-IR kwasu migdałowego zestawiono w tabeli 4, z położeniami odpowiadających im pasm dla migdalinianu kobaltu i miedzi, zarówno w widmach eksperymentalnych, jak i teoretycznych. Obliczone zostały intensywności drgań w widmie FT-IR analizowanych związków.

**Tabela 4.** Wartości liczb falowych i intensywności pasm w widmach migdalinianu kobaltu i miedzi w odniesieniu do kwasu migdałowego.

Kwas migdałowy [7]				Migdalinian kobaltu			Migdalinian miedzi			Przypisanie [6]	
IR <sub>Eksp</sub>	R <sub>exp</sub>	Teoret		IR <sub>Eksp</sub>	Teoret		IR <sub>Eksp</sub>	Teoret			
[cm <sup>-1</sup> ]	[cm <sup>-1</sup> ]	[cm <sup>-1</sup> ]	Int. <sub>IR</sub>	[cm <sup>-1</sup> ]	[cm <sup>-1</sup> ]	Int. <sub>IR</sub>	[cm <sup>-1</sup> ]	[cm <sup>-1</sup> ]	Int. <sub>IR</sub>		
3400 (s)		3243	7,7	3647 (w)	3643	57,2 18,9	3851 (vw)	3687	29,0 63,0	vOH	
3070 (m)	3064 (vs)	3228	21,4	3065 (s)	3193	0,1 0,3	3065 (w)	3085	32,5 33,6	vCH	2
3031 (m)	3049 (m)	3216	25,1	3045 (w)	3104	6,2 5,9	3049 (w)			vCH	20a
2967 (m)		3202	12,3	2994 (w)			2992 (w)			vCH	20b
2927 (m)		3191	0,1							v <sub>as</sub> CHOH	
2716 (m)		3112	10,2	2739 (vw)			2787 (w)			v <sub>s</sub> CHOH	
1716 (vs)	1719 (m)	1700	244,8							vC=O	
				1575 (vs)	1651	0,3 9,6	1638 (vs)	1632	0,8 0,5	v <sub>as</sub> COO	
1588 (w)	1588 (w)	1523	22,7		1523	40,7 2,0	1582 (m)	1522	22,5 6,3	vCC	8b
1497 (w)		1479	12,4	1497 (w)	1483	17,3 6,1	1497 (w)	1483	15,8 30,8	vCC	19a
1452 (w)		1420	18,2	1456 (w)	1456	231,8 13,7	1456 (w)	1467 1463	2,2 587,7	vCC	19b
				1412 (m)	1416 1414	96,5 278,7	1351 (m)	1418 1414	62,8 367,9	v <sub>s</sub> COO	
1378 (m)		1380	0,6	1365 (m)	1382	48,0 26,6		1376	3,3 3,0	βOH δCHOH	
1299 (s)	1295 (w)	1300	37,3	1280 (m)	1291 1290	36,1 17,3	1286 (w)	1341	102,3 377,8	βOH vCOH	
1253 (w)	1256 (w)	1257	20,3	1252 (w)	1245	37,3 5,6	1256 (w)	1306	16,4 9,2	τCHOH βCH	
1229 (m)	1222(vw)	1222	0,8					1221	88,1 57,7	ωCHOH	
1192 (m)	1192 (m)	1203	16,7	1200 (w)	1204	26,7 26,1	1197 (w)	1202	8,2 0,1	βCH	9a
1156 (vw)	1155 (w)	1121	51,1							βCH	9b
1062 (s)	1058(vw)	1054	58,2	1079 (m)	1055	27,5 16,5	1079 (w)	1109	7,3 12,4	βCH	18a
1028 (w)	1030 (m)	1028	1,5	1023 (w)	1033	0,8 0,5	1023 (w)	1050	0,52 0,74	βCH	18b
1004 (w)	1004 (s)	1016	1,3	1007 (m)	1016	1,1	998 (w)	1015	1,9 2,4	αCCC vCOH	12
940 (m)		976	5,1	952 (w)	981	8,9 0,3	943 (w)	971	9,3 9,4	γCH	17a
889 (m)		890	30,2	921 (w)	897	0,5 0,3	862 (vw)	922,6 921,5	2,8 9,8	vC-COO	
855 (w)	858 (w)	864	5,1							βC=O	
768 (w)	768 (vw)	769	72,3	797 (w)	789 785	3,8 35,2	800 (w)	807 804	7,1 23,1	γCH	11

733 (s)	732 (w)	729	37,1	752 (m)	757 754	76,2 262	754 (w)	750	22,3	φCC	4
								724	24,3 52,7	βCOO	
697 (s)		710	41,7							αCCC	1
				698 (s)	687 683	15,2 123	694 (m)	690 683	0,7 344,1	γCOO	
528 (m)		564	44,7	520 (m)	535	8,2	528 (vw)	520	6,6	γOH	
494 (m)		494	6,4					499	2,8	φCC	16b
467 (w)		446	5,4	438 (w)			460 (vw)			φCC	16a

Oznaczenia: vs-bardzo mocne, s-mocne, m-średnie, w-słabe, vw-bardzo słabe, v-rozciągające, β-zginające w płaszczyźnie, γ-zginające poza płaszczyzną, δ-nożycowe, α-zginające pierścienia, φ-deformacyjne pierścienia, ω-wachlarzowe, τ-skręcające

W widmie kwasu migdałowego obecne są pasma pochodzące od drgań rozciągających grupy karbonylowej przy  $1716\text{ cm}^{-1}$  (FT-IR). Utworzenie kompleksu kwasu migdałowego z miedzią i kobaltem skutkuje zmianami w strukturze elektronowej, co prowadzi do zmiany położenia pasm w widmach tych kompleksów. W wyniku podstawienia wodoru grupy karboksylowej atomem metalu w widmach kompleksów zanikły pasma pochodzące od drgań rozciągających  $\nu_{\text{C=O}}$  i zginających  $\beta_{\text{C=O}}$ . Natomiast pojawiły się pasma drgań rozciągających asymetrycznych grupy karbonylowej w przypadku migdalinianu miedzi przy  $1638\text{ cm}^{-1}$  i dla migdalinianu kobaltu przy  $1575\text{ cm}^{-1}$  oraz drgań rozciągających symetrycznych przy  $1351\text{ cm}^{-1}$  dla migdalinianu miedzi i  $1412\text{ cm}^{-1}$  dla migdalinianu kobaltu. Pojawiły się również drgania deformacyjne poza płaszczyznę grupy karboksylowej  $\gamma_s$  w położeniu  $698\text{ cm}^{-1}$  oraz  $694\text{ cm}^{-1}$  odpowiednio dla migdalinianu kobaltu i miedzi. Zmiany położenia pasm i intensywności drgań pierścienia aromatycznego wskazują na zmianę gęstości elektronowej w przypadku uzyskanych soli.

**Wnioski:** Z analizy widm FT-IR wynika, że kwas migdałowy z miedzią(II) i kobaltem(II) tworzy kompleksy poprzez podstawienie wodoru grupy karboksylowej atomem metalu, którego obecność ma duży wpływ na zmiany gęstości elektronowej pierścienia aromatycznego w uzyskanych kompleksach. Świadczą o tym przesunięcia pasm odpowiadających drganiom pierścienia aromatycznego oraz zmiany ich intensywności. Przeważnie obserwuje się wzrost wartości liczbowych tych parametrów. Uwzględniając różnice w wartościach liczb falowych pochodzących od drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych anionu karboksylanowego ( $\Delta\nu$ ) w badanych kompleksach w porównaniu do tych pasm w widmie soli sodowej możemy określić przybliżony typ koordynacji metal – ligand. W przypadku migdalinianu kobaltu jest to koordynacja dwupozycyjna mostkująca, natomiast w przypadku migdalinianu miedzi koordynacja jednopozycyjna. W oparciu o obliczone wartości luki elektronowej badanych związków można stwierdzić, że migdalinian kobaltu i miedzi wykazuje większą reaktywność od kwasu migdałowego, ponieważ wartość liczbową luki elektronowej dla kwasu jest największa. Jednocześnie kompleksy kwasu migdałowego wykazują większą stabilność od czystego ligandu, ponieważ obliczone dla nich wartości

potencjału jonizacji są wyższe w porównaniu z potencjałem jonizacji kwasu migdałowego.

Praca wykonana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr. 2017/31/NZ7/03083.

### **Literatura**

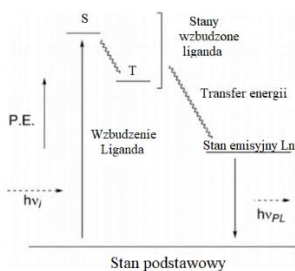
1. R. Jastrząb, M. Zabizsak, M. Nowak, Na pograniczu chemii i biologii, Wydawnictwa Naukowe UAM, Poznań, 2014.
2. W. Jankowiak, W. Imielski, E. Janeba-Bartoszewicz, Kosmetologia estetyczna, 5 (2016) 57.
3. P. Halder, B. Chakraborty, P. R. Banerjee, E. Zangrando, T.K. Paine. Cryst. Eng. Commun., 11 (2009) 2650.
4. R. Carballo, B. Covelo, M. Vazquez-Lopez, E. Garcia-Martínez, A. Castiñeiras, J.Z. Nicros, Anorg. Allg. Chem., 631 (2005) 785.
5. M. Moriya, S. Tominga, T. Hashimoto, K. Tanifuji, T. Matsumoto, Y. Ohki, K. Tatsumi, J. Kaneshiro, Y. Uesu, W. Sakamoto, T. Yogo., Inorg. Chem., 51 (2012) 4689.
6. G. Varsanyi, Assignments for Vibrational Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Wiley, New York, 1986.
7. M. Parcheta, R. Świsłocka, M. Kalinowska, G. Świdorski, K. Gryko, W. Lewandowski, Nauka i przemysł, Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2020.

## LUMINESCENCYJNE WŁAŚCIWOŚCI POLIMERU KOORDYNACYJNEGO Dy(III) Z KWASEM 1H-PIRAZOLO-3,5-DIKARBOKSYLOWYM

**D. VLASYUK<sup>1</sup>, R. ŁYSZCZEK<sup>1</sup>, A. JUSZA<sup>2</sup>, R. PIRAMIDOWICZ<sup>2</sup>,** <sup>1</sup>UMCS, Katedra Chemii Ogólnej, Koordynacyjnej i Krystalografii, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Plac Marii Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin; <sup>2</sup>Politechnika Warszawska, Instytut Mikroelektroniki i Optoelektroniki, Zakład Optoelektroniki, Ul. Koszykowa 75, 00-662 Warszawa.

**Abstrakt:** Celem pracy było określenie właściwości luminescencyjnych polimeru koordynacyjnego jonów Dy(III) z kwasem 1H-pirazolo-3,5-dikarboksylowym. Proces kompleksowania oraz właściwości termiczne otrzymanego kompleksu zostały przebadane za pomocą spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR) oraz różnymi metodami analizy termicznej (TG, DSC) w atmosferze powietrza. Zarejestrowano widmo wzbudzenia, widmo emisyjne oraz krzywą zaniku fluorescencji dla 1H-pirazolo-3,5-dikarboksylanu dysprozu(III) otrzymanego w warunkach hydrotermalnych.

**Wprowadzenie:** Od wielu lat szeroko stosowaną metodą wytwarzania wysoko luminescencyjnych materiałów jest wbudowywanie jonów lantanowców (Ln) do funkcjonalnych struktur szkieletowych. Jony lantanowców są atrakcyjnymi lumoforami ze względu na ich wąskie widma emisyjne, nawet w roztworze, jednak przejścia elektronowe lantanowców, które powodują emisję fotonów są ekranowane przez powłokę 5d. Przejścia elektronowe Ln(III) są zabronione przez reguły wyboru (Laporte), co prowadzi do słabej absorpcji i niskich wydajności kwantowych. Rozwiązaniem, tego problemu jest kompleksowanie pożądanego lantanowca z silnie absorbującym ligandem organicznym. W obecności silnego sprzężenia oscylacyjnego pomiędzy ligandem a jonem metalu, można osiągnąć bezpośredni transfer energii z łatwiej dostępnego stanu wzbudzonego liganda do odpowiedniego poziomu energii metalu. To sprzężenie prowadzi do zwiększenia intensywności luminescencji i jest powszechnie znane jako efekt „antenowy” [1]. Jak wspomniano powyżej, wydajność luminescencji lantanowca w kompleksach organicznych jest zwykle osiągnięta przez zastosowanie ligandów „antenowych”, które skutecznie przenoszą energię uzyskaną w wyniku absorpcji fotonów do jonów Ln w strukturze kompleksu (Rys. 1). W większości kompleksów Ln, transfer energii zachodzi ze stanu wzbudzonego tripletu liganda do stanu emisyjnego Ln. Fakt ten ma istotne konsekwencje dla wyboru liganda organicznego podczas projektowania tego typu związków. Efekt anteny w wielu przypadkach obejmuje trzy sekwencyjne przejścia i relaksację emisyjną do stanu podstawowego lantanowca (Rys. 1) [1,2].

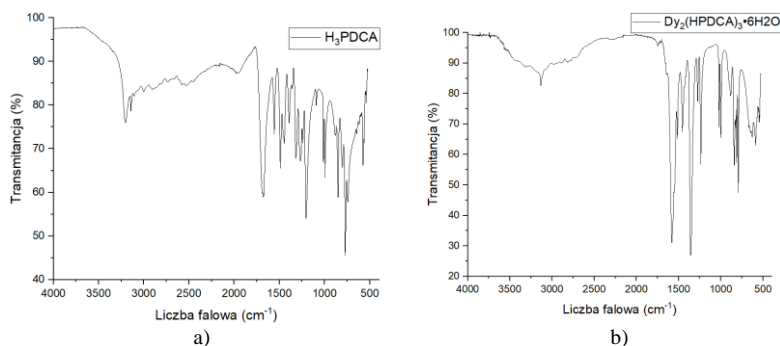


Rys. 1. Diagram poziomów energetycznych stanów emisyjnych jonów lantanowców (III) [2].

W niniejszej pracy za taką anteną transferu energii, posłużył kwas 1H-pirazolo-3,5-dikarboksylowy, który wykazuje dobre właściwości kompleksujące względem jonów Ln(III) a jednocześnie zawiera w swojej budowie grupy chromoforowe C=O i pierścien pirazolowy który jest układem sprzężonych wiązań  $\pi$ , które z kolei mogą absorbować kwanty promieniowania i transferować je do jonu centralnego.

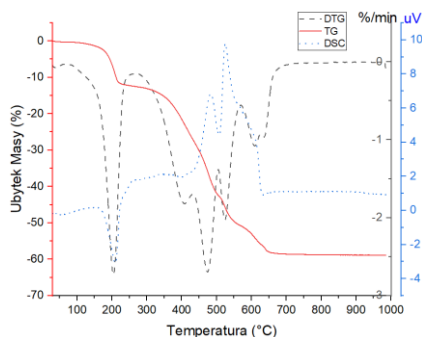
**Część eksperymentalna:** Synteza kompleksu o właściwościach luminescencyjnej zachodziła w warunkach hydrotermalnych. Zdeprotonowany kwas pirazolo-3,5-dikarboksylowy (1,5 mmol, 25 cm<sup>3</sup>) został zmieszany z wodnym roztworem azotanu(V) dysprozu(III) (1mmol, 20 cm<sup>3</sup>) w wyniku czego pH mieszaniny reakcyjnej wynosiło 4,5. Otrzymaną zawiesinę przeniesiono do naczynia teflonowego i zamknięto w stalowym autoklawie. Dla osiągnięcia warunków hydrotermalnych naczynie reakcyjne z mieszaniną były ogrzewane izotermicznie w 120°C przez 72 godziny. Otrzymany osad został odsączony, przemyty wodą destylowaną oraz wysuszony w temperaturze pokojowej. Widmo wzbudzenia, emisji oraz czas zaniku fluorescencji otrzymanego kompleksu zostały zarejestrowane na aparacie Horiba PTI Quanta-Master. Widma rejestrowane w temperaturze pokojowej. Widmo (ATR-FTIR) otrzymanego związku zarejestrowano na spektrofotometrze Nicolet 6700 z przystawką diamentową w zakresie 4000-600 cm<sup>-1</sup>. Krzywe TG/DSC zarejestrowano na analizatorze termicznym Setsys 16/18 firmy Setaram, w przepływowej atmosferze powietrza z szybkością grzania 10°C/min.

**Wyniki:** Dla potwierdzenia zajścia reakcji kompleksowania, przeprowadzono analizę widmi ATR-FTIR wolnego kwasu H<sub>2</sub>PDCA oraz zsyntezowanego kompleksu Dy<sub>2</sub>HPDCA·nH<sub>2</sub>O (Rys. 2). Zanik pasma absorpcyjnego  $\nu(\text{C}=\text{O})$  przy 1687 cm<sup>-1</sup> na widmie kwasu H<sub>2</sub>PDCA (Rys. 2a) oraz powstanie dosyć szerokich pasm przy liczbach falowych 1579 cm<sup>-1</sup> oraz 1359 cm<sup>-1</sup> na widmie kompleksu (Rys. 2b) pochodzących od drgań rozciągających asymetrycznych  $\nu_{as}(\text{COO})$  i symetrycznych  $\nu_s(\text{COO})$  grup karboksylanowych, świadczą o deprotonacji liganda i powstaniu wiązań koordynacyjnych między metalem a grupami karboksylanowymi liganda.



Rys. 2. a) Widmo ATR-FTIR wolnego kwasu H<sub>3</sub>PDCA, b) Widmo ATR-FTIR kompleksu Dy<sub>2</sub>(HPDCA)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.

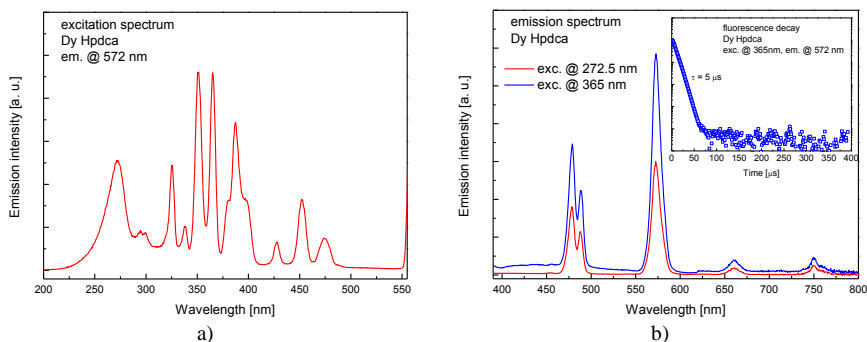
Analiza termiczna wykazała, że otrzymany związek jest termicznie stabilny do temperatury 102°C a w zakresie temperatury 102–219°C zachodzi proces dehydratacji, podczas którego są uwalniane cząsteczki wody z sfery koordynacyjnej. Ubytek masy na krzywej TG, wskazuje na obecność 6 cząsteczek wody w strukturze kompleksu. Po procesie dehydratacji następuje proces rozkładu bezwodnego kompleksu do tlenku Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, który zachodzi w zakresie temperatury 219–712°C. (Rys. 3).



Rys. 3. Krzywe TG, DTG oraz DSC otrzymanego kompleksu Dy<sub>2</sub>HPDCA·6H<sub>2</sub>O.

Widmo wzbudzenia kompleksu Dy<sub>2</sub>HPDCA·6H<sub>2</sub>O (Rys. 4a) zarejestrowano przy 572 nm. Widmo składa się z szerokiego pasma w zakresie 230–280 nm (maksimum przy 272,5 nm) pochodzącego od H<sub>3</sub>PDCA oraz szereg pasm związanych z przejściami f-f elektronowymi w jonie Dy(III). Najsilniejszepasma przy 325, 350, 365, 387, 427, 453 i 475 nm związane są z przejściem ze stanu podstawowego <sup>6</sup>H<sub>15/2</sub> dysprozu(III) do stanów <sup>4</sup>M<sub>17/2</sub>; <sup>6</sup>P<sub>7/2</sub> + <sup>4</sup>M<sub>7/2</sub>; <sup>4</sup>I<sub>11/2</sub>; <sup>4</sup>F<sub>7/2</sub> + <sup>4</sup>I<sub>13/2</sub>; <sup>4</sup>G<sub>11/2</sub>; <sup>4</sup>I<sub>15/2</sub> oraz <sup>4</sup>F<sub>9/2</sub>.





**Rys. 4.** a) Charakterystyka wzbudzeniowa próbki Dy(III) (H<sub>3</sub>pdca), emisja monitorowana: 572 nm;  
 b) charakterystyka emisyjna próbki Dy(III) (H<sub>3</sub>pdca), pobudzenie: 272.5 nm (ligandy) oraz 365 nm (poziomy energetyczne dysprozu) wraz z dynamiką fluorescencji.

Widma emisyjne kompleksu Dy<sub>2</sub>HPDCA·6H<sub>2</sub>O zarejestrowano przy wzbudzeniu światłem o długości 275.5 nm oraz 365 nm (Rys. 4b). Kompleks dysprozu(III) z kwasem 3,5 pyrazolodikarboksylowym, świeci dość intensywnie w zakresie widzialnym (dominujące pasma w zakresie żółtym i niebieskim) zarówno przy pobudzaniu przez pasmo wzbudzenia ligandów (272,5 nm), jak i bezpośrednio przez wysokoleżące poziomy energetyczne jonów dysprozu (365 nm). Widmo emisyjne badanego kompleksu wykazuje pasma przy 479, 488; 572 oraz 660 nm, które związane są z emisją promieniowania ze stanu wzbudzonego <sup>4</sup>F<sub>9/2</sub> do poziomów <sup>6</sup>H<sub>15/2</sub>, <sup>6</sup>H<sub>13/2</sub> oraz <sup>6</sup>H<sub>11/2</sub> [3]. Pomiar dynamiki fluorescencji wskazują, że czas życia poziomu <sup>4</sup>F<sub>9/2</sub> jest bardzo krótki (na poziomie pojedynczych μs, podczas gdy dla materiałów krystalicznych i szklanych kształtuje się na poziomie powyżej 1 ms). Nie zaobserwowano zmiany dynamiki fluorescencji przy różnych pobudzeniach próbki.

**Wnioski:** W warunkach hydrotermalnych otrzymano nowy kompleks jonów Dy(III) z kwasem 1H-pirazolo-3,5-dikarboksylowym. Związek zawiera w strukturze także sześć cząsteczek wody. Kompleks jest stabilny termicznie w temperaturze pokojowej, a ogrzewanie prowadzi do procesu dehydracji powyżej 102°C. W wyższych temperaturach następuje dalszy rozkład kompleksu do Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Otrzymany związek kompleksowy charakteryzuje się emisją światła zielono-żółtego. Wyniki badań wskazują, iż zastosowany ligand w ograniczonym stopniu pełni rolę anteny.

#### Literatura:

1. M. D. Allendorf, C. A. Bauer, R. K. Bhakta and R. J. T. Houka, Chem. Soc. Rev., 38 (2009) 1330.
2. N. Sabbatini, M. Guardigli and J.-M. Lehn, Coord. Chem. Rev., 123 (1993) 201.
3. Y. L. P. Reddy, M. Waaz, S. N. Ahmed, C.V. K. Reddy, J. I.S.E.T., 4 (2017) 1.

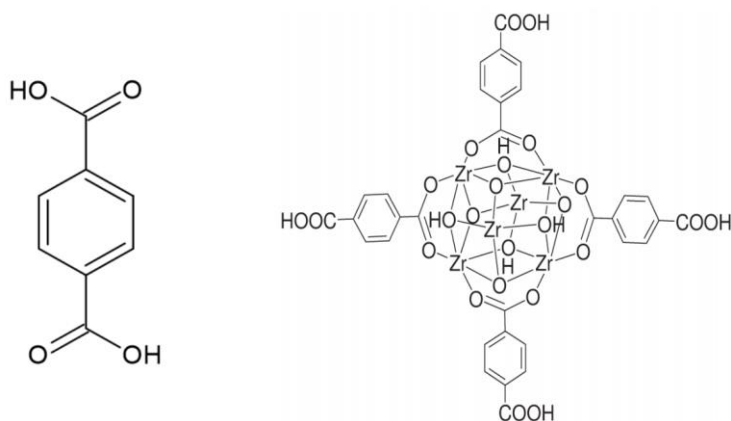
## **POLIMERY KOORDYNACYJNE NA BAZIE JONÓW CYRKONU(IV) I WYBRANYCH JONÓW LANTANOWCÓW(III)**

**M. GROSZEK, R. ŁYSZCZEK**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Ogólnej, Koordynacyjnej i Krystalografii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Zawarto podstawowe informacje odnośnie sieci metalo-organicznych oraz warunków syntezy i charakterystykę związków kompleksowych cyrkonu(IV) dotowanych jonami lantanowców(III) na bazie kwasu 1,4-benzenodikarboksylowego. Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka otrzymanych sieci metalo-organicznych z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR).

**Wprowadzenie:** Związki chemiczne o strukturze typu MOF (z ang. metal-organic framework) są znane od późnych lat 50 ubiegłego wieku i ciągle odkrywane są nowe właściwości aplikacyjne tych struktur [1]. Termin MOF został wprowadzony do języka naukowego w 1999 przez O.M. Yahgi. Pod względem chemicznym sieci metalo-organiczne zaliczane są do polimerów koordynacyjnych, których struktura wynika bezpośrednio z powstających wiązań koordynacyjnych pomiędzy jonami metali, a ligandami organicznymi. Zgodnie z terminologią IUPAC kompleksy o charakterze MOF zbudowane są z centr metalicznych nazywanych węzłami oraz ligandów organicznych – łączników i ponadto muszą mieć potencjalnie charakter porowaty [2]. Drugorzędowe jednostki budulcowe SBU (z ang. secondary building unit) są elementem powtarzającym się w porowatych sieciach zbudowanych z różnych łączników. Kontrola wielkości porów oraz podstawowych właściwości chemicznych jest możliwa dzięki jednostkom SBU, które mogą być w relatywnie prosty sposób modyfikowane. Przykładem sieci metalo-organicznych bazujących na takich jednostkach są MOF-y oparte na jonach Zr(IV) (min. UiO-66 oraz UiO-67). Związki te zawierają jednostki  $[\text{Zr}_6\text{O}_6(\text{OH})_4]^{12+}$ , które są połączone ze sobą odpowiednio przez łącznik 4,4'-bifenylodikarboksylianowy oraz 1,4-dikarboksylian [3]. Sieci metalo-organiczne znajdują się w centrum zainteresowania głównie z powodu swojej bardzo dużej powierzchni właściwej sięgającej nawet powyżej  $6000\text{m}^2/\text{g}$  (DUT-32) często nie możliwej do osiągnięcia przez inne materiały porowate [4]. Innymi pożądanymi przez świat nauki właściwościami są stabilność chemiczna oraz coraz większa wydajność katalityczna. W medycynie MOF-y są coraz częściej używane jako nośniki substancji leczniczych, dzięki rozwiązaniu tego typu zwiększana jest przyswajalność oraz szybkość uwalnianego leku [5]. Zmodyfikowany MOF w porównaniu do przemysłowego adsorbentu wykazuje większą pojemność adsorpcyjną jodku metylu, co jest wykorzystywane w wychwytywaniu tego radioaktywnego związku. Odnotowano również wykorzystanie związków typu MOF w mikro- i nanorobotyce, służyły one do bezpośredniego kontrolowania ruchu cząsteczek [6]. Sieci metalo-organiczne oparte na jonach Zr(IV) są szczególnie szeroko badane ze względu na ich świetne właściwości termiczne oraz wysoką stabilność w środowisku kwasowym. Ponadto

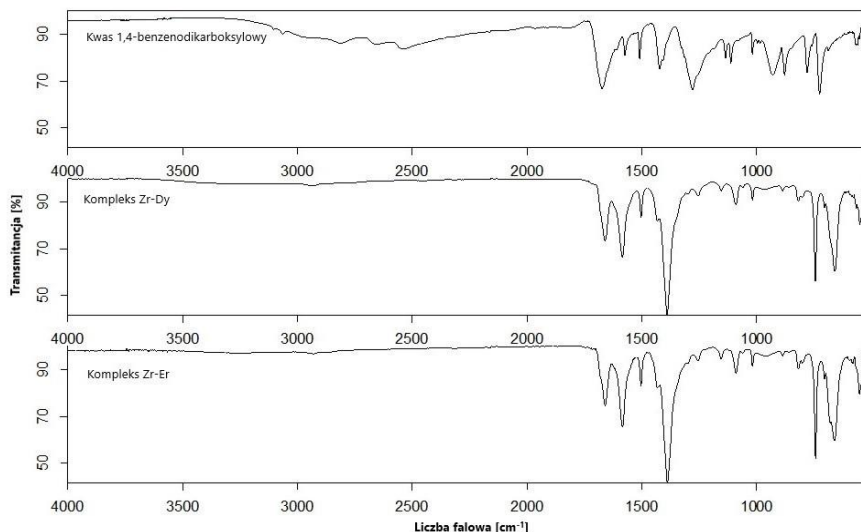
możliwość modyfikacji łączników organicznych zawierających różne grupy funkcyjne takie jak aminy, chlorowce, grupy hydroksylowe czy nitrowe, rozszerza możliwości aplikacyjne tej grupy związków [7]. MOF-y oparte na jonach Zr(IV) dotowane jonami lantanowców(III) o właściwościach luminescencyjnych, mogą być wykorzystane jako prekursorzy do otrzymywania domieszkowanego jonami Ln(III) tlenku cyrkonu(IV). Takie materiały znajdują zastosowanie w fotonice min. jako dodatki do światłowodów. Celem pracy jest synteza metodą solwotermalną z ogrzewaniem mikrofalami związków kompleksowych cyrkonu(IV) dotowanych jonami lantanowców(III) tj. Er(III) and Dy(III) z kwasem 1,4-benzenodikarboksylowym (1,4-BTC) (Rys. 1) oraz charakterystyka otrzymanych sieci metalo-organicznych metodami spektroskopowymi.



Rys. 1. Struktura kwasu 1,4-benzenodikarboksylowego oraz struktura MOF-u UiO-66 [8].

**Część eksperymentalna:** Syntezę związków kompleksowych Zr(IV) dotowanych jonami Ln(III) z kwasem 1,4-BTC ( $C_8H_6O_4$ ) przygotowano w oparciu o założenie, iż zawartość jonów Ln(III) w otrzymanych kompleksach będzie na poziomie 10%. W przypadku kompleksu zawierającego 10% jonów Dy(III) odważono: 1,8728g  $ZrCl_4$ ; 0,166g  $DyCl_3 \cdot xH_2O$  oraz 2,8245g  $C_8H_6O_4$ . Dla kompleksu zawierającego 10% jonów Er(III) odważono: 1,8728g  $ZrCl_4$ ; 0,1636 g  $ErCl_3 \cdot xH_2O$  oraz 2,819 g  $C_8H_6O_4$ . Substraty rozpuszczono w 30 ml DMF i przeniesiono do naczyń teflonowych reaktora mikrofalowego Mars 5 firmy CEM Corporation. Następnie wraz z naczyniem kontrolnym naczynia pomiarowe zostały umieszczone na rotorze i wstawione do reaktora. Ustawiono następujące parametry pracy reaktora: 400W, grzanie z temperatury pokojowej do temperatury  $120^\circ C$  w czasie 0,5h, ogrzewanie izotermiczne w  $120^\circ C$  przez 1h z ciągłym mieszaniem. Zawartość wystudzonych naczyń przesączono, przemyto DMF i zostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Otrzymano kompleksy w postaci białych polikrystalicznych proszków. Widma w podczerwieni ATR-FTIR zarejestrowane na spektrofotometrze Nicolet 6700 firmy Thermo Scientific wyposażonego w diamentową przystawkę Smart iTR.

**Wyniki:** Widma w podczerwieni kwasu 1,4-BTC oraz zsyntezowanych związków kompleksowych Zr(IV)-Ln(III)/BTC, które zostały zarejestrowane w zakresie 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  metodą ATR-FTIR umieszczono na rysunku 2.



**Rys. 2.** Widma ATR-FTIR: kwasu 1,4-BTC, kompleksu Zr-Er oraz kompleksu Zr-Dy.

Widmo kwasu 1,4-BTC w podczerwieni jest zdominowane przez pasma charakterystyczne dla drgań grup COOH. W zakresie 2816-2539  $\text{cm}^{-1}$  obserwuje się szereg pasm od drgań rozciągających  $\nu\text{OH}$  co jest zgodne z danymi literaturowymi [9]. Kształt tego pasma wskazuje, iż grupy OH zaangażowane są w międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Przy liczbie falowej 1673  $\text{cm}^{-1}$  występuje bardzo intensywne pasmo pochodzące od drgań rozciągających  $\nu\text{C=O}$  natomiast przy liczbie falowej 1279  $\text{cm}^{-1}$  występuje również silne pasmo związane z drganiami rozciągającymi  $\nu\text{C-O}$  z grup COOH [10]. W zakresie 1423-1407  $\text{cm}^{-1}$  występuje pasmo od drgań deformacyjnych  $\delta\text{COH}$ , a przy liczbie falowej równej 930  $\text{cm}^{-1}$  widoczne jest pasmo od drgania deformacyjnego  $\beta\text{COH}$  [11]. Po reakcji kompleksowania na widmach powstałych kompleksów pojawiają się pasma od drgań rozciągających asymetrycznych grup karboksylanowych  $\text{COO}^-$  przy 1585  $\text{cm}^{-1}$  oraz drgań rozciągających symetrycznych grup karboksylanowych  $\text{COO}^-$  przy 1390  $\text{cm}^{-1}$  w przypadku obu kompleksów. Występowanie tych pasm przy identycznych liczbach falowych wskazuje na izostrukuralny charakter otrzymanych związków. W obydwu kompleksach koordynacja atomów centralnych zachodzi w analogiczny sposób. Ponadto, widma obydwu związków kompleksowych wykazują obecność dość silnego pasma przy liczbie falowej równej 1660  $\text{cm}^{-1}$ , które pochodzi od drgań  $\nu\text{C=O}$  z użytego rozpuszczalnika N, N'-dimetyloformamidu (DMF-u). Położenie tych pasm świadczy o tym, iż cząsteczki rozpuszczalnika nie uczestniczą w koordynacji atomów centralnych i znajdują się w kanałach porowatych struktur otrzymanych polimerów koordynacyjnych.

**Wnioski:** Zsyntetyzowano związki kompleksowe na bazie cyrkonu(IV) dotowane jonami dysprozu(III) oraz jonami erbu(III). Widma ATR-FTIR potwierdziły zajście reakcji kompleksowania co zaobserwowano na podstawie zaniku pasm pochodzących od grup COOH i pojawienie się pasm drgań rozciągających od grup COO. W strukturach kompleksów znajdują się ponadto cząsteczki rozpuszczalnika tj. DMF. Otrzymane związki kompleksowe stanowią prekursory nieorganiczno-organiczne do syntezy tlenku cyrkonu(III) domieszkowanego jonami Ln(III).

**Literatura:**

1. F. W. Knobloch, W. H. Rauscher, J. Polym. Sci., 38 (1959) 261.
2. M. Cude, IUPAC Provisional Recommendations on Metal-Organic Framework and Coordination Polymer Terminology, (2016).
3. L. Valenzano, B. Civaleri, S. Chavan, S. Bordiga, M. H. Nilsen, S. Jakobsen, K. P. Lillerud, C. Lamberti, Chem. Mater., 23 (2011) 1700.
4. S. Szeligowska, J. Choma, M. Wiadomości Chemiczne, 71 (2017) 318.
5. G. Wyszogrodzka, P. Dorożyński, Polim. Med., 15 (2015) 86.
6. A. F. Demirors, M. T. Akan, E. Poloni, A. R. Studart, Soft Matter, 14 (2018) 4741.
7. J. H. Cavka, S. Jakobsen, U. Olsbye, N. Guillou, C. Lamberti, S. Bordiga, K. P. Lillerud, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 13850.
8. [https://www.strem.com/uploads/web\\_structures/40-1108.gif](https://www.strem.com/uploads/web_structures/40-1108.gif).
9. A. Te' llez S., Spectrochimica Acta Part A, 57 (2001) 993.
10. M. St. C. Flett, J. Chem. Soc., 4 (1951) 962.
11. L.J. Bellamy, The Infrared Spectra of Complex Molecules, Methuen, (1966).

## **ZASTOSOWANIE EKSTRAKCJI WSPOMAGANEJ ULTRADŹWIĘKAMI ORAZ EKSTRAKCJI DO FAZY STAŁEJ (SPE) W CELU IZOLACJI ZWIĄZKÓW O AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ Z WYTŁOKÓW Z JABŁEK**

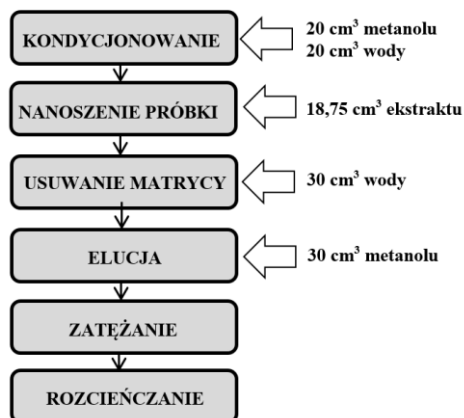
**E. GOŁĘBIEWSKA, M. WYRWAS, M. KALINOWSKA**, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45 E, 15-351 Białystok.

**Abstrakt:** Jabłka, obok arbuźów i bananów, są jednymi z wiodących owoców pod względem wielkości produkcji na świecie. Powszechnie wiadomo, że owoce i warzywa są cennym źródłem licznych substancji bioaktywnych wspomagających prawidłowe funkcjonowanie organizmu, z tego względu powinny być nieodzownym elementem codziennej diety. Jednak ciągły rozwój rynku żywności, intensywny tryb życia oraz zmiany w zwyczajach żywieniowych skutkują tym, że konsumenci coraz częściej zamiast po świeże owoce sięgają po ich odpowiedniki w postaci np. smoothie lub soków. Szacuje się, że przy produkcji soku z jabłek, około 1/4 masy surowca pozostaje niewykorzystywana i jest klasyfikowana, jako odpad wymagający odpowiedniego zagospodarowania. Nie wszyscy zdają sobie jednak sprawę, że takie wytloki nadal bogate są w cenne związki biologiczne. Z tego względu w poniższej pracy przedstawiono optymalne metody ekstrakcji związków bioaktywnych z wytlóków z jabłek oraz zbadano wpływ ekstrakcji, na jakość otrzymanych ekstraktów pod względem ich aktywności antyoksydacyjnej. Ponadto oznaczono zawartość związków fenolowych i triterpenoidów w pozyskanych ekstraktach za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

**Wprowadzenie:** Jednym z czołowych producentów jabłek w skali świata jest Polska. Produkuje się w niej średnio około 2,5 mln jabłek rocznie. Główne kierunki zagospodarowania tych owoców to eksport (27%), przetwórstwo (koncentraty, soki) oraz spożycie [1,2]. Intensywny rozwój gospodarczy oraz zmiany w nawykach żywieniowych społeczeństwa spowodowały, że zamiast po świeże owoce konsumenci coraz chętniej sięgają po ich odpowiedniki np. w formie soków lub koktajli typu smoothie [3]. Jednak taka obróbka owoców wiąże się z powstawaniem znacznych ilości odpadów, takich jak skórki, miąższ i pestki, znanych inaczej jako wytloki. Szacuje się, że wytloki stanowią około 25-30% masy wyjściowej surowca [4]. Dlatego w celu ochrony środowiska naturalnego niezwykle istotnym aspektem jest opracowywanie nowych metod zrównoważonego gospodarowania powstającymi odpadami. Do niedawna wytloki były niedocenianym surowcem, stosowanym głównie jako dodatek do paszy dla zwierząt lub surowiec do produkcji bioetanolu i biogazu [5]. Liczne przeprowadzone badania potwierdziły ich wysoki potencjał antyoksydacyjny, związany z obecnością dużych ilości substancji bioaktywnych (związki fenolowe, pektyny, witaminy, błonnik, makro- i mikroelementy), nawet po procesie obróbki [6]. Jednak należy zaznaczyć, że rodzaj i ilość substancji bioaktywnych zawartych w wytlókach będzie różnić się w zależności od odmiany, pochodzenia i stopnia dojrzałości jabłek oraz od

technologii ich przetwarzania i przechowywania [4,7]. Badania donoszą także, że w skórce jabłek, czyli w głównym składniku wyłoków, znajduje się więcej składników bioaktywnych niż w samym miąższu owocu [8]. Największe znaczenie zdrowotne przypisuje się zawartym w owocach antyoksydantom - polifenolom, które dzięki obecności w swojej budowie grup hydroksylowych przyłączonych do pierścienia aromatycznego, wykazują m.in. właściwości przeciwdrobnoustrojowe. antyutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwalergiczne oraz antyproliferacyjne [9,10]. Z tego względu wyłoki z jabłek powinny być uznawane nie jako materiał odpadowy, ale jako potencjalne i ciągle niewykorzystane źródło naturalnych związków bioaktywnych, które mogłyby znaleźć zastosowanie np. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym lub kosmetycznym. Do tej pory opracowano już wiele metod izolacji fitozwiązków z materiału roślinnego, z czego jedną z najczęściej wykorzystywanych technik jest ekstrakcja. Niezwykle ważnym aspektem jest to, aby technologie te były jak najbardziej wydajne oraz przyjazne dla środowiska, dlatego tak istotne są prace nad optymalizacją tych procesów [11]. W poniższej pracy opracowano optymalną metodę ekstrakcji związków bioaktywnych z wyłoków z jabłek odmiany Ligol. Otrzymane ekstrakty zbadano pod kątem aktywności antyoksydacyjnej (test DPPH<sup>•</sup>) oraz zawartości związków fenolowych i triterpenoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

**Część eksperymentalna:** Materiał badawczy stanowiły wysuszone wyłoki z jabłek odmiany Ligol (*Malus domestica*), pochodzące z uprawy konwencjonalnej. W celu przeprowadzenia ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami do ciemnych zakręcanych butelek odważono po 1,000 g wyłoków i dodano po 25,00 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika – wody. Ekstrakcję prowadzono 3-krotnie w łaźni ultradźwiękowej (50 Hz; 3x30 min; T= 60°C), każdorazowo przesączając wyłoki pod zmniejszonym ciśnieniem i z powrotem umieszczając je w butelkach by ponownie poddać je ekstrakcji świeżą porcją rozpuszczalnika. Całkowita objętość ekstraktu wynosiła 75,00 cm<sup>3</sup>. Do przygotowania ekstraktów przeznaczonych do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) użyto wyłoków o masach 0,250 g. W pierwszym etapie przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami przy użyciu wody (6,25 ml; 50 Hz; 3x30 min; T= 60°C). Całkowita objętość ekstraktu wynosiła 18,75 cm<sup>3</sup>. Następnie tak otrzymane ekstrakty poddano ekstrakcji do fazy stałej celem oczyszczenia ekstraktów i izolacji związków fenolowych. Ekstrakcję do fazy stałej wykonano w komorze SPE Chromabond. Procedurę SPE rozpoczęto od kondycjonowania fazy stacjonarnej umieszczonej w kolumnach. Następnie naniesiono ekstrakt i usuwano matrycę odpowiednim rozpuszczalnikiem. Kolejnym etapem było wymywanie zatrzymanych na absorbencie związków za pomocą metanolu. Sposób przeprowadzenia tego procesu oraz rodzaje i objętości dobranych rozpuszczalników przedstawiono na Rysunku 1. Całkowita objętość ekstraktu po zakończeniu procesu wynosiła 18,75 cm<sup>3</sup>.



**Rys. 1.** Schemat obrazujący wykorzystanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) celem izolacji związków fenolowych z ekstraktu.

Aktywność antyoksydacyjną wodnych ekstraktów zmierzono za pomocą testu z rodnikiem DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenyl-1-pikrylohydrozylowym) [12]. Oznaczenie polegało na tym, że do 1 cm<sup>3</sup> ekstraktu dodano 2 cm<sup>3</sup> metanoleowego roztworu DPPH<sup>\*</sup> (60 μmol/dm<sup>3</sup>). Próbę kontrolną stanowiła próbka, w której zamiast ekstraktu znajdował się rozpuszczalnik. Całość dokładnie wymieszano oraz inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie za pomocą spektrofotometru zmierzono absorbancję prób przy długości fali λ= 516 nm wobec metanolu. Aktywność ekstraktów (%inhibicji rodnika DPPH<sup>\*</sup>) policzono korzystając ze wzoru:

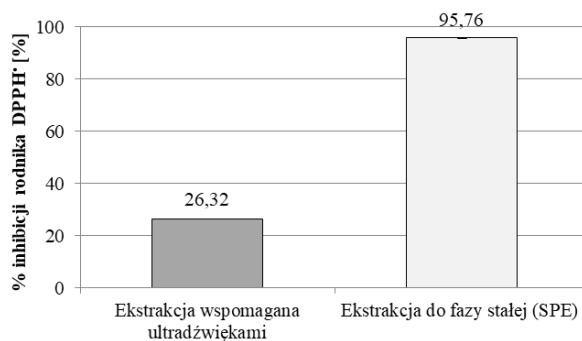
$$\% I = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{próba}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100\%$$

gdzie: %I - procent inhibicji rodnika DPPH<sup>\*</sup>, A<sub>kontrola</sub> - absorbancja próby kontrolnej bez dodatku badanego ekstraktu, A<sub>próba</sub> - absorbancja próby z dodatkiem badanego ekstraktu. Do oznaczania związków fenolowych w ekstraktach z wyłoków jabłkowych zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją UV, przy zastosowaniu kolumny analitycznej Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6×250 mm; 5 μm). Objętość wstrzykiwanych próbek wynosiła 10 μl. Próbki ekstraktów zatężono do objętości 0,5-1,0 ml. W przypadku analizy związków fenolowych faza ruchoma składała się z acetonitrylu i 2% kwasu octowego przy przepływie 1 ml/min. Zastosowano gradientowy program elucji a detektor ustawiono na 280, 320 i 360 nm. Dla triterpenoidów fazę ruchomą stanowił 90% acetonitryl i 10% woda, prędkość fazy ruchomej: 0,5 ml/min. Elucja miała charakter izokratyczny, objętość próbki wynosiła 10 μl, a długość fali analitycznej była równa 280 nm.

**Wyniki:** Aktywność antyoksydacyjną ekstraktów uzyskanych na drodze ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami oraz ekstrakcji do fazy stałej zmierzono za pomocą testu z rodnikiem DPPH<sup>\*</sup>. Wyniki przedstawiono na Rysunku 2. Badane ekstrakty są zdolne do inhibicji rodnika DPPH<sup>\*</sup> odpowiednio na poziomie 26,32 ± 0,011% dla ekstraktów poddanych działaniu ultradźwięków oraz 95,76 ± 0,006% dla ekstraktów poddanych ekstrakcji do fazy stałej. Ekstrakcja do fazy stałej, pozwala na niemal 4-krotne zwiększenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów, wyrażonej jako procent inhibicji rodnika DPPH<sup>\*</sup>. Może to być spowodowane usunięciem

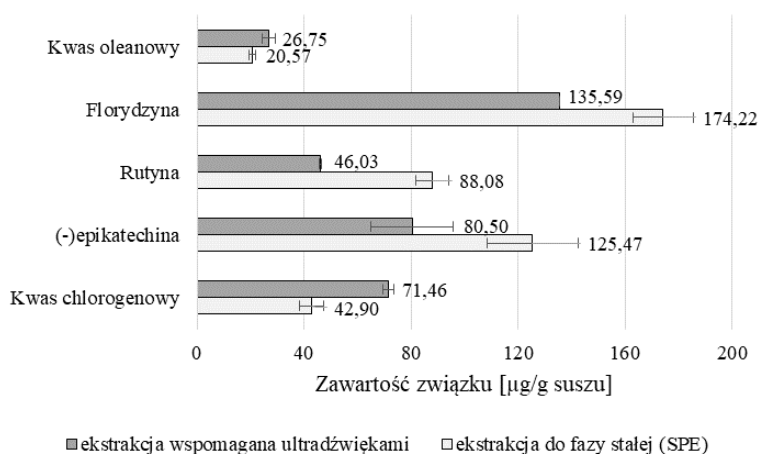


z roztworów substancji wpływających na kinetykę reakcji lub wchodzących w reakcje konkurencyjne z antyutleniaczami a DPPH<sup>\*</sup>.



**Rys. 2.** Porównanie średniej wartości procentu inhibicji rodnika DPPH<sup>\*</sup> przez ekstrakty otrzymane na drodze ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (EW) oraz ekstrakcji do fazy stałej (EW-SPE).

Zawartość związków fenolowych i triterpenoidów w pozyskanych ekstraktach oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Badane ekstrakty zawierają znaczne ilości związków fenolowych oraz związków triterpenoidowych (Rys. 3). Najwięcej tych związków zidentyfikowano w ekstraktach z wytloków z jabłek z zastosowaniem techniki SPE. Do związków zidentyfikowanych w największej ilości w ekstraktach uzyskanych w wyniku obu typów ekstrakcji należą florydżyna (EW: 135,592 ± 0,065 µg/g; EW-SPE: 174,218 ± 11,184 µg/g), rutyna (EW: 46,031 ± 0,433 µg/g; EW-SPE: 88,081 ± 6,205 µg/g), (-)epikatechina (EW: 80,499 ± 15,02 µg/g; EW-SPE: 125,467 ± 16,830 µg/g), kwas chlorogenowy (EW: 71,464 ± 2,590 µg/g; EW-SPE: 42,899 ± 4,580 µg/g) oraz kwas oleanowy (EW: 27,750 ± 2,401 µg/g; EW-SPE: 20,567 ± 1,133 µg/g).



**Rys. 3.** Porównanie zawartości wybranych polifenoli oraz triterpenoidów w wytlokach z jabłek [mg/g suszu] ekstraktów EW oraz EW-SPE.

**Wnioski:** Ekstrakty z wyłóków z jabłek odmiany Ligol (*Malus domestica*), ze względu na bogactwo w związki fenolowe (florydżyna, rutyna, (-)epikatechina, kwas chlorogenowy) jak i związki triptenoidowe (kwas oleanowy) charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, wrażeń jako stopień inhibicji rodnika DPPH<sup>•</sup>. Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) pozwoliło na oczyszczenie ekstraktów z substancji przeszkadzających i wpływających na wynik oznaczeń (np. cukrów, białek, soli metali). Otrzymane wyniki wskazują na duży potencjał wyłóków, jako materiału do pozyskiwania substancji bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających, które mogą mieć zastosowanie w biotechnologii, rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym lub spożywczym jako np. dodatek w żywności funkcjonalnej. Substancje te można ekstrahować z wyłóków z jabłek zgodnie z zasadami zielonej chemii, czyli stosując jako rozpuszczalnik wodę oraz techniki ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami, co czyni proces izolacji związków fenolowych ekonomicznym i przyjaznym środowisku.

Badania zostały zrealizowane w ramach pracy badawczej WI/WB-IIŚ/3/2021 w Katedrze Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej i sfinansowane z subwencji 2021 przekazanej przez Ministra Nauk i Szkolnictwa Wyższego.

#### **Literatura:**

1. S. Kierczyńska, Roczniki Naukowe, 17 (2015) 131.
2. T. Tarko, A. Duda-Chodak, A. Bebak, Żywność: nauka – technologia - jakość, 4 (2012) 55.
3. K. Jąder, Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, 19 (2017) 93.
4. C.A. Perussello, Z. Zhang, A. Marzocchella, B.K. Tiwari, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11 (2017) 776.
5. K. Śliwa, M.A. Malinowska, E. Sikora, J. Ogonowski, Przemysł Chemiczny, 94 (2015) 357.
6. E. Masiarz, H. Kowalska, M. Bednarska, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 1 (2019) 103.
7. D. Wichrowska, E. Żary-Sikorska, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 54 (2015) 286.
8. H. Kowalska, A. Lenart, A. Marzec, A. Ciurzyńska, J. Cichowska, K. Czajkowska, M. Wojnowski, M. Hankus, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2 (2015) 119.
9. M. Kalinowska, Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, 17 (2012) 37.
10. M. Akimowicz, M. Samsonowicz, Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, 75 (2020) 5.
11. N. Pap, E. Pongracz, L. Myllykoski, R. Keiski, Proceedings of the Waste Minimization and Resources Use Optimization Conference (2004) 159.
12. C.A. Rice-Evans, A.T. Diplock, M.C.R. Symons, Techniques in Free Radical Research, London, New York, Tokyo, Amsterdam, 1991.

## **WPLYW PROCESU FERMENTACJI NA WYDAJNOŚĆ EKSTRAKCYI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH Z ODPADÓW Z PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO**

**K. GRYKO, M. ZAWADZKA, M. KALINOWSKA**, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok.

**Abstrakt:** Przeprowadzono ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami wycieków z jabłek odmiany Ligoł, stosując fermentację mlekową. Skład tak uzyskanych ekstraktów określono przy wykorzystaniu spektrofotometrycznego oznaczenia całkowitej zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu, a także oznaczenia zawartości wybranych związków fenolowych i triterpenoidu (kwasu ursolowego) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym. Wyniki wskazują, że wycieki z jabłek mogą być surowcem do pozyskania cennych, prozdrowotnych związków. Procesy fermentacji mlekowej umożliwiły większy odzysk wspomnianych substancji z wycieków.

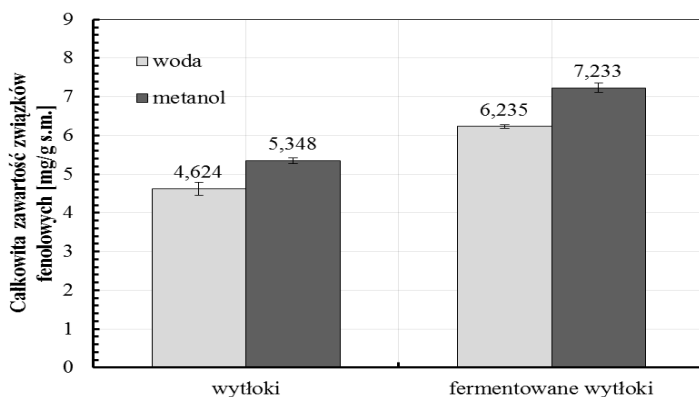
**Wprowadzenie:** W ostatnich latach nastąpiło wzmożone zainteresowanie konsumentów zdrową żywnością. Zauważyć można trend w kierunku spożycia produktów pochodzenia roślinnego. Prowadzi to do powstawania coraz większej ilości trudnych do zagospodarowania odpadów, którymi są pozostałości po owocach i warzywach (pestki, wycieki, a także elementy odrzucone w procesie sortowania). Odpady te wykazują potencjał do pozyskiwania z nich znacznych ilości związków bioaktywnych, w tym prozdrowotnych. W wielu badaniach [1], [2] został potwierdzony pozytywny wpływ związków bioaktywnych pochodzących z wycieków na zdrowie ludzi i zwierząt. Dlatego też wycieki owocowe lub warzywne mogą być wykorzystywane jako naturalny dodatek wzbogacający żywność w związki bioaktywne [3]. Takie podejście jest zgodne z ideą gospodarki o obiegu zamkniętym, której celem jest minimalizowanie strat wynikających z uciążliwości przechowywania i bezpośredniej utylizacji wspomnianych odpadów. W naszym kraju owocem najczęściej spożywanym i przetwarzanym jest jabłko. Istnieje wiele doniesień wskazujących na bogaty skład polifenolowy jabłek [4]. Związki te charakteryzują się właściwościami przeciwutleniającymi, przeciwcukrzycowymi i przeciwzapalnymi, co stanowi motywację do stosowania ich w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym. Wśród obecnych w jabłkach związków fenolowych można wyróżnić substancje z grup: kwasów hydroksybenzoesowych i hydroksycynamonowych, flawonoli czy antocyjan. Jednym z głównych kwasów fenolowych obecnych w jabłku jest kwas chlorogenowy, który odznacza się wysoką zdolnością do zmiatania reaktywnych form tlenu, takich jak rodnik nadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroksylowy ( $HO^{\cdot}$ ) czy nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) [5], [6]. Na uwagę zasługują także triterpenoidy, które mają silne działanie przeciwnowotworowe i mogą częściowo odpowiadać za przeciwnowotworowe właściwości ekstraktów z jabłek [7]. Związki fenolowe z materiału roślinnego są zwykle ekstrahowane przy pomocy organicznych rozpuszczalników przy zastosowaniu konwencjonalnych metod ekstrakcji takich jak: maceracja, ekstrakcja Soxhleta, ekstrakcja cieczą w stanie nadkrytycznym,

ekstrakcja przy wysokim ciśnieniu hydrostatycznym, ekstrakcja ultradźwiękami czy ekstrakcja wspomagana mikrofalami [8]. Metody te są skuteczne w przypadku wolnych związków fenolowych. Większość z nich występuje jednak w nierozpuszczalnej formie związanej w postaci koniugatów ze składnikami ściany komórkowej [9]. Związki fenolowe najczęściej występują w formie związanej w postaci glikozydów lub estrów, przy czym mogą się one wiązać z kwasami tłuszczowymi, sterolami i ścianami komórkowymi [4]. Ekstrakcja bioaktywnych polifenoli połączona z procesem fermentacji biomasy okazuje się być wydajniejszym procesem niż samodzielna ekstrakcja z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych [9]. Podczas procesu fermentacji bakterie kwasu mlekowego produkują enzymy, m.in. amylazy, proteazy i lipazy. Hydrolizują one polisacharydy, białka i lipidy do nietoksycznych substancji smakowych, zapachowych oraz modyfikujących teksturę i wpływają na właściwości sensoryczne produktu, atrakcyjne dla konsumentów [10]. Produktem „ubocznym” tych reakcji jest uwolnienie związanych substancji bioaktywnych. Ponadto bakterie wytwarzają dodatkowe związki bioaktywne na drodze wtórnego metabolizmu, co może wzbogacać produkt końcowy [9]. Fermentacja przynosi zatem liczne korzyści, wliczając w to wzbogacenie produktu w dobroczynne mikroorganizmy oraz pożądane substancje biologicznie aktywne. Jako przykład może służyć fermentowany sok z granatu, w którym zaobserwowane nawet 75-krotnie wyższą zawartość bioaktywnych przeciwutleniaczy, względem produktu niepoddanego fermentacji [11].

**Część eksperymentalna:** W celu przeprowadzenia fermentacji wyłoków jabłek (odmiany Ligol) odważono 10 g zmielonych wyłoków, dodano 150 ml wody destylowanej oraz 0,01 g ożywionych kultur starterowych bakterii *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactococcus lactis*. Fermentację prowadzono przez 72 godziny w wytrząsarce laboratoryjnej (25°C; pH = 5,5). Następnie odparowano rozpuszczalnik i poddano wyłoki suszeniu właściwemu przez 72 godziny w suszarce przy temperaturze 60°C celem dezaktywacji flory bakteryjnej. Wysuszone wyłoki ponownie zmielono, przeniesiono do zamkniętego naczynia i przechowywano w lodówce. W celu otrzymania ekstraktów z wyłoków jabłkowych (zarówno fermentowanych, jak i tych, które nie zostały poddane fermentacji – próba kontrolna) rozdrobniony materiał ekstrahowano z zastosowaniem ultradźwięków stosując jako rozpuszczalniki wodę oraz wodny roztwór metanolu (80%). Ogólna zawartość związków fenolowych została określona spektrofotometrycznie metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu [12]. Przed wykonaniem oznaczenia sporządzono krzywe wzorcowe kwasu galusowego w wodzie i w metanolu. W tym celu pobierano po 0,25 ml każdego z przygotowanych rozcieńczeń kwasu galusowego, co skutkowało otrzymaniem w mieszaninach reakcyjnych stężeń w zakresie 8,5-0,75 mg/l. Następnie dodawano do każdej próbki po 0,25 ml odczynnika Folina-Ciocalteu rozcieńczonego wodą dejonizowaną 1:1, 0,5 ml 14% roztworu węgla sodu oraz 4 ml wody dejonizowanej. Po godzinnej inkubacji mierzono absorbancję próbek wobec próby zerowej, gdzie zamiast kwasu galusowego użyto rozpuszczalnika (wody dejonizowanej lub metanolu 80%) przy  $\lambda=760$  nm. Oznaczenia wykonano trzykrotnie w trzech niezależnych doświadczeniach. Wykreślono krzywą wzorcową

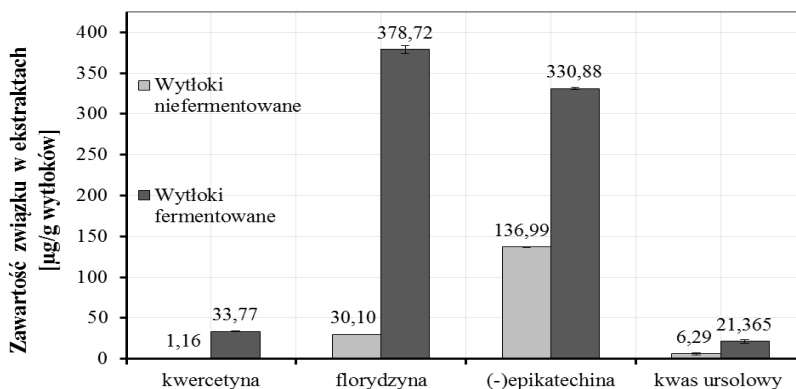
w programie Statistica 13 (wzór krzywej wzorcowej kwasu galusowego w wodzie:  $y = 0,0053x + 0,0201$ ;  $R^2 = 0,9976$ ; w metanolu:  $y = 0,0054x + 0,0046$ ;  $R^2 = 0,9948$ ). Następnie w analogiczny sposób określono całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach. Oznaczenia również wykonano trzykrotnie w trzech niezależnych doświadczeniach. Wyniki opracowano w programie Statistica 13. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach podano w przeliczeniu na kwas galusowy korzystając z krzywych wzorcowych. Końcowy wynik oznaczenia podano w jednostkach  $\text{mg}/\text{dm}^3$  s.m. W celu określenia zawartości wybranych związków fenolowych w ekstraktach z wytlóków jabłkowych zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną typu DAD [13]. Stosowano kolumnę Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical (4,6 x 250 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Objętość próbki do nastrzyku wynosiła 10  $\mu\text{l}$ . W przypadku analizy związków fenolowych faza ruchoma składała się z acetonitrylu (A) i 2% kwasu octowego (B) przy szybkości przepływu 1 ml/min; gradientowy program elucji: 0–40 min, gradient liniowy od 3 do 15% A i od 97 do 85% B; 40–60 min, gradient liniowy 15–25% A i 85–75% B; 60–75 min: gradient liniowy 25–50% A i 75–50% B; 75–80 min: gradient liniowy 50–95% A i 50–5% B; gradient liniowy 80–85 min: 95–3% A i 5–97% B; 85–90 min: 3% A i 97% B. Detektor ustawiono na 280, 320 i 360 nm. W przypadku analizy triterpenoidów fazą ruchomą był 90% acetonitryl i 10% woda, elucja izokratyczna, prędkość fazy ruchomej: 0,5 ml/min, objętość próbki: 10  $\mu\text{l}$ , długość fali analitycznej: 280 nm.

**Wyniki:** Całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach z wytlóków z jabłek Ligol oznaczono za pomocą testu z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu, wyniki przedstawiono na rysunku 1. Fermentacja wytlóków z jabłek wpłynęła na wzrost zawartości związków fenolowych w ekstraktach (ekstrakty wodne:  $4,624 \pm 0,164$   $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.m.}}$  – wytloki niefermentowane,  $6,235 \pm 0,051$   $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.m.}}$  – wytloki fermentowane; metanolowe:  $5,348 \pm 0,066$   $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.m.}}$  – wytloki niefermentowane,  $7,233 \pm 0,122$   $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.m.}}$  – wytloki fermentowane). Metanol jest lepszym niż woda rozpuszczalnikiem do ekstrakcji związków fenolowych z wytlóków z jabłek.



Rys. 1. Całkowita zawartość związków fenolowych w ekstraktach z wytlóków z jabłek określona spektrofotometryczną metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu.

Wyniki oznaczeń wybranych związków fenolowych oraz triterpenoidów w ekstraktach metanolowych metodą HPLC-DAD przedstawiono na rysunku 2. Zaobserwowano wyraźny wpływ procesu fermentacji na ilość wybranych związków w ekstraktach. Zawartość florydzyiny wzrosła ponad 100-krotnie (wytłoki niefermentowane:  $30,10 \pm 0,15$ ; fermentowane:  $378,72 \pm 5,08$   $\mu\text{g/g}_{\text{wytłoków}}$ ). Natomiast zawartość kwercetyny, (-)epikatechiny i kwasu ursolowego w ekstraktach z wytłoków niefermentowanych i fermentowanych wynosiła odpowiednio:  $1,16 \pm 0,049$  i  $33,77 \pm 0,56$ ;  $136,99 \pm 0,143$  i  $330,88 \pm 1,38$ ;  $6,291 \pm 1,45$  i  $21,37 \pm 2,58$   $\mu\text{g/g}_{\text{wytłoków}}$ .



Rys. 2. Wyniki oznaczenia zawartości poszczególnych związków fenolowych i kwasu ursolowego w ekstraktach metanolowych metodą HPLC-DAD.

**Wnioski:** Fermentacja wytłoków z jabłek znacznie zwiększyła zawartość związków fenolowych w ekstraktach. Zastosowanie odpowiednich bakterii fermentacyjnych oraz optymalizacja procesu fermentacji odpadów z przemysłu rolno-spożywczego może być potencjalnym rozwiązaniem rosnącego zapotrzebowania na związki bioaktywne pochodzenia naturalnego, które mogą mieć zastosowanie w biotechnologii, przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym. Techniki wspomagające procesy ekstrakcyjne, w tym proces fermentacji, mogą znaleźć zastosowanie w technologii żywności. Ponadto, zachęcają do tego względy ekonomiczne, pozwalające na zrównoważoną gospodarkę odpadami z przemysłu spożywczego.

Badania zostały zrealizowane w ramach pracy badawczej WI/WB-IIŚ/4/2021 Katedry Chemii, Biologii i Biotechnologii Politechniki Białostockiej i sfinansowane z subwencji 2021 przekazanej przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

#### Literatura:

1. M. Belović, A. Torbica, I. Pajić-Lijaković, J. Mastilović, Food Chemistry, 237 (2017) 1226.
2. S. Dabbou, F. Gai, M. Renna, L. Rotolo, S. Dabbou, C. Lussiana, A. Kovitvadhi, A. Brugiapaglia, M. De Marco, A. N. Helal, I. Zoccarato, Meat Science, 124 (2017) 77.
3. J. Majerska, A. Michalska, A. Figiel, Trends in Food Science and Technology, 88 (2019) 207.
4. M. Kalinowska, A. Bielawska, H. Lewandowska-Siwkiewicz, W. Priebe, W. Lewandowski, Plant Physiology and Biochemistry, 84 (2014) 169.

5. L. Panzella, M. Petriccione, P. Rega, M. Scortichini, A. Napolitano, *Food Chemistry*, 140 (2013) 672.
6. Y. Xi, W. Jiao, J. Cao, W. Jiang, *PLoS One*, 12 (2017) 1.
7. X. He, R.H. Liu, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11 (2007) 4366.
8. I. Ignat, I. Volf, and V. I. Popa, *Food Chemistry*, 126 (2011) 1821.
9. T. Bhanja Dey, S. Chakraborty, K.K. Jain, A. Sharma, R.C. Kuhad, *Trends in Food Science and Technology*, 53 (2016) 60.
10. M. Trzaskowska, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 89 (2013) 5.
11. M. Dżugan, J. Kisała, M. Wesołowska, *Rola procesów technologicznych w kształtowaniu jakości żywności*, Kraków 2016, 143.
12. M. Cybul, R. Nowak, *Herba Polonica*, 54 (2008) 68.
13. P. Mróz, K. Wilczek, M. Żak, M. Zielińska-Pisklak, *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 6 (2012) 40.

## PROCEDURA OZNACZANIA ŚLADOWYCH ILOŚCI INDU I TYTANU METODĄ WOLTAMPEROMETRII STRIPINGOWEJ Z WYKORZYSTANIEM STAŁEJ ELEKTRODY FILMOWEJ

**M. ADAMCZYK, M. GRABARCZYK, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.**

**Abstrakt:** Opisano procedurę jednoczesnego oznaczania indu i tytanu w próbkach wód naturalnych metodą adsorpcyjnej woltamperometrii stripingowej, w której pomiar oparty jest na adsorpcyjnym nagromadzeniu kompleksów indu i tytanu z kupferronem na błonkowej elektrodzie ołowiowej. W skład roztworu podstawowego po optymalizacji wchodziły  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  bufor octanowy  $\text{pH} = 6,0$ ,  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  kupferron oraz  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Pb(II)}$ . Kompleksy  $\text{In(III)}$ -kupferron i  $\text{Ti(IV)}$ -kupferron nagromadzano na powierzchni elektrody przy potencjale  $-0,9 \text{ V}$  przez  $30 \text{ s}$ . Opracowana procedura umożliwia oznaczanie jonów indu w zakresie stężeń od  $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  do  $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  oraz jonów tytanu w zakresie stężeń od  $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  to  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

**Wprowadzenie:** Znaczenie procedury jednoczesnego oznaczania  $\text{In(III)}$  i  $\text{Ti(IV)}$  w próbkach wód środowiskowych wynika z faktu, że w ostatnim czasie pierwiastki te zyskały duże zainteresowanie. Ze względu na swoje pożądane właściwości cieszą się szerokim zastosowaniem w różnorodnych gałęziach przemysłu, co prowadzi do ich ciągłego przedostawania się do środowiska naturalnego, co z kolei nie pozostaje bez wpływu na organizmy żywe. Wpływ tytanu na istoty żywe nie jest do końca poznany, jednak udowodniono toksyczne działanie dwutlenku tytanu kumulującego się w organizmach, który jest przyczyną wielu chorób. Przewlekłe skutki zdrowotne odnotowano również w przypadku nadmiernego gromadzenia się indu. W związku z tym istnieje konieczność ciągłego monitorowania stężeń tych pierwiastków w środowisku. Metodą doskonale nadającą się do tego celu jest adsorpcyjna woltamperometria stripingowa. Jest ona stosunkowo szybka, tania, a zarazem dokładna i łatwa w zastosowaniu. Niezwykle wysoka czułość wynika z zateżnienia analitu w postaci kompleksu z określonym czynnikiem kompleksującym na elektrodzie pracującej przed właściwym procesem elektrodowym, stanowiącym podstawę oznaczenia. Wcześniejsze badania dowiodły, iż  $\text{In(III)}$  i  $\text{Ti(IV)}$  tworzą elektrochemicznie aktywne kompleksy z kupferronem, co umożliwia woltamperometryczne oznaczanie tych pierwiastków i pozwala na uzyskanie niskiej granicy wykrywalności [1-3]. W związku z tym procedurę jednoczesnego oznaczania indu i tytanu opracowano z wykorzystaniem kupferronu jako czynnika kompleksującego, który zapewnił odpowiednie rozdzielenie pików pochodzących od obu oznaczanych pierwiastków.

**Część eksperymentalna:** Pomiary woltamperometryczne przeprowadzono za pomocą analizatora  $\mu\text{Autolab}$  (Utrecht, Holandia). Do badań wykorzystano układ trójelektrodowy, w skład którego wchodziły: elektroda z węgla szklanego o średnicy  $1 \text{ mm}$  jako elektroda pracująca, elektroda platynowa pełniąca rolę elektrody pomocniczej oraz elektroda chlorosrebrowa  $\text{Ag/AgCl}$  (z nasyconym  $\text{NaCl}$ ) jako



elektroda odniesienia. Pomiary metodą adsorpcyjnej woltamperometrii stripingowej prowadzono w roztworze zawierającym  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  bufor octanowy o  $\text{pH} = 6,0$ ,  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  kupferron i  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  Pb(II). Woltamperometryczny pomiar wykonywano z roztworów nieodtlenionych i składał się on z następujących etapów:

- jednoczesne tworzenie filmu ołowiu na powierzchni elektrody z węgla szklistego i nagromadzanie na niej na drodze adsorpcji kompleksów In(III)-kupferron i Ti(V)-kupferron przy potencjale  $-0,9 \text{ V}$  przez 30 s.
- rejestracja sygnału analitycznego w wyniku zmiany potencjału od  $-0,6$  do  $-0,9 \text{ V}$ .

Dodatkowo po każdym pomiarze elektrodę czyszczono elektrochemicznie: najpierw do elektrody ołowiowej przykładano potencjał  $-1,2 \text{ V}$  przez 15 s (w tym czasie następowało czyszczenie elektrody z tlenków ołowiu, które mogły powstać podczas kontaktu elektrody ołowiowej z powietrzem, następowała ich redukcja do postaci metalicznej). W drugim etapie przykładano potencjał  $+0,2 \text{ V}$  przez 15 s w tym czasie metaliczny ołów utleniało do jonów Pb(II), które przechodziły do roztworu.

**Wyniki:** Dobór elektrolitu podstawowego - we wcześniej opracowanych procedurach woltamperometrycznych wykorzystujących aktywność elektrochemiczną kompleksów jonów metali z kupferronem zastosowano środowisko kwaśne [4-7]. W związku z tym w niniejszej pracy, jako elektrolitu podstawowego użyto buforu octanowego jako odpowiedniego do tworzenia zarówno kompleksów In(III)-kupferron jak i Ti(IV)-kupferron. W celu dobrania najbardziej optymalnych warunków w proponowanej procedurze skupiono się na doborze odpowiedniego pH buforu octanowego. Pomiary prowadzono w zakresie pH od 3,5 do 6,4, przy czym stężenie każdego z badanych buforów było takie samo i wynosiło  $0,2 \text{ mola L}^{-1}$ . W przypadku jednoczesnego oznaczania dwóch pierwiastków, oprócz prądu ich pików, bardzo ważnym parametrem jest również odpowiednie oddzielenie sygnałów pochodzących od obu analitów na woltamperogramie. W przypadku indu i tytanu zauważono, że ich piki rosły wraz ze wzrostem pH, a sygnał tytanu osiągał maksimum przy pH 6, natomiast maksymalny pik indu otrzymano przy pH 4,5. Biorąc pod uwagę również fakt, że wraz ze wzrostem pH następowało lepsze rozdzielenie pików, do dalszych badań wybrano pH buforu octanowego równe 6.

Potencjał i czas nagromadzania, aby uprościć przebieg pomiaru, zaproponowaliśmy prowadzenie jednego etapu nagromadzania, podczas którego następowało jednoczesne tworzenie się in situ filmowej elektrody ołowiowej i nagromadzanie na niej tytanu i indu. Badano wpływ wartości potencjału na natężenia prądów pików tytanu i indu oraz rozdzielenie obu pików w zakresie od  $-0,55 \text{ V}$  do  $-1,1 \text{ V}$  przy stałym czasie nagromadzania 30 s. Zauważono, że po zmianie potencjału nagromadzania w kierunku wartości bardziej ujemnych, z  $-0,55 \text{ V}$  do  $-1,0 \text{ V}$ , oba piki stawały się wyższe. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że separacja obu analizowanych pików była najlepsza przy potencjale  $-0,9 \text{ V}$ , potencjał ten został wstępnie wyselekcjonowany jako najbardziej optymalny. Następnie zmieniano czas nagromadzania w zakresie 10-100 s przy potencjale akumulacji  $-0,9 \text{ V}$ . Sygnały woltamperometryczne rosły prawie liniowo wraz ze wzrostem czasu akumulacji do 30 s zarówno w przypadku tytanu jak i indu. Przy dłuższym czasie nagromadzania wysokość pików Ti(IV) zaczęła się stopniowo zmniejszać, natomiast wysokość pików In(III) pozostawała taka sama jak dla czasu równego 30 s. Podsumowując, wybrano

czas akumulacji 30 s, aby uzyskać najniższą możliwą czułość, nie wydłużając jednocześnie pomiaru.

Wpływ stężenia kupferronu: z uzyskanych wyników wynika, że pik indu pojawia się już przy stężeniu kupferronu równym  $2 \times 10^{-5}$  mola  $L^{-1}$ , natomiast sygnał tytanu pojawia się przy stężeniu  $5 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ . Następnie oba sygnały rosły wraz ze wzrostem stężenia czynnika kompleksującego do  $4 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$  dla tytanu i  $5 \times 10^{-4}$  mola  $L^{-1}$  dla indu, natomiast przy wyższych stężeniach pozostawały stałe. Dlatego jako najbardziej odpowiednie dla obu oznaczanych pierwiastków wybrano stężenie kupferronu równe  $5 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ . Kluczowym czynnikiem wpływającym na jakość filmu ołowiowego utworzonego na elektrodzie z węgla szklitego, a także na wysokość pików indu i tytanu, jest stężenie jonów ołowiu wprowadzanych do analizowanego roztworu. W związku z tym zbadano wpływ stężenia Pb(II) na sygnały analityczne uzyskane przy stałym stężeniu Ti(IV) i In(III) równym  $1 \times 10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ . Stężenie Pb(II) zmieniano w zakresie stężeń od  $1 \times 10^{-6}$  mola  $L^{-1}$  do  $1,2 \times 10^{-4}$  mola  $L^{-1}$ . Pik tytanu pojawił się przy stężeniu ołowiu  $5 \times 10^{-6}$  mola  $L^{-1}$ , podczas gdy pik indu pojawił się przy stężeniu ołowiu  $7 \times 10^{-6}$  mola  $L^{-1}$ . Następnie oba piki rosły aż do momentu gdy stężenie Pb(II) wzrosło do  $5 \times 10^{-5}$  mola  $L^{-1}$  i  $7 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ , odpowiednio dla indu i tytanu, aby ostatecznie osiągnąć stałą wartość. Jako optymalne stężenie ołowiu dla obu oznaczonych pierwiastków przyjęto wartość równą  $7 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ . Selektyność proponowanej procedury oznaczania In(III) i Ti(IV) zbadano wprowadzając rosnące stężenia jonów innych metali do roztworu o stałym stężeniu In(III) i Ti(IV) równym  $1 \times 10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ . Stężenia jonów obcych były takie same jak stężenie tytanu i indu oraz 10 lub 100 krotnie wyższe od stężeń oznaczonych jonów, tj.  $1 \times 10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  mol  $L^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ . Przez dopuszczalne stężenie rozumiano takie ilości jonów obcych, które powodują zmianę w wysokości sygnału indu i tytanu mniejszą lub równą 5%. Maksymalne dopuszczalne stężenia jonów obcych nie wpływające na sygnał tytanu i indu zaprezentowano w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Dopuszczalne stężenia jonów obcych.

Jony obce	Dopuszczalne stężenie jonu obcego w oznaczaniu Ti(IV)	Dopuszczalne stężenie jonu obcego w oznaczaniu In(III)
Au(III)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$
Bi(III)	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$
Cd(II)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
Co(II)	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$
Cr(III)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
Cu(II)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$
Fe(III)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
Ga(III)	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-5}$
Ge(IV)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
Hg(II)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
Mn(II)	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$
Mo(VI)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
Ni(II)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$
Pt(IV)	$1 \times 10^{-6}$	*

Sb(III)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
V(V)	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-5}$
W(VI)	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$
Zn(II)	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$

\* nie zbadano dokładnie dopuszczalnego stężenia Pt(IV), przy którym można otrzymać niezakłócony sygnał od In(III).

**Wnioski:** W pracy przedstawiono zoptymalizowaną, voltamperometryczną procedurę jednoczesnego oznaczania śladowych ilości In(III) i Ti(IV). Stwierdzono, że elektroda ołowiowa generowana in situ na podłożu z węgla szklanego jest właściwym podejściem do jednoczesnego oznaczania Ti(IV) i In(III). W skład roztworu podstawowego po optymalizacji wchodziły:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  bufor octanowy  $\text{pH} = 6,0$ ,  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  kupferron i  $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  Pb(II). Natomiast najbardziej wydajne nagromadzenie kompleksów In(III)-kupferron i Ti(IV)-kupferron zapewniało przykładowe do elektrody potencjału  $-0,9 \text{ V}$  przez  $30 \text{ s}$ . W proponowanej procedurze stwierdzono, że większość badanych obcych jonów nie powoduje zakłóceń.

#### Literatura:

1. M.A. Tarselli, Nature Chemistry, 5 (2013) 546.
2. D.L. Heiserman, Księga pierwiastków chemicznych, Wydawnictwo Prószyński i S-ka, Warszawa (1997).
3. B. Jeżowska-Trzebiatowska, S. Kopacz, T. Mikulski, Występowanie i technologia pierwiastków rzadkich, Wydanie drugie zmienione PWN, Warszawa (1990).
4. J. Wasąg, M. Grabarczyk, J. Electrochem. Soc., 163 (2016) H1076.
5. M. Grabarczyk, J. Wasąg, J. Electrochem. Soc., 163 (2016) H218.
6. M. Grabarczyk, J. Wasąg, J. Electrochem. Soc., 163 (2016) H465.
7. J. Wasąg, M. Grabarczyk, Anal. Methods, 8 (2016) 3605.

## SZEROKOPASMOWE ŚWIATŁOWODOWE ŹRÓDŁA ŚWIATŁA DLA ZASTOSOWAŃ SPEKTROSKOPOWYCH

**M. GRZESIAK, P. MERGO**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Pracownia Technologii Światłowodów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Światłowody posiadają szerokie spektrum zastosowań od wzmacniaczy optycznych po medium transmisyjne oraz czujniki. Szczególnym zainteresowaniem obdarzono szerokopasmowe źródło światła typu Supercontinuum (SC) oraz przestrajalne lasery bazujące na przesunięciu częstotliwościowym solitonów (SSFS). W niniejszej pracy przedstawiono teoretyczne struktury światłowodów nieliniowych domieszkowanych GeO<sub>2</sub> i F. Badania skupiały się na opracowaniu struktur światłowodów bazujących na technologii światłowodów klasycznych charakteryzujących się odpowiednio ukształtowaną dyspersją chromatyczną.

**Wprowadzenie:** Światłowody oprócz ich głównego zastosowania w telekomunikacji znajdują wiele innych np. czujniki światłowodowe, wzmacniacze światłowodowe, lasery światłowodowe. W przypadku projektowania światłowodów jako źródła szerokopasmowego światła konieczne jest wzięcie pod uwagę efektów nieliniowych. Generacja SC polega na poszerzeniu spektralnym impulsu pompującego światłowód [1]. Wysoce nieliniowe światłowody pompuje się ultrakrótkimi (rzędu femtosekund) impulsami świetlnymi, które w wyniku zjawisk nieliniowych obecnych w światłowodzie poszerzają zakres emitowanego światła nawet od 1,0 do 2,2 μm. Jednym z głównych parametrów nieliniowych wpływających na zjawisko generacji SC jest dyspersja chromatyczna ( $D_\lambda$  [ps/(nm·km)]), czyli zależność współczynnika załamania światła od długości fali. Dyspersja chromatyczna wyrażana w ps/(km·nm) może być anomalna ( $D_\lambda > 0$ ) i normalna ( $D_\lambda < 0$ ) [2]. Krzywa dyspersji światłowodu przeznaczonego do generacji SC powinna charakteryzować się płaską charakterystyką krzywej dyspersji i wartościami bliskimi zera dyspersji. Generacja SC może następować zarówno w obszarze anomalnym jak i normalnym, otrzymując odpowiednio SC o innym charakterze. Stosując światłowód o dyspersji anomalnej otrzymuje się szerokopasmowe SC, które charakteryzuje się dużą niejednorodnością gęstości mocy. Pompowanie światłowodu o dyspersji normalnej pozwala uzyskać wysoce koherentne (tj. spójne w czasie i przestrzeni) SC [3,4]. Kolejnym istotnym parametrem światłowodu nieliniowego jest efektywne pole modu ( $A_{eff}$ ), które określa powierzchnię propagowanego w światłowodzie modu względem jego przekroju poprzecznego. Parametr ten wpływa bezpośrednio na efektywny współczynnik nieliniowości ( $\lambda$ ), który jest miarą określającą nieliniowość światłowodu. Wyznacza się go ze wzoru:  $\gamma = (2 \cdot \pi \cdot n_2) / (\lambda \cdot A_{eff})$ , gdzie  $n_2$  - nieliniowy współczynnik załamania światła,  $\lambda$  - długość fali. Z tego względu im mniejsze wartości  $A_{eff}$  dla danej długości fali tym większa nieliniowość światłowodu. Innym specyficznym źródłem światła jest przestrajalny laser światłowodowy wykorzystujący zjawisko przesunięcia częstotliwościowego solitonu (SSFS). Soliton jest to odosobniony, samopodtrzymujący się impuls, który nie ulega rozmyciu w czasie. Efekt ten otrzymuje się w wysoce nieliniowych światłowodach o dużych

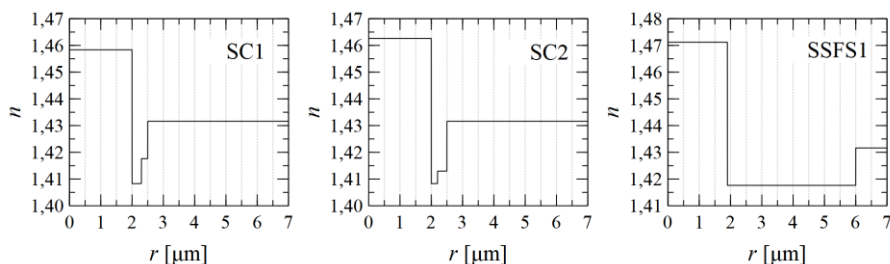
wartościach dyspersji w obszarze anomalnym pompowanych ultrakrótkimi impulsami o wysokiej częstotliwości powtarzania. Generowany soliton charakteryzuje się wysoką energią i bardzo krótkim czasem życia (rzędu femtosekund). Długość fali generowanego solitonu zależy od mocy pompowanego impulsu, im większa moc impulsu tym krótszy czas życia. Wraz ze zwiększaniem mocy pompy soliton przesuwa się w obszar dłuższych długości fali [5]. Również w przypadku generacji SSFS jak i SC istotne są parametry  $D_\lambda$ ,  $A_{eff}$  i  $\gamma$ . W badaniach nad generacją SC i SSFS głównie wykorzystuje się światłowody mikrostrukturalne, które charakteryzują się dużą swobodą w ich projektowaniu. Ich główną zaletą jest możliwość otrzymania dużych nieliniowości na krótkim odcinku światłowodu. Wadą tego typu światłowodów jest ich stosunkowo skomplikowana metoda wytwarzania, możliwe niejednorodności w wytwarzaniu oraz mała powtarzalność wytwarzania. W przeciwieństwie do światłowodów mikrostrukturalnych, technologia światłowodów klasycznych jest mniej wymagająca i bardziej powtarzalna. Istotną zaletą jest ich mniejszy koszt wytwarzania oraz długość wyciągniętego światłowodu z jednej preformy, który znacznie przewyższa światłowody mikrostrukturalne. W światłowodach klasycznych kształtowanie dyspersji uzyskuje się poprzez zmianę geometrii rozkładu profilu załamania światła. Jako domieszkę zwiększającą współczynnik załamania światła szkła krzemionkowego stosuje się głównie  $GeO_2$ , natomiast zmniejszającą  $B_2O_3$  lub F.

**Część eksperymentalna:** Symulacje metodą elementów skończonych wybranych struktur światłowodów nieliniowych wykonano przy użyciu oprogramowania COMSOL Multiphysics z modułem RF Module. Symulacja polegała na znalezieniu dla wybranych długości fali wartości własnej będącej efektywnym współczynnikiem załamania światła propagowanego modu ( $N_{eff}$ ). Do otrzymanych danych dopasowano krzywą w postaci wielomianu, którą następnie dwukrotnie różniczkowano. Wartość dyspersji chromatycznej obliczono wg następującego wzoru:  $D_\lambda = (-\lambda/c) \cdot (d^2 N_{eff} / d\lambda^2)$ , gdzie  $\lambda$  – długość fali [nm],  $c$  – prędkość światła w próżni [km/ps]. Efektywne pole modu liczono przy pomocy oprogramowania COMSOL Multiphysics ze wzoru  $A_{eff} = (\int I dA)^2 / (\int I^2 dA)$ , gdzie  $I$  – natężenie mocy optycznej,  $A$  – powierzchnia przekroju poprzecznego struktury.

**Wyniki:** Rysunek 1 przedstawia profile rozkładu współczynnika załamania światła opracowanych teoretycznie struktur światłowodów. W Tabeli 1 przedstawiono stężenia molowe domieszek użytych w opracowanych strukturach światłowodów. Światłowody oznaczone symbolami SC1 i SC2 zostały zoptymalizowane pod kątem generacji Supercontinuum, natomiast światłowód SSFS1 pod kątem generacji przestrzajalnych solitonów.

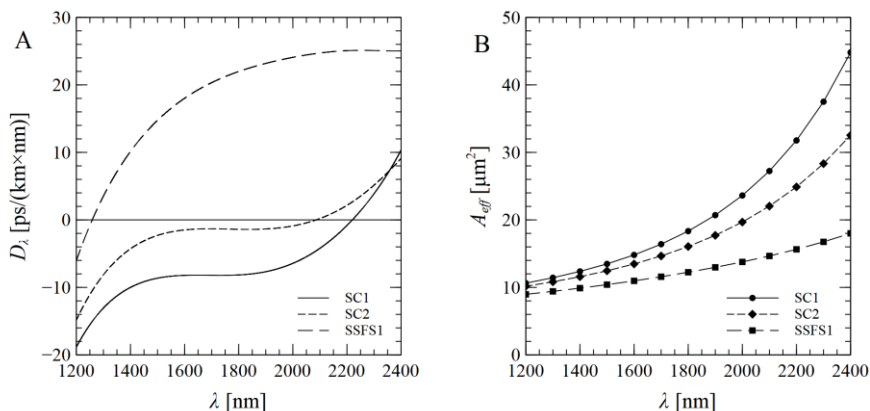
**Tabela 1** Ilość domieszek opracowanych struktur światłowodów.

Światłowód	Ilość domieszki [% mol]		
	Rdzeń [ $GeO_2$ ]	Płaszcz 1 [F]	Płaszcz 2 [F]
SC1	19	5	3
SC2	22	5	4
SSFS1	28	3	-



**Rys.1.** Profile rozkładu współczynnika załamania światła zaprojektowanych teoretycznie nieliniowych światłowodów domieszkowanych fluorem.

W celu uzyskania w światłowodzie dużych nieliniowości zastosowano bardzo małe rdzenie oraz stosunkowo duże domieszki germanowe. Wszystkie struktury zoptymalizowano pod kątem pracy jednomodowej w zakresie powyżej 1400 nm. Obniżenie współczynnika załamania światła wokół rdzenia wynikającego z dodatku fluoru powoduje przesunięcie długości fali powyżej, której światłowod jest jednomodowy. Im szerszy i głębszy obszar obniżenia współczynnika załamania światła tym bardziej ta długość fali przesuwana jest w stronę fal krótszych. Mały rdzeń dodatkowo zmniejsza efektywne pole modu co pozytywnie wpływa na charakter nieliniowy światłowodu. Rysunek 2 przedstawia obliczone teoretycznie krzywe dyspersji chromatycznej i efektywnego pola modu dla opracowanych struktur światłowodów. W przypadku światłowodów SC1 i SC2 uzyskano płaską dyspersję w zakresie około 1400 – 2000 nm oraz efektywne pole modu nieprzekraczające w tym zakresie  $30 \mu\text{m}^2$ . W przypadku światłowodu o dyspersji ukształtowanej pod kątem generacji przestrajalnych solitonów - SSFS1 udało się uzyskać dyspersję anomalną w zakresie pracy jednomodowej. Aby uzyskać taką charakterystykę w technologii światłowodów klasycznych konieczna jest duża domieszka germanu w rdzeniu oraz szeroki fragment obniżający współczynnik załamania światła wokół rdzenia. Efektywne pole modu światłowodu SSFS1 zmienia się nieznacznie wraz ze wzrostem długości fali.



**Rys.2.** Wykresy przedstawiające: obliczoną dyspersję chromatyczną (A) i efektywne pole modu (B) zaprojektowanych struktur światłowodów.

**Wnioski:** Opracowano teoretyczne struktury wysoce nieliniowych światłowodów w technologii światłowodów klasycznych domieszkowanych  $\text{GeO}_2$  i F. Struktury te charakteryzują się odpowiednio ukształtowaną charakterystyką dyspersyjną oraz rozkładem efektywnego pola modu w zakresie bliskiej podczerwieni.

**Literatura:**

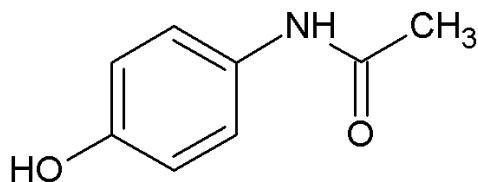
1. J. M. Dudley, J. R. Taylor, Supercontinuum Generation in Optical Fibers, Cambridge University Press, Cambridge 2010.
2. A. Jha, Inorganic Glasses for Photonics: Fundamentals, Engineering, and Applications, Wiley, 2016.
3. K. Tarnowski, T. Martynkien, P. Mergo, K. Poturaj, G. Soboń, W. Urbańczyk, Opt. Express, 24 (2016) 30523.
4. K. Tarnowski, T. Martynkien, P. Mergo, K. Poturaj, A. Anuskiewicz, P. Béjot, F. Billard, O. Faucher, B. Kibler, W. Urbanczyk, Opt. Express, 25 (2017) 27452.
5. G. Soboń, T. Martynkien, K. Tarnowski, P. Mergo, J. Sotor, Photon. Res., 5 (2017) 151.

## CZUJNIKI SITODRUKOWANE W JEDNOCZESNEJ ANALIZIE PARACETAMOLU, DIKLOFENAKU I TRAMADOLU

**J. KOZAK, K. TYSZCZUK-ROTKO**, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** W niniejszej pracy zastosowano niemodyfikowane i modyfikowane grafenem, mezoporowatym materiałem węglowym, nanowłóknami węglowymi lub wielościennymi nanorurkami węglowymi czujniki sitodrukowane w woltamperometrycznych oznaczeniach paracetamolu, diklofenaku i tramadolu. Pomiarzy prowadzono z wykorzystaniem adsorpcyjnej woltamperometrii stripingowej fali prostokątnej (SWAdSV). Czujnik sitodrukowany z węglową elektrodą pracującą (SPCE) został wybrany do dalszej optymalizacji procedury pomiarowej. W celu wzmocnienia sygnału tramadolu powierzchnia SPCE była dodatkowo elektrochemicznie aktywowana i modyfikowana dodecylosiarczanem sodu (SDS).

**Wprowadzenie:** Paracetamol (PA), znany również, jako acetaminofen jest powszechnie stosowanym, nieopiodowym i niesteroidowym lekiem przeciwbólowym dostępnym bez recepty, wymienionym, jako lek podstawowy przez Światową Organizację Zdrowia. Lek ten jest szeroko stosowany, jako bezpieczny i skuteczny środek przeciwbólowy związany z bólami głowy, pleców, zapaleniem stawów i bólami pooperacyjnymi. Stosowano go również w celu zmniejszenia objawów kaszlu, przeziębienia i gorączki. Działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe paracetamolu jest podobne do aspiryny, ale zwykle preferuje się paracetamol, zwłaszcza u pacjentów wrażliwych na kwas acetylosalicylowy. Jest lepiej tolerowany niż leki z grupy NLPZ i nie powoduje skutków ubocznych ze strony układu pokarmowego. W przypadku silnego bólu można go stosować w połączeniu z lekami opioidowymi. Mechanizm działania przeciwbólowego acetaminofenu jest związany z hamowaniem syntezy prostaglandyn w ośrodkowym układzie nerwowym. Działanie przeciwgorączkowe natomiast polega na wpływie leku na układ termoregulacji, który zlokalizowany jest w podwzgórz [1,2]. Wzór strukturalny paracetamolu zaprezentowano na Rysunku 1.

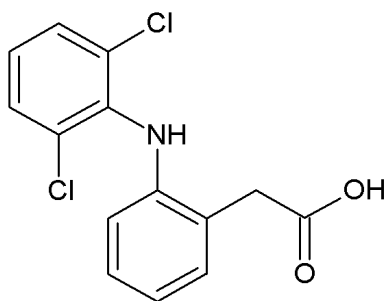


Rys. 1. Wzór strukturalny paracetamolu.

Diklofenak (DF, Rys. 2) to niesteroidowy lek przeciwzapalny, pochodna kwasu aminofenylooctowego o silnym działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym

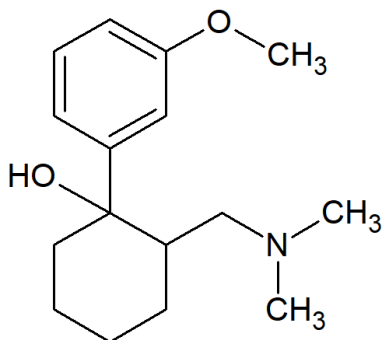


i przeciwgorączkowym. Działanie leku powoduje hamowanie indukcyjnych (COX-2) cyklooksygenaz, odpowiedzialnych za syntezę prozapalnych prostaglandyn w miejscu zapalenia i konstytutywnych (COX-1) oraz syntezę prostaglandyn pełniących fizjologiczną funkcję w przewodzie pokarmowym oraz nerki. Diklofenak jest szybko i całkowicie wchłaniany z przewodu pokarmowego, a następnie całkowicie eliminowany w ciągu 12 godzin, około 60% z moczem i 33% z kałem. Diklofenak jest stosowany, jako lek przeciwbólowy i przeciwzapalny w reumatoidalnym zapaleniu stawów, innych chorobach układowych tkanki łącznej, napadzie dny moczanowej, chorobie zwyrodnieniowej stawów, w zapobieganiu i leczeniu bólu pooperacyjnego i nerwobólów. Diklofenak nie jest zalecany dla dzieci poniżej 12 roku życia oraz osób cierpiących na wrzody żołądka i dwunastnicy, zaburzenia czynności wątroby, niewydolność nerek i porfirię [3,4].



Rys. 2. Wzór strukturalny diklofenaku.

Tramadol (TR, Rys. 3) jest nietypowym opioidowym lekiem przeciwbólowym o działaniu ośrodkowym, składającym się z dwóch enancjomerów, z których oba biorą udział w jego działaniu poprzez różne mechanizmy. Hamuje wychwyty zwrotne noradrenaliny (norepinefryny) i serotoniny, wiążąc się z miejscami ich wychwyty zwrotnego w neuronach, co prowadzi do jednoczesnej redukcji aferentnej sygnalizacji bólu i wzmocnienia eferentnej sygnalizacji hamującej. Doustne połączenie ustalonych dawek tramadolu i paracetamolu w postaci tabletek jest wskazane w objawowym leczeniu bólu o nasileniu od umiarkowanego do silnego. Jest skuteczny w łagodzeniu bólu u dorosłych pacjentów z bólem pooperacyjnym po drobnych zabiegach chirurgicznych, bólem mięśniowo-szkieletowym, bolesną cukrzycową neuropatią obwodową lub bólem migrenowym. Terapeutyczne stężenie tego opioidu w osoczu mieści się w zakresie 100–300 mg L<sup>-1</sup>. Tramadol jest szybko i prawie całkowicie wchłaniany po podaniu doustnym, ale z powodu metabolizmu pierwszego przejścia jego całkowita biodostępność wynosi około 65–70%. Około 10–30% tego leku jest wydalane z moczem [2,5]. Oprócz metod elektrochemicznych w oznaczeniach przedstawionych powyżej związków stosuje się metody chromatograficzne tj. wysokosprawną chromatografię cieczową [6], chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas [7]. Metodą stosowaną w analizie paracetamolu, diklofenaku i tramadolu jest również spektrofotometria UV-VIS [8].

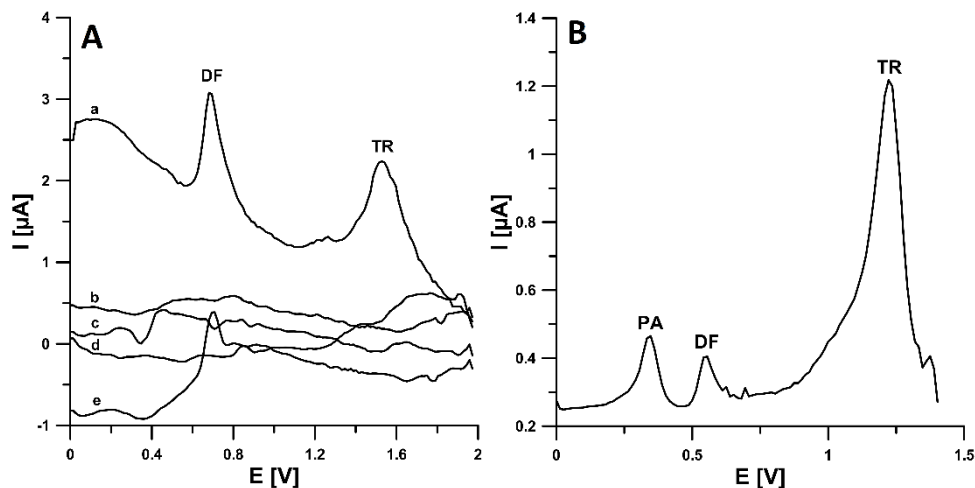


Rys. 3. Wzór strukturalny tramadolu.

**Część eksperymentalna:** Pomiary wykonywane są z wykorzystaniem analizatora elektrochemicznego  $\mu$ Autolab pod kontrolą oprogramowania GPES 4.9 w klasycznym naczynku elektrochemicznym o pojemności 10 mL. Wykorzystano sitodrukowane czujniki węglowe niemodyfikowane oraz modyfikowane grafenem, uporządkowanym mezoporowatym materiałem węglowym (OMC), nanowłóknami węglowymi (CNFs) i wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNTs). Pomiary prowadzono z wykorzystaniem adsorpcyjnej voltamperometrii strippingowej fali prostokątnej w  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  roztworze buforu octanowego o  $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$  bez lub z dodatkiem  $15 \text{ mg L}^{-1}$  dodecylosiarczanu sodu (SDS). Roztwory wzorcowe PA, DF i TR o stężeniach odpowiednio  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  i  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  otrzymano przez rozpuszczenie naważki każdego ze związków w wodzie dejonizowanej.

**Wyniki:** Badania wstępne, w których porównano czujniki sitodrukowane z węglową elektrodą pracującą niemodyfikowaną, modyfikowaną grafenem, wielościennymi nanorurkami węglowymi, nanowłóknami węglowymi oraz mezoporowatym materiałem węglowym wykazały, że najwyższe i najlepiej ukształtowane sygnały analityczne DF i TR uzyskano na niemodyfikowanej elektrodzie węglowej, SPCE (Rys. 4A). W dalszej części badań sprawdzono możliwość zastosowania SPCE, w jednoczesnych oznaczeniach PA, DF i TR. Na podstawie otrzymanych badań (Rys. 4B) stwierdzono, że sygnały analityczne PA, DF i TR są dobrze ukształtowane i rozdzielone, co potwierdza możliwość ich jednoczesnego oznaczania. Powierzchnia SPCE został następnie elektrochemicznie aktywowana i zmodyfikowana dodecylosiarczanem sodu, co pozwoliło na znaczne wzmocnienie sygnału pochodzącego od tramadolu. Optymalizacja procedury pomiarowej i jej zastosowanie jest przedmiotem dalszych badań. Aktywacja jest znaną metodą poprawy właściwości czujników sitodrukowych (zwiększenie czułości na analit i ułatwienie transferu elektronów). Aktywacja może funkcjonalizować powierzchnię elektrody, zwiększać powierzchnię czynną lub usuwać zanieczyszczenia obecne na powierzchni. Wśród metod aktywacji elektrod sitodrukowych wyróżnia się polerowanie mechaniczne lub ultradźwiękowe, obróbkę cieplną oraz aktywację elektrochemiczną [9,10]. Dzięki adsorpcji surfaktantów na powierzchni elektrody zmieniają się jej właściwości, co wpływa na szybkość reakcji. Ponadto środki

powierzchniowo czynne skutecznie stabilizują odpowiedź woltamperometryczną, chroniąc powierzchnię elektrody przed zanieczyszczeniami. Wykazano, że surfaktanty mogą zwiększać nagromadzenie się niektórych cząsteczek elektroaktywnych na powierzchni elektrody, co skutkuje poprawą sygnału analitycznego i wzrostem czułości opracowanej metody [11,12].



**Rys. 4. A)** Woltamperogramy otrzymane podczas oznaczania  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> diklofenaku i  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> tramadolu na węglowych czujnikach sitodrukowanych: niemodyfikowanym (a), modyfikowanym nanowłóknami węglowymi (b), modyfikowanym grafenem (c), modyfikowanym uporządkowanym mezoporowatym materiałem węglowym (d) i modyfikowanym wielościennymi nanorurkami węglowymi (e), **B)** Woltamperogramy zarejestrowane podczas oznaczania  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> PA,  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> DF i  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> TR. Potencjał i czas nagromadzenia: -0,25 V i 30 s. Parametry SWV: amplituda 50 mV, częstotliwość 50 Hz.

## Literatura:

1. F. Cao, Q. Dong, C. Li, J. Chen, X. Ma, Y. Huang, D. Song, C. Ji, Y. Lei, *Sens. Actuators B Chem.*, 256 (2018) 143.
2. S. Glavanović, M. Glavanović, V. Tomišić, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 157 (2016) 258.
3. A. Sasal, K. Tyszczuk-Rotko, M. Wójciak, I. Sowa, *Materials*, 13 (2020) 781.
4. K. Kimuama, N. Rodthongkumb, N. Ngamrojanavanich, O. Chailapakul, N. Ruecha, *Microchem. J.*, 155 (2020) 104744.
5. Z. Bagherinasab, H. Beitollahi, M. Yousefi, M. Bagherzadeh, M. Hekmati, *Microchem J.* 156 (2020) 104803.
6. A. Ali, M. M. Athar, M. Ahmed, K. Nadeem, G. Murtaza, U. Farooq, M. Salman, *Acta Pharm.*, 69 (2019) 249.
7. T. Saito, S. Morita, S. Inoue, I. Yamamoto, S. Inokuchi, *Forensic Toxicol.* 26 (2008) 27.
8. S. Behera, S. Ghanty, F. Ahmad, S. Santra, S. Banerjee, *J Anal Bioanal Tech.* 3/6 (2012) 1000151.
9. M.I. González-Sánchez, B. Gómez-Monedero, J. Agrisuelas, J. Iniesta, E. Valero, *Electrochem commun.* 91 (2018) 36.
10. M.I. González-Sánchez, B. Gómez-Monedero, J. Agrisuelas, J. Iniesta, E. Valero, *J. Electroanal. Chem.*, 839 (2019) 75.
11. G. Tigari, J. G. Manjunatha, *J. Sci.-Adv. Mater. Dev.*, 5 (2020) 56.
12. N. F. Atta, S. A. Darwish, S. E. Khalil, A. Galal, *Talanta*, 72 (2007) 1438.

## **ZASTOSOWANIE METOD FIZYKOCHEMICZNYCH W ANALIZIE MATERIAŁÓW NA BAZIE BIOCERAMIKI**

**M. JĘDREK<sup>1,2</sup>, G. KALISZ<sup>2</sup>, J. MATYS<sup>2</sup>, I. STEFANOWICZ-PIĘTA<sup>3</sup>,  
A. SROKA-BARTNICKA<sup>2,4</sup>,** <sup>1</sup> Collegium Medicum Wydział Medyczny  
Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego, ul. Kazimierza Wóycickiego 1/3,  
01-938 Warszawa, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny,  
Zakład Biofarmacji, ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin, <sup>3</sup>Instytut Chemii Fizycznej  
Polskiej Akademii Nauk, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, <sup>4</sup>Uniwersytet  
Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki  
i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-400 Lublin.

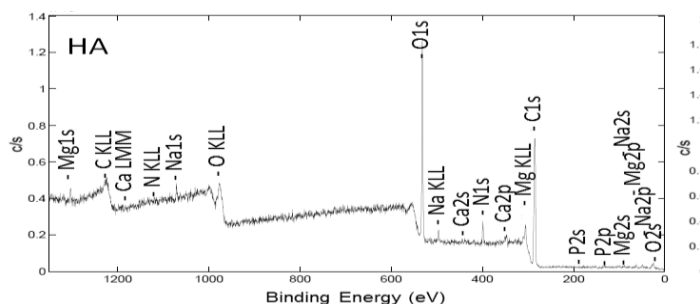
**Abstrakt:** W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie metod fizykochemicznych takich jak: spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS, z ang. X-ray photoelectron spectroscopy), spektroskopia DRIFT tj. odbicia rozproszonego od niejednorodnych powierzchni (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed) oraz skaningowy mikroskop elektronowy w analizie materiałów na bazie bioceramiki czyli hydroksyapatytu. Badano hydroksyapatyt za pomocą trzech różnych technik aby dokonać charakterystyki fizykochemicznej. Zastosowanie trzech różnych metod analitycznych umożliwia skorelowanie uzyskanych informacji chemicznych oraz właściwości fizycznych, co pozwoli na szeroką ocenę badanego materiału.

**Wprowadzenie:** Rozwój współczesnej medycyny pociąga za sobą konieczność wprowadzania na rynek coraz nowszych materiałów na bazie bioceramiki oraz udoskonalania właściwości już istniejących. Porowatość biomateriałów umożliwia ich połączenie z żywą tkanką, w wyniku czego dochodzi do proliferacji i różnicowania się komórek w obrębie porów. Odpowiedni rozmiar i połączenia między porami decydują o przenikaniu i mineralizacji tkanki, dając dobre i trwałe połączenie implantu z kością. Materiały bioceramiczne charakteryzują się biokompatybilnością, nie wywołują reakcji toksycznych, alergicznych, mutagennych oraz kancerogennych [1]. Z tych właśnie względów materiały te stosuje się przy uzupełnianiu ubytków kostnych. Różne właściwości mikrostrukturalne i fizykochemiczne biomateriałów, takie jak fizykochemia powierzchni, jej chropowatość, topografia, właściwości mechaniczne i swobodna energia międzyfazowa mają kluczowe znaczenie dla adhezji, proliferacji i różnicowania komórek [2,3]. W celu porównania poszczególnych materiałów i reakcji zachodzących na ich powierzchni stosuje się analizę fizykochemiczną, w szczególności analizę spektralną. Jednymi z najczęściej stosowanych technik spektroskopowych są: spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X oraz spektroskopia DRIFT. W celu obserwacji topografii badanego materiału bioceramicznego oraz charakteryzacji substancji organicznych oraz nieorganicznych w skali od nanometrycznej do mikrometrycznej wykorzystywany jest skaningowy mikroskop elektronowy. Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) oparta jest o pomiary energii kinetycznej elektronów w próżni, wzbudzonych w materiale i wyemitowanych na

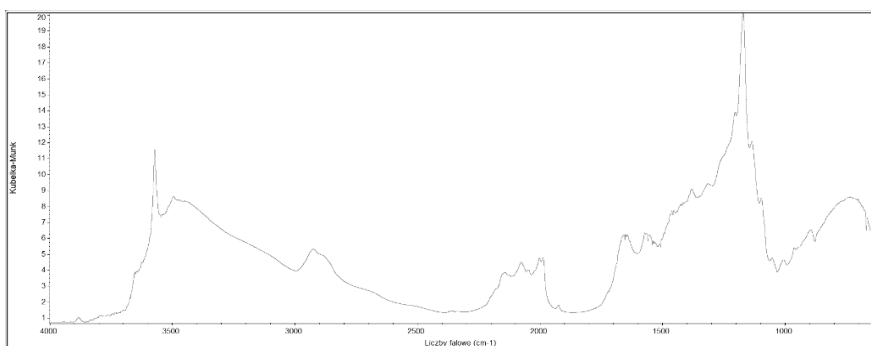
zewnątrz materiału pod wpływem wiązki promieniowania X. Kwant promieniowania X o dostatecznej energii (tzw. krytyczna energia wzbudzenia) może zostać zaabsorbowany przez elektron z wewnętrznego poziomu stacjonarnego 1s atomu i spowodować wyrzucenie elektronu o pewnej energii kinetycznej w próżnię. Największą zaletą widm fotoelektronów jest możliwość bezpośredniego pomiaru tzw. przesunięć chemicznych, czyli linii wynikających ze zmian otoczenia chemicznego atomów rozpatrywanego pierwiastka, co pozwala na rozpoznanie, w jakim związku chemicznym występują rozpatrywane pierwiastki [4]. Jednym z rodzajów spektroskopii w podczerwieni jest spektroskopia DRIFT. Dzięki wykorzystywaniu odbicia rozproszonego od niejednorodnych powierzchni, możliwe jest uzyskanie widma w wyniku pomiaru promieniowania odbitego od próbki. Padające na daną próbkę promieniowanie jest w stanie przenikać w jej głąb, w wyniku czego ulega ono wielokrotnemu odbiciu spowodowanemu kolejnymi warstwami atomów. Prowadzi to do jego częściowego osłabienia i opuszczenia próbki pod innym kątem niż pierwotny kąt padania. Intensywność promieniowania odbitego w sposób rozproszony jest mierzona za pomocą układu lusterek lub lustro sferycznego kierujących promieniowanie odbite od próbki we wszystkich kierunkach do detektora [5]. Skaningowy mikroskop elektronowy używa skupionej wiązki wysokoenergetycznych elektronów, która bombarduje próbkę linia po linii. Padające elektrony reagują z atomami na próbce co powoduje ich rozproszenie. Rozproszenie to może być elastyczne i nieelastyczne. W przypadku pierwszego prędkość oraz energia kinetyczna pozostają niezmiennie przy jednoczesnej zmianie trajektorii elektronów. Wynika to z różnicy pomiędzy masą jądra atomowego a masą elektronu. W rozproszeniu nieelastycznym trajektoria padających elektronów może być lekko wzburzona lecz ich energia jest tracona poprzez reakcję z elektronami na orbitalach atomowych. W rezultacie interakcji elektron-próbka uzyskujemy informację na temat składu chemicznego, struktury krystalicznej oraz rozmiarów obiektów wchodzących w skład badanej próbki, dzięki którym generowany jest jej dwuwymiarowy obraz [6].

**Część eksperymentalna:** W celu zbadania charakterystyki chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytu użyto: spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS), spektroskopii DRIFT oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Powyższe techniki pozwoliły na precyzyjną ocenę powierzchni hydroksyapatytu oraz ocenę jego składu chemicznego.

**Wyniki:** Zastosowanie spektroskopii XPS pozwoliło na identyfikację węgla, azotu, tlenu, wapnia i fosforu, wchodzących w skład badanego materiału. Dla próbki badanego hydroksyapatytu można zidentyfikować cztery główne regiony w zakresach częstotliwości: 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla cząsteczek hydratów wody, 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla pasm  $\nu$  C-H i  $\nu$  N-H, 3000-2100  $\text{cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla jonów obojnaczych aminokwasów oraz 1550-750  $\text{cm}^{-1}$  charakterystyczne dla węglanów i grupy  $\text{HPO}_4$ . Za pomocą techniki SEM można badać strukturę i porowatość hydroksyapatytu.



Rys. 1. XPS – widmo pomiarowe dla próbki hydroksyapatytu.



Rys. 2. Widmo czystego hydroksyapatytu (HA) uzyskane w spektroskopii DRIFT.

**Wnioski:** Przeprowadzone badania umożliwiły zbadanie właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytu. Wykazano, że techniki fizykochemiczne, takie jak DRIFT, XPS i SEM, są skutecznym sposobem analizy próbek ceramicznych i mogą być stosowane w badaniach biomateriałów stosowanych w medycynie regeneracyjnej, w tym inżynierii tkanki kostnej.

Projekt realizowany w ramach grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej POWROTY (POIR.04.04.00-00-4398/17-00 POWROTY/2017-4/14) oraz (POWROTY/2016-1/5).

### Literatura:

1. M. Szczepkowska, M. Łuczuk, Inżynieria Systemów Technicznych, 2 (2014) 231.
2. F.M. Chen, X.H. Liu, Prog. Polym. Sci., 53 (2016) 86.
3. X. Yue, M. Nagaoka, A. Toshihiro, Biomater. Asia, WORLD SCIENTIFIC, (2008) 143.
4. M. Żelechower, D. Stróż, W. Ryba-Romanowski, Wybrane metody badań materiałów, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Katowice, 2015, 31.
5. J.A. Lercher, A. Jentys, Chapter 13 - Infrared and Raman Spectroscopy for Characterizing Zeolites, Editor(s): J. Čejka, H. van Bekkum, A. Corma, F. Schüth, Studies in Surface Science and Catalysis, 168 (2007) 435.
6. R. F. Egerton, Physical principles of electron microscopy : an introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer, 2005, 125.

## ZASTOSOWANIE TECHNIKI MALDI MSI DO ANALIZY TKANKI KALUSA UFORMOWANEGO NA ŁODYDZE POMIDORA POD WPLYWEM INFEKCJI *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

K. SUŚNIAK, I. KOMANIECKA, A. PASTUSZKA, A. CHOMA, UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, 20-033 Lublin.

**Abstrakt:** Obrazowanie metodą spektrometrii mas (MSI) zastosowane wraz z techniką MALDI (desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą) zostało wykorzystane do analizy tkanki roślinnej (kalusa) powstałej w wyniku infekcji łodygi pomidora fitopatogenem (*Agrobacterium tumefaciens*). W komórkach kalusa stwierdzono nagromadzenie wtórnych metabolitów. Związki te zidentyfikowano na podstawie otrzymanych widm masowych jako pochodzące od  $\alpha$ -tomatyny - glikoalkaloidu występującego w łodygach i liściach pomidora. Technika MALDI-MSI umożliwiła zobrazowanie przestrzennego rozmieszczenia tego związku w analizowanej tkance.

**Wprowadzenie:** Obrazowanie metodą spektrometrii mas (MSI) jest wykorzystywane do wizualizacji przestrzennego rozmieszczenia *in situ*, bez znakowania, związków takich jak: peptydy, białka, cukry czy lipidy. MSI pozwala na wykonanie analiz tkanek i komórek bez ich wcześniejszego przygotowania [1]. Masa cząsteczkowa analitów może się wahać od około 100 kDa (i więcej), dla dużych białek do 1 kDa (i poniżej) dla małych endogennych metabolitów [2]. Zasada działania spektrometrii mas opiera się na jonizacji związków chemicznych, a następnie separacji uzyskanych jonów na podstawie stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ) i rejestracji jonów w formie widma. W przypadku MSI widma masowe są zbierane w trakcie skanowania z każdego punktu tkanki, a następnie są przekształcane na mapy rozmieszczenia przestrzennego cząsteczek [3]. Najczęściej wykorzystywaną metodą jonizacji stosowaną w MSI jest desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą (MALDI). MALDI to technika łagodnej jonizacji, która pozwala na analizę dużych cząsteczek nie powodując ich nadmiernej fragmentacji. Ponadto w trakcie jonizacji tą techniką powstają głównie jony o pojedynczym ładunku [4]. W przypadku stosowania techniki MALDI jedyną modyfikacją preparatu tkankowego jest konieczność użycia matrycy czyli krystalizującego związku organicznego wspomagającego jonizację próbki pod wpływem wiązki lasera UV [5]. Prostota przygotowania próbki oraz możliwość jednoczesnej analizy chemicznej metabolitów oraz wizualizacji ich rozmieszczenia (dzięki określeniu współrzędnych x, y analizowanego miejsca bezpośrednio w tkance) sprawia, że MALDI MSI staje się narzędziem powszechnie stosowanym do obrazowania metabolitów roślinnych w tkankach [6]. Technikę MALDI MSI zastosowano do analizy tkanki kalusa, powstającego wskutek infekcji rośliny przez patogenną, glebową bakterię *Agrobacterium tumefaciens*. Te Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Rhizobiaceae* to fitopatogeny atakujące łodygi i korzenie wielu odmian

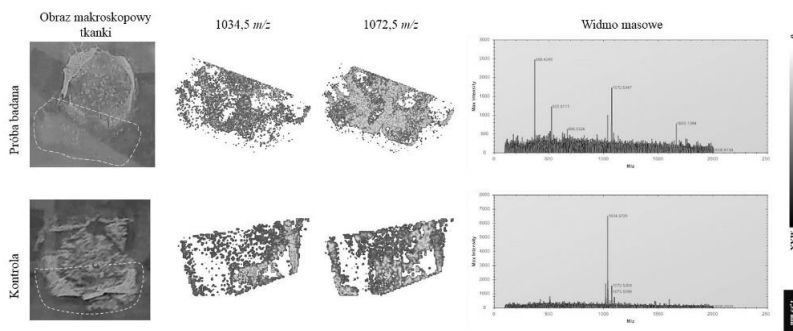
roślin dwuliściennych i niektórych roślin nagozalążkowych. *Agrobacterium* atakuje głównie zranione tkanki, które rozpoznaje przez wydzielane przez miejscach zranienia związki takie jak fenole i cukry działające jako chemoatraktanty. Patogen transformuje komórki roślinne wymuszając ich ciągłe podziały co prowadzi do powstawania tkanki tumorowej. Transformacja komórek rośliny wynika ze zdolności tych bakterii do przenoszenia fragmentu własnego DNA do komórek roślinnych i jego integracji z materiałem genetycznym rośliny-gospodarza [7]. Źródłem transferowanego DNA (tzw. T-DNA) jest plazmid Ti. Ekspresja genów kodowanych przez T-DNA w komórce roślinnej prowadzi do produkcji enzymów, które katalizują syntezę hormonów roślinnych – auksyn i giberelin, odpowiedzialnych za rozrost tkanki (kalusa). Zainfekowana tkanka roślinna produkuje opiny – niskocząsteczkowe związki, które mogą być metabolizowane wyłącznie przez komórki *Agrobacterium*, służąc im jako źródło węgla i azotu i w powyższy sposób zapewniając selektywną korzyść dla tego gatunku bakterii [8]. Zakażenie rośliny przez *A. tumefaciens* powoduje nieodwracalne zmiany w tkance roślinnej zarówno te anatomiczne jak i metaboliczne. Do prześledzenia tych zmian posłużyła technika MALDI MSI.

**Część eksperymentalna:** Jako organizm modelowy w badaniach zostały wykorzystane siewki pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) odmiana Betalux. 6-cio tygodniowe rośliny (po 5 w każdej grupie), z rozwiniętym trzecim liściem, skałeczono sterylną igłą na odcinku ok. 1 cm, pomiędzy 1-szym a 2-gim liściem. W powstałą ranę wprowadzono 20  $\mu$ l odmłodzonej (48h) hodowli *A. tumefaciens* C58 w przypadku próby badanej, bądź pozostawiono bez infekowania, na powietrzu, w przypadku kontroli. Po okresie 4 tygodni zebrano rośliny z w pełni wytworzonym kalusem na łądzy, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu ich analizy. Jednocentymetrowe fragmenty łądzy wraz z kalusem (próba badana) lub miejscem zranienia (kontrola) przeniesiono do  $-20^{\circ}\text{C}$  i w tej temperaturze krojono na 30  $\mu$ m skrawki przy użyciu kriomikrotomu (Leica CM1950, Nussloch, Germany). Skrawki przytwierdzono do szkiełek mikroskopowych typu *no-frost*. Następnie, za pomocą aerografu, na przytwierdzone skrawki naniesiono kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy jako matrycę (CHCA; 10 mg/ml w 70% acetonitrylu z dodatkiem 0,1% TFA) i poddano analizie MALDI MSI. Analizę przeprowadzono przy użyciu spektrometru mas typu MALDI Q-TOF (Synapt G2-Si, Waters) wyposażonego w laser Nd:YAG ( $\lambda = 355$  nm). Obrazy uzyskano w trybie jonów dodatnich w zakresie 100–2000  $m/z$  przy ustawieniu mocy lasera 250 eV i częstotliwości 1000 Hz. Krok lasera wynosił 60 $\mu$ m x 60 $\mu$ m (w płaszczyźnie x,y). Uzyskane mapy były analizowane w programie HDImaging (Waters) oraz znormalizowane do TIC (Total Ion Current).

**Wyniki:** Analizie MALDI MSI poddano skrawki łądzy pomidora zakażonego *A. tumefaciens* oraz rośliny z próby kontrolnej. Na Rys. 1, w lewym panelu przedstawiono obrazy makroskopowe tkanek roślinnych po nałożeniu matrycy, w panelu środkowym pokazano wybrane znormalizowane mapy dla wybranych, intensywnych sygnałów, zaś w panelu prawym pokazano uśrednione widma masowe dla całej analizowanej tkanki. Analizując widma masowe otrzymane dla skrawków kalusa i próby kontrolnej stwierdzono obecność intensywnych sygnałów



o  $m/z$  1034.57 oraz 1072.57, rozmieszczonych w całej objętości tkanki kalusa oraz w epidermie łodygi rośliny kontrolnej. Sygnały te zidentyfikowano na podstawie danych literaturowych jako  $\alpha$ -tomatynę i jej pochodną przyporządkowując wartościom  $m/z$  1034.57 oraz 1072.57 odpowiednio masę cząsteczkową tomatyny protonowanej  $[M+H]^+$  oraz potasowanej  $[M+K]^+$  [9]. Tomatyna jest glikoalkaloidem występującym zarówno w łodygach jak i w liściach pomidorów. Substancja ta wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe [10]. Przymuszczalnie obserwowane w doświadczeniu wyższe stężenie w łodydze pomidora zakażonego wobec kontroli może być wynikiem reakcji obronnej rośliny wobec patogena.



**Rys. 1.** Analiza MALDI MSI tkanki kalusa powstałego na łodydze pomidora po zakażeniu *A. tumefaciens* i fragmentu łodygi z próby kontrolnej. W panelach przedstawiono kolejno: obraz makroskopowy skrawka tkanki po naniesieniu matrycy, uzyskane mapy chemiczne dla  $\alpha$ -tomatyny w przekroju poprzecznym łodygi pomidora, uśrednione widma masowe z całej analizowanej tkanki.

**Wnioski:** Zakażenie *Agrobacterium tumefaciens* powoduje widoczne zmiany anatomiczne w tkance roślinnej poprzez wywołanie powstawania narośli (kalusa) oraz idące za tym zmiany metaboliczne, np. zwiększoną produkcję glikoalkaloidu przeciwbakteryjnego  $\alpha$ -tomatyny. Jej nagromadzenie w tkance roślinnej oraz lokalizacja mogą być oceniane poprzez detekcję metabolitów techniką MALDI MSI. Uśrednione widmo mas tkanki kalusa wskazuje na obecność szeregu dodatkowych jonów reprezentujących związki charakterystyczne dla tej tkanki. Identyfikacja tych substancji jest tematem obecnie prowadzonych badań.

Praca powstała w ramach realizacji projektu OPUS finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr projektu: 2018/31/B/NZ9/01755).

### Literatura:

1. F.Y. Yang i in., Arch. Insect Biochem. Physiol, 103(2020) 1.
2. K. Schwamborn, R.M. Caprioli, Nat. Rev. Cancer, 10 (2010) 639.
3. N. Bjarnholt i in., Nat. Prod. Rep, 31 (2014) 818.
4. W. Michno i in., J. Neurochem., 151 (2019) 488.
5. Y. Nakashima i in., Rapid Commun. Mass Spectrom, 34 (2020) e8703.
6. C. Seaman i in., Anal. Chem, 86 (2014) 10071.
7. A. Ziemiencowicz, Acta Biochimica Polonica, 48 (2001) 623.
8. A. Pitzschke, H. Hirt, EMBO J., 29 (2010) 1021.
9. T. Cataldi i in., Rapid Commun. Mass Spectrom., 19 (2005) 3103.
10. Y. You, J. van Kan, New Phytologist, 230 (2021) 90.

## ZNACZENIE WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W BADANIACH LIPOFILOWOŚCI

D. STRASZAK, K. WOJCIECHOWSKA, P. GLAZ, D. MATOSIUK, UM,  
Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych,  
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Chromatografia cieczowa jest jedną z najważniejszych technik analitycznych stosowanych od lat 70 ubiegłego wieku do oznaczania lipofilowości związków chemicznych. Ciągłe trwają poszukiwania sposobu modyfikacji zarówno fazy ruchomej, jak i stacjonarnej, aby jak najprecyzyjniej odzwierciedlały one warunki panujące w organizmach żywych. Odkrycia ostatnich lat przyczyniły się do wprowadzenia nowych rozwiązań w sposobie pomiaru i analizie parametrów chromatograficznych, które korelującą z istotnymi deskryptorami farmakologicznymi, a tym samym zwiększyło się znaczenie technik chromatograficznych w poszukiwaniu związków o potencjale biologicznym.

**Wprowadzenie:** Podstawowymi właściwościami fizyko-chemicznymi pozwalającymi przewidzieć absorpcję, dystrybucję, metabolizm, eliminację oraz toksyczność leku (ADMET) są: lipofilowość, rozpuszczalność w wodzie oraz stała jonizacji. Parametry te są ze sobą ściśle powiązane, zazwyczaj każdy z nich oznaczany jest w osobnym badaniu metodami bezpośrednimi lub pośrednimi. Aby lek wykazał aktywność biologiczną musi rozpuszczać się zarówno w niepolarnych, jak i polarnych rozpuszczalnikach. Modyfikując wyżej wspomniane parametry można wpływać na właściwości farmakokinetyczne związku. Lipofilowość stanowi jedną z najważniejszych właściwości związków aktywnych biologicznie. Jest podstawowym czynnikiem biodostępności decydującym, min. o przenikaniu leku przez błony biologiczne czy oddziaływaniu z receptorami, a dzięki temu indukuje odpowiedź komórkową. Zgodnie z definicją IUPAC lipofilowość stanowi powinowactwo danej cząsteczki lub jej fragmentu do środowiska lipofilowego. Parametrem określającym właściwości lipofilowe jest współczynnik podziału pomiędzy fazę wodną i organiczną ( $\log P$ ), a układem referencyjnym jest układ ekstrakcyjny oktan-1-ol – woda [1-5]. Wysokosprawną chromatografią cieczową w odwróconym układzie faz (ang. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) to jedna z kluczowych metod wykorzystywanych w pomiarach lipofilowości. Zgodnie z teorią solwofobową, retencja substancji na kolumnie jest wywołana wymuszoną „adsorpcją”. Hydrofobowa część związku asocjuje z hydrofobowymi łańcuchami węglowymi fazy stacjonarnej z wykorzystaniem sił van der Waalsa, natomiast woda ze względu na duże napięcie powierzchniowe włacza niepolarną część związku między alkilowe łańcuchy. Charakterystyczne jest to, że grupy polarne cząsteczki są zawsze zwrócone w kierunku fazy ruchomej. W chromatografii odwróconych faz stosuje się niepolarną i hydrofobową fazę stacjonarną. Polarność fazy stacjonarnej jest zależna od długości i ilości łańcuchów alkilowych [6]. Najczęściej wykorzystywanym adsorbentem RP jest oktadecylsilanizowany żel krzemionkowy (ang. *Octadecyl Silica Gel*, ODS). Typowe płytki ODS zawierają częściowo niezestryfikowane grupy silanolowe, które za pomocą wiązań wodorowych i sił elektrostatycznych

wpływają na wyniki pomiaru. Jeżeli faza ruchoma posiada wysoką zawartość wody, wspomniane wyżej grupy są osłaniane przez jej cząsteczki, co nie wpływa na ostateczny wynik badania. Jeżeli jednak zawartość wody jest niska, to podczas rozwijania chromatogramu mogą nastąpić polarne oddziaływania między wolnymi grupami silanolowymi i polarnymi grupami badanego związku, co może spowodować nieprawidłowości w pomiarze lipofilowości, skutkujące zwiększeniem wartości parametru  $\log k$ . Płytki ODS są w tej chwili rekomendowane jako faza stacjonarna w technikach chromatograficznego pomiaru lipofilowości. Posiadają one zbliżone właściwości do błon biologicznych, w przeciwieństwie do oktan-1-olu mają charakter anizotropowy, a ich powierzchnie powlekają hydrofobowe łańcuchy węglowe, przez co cząsteczki badanej substancji mogą wnikać na różną głębokość fazy. Układ taki odzwierciedla w bliższym stopniu struktury biologiczne niż układ oktanol – woda. Wadą silanizowanych żeli krzemionkowych jest jednak brak ich trwałości w zasadowym i silnie kwaśnym środowisku, dlatego wykorzystuje się je jedynie w granicach pH 2,5-7,5 [6,7]. Aby ograniczyć ilość wolnych grup silanolowych stworzono kolumny, pokryte trimetylochlorosilanem (TMCS) lub heksametylodydisilazanem (HMDS), fazy stacjonarne z inkorporowanymi polarnymi grupami takimi jak sulfonamidowa, eterowa czy amidowa (np. Discovery<sup>TM</sup> RP-Amide-C<sub>16</sub>, Supelcosil LC-ABZ<sup>+</sup>) oraz kolumny zawierające mosty propylenowe (e.g. Zorbax<sup>TM</sup> Extend-C<sub>18</sub>). Innym rozwiązaniem są kolumny o budowie polimerowej, które pozbawione są efektu grup silanolowych [3,8,9]. Fazę ruchomą w RP-HPLC stanowi mieszanina wody lub buforu z organicznym modyfikatorem. Najczęściej do tego celu wykorzystuje się metanol, acetonitryl, aceton, dioksan lub tetrahydrofuran. Dodanie organicznego modyfikatora jest konieczne, bowiem zmniejsza on polarność fazy ruchomej i zwiększa rozpuszczalność związku oznaczanego, a przez to wydłuża jego migrację [7]. Podczas badania analizowane związki powinny być zachowane w formie neutralnej, dlatego też w fazie ruchomej stosuje się bufony, głównie sól buforowana fosforanem (PBS), kwas 4-morfolinopropylsulfonowy (MOPS) lub bufor fosforanowy. Mają one niewielką tendencję do tworzenia par jonowych, a jednocześnie dużą pojemność buforową [10]. Teoretycznie modyfikator nie powinien mieć wpływu na wynik oznaczenia lipofilności związku, to jednak wartości  $\log k$  otrzymane z wykorzystaniem różnych modyfikatorów różnią się pomiędzy sobą. Wynika to z ich wpływu na kwasowość wolnych grup silanolowych w kolumnie,  $pK_a$  substancji oznaczanej oraz pH fazy mobilnej. Zaleca się, aby modyfikatorem organicznym był w pierwszej kolejności metanol, jest to związane z podobieństwem fizykochemiczne do wody, przez co nie zaburza on powstawania wiązań wodorowych między cząsteczkami wody [1-4]. Ze względu na ryzyko oddziaływań między wolnymi grupami silanolowymi a substancją badaną, jako substancje maskujące do pomiarów wykorzystuje się hydrofobowe aminy takie jak N,N-dimetylooktyloaminę czy n-decyloaminę. W przypadku stosowania acetonitrylu jako modyfikatora organicznego, ich skuteczność jest znacznie osłabiona, ponieważ acetonitryl posiada słabe właściwości zwilżania wodą powierzchni fazy stacjonarnej, przez co nie pozwala dotrzeć aminom w głąb adsorbentu, a tym samym hamuje ich działanie [11]. Nowymi substancjami maskującymi są RTILs (ang. *Room-Temperature Ionic Liquids*). Ich zastosowanie jest jednak ograniczone ze względu na ich wpływ na detekcję UV oraz możliwość tworzenia par jonowych z substancjami jonizującymi.

Dodatkiem maskującym w fazie ruchomej może być także oktan-1-ol, który tworzy na powierzchni fazy stacjonarnej oktanolową warstwę w wyniku preferencyjnej sorpcji [12]. Klasyczne fazy stacjonarne stosowane w RP-HPLC dają co raz bardziej precyzyjne możliwości pomiarów parametrów lipofilowości substancji. Jednak punkt odniesienia jakim jest oktan-1-ol, nie odzwierciedla w pełni właściwości błon biologicznych, dlatego równolegle trwają prace nad biomimetycznymi fazami stacjonarnymi, które swoimi właściwościami będą imitować strukturę błon biologicznych. Przykładem takiej fazy stacjonarnej jest stworzona przez Pidgeona i wsp. immobilizowane sztuczne błony biologiczne (ang. *Immobilised Artificial Membrane*, IAM) [13,14]. IAM posiada na powierzchni fosfolipidową monowarstwę związaną kowalencyjnie z aminopropylsilanem rdzenia. Mechanizm retencji na IAM opiera się na oddziaływaniach hydrofobowych oraz sił elektrostatycznych pomiędzy substancją badaną a powierzchnią błony. Wykorzystanie retencji związanej z jonizacją oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi umożliwiło pomiar parametrów lipofilowości mocnych zasad, takich jak metformina, które w fizjologicznym pH są silnie zjonizowane, a pomiar w klasycznej metodzie RP-HPLC był niemożliwy [15,16]. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka wariantów kolumn IAM, w których warstwę fosfolipidową tworzą: fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloglicerol (PG), kwas fosfatydowy (PA) lub fosfatydyloseryna (PS). Fazą ruchomą stosowaną z IAM jest najczęściej PBS. W przypadku IAM zwykle nie ma potrzeby, aby do badania używać modyfikatora organicznego. Jeśli jednak zaistnieje taka konieczność to wówczas najczęściej wykorzystuje się acetonitryl. W przeciwieństwie do klasycznej RP-HPLC, metanol nie może być używany w badaniu, ponieważ wpływa on na stabilność kolumny. Trwałość IAM zależna jest również od pH, a można ją stosować w granicach pH od 2,5 do 7,4. Udowodniono, że wartość  $\log K_{IAM}$  bardzo dobrze koreluje z ważnymi farmakologicznymi parametrami takimi jak absorpcja leku po podaniu doustnym, penetracja skóry, przenikanie przez barierę krwi – mózgu, przepuszczalność przez model komórkowy CaCo-2 [13-17]. Innym przykładem biomimetycznych faz stacjonarnych są kolumny pokryte proteinami np. albuminami ludzkiej surowicy (HSA) [16]. Ciekawą alternatywą dla powszechnie stosowanych technik HPLC jest chromatografia z immobilizowanymi liposomami (ang. *Immobilized Liposome Chromatography*, ILC). Fazy w niej stanowią liposomy zbudowane amfifilowych fosfolipidów tworzących sferyczne naczynia wypełnione fazą wodną. Podział substancji w ILC imituje mechanizm adsorpcji błon biologicznych. Polarne głowy fosfolipidów decydują o elektrostatycznych właściwościach liposomu, mogą układać się w różnych kierunkach na powierzchni kolumny zależnie od rozpuszczalnika i właściwości substancji oznaczanej. [18]. Ze względu na specyficzne oddziaływania występujące w podczas podziału w ILC, często używa się pojęcia fosfolipofilowości. Wyniki otrzymane za pomocą tej techniki wykazują wysoką korelację z przepuszczalnością przez model komórkowy CaCo-2 [19].

**Wnioski:** RP-HPLC posiada wiele zalet. Przede wszystkim jest metodą szybką, a do oznaczeń wystarczy jedynie niewielka ilość badanego związku. Ponadto, daje możliwość analizowania związków o zróżnicowanej strukturze, w tym odznaczających się małą i dużą lipofilowością ( $\log P$  od 1 do 6), a na wynik pomiaru

nie mają wpływu zanieczyszczenia próbki. Parametry chromatograficzne takie jak log k są wykorzystywane w skryningowych testach nowych kandydatów na leki. Współczynniki retencji są korelowane z deskryptorem lipofilowości i stosowane w analizie QSRR (ang. *Quantitive Structure-Retention Relationship*), jak również QSAR (ang. *Quantitive Retention-Activity Relationships*). RP-HPLC wykorzystywana jest do oznaczania parametrów biodostępności, w tym przenikalności przez błony biologiczne, wchłaniania oraz wiązania się z białkami krwi związków o potencjalnym zastosowaniu medycznym. Wyniki otrzymane tą metodą są często korelowane ze współczynnikami aktywności biologicznej, min. MIC, LD oraz LC [6,20,21]. Dzięki tym zaletom chromatografia zyskuje kluczowe znaczenie w badaniach procesów ADMET *in silico*.

### Literatura:

1. S.K. Poole, C.F. Poole, *Journal of Chromatography B*, 797 (2003) 3.
2. C. Hansh, A. Leo, D.H. Hoekman, *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants*, American Chemical Society, Washington DC 1995.
3. J.G. Topliss, *Discovery and Design*, 1 (1993) 253.
4. K. Józwiak, H. Szumiło, E. Soczewiński, *Wiadomości Chemiczne*, 55 (2001) 1047.
5. E. Lipinski, *Molecular Drug Properties Measurement and Prediction*, Wiley-VCH, Weinheim 2008.
6. R. Kaliszan, *Chemical Reviews*, 107 (2007) 3212.
7. C. Liang, H. Lian, *Trends in Analytical Chemistry*, 68 (2015) 28.
8. U.D. Neue, K. Tran, P.C. Iraneta, B.A. Alden, *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 174.
9. J.E. Haky, S. Vemulapalli, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 13 (1990) 3111.
10. F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, F. Journal of Medicinal Chemistry, 44 (2001) 2490.
11. C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31 (2007) 79
12. M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod, *Journal of Chromatography A*, 1119 (2006) 202.
13. C. Pidgeon, S. Ong, H. Liu, X. Qui, M. Pidgeon, A.H. Dantzig, J. Munroe, W.J. Hornback, J.S. Kasher, L. Glunz, T. Szczerba, *Journal of Medicinal Chemistry*, 38 (1995) 590.
14. S. Ong, H. Liu, C. Pidgeon, *Journal of Chromatography A*, 728 (1996) 113.
15. T. Godard, E. Grushka, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1211.
16. K.L. Valkó, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130 (2016) 35.
17. L. Grumetto, C. Carpentiero, P. Di Vaio, F. Frecentese, F. Barbato, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75 (2013) 165.
18. G.P. Balen, C.M. Martinet, G. Caron, G. Bouchard, M. Reist, P.A. Carrupt, R. Fruttero, A. Gasco, B. Testa, *Medicinal Research Reviews*, 24 (2004) 299.
19. P. Lundahl, F. Beigi, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1997) 221.
20. A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan, *Current Medicinal Chemistry*, 10 (2003) 381.
21. M. Janicka, *Journal of Chromatographic Science*, 52 (2014) 676.

## **ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO BADANIA MECHANIZMU DZIAŁANIA NANOCZĄSTEK TLENKÓW METALI W ELEKTRODACH JONOSELEKTYWNYCH**

**K. PIETRZAK<sup>1</sup>, C. WARDAK<sup>1</sup>, SZ. MALINOWSKI<sup>2</sup>, N. KRSTULOVIĆ<sup>3</sup>,**  
<sup>1</sup>UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii  
Analitycznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin, <sup>2</sup>Politechnika  
Lubelska, Wydział Budownictwa i Architektury, Katedra Geotechniki,  
ul. Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin, <sup>3</sup>Instytut Fizyki, Bijenička cesta 46, 10 000  
Zagrzeb.

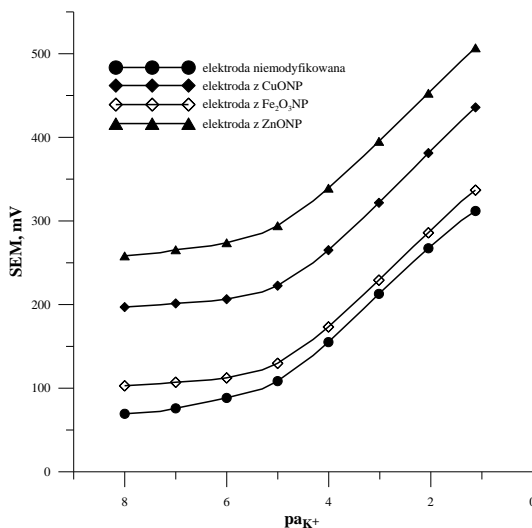
**Abstrakt:** W ostatnich latach nanocząstki metali i tlenków metali cieszą się ogromną popularnością wśród naukowców, którzy wciąż opracowują nowe metody ich otrzymywania oraz szukają nowych obszarów zastosowań. Jednym z nich jest wykorzystanie nanocząstek w konstrukcji czujników elektrochemicznych. W niniejszej pracy opisano elektrody jonoselektywne, w których jako stały kontakt zastosowano warstwę nanocząstek tlenków metali (tlenek miedzi, żelaza i cynku), a do zbadania ich parametrów analitycznych oprócz metod potencjometrycznych wykorzystano również metodę elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS), która posłużyła do wyznaczenia parametrów elektrycznych otrzymanych czujników.

**Wprowadzenie:** Metoda spektroskopii impedancyjnej w ostatnich latach jest coraz popularniejsza i służy głównie jako narzędzie do badania właściwości elektrycznych i elektrochemicznych materiałów i systemów. W dużym uproszczeniu metoda ta polega na przyłożeniu bodźca elektrycznego (o znanym natężeniu lub napięciu) do badanych elektrod oraz obserwowaniu otrzymanej w ten sposób odpowiedzi [1]. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) umożliwia rozdzielenie oraz charakterystykę procesów kinetycznych zachodzących w różnych układach elektrochemicznych [2]. W odniesieniu do elektrod jonoselektywnych jest to szybka i wygodna metoda, umożliwiająca badanie kinetyki przenoszenia ładunku na granicy faz pomiędzy membraną jonoselektywną a elektrodą wewnętrzną. Pozwala zoptymalizować i scharakteryzować membrany jonoselektywne oraz monitorować ich pracę. EIS umożliwia wyznaczenie wielu parametrów, takich jak oporność wewnętrzna i oporność przenoszenia ładunku oraz pojemność warstwy podwójnej [3]. Ponadto dzięki uzyskanym za jej pomocą wynikom można określić, czy badane czujniki nadal pracują w prawidłowy sposób lub też czy potrzebują dodatkowej kalibracji [2]. W pracy wykorzystano metodę elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej do scharakteryzowania i porównania elektrod jonoselektywnych z warstwą nanocząstek tlenków metali jako stałego kontaktu. Badania wykonano dla elektrod potasowych z dobrze zdefiniowaną membraną zawierającą walinomycynę jako jonofor.

**Część eksperymentalna:** Skonstruowano elektrody jonoselektywne ze stałym kontaktem (SCISEs) czule na jony potasowe. Pośród materiału elektrody stałej

z węgla szklanego (GCE) a warstwą membrany jonoselektywnej (3% walinomycyna, 1% KTPCIPB [tetrakis(p-chlorofenylo)boran potasu], 32% PVC [polichlorek winylu], 64% DOS [sebacynian bis(2-etyloheksylu)]) umieszczono warstwę nanocząstek odpowiednio tlenku miedzi, żelaza i cynku. W celu porównania wykonano też elektrodę niemodyfikowaną, w której membranę jonoselektywną naniesiono bezpośrednio na elektrodę z węgla szklanego. Pomiar siły elektromotorycznej (SEM) wykonywano dla ogniwa zbudowanego z badanej elektrody jonoselektywnej (SCISE) oraz elektrody referencyjnej chlorosrebrowej Ag/AgCl (Metrohm) w temperaturze pokojowej i z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego oraz 16-kanalowego systemu zbierania danych Lawson Labs. Widma EIS rejestrowano przy potencjale obwodu otwartego, przy amplitudzie 10 mV i w zakresie częstotliwości od 0,1 Hz do 100 kHz z wykorzystaniem elektrochemicznego analizatora AUTOLAB (Eco Chemie, Netherlands) i oprogramowania Nova 2.1. Pomiar impedancyjne wykonywano dla układu 3-elektrodowego zawierającego badaną elektrodę SCISE, referencyjną elektrodę chlorosrebrową i elektrodę pomocniczą – pręt z węgla szklanego.

**Wyniki:** Potencjometryczną odpowiedź elektrod badano w roztworach  $\text{KNO}_3$  w zakresie stężeń  $10^{-8}$  -  $10^{-1}$  mol  $\text{L}^{-1}$  poprzez pomiar siły elektromotorycznej ogniwa elektrochemicznego. Krzywe kalibracyjne uzyskane dla badanych elektrod przedstawiono na Rysunku 1.



Rys. 1. Krzywe kalibracyjne otrzymane dla badanych elektrod.

Z pomiarów potencjometrycznych wyznaczono podstawowe parametry analityczne elektrod, takie jak nachylenie prostoliniowego odcinka krzywych charakterystyki elektrod, granica wykrywalności, czas odpowiedzi oraz krótko- i długoterminowa stabilność (dryft) potencjału. Parametry te zebrano w Tabeli 1. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 1. wprowadzenie dodatkowej warstwy pośredniej nanocząstek tlenków metali (MONPs) powoduje przede wszystkim istotną poprawę

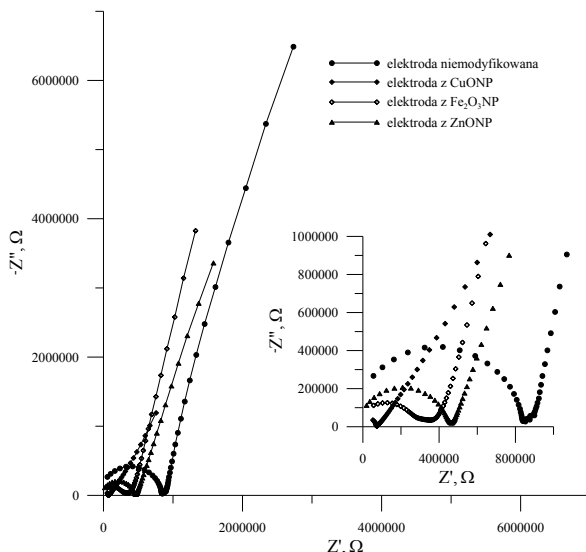
stabilności potencjału oraz większą trwałość elektrod. W celu zbadania wpływu rodzaju nanocząstek tlenku metalu na parametry elektrochemiczne elektrod wyznaczono i porównano widma EIS otrzymane dla elektrod z warstwą pośrednią nanocząstek tlenków metali oraz dla elektrody niezmodyfikowanej. Widma impedancyjne uzyskane dla badanych elektrod przedstawiono na Rysunku 2.

**Tabela 1.** Wybrane parametry analityczne wyznaczone dla badanych elektrod.

Parametr	ISE	CuONP	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NP	ZnONP
Nachylenie [mV/Dec]	-55,03 <sup>(a)</sup> -54,79 <sup>(b)</sup>	-57,52 <sup>(a)</sup> -53,74 <sup>(b)</sup>	-56,81 <sup>(a)</sup> -55,11 <sup>(b)</sup>	-56,07 <sup>(a)</sup> -55,47 <sup>(b)</sup>
Zakres liniowości [mol L <sup>-1</sup> ]	1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(a)</sup> 1×10 <sup>-4</sup> – 1×10 <sup>-1(b)</sup>	1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(a)</sup> 1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(b)</sup>	1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(a)</sup> 1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(b)</sup>	1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(a)</sup> 1×10 <sup>-5</sup> – 1×10 <sup>-1(b)</sup>
Granica wykrywalności [mol L <sup>-1</sup> ]	5,9×10 <sup>-6(a)</sup> 1,9×10 <sup>-5(b)</sup>	3,1×10 <sup>-6(a)</sup> 7,7×10 <sup>-6(b)</sup>	4,5×10 <sup>-6(a)</sup> 6,1×10 <sup>-6(b)</sup>	3,7×10 <sup>-6(a)</sup> 5,0×10 <sup>-6(b)</sup>
Krótkoterminowy dryft potencjału [mV/h]	5,17	0,54	1,40	0,16
Długoterminowy dryft potencjału [mV/dzień]	1,1	0,39	0,86	0,22
Czas odpowiedzi [s]	6-8	4-6	6-8	4-6

<sup>(a)</sup> parametry wyznaczone dla elektrody po tygodniu od wykonania elektrody

<sup>(b)</sup> parametry wyznaczone dla elektrody po 8 tygodniach od wykonania elektrody



**Rys. 2.** Widma uzyskane metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) dla elektrod z warstwą nanocząstek tlenku miedzi, żelaza i cynku oraz niezmodyfikowanej elektrody (ISE(c)) otrzymane w roztworze KNO<sub>3</sub> o stężeniu 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, rejestrowane przy potencjale obwodu otwartego w zakresie częstotliwości 0,1 Hz – 100 kHz.



Jak widać na powyższym rysunku, wszystkie widma impedancyjne miały kształt półokręgu w obszarze wysokich częstotliwości oraz część półokręgu w obszarze niskich częstotliwości. Część widma wyznaczoną dla wysokich częstotliwości można przypisać oporności wewnętrznej membrany i oporności granicy faz membrana/warstwa stałego kontaktu ( $R_b$ ) i pojemności geometrycznej ( $C_g$ ) membrany jonoselektywnej. Część widma o niskich częstotliwościach związana jest z opornością przenoszenia ładunku ( $R_{ct}$ ) i pojemnością warstwy podwójnej ( $C_{dl}$ ) na granicy faz między membraną polimerową a elektrodą wewnętrzną, w tym przypadku elektrodą z węgla szklanego [1,2].  $R_b$  określono na podstawie średnicy półokręgu na widmie EIS w zakresie wysokich częstotliwości, która wynika głównie z oporności membrany jonoselektywnej i warstwy pośredniej, natomiast  $C_{dl}$  oszacowano na podstawie najniższej wartości częstotliwości za pomocą równania  $C_{dl} = 1/(2\pi fZ'')$  [1], gdzie  $f = 0,1$  Hz. Wartość pojemności warstwy podwójnej jest związana z procesami dyfuzji i szybkością przenoszenia ładunku na granicy faz. Zauważono, że po wprowadzeniu tlenków metali jako warstwy pośredniej, zmniejszył się zarówno półokrąg w obszarze wysokich częstotliwości, jak i część widma wyznaczona dla niskich częstotliwości. Wyznaczona oporność  $R_b$  dla elektrody niemodyfikowanej wynosiła 8,97 k $\Omega$ . Wartość ta była znacznie mniejsza dla elektrod z warstwą pośrednią nanocząstek tlenku metalu i wynosiła 1,06; 3,17 i 4,76 k $\Omega$  dla elektrod z warstwą CuONP, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP i ZnONP. Podobnie różna była wartość pojemności warstwy podwójnej dla elektrod modyfikowanych nanocząstkami tlenków metali i elektrody niemodyfikowanej. Wyznaczona pojemność warstwy podwójnej wynosiła 1,1; 0,32 i 0,47  $\mu$ F odpowiednio dla elektrod z warstwą CuONP, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NP i ZnONP, podczas gdy dla elektrody niemodyfikowanej wynosiła 0,09  $\mu$ F. Ponieważ wszystkie elektrody miały tę samą membranę, różnica zaobserwowana na wykresach EIS wynikała z różnic w oporności materiału warstwy wewnętrznej i jego własności przewodzących. Najniższą wartość  $R_b$  i najwyższą wartość  $C_{dl}$  uzyskano dla elektrod zawierających nanocząstki tlenku miedzi (odpowiednio 8-krotny spadek i ponad 10-krotny wzrost w porównaniu do elektrody niemodyfikowanej).

**Wnioski:** Zastosowanie MONPs jako warstwy pośredniej w konstrukcji elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem pozwala na uzyskanie czujników o lepszej stabilności i trwałości w czasie. Obecność warstwy pośredniej powoduje obniżenie oporności wewnętrznej membrany oraz zwiększenie pojemności warstwy podwójnej. Dzięki temu transport ładunku przez granicę faz jest szybszy i łatwiejszy, co skutkuje lepszą stabilnością potencjału oraz zwiększoną trwałością elektrod w czasie.

### Literatura:

1. R. E. Barsoukov, J. R. Macdonald, Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications, Wiley-Interscience, New Jersey 2005.
2. A. Radu, S. Anastasova-Ivanova, B. Paczosa-Bator, M. Danielewski, J. Bobacka, A. Lewenstam, D. Diamond, Analytical Methods, 2 (2010) 1490.
3. E. L. Anderson, P. Bühlmann, Analytical Chemistry, 88 (2016) 9738.

## ZASTOSOWANIE LC-QTOF W PROFILOWANIU LIPIDOMICZNYM OLEI ROŚLINNYCH

**A. KOZUB, A. STACHNIUK, A. SUMARA, E. FORNAL**, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Patofizjologii, ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin.

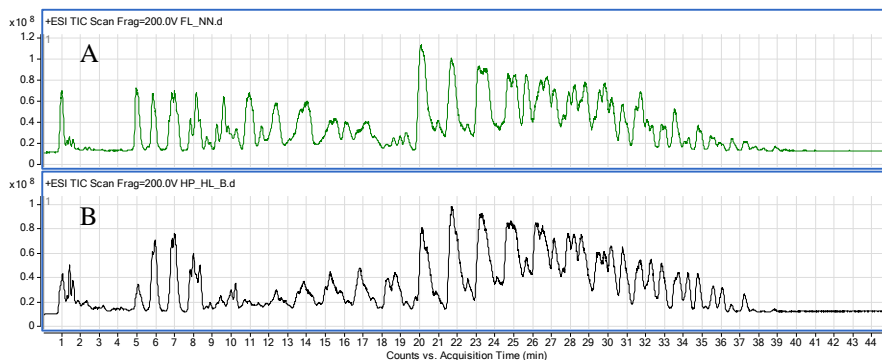
**Abstrakt:** W pracy przedstawiono zastosowanie profilowania lipidomicznego dwóch olejów tłoczonych na zimno: oleju lnianego i oleju konopnego z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-HRMS). Na podstawie profilu MS ekstraktów z olei uzyskanych z analizy LC/QTOF zidentyfikowano jony różnicujące umożliwiające rozpoznawanie rodzaju oleju.

**Wprowadzenie:** Na przestrzeni ostatnich lat nastąpił gwałtowny rozwój obszarów badawczych z zakresu nauk zwanych naukami omicznymi. Wzrost zaawansowania technologicznego dostępnych technik analitycznych umożliwił wyłonienie wśród nich subdyscypliny jaką jest lipidomika. Zapewnia ona możliwość rozpoznania całego zestawu związków lipidowych w danym układzie zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym [1]. Izolacja i identyfikacja lipidów jest niezwykle wymagającym zadaniem przez wzgląd na różnorodność strukturalną lipidów, a także zróżnicowany skład matrycy analizowanej próbki. Zważywszy na wysoką czułość i dobrą specyficzność najpowszechniejszymi technikami badawczymi wykorzystywanymi w analizach lipidomicznych są techniki oparte na spektrometrii mas. Szerokie spektrum dostępnych analizatorów mas umożliwia analizę zróżnicowanych klas lipidów na podstawie pomiaru stosunku masy do ładunku danego jonu. Wynik analizy lipidomicznej jest charakterystyką pełnego lipidomu zdefiniowanego przez wszystkie struktury lipidów w danej próbce, która niejednokrotnie może zawierać ponad 1000 różnych lipidów [2]. Profilowanie lipidomiczne znajduje szerokie zastosowanie w badaniach naukowych dotyczących zaburzeń neurologicznych, chorób nowotworowych, zespołów metabolicznych oraz w testach nad opracowywaniem leków [3]. Dodatkowo, jest techniką dyskryminacyjną skutecznie stosowaną w badaniach żywieniowych celowanych na różnicowanie i uwierzytelnianie produktów spożywczych [4]. W niniejszej pracy wykorzystano podejście profilowania lipidomicznego z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas typu kwadrupol - analizator czasu przelotu oraz narzędzi chemometrycznych w różnicowaniu dwóch olejów tłoczonych na zimno: oleju lnianego i oleju konopnego. Najważniejszą zaletą tych dwóch olejów jest zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, których podaż jest konieczna ze względu na niezdolność organizmu do ich samodzielnej produkcji.

**Część eksperymentalna:** Materiał badawczy stanowiły dwa oleje roślinne tłoczone metodą na zimno (olej lniany (n=3), olej konopny (n=3)). Przygotowano próbki poddając je ekstrakcji ciecz-ciecz z wykorzystaniem roztworu heksanu i mieszaniny metanol : izopropanol (1:1, v:v). Próbki wytrząsano i umieszczono w temperaturze 2-8°C na czas 2 h. Następnie poddano wirowaniu i filtrowaniu. Uzyskany ekstrakt

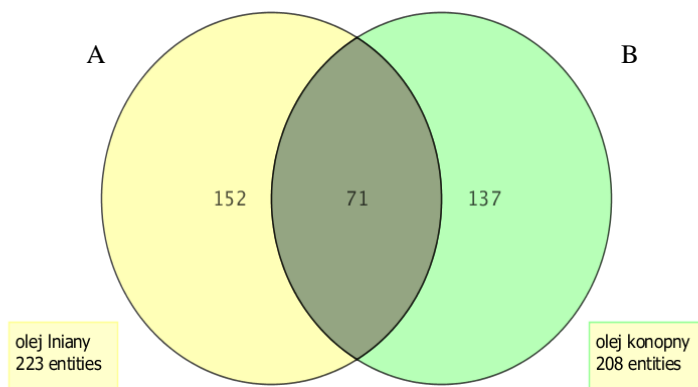
przeniesiono do fiolek autosamplerowych i poddano analizie LC-QTOF. Analizę LC-QTOF prowadzono przy pomocy ultrasprawnego chromatografu cieczowego Agilent Technology HPLC seria 1290 Infinity sprzężonego ze spektrometrem mas typu kwadrupol-analizator czas przelotu Agilent Technology 6550 iFunnel LC/QTOF. Proces rozdzielania chromatograficznego prowadzono na kolumnie Agilent Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HD, 2.1x100 mm o średnicy ziaren 1.8  $\mu\text{m}$ . Fazę ruchomą stanowił 10 mM mrówczan amonu w roztworze metanolu i wody (8:2, v:v) (A) i isopropanolu (B). Zastosowano elucję gradientową w czasie 45 min z szybkością przepływu fazy ruchomej 0,28 ml/min i czasem kondycjonowania kolumny równym 5 min. Objętość dozowanej próbki wynosiła 1  $\mu\text{l}$ . Zoptymalizowano parametry źródła jonów Agilent Jet Stream Technology (ESI +). Uzyskano następujące parametry: prędkość przepływu gazu rozpylającego 14 l/min, temperatura gazu rozpylającego 200°C, ciśnienie nebulizera 35 psi. Wykonano analizy skan MS. Uzyskane wyniki poddano obróbce z wykorzystaniem programu Mass Hunter Qualitative i Mass Hunter Profinder (Agilent Technologies). Wyrównanie czasów retencji i mas oraz filtrowanie mas osiągnięto przy pomocy programu Mass Profiler Professional (Agilent Technologies).

**Wyniki:** Olej lniany i olej konopny analizowano w trybie skan MS, uzyskując dla nich profile lipidomiczne. Rysunek 1 przedstawia chromatogramy całkowitego strumienia jonów TIC (ang. total ion current) uzyskane dla ekstraktu z oleju lnianego (A) i ekstraktu z oleju konopnego (B). Zauważalne różnice w profilach chromatograficznych świadczą o zróżnicowanym jakościowym składzie frakcji lipidów.



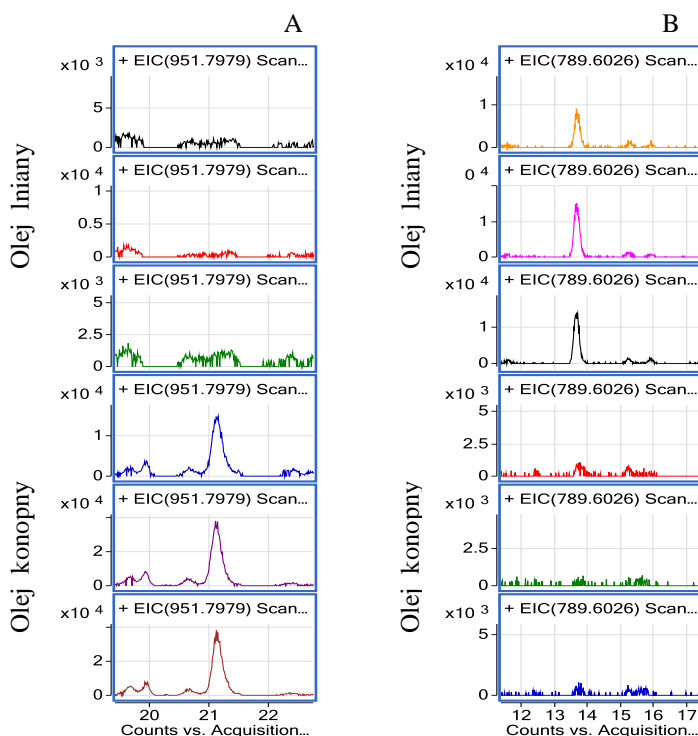
**Rys. 1.** Chromatogramy TIC uzyskane dla oleju lnianego (A) oraz oleju konopnego (B).

Dzięki zastosowaniu algorytmu *Findy by Molecular Feature* wyekstrahowano spektra i chromatogramy związków obecnych w obu olejach oraz związków różnicujących. Otrzymane wyniki poddano obróbce, dążąc do identyfikacji w widmach LC/MS jonów charakterystycznych dla oleju lnianego i jonów charakterystycznych dla oleju konopnego. Przy pomocy programu Mass Profiler Professional (Agilent Technologies) wyrównano czasy retencji i masy oraz przeprowadzono filtrowanie mas. Zestawienie liczby cech lipidomicznych obecnych w dwóch rodzajach olei oraz cech różnicujących zaprezentowano na rysunku 2.



Rys.2. Zestawienie liczby cech lipidomicznych wspólnych oraz różnicujących dla oleju lnianego (A) i oleju konopnego (B).

Wyekstrahowane chromatogramy EIC (ang. extracted ion chromatogram) na przykładzie jonów różnicujących olej lniany od oleju konopnego ( $m/z$  789.6026) oraz olej konopny od oleju lnianego ( $m/z$  951.7979) przedstawiono na rysunku 3.



Rys.3. Chromatogramy EIC jonów różnicujących oleje konopne ( $n=3$ ) od olei lnianych ( $n=3$ ),  $m/z$  951.7979 (A) oraz oleje lniane ( $n=3$ ) od olei konopnych ( $n=3$ ),  $m/z$  789.6026 (B).

**Wnioski:** Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką skuteczność metody LC-MS/MS w pozyskiwaniu profili lipidomicznych tłoczonych na zimno olei roślinnych. Wykorzystanie chemometrii i analizy statystycznej umożliwiło identyfikację jonów różnicujących, które dają możliwość potwierdzenia autentyczności badanych olei.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant nr 2018/31/B/NZ9/02762.

**Literatura:**

1. M.D. Luque de Castro, R. Quiles-Zafra, Talanta, 219 (2020) 121197.
2. Z. Wu, G.I. Bagarolo, S. Thorøe-Boveleth, J. Jankowski, Advanced Drug Delivery Reviews, 159 (2020) 294.
3. K. Yang, X. Han, Trends in Biochemical Sciences, 41/11 (2016) 954.
4. H. Chen, F. Wei, X. Dong, J. Xiang, S. Quek, X. Wang, Current Opinion In Food Science, 16 (2017) 80.

## **ZASTOSOWANIE ELEKTRODY Z CYKLICZNIE ODNAWIALNEGO FILMU CIEKŁEGO AMALGAMATU SREBRA (R-AgLAFE) DO BADANIA KINETYKI I MECHANIZMU ELEKTROREDUKCJI JONÓW Bi(III) W OBECNOŚCI 2-TIOCYTOZyny W ROTWORACH O ZMIENNEJ AKTYWNOŚCI WODY**

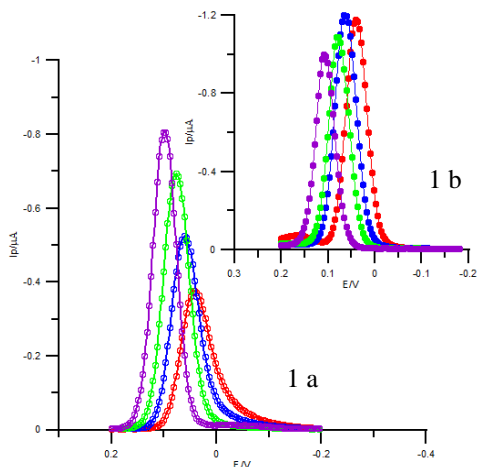
**M. MARTYNA**, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej Pl. Marii Curie – Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Wykazano, że aktywność wody wpływa na przebieg mechanizmu elektroredukcji jonów Bi(III) w chloranach(VII) na nowo skonstruowanej elektrodzie z cyklicznie odnawialnego filmu amalgamatu srebra (R-AgLAFE). Zbadano wielkość efektu katalitycznego działania 2-tiocytozyny (TC) na proces elektroredukcji jonów Bi(III) oraz skorelowano otrzymane wyniki ze zmianami aktywności wody.

**Wprowadzenie:** Nowotwory, jako choroby cywilizacyjne XXI wieku stanowią duże wyzwanie dla medycyny, zwłaszcza w kwestii diagnostyki i metod ich leczenia [1]. Jedną spośród stosowanych metod leczenia jest chemioterapia, której założenie opiera się na zastosowaniu leków oddziałujących na cykl komórkowy, co niestety powoduje, że jest terapią toksyczną dla całego organizmu. Mając wzgląd na to zasadne wydają się badania mechanizmów działania leków oraz poszukiwania nowych systemów kontrolowanego uwalniania leków, co może być wykorzystane do dokładnego monitorowania stanu zdrowia pacjenta [2,3]. W badaniach kinetyki i mechanizmu elektroredukcji jonów Bi(III) wykorzystano 2-tiocytozynę (związek z potwierdzoną antyleukemiczną aktywnością stosowany jako lek w chemioterapii, głównie w białaczkach szpikowych [3]), która wpisując się w wymogi reguły „cap-pair” sformułowanej przez Sykuta [4], może wykazywać aktywność katalityczną. Mechanizm elektroredukcji depolaryzatorów w obecności substancji organicznych jest złożony, ponieważ łączy w sobie zarówno etapy przejścia elektronów jak i etapy chemiczne [5,6], w których substrat lub związek pośredniczący traci część otoczki solwatacyjnej, w wyniku czego tworzy na powierzchni elektrody kompleksy uczestniczące w przeniesieniu elektronów. Wyniki badań zostały uzyskane z wykorzystaniem innowacyjnej elektrody z cyklicznie odnawialnym filmem ciekłego amalgamatu srebra (R-AgLAFE) [7]. Elektroda ta jest doskonałą alternatywą dla dotychczas stosowanej elektrody rtęciowej. Pozwala ona na możliwość pracy w szerokim zakresie potencjałów, co umożliwi dokładniejsze wyznaczenie parametrów kinetycznych [7]. Ponadto wpisuje się ona w nurt zielonej chemii z racji znacznego obniżenia zużycia toksycznej rtęci do wytwarzania filmu amalgamatu i redukcji generowania odpadów. Zastosowane techniki pomiarowe pozwoliły na wyznaczenie parametrów kinetycznych, które wskazały na efekt katalityczny działania 2-tiocytozyny na elektroredukcję jonów Bi(III) oraz na korelację tych parametrów kinetycznych ze zmianami aktywności wody.

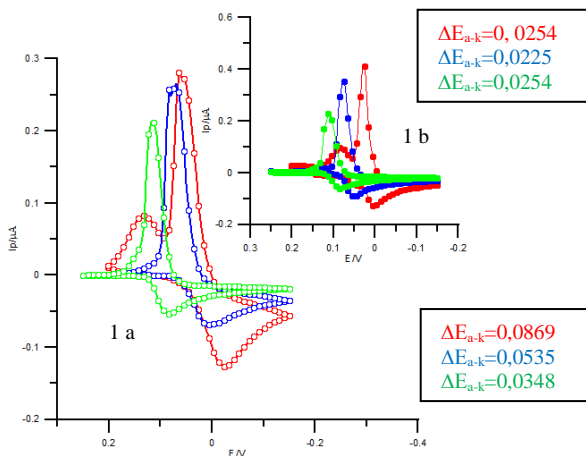
**Część eksperymentalna:** Dane wyjściowe uzyskano za pomocą analizatora elektrochemicznego  $\mu$ Autolab (wersja 4.9) wraz z oprogramowaniem GPES firmy Eco Chemie. Naczynko trójelektrodowe zamontowane było w programowalnym statywie Mtm-anko M165 i zawierało układ trzech elektrod. Elektroda roboczą była elektroda z cyklicznie odnawialnego filmu amalgamatu srebra (R-AgLAFE), elektrodą odniesienia była elektroda chlorkowo-srebrowa (Ag/AgCl, 3 M KCl), a elektrodą porównawczą drut Pt. Wszystkie roztwory termostатовano i odtleniano azotem sporządzając je bezpośrednio przed pomiarami. Roztwory przygotowano bazując na odczynnikach cz. d. a.:  $\text{HClO}_4$  (Fluka),  $\text{NaClO}_4$  (Fluka),  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 2-tiocytozyna (Sigma Aldrich). Jako elektrolit podstawowy zastosowano chlorany(VII) w zakresie stężeń od  $1\text{-}8 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , natomiast rolę depolaryzatora pełniły jony Bi(III) o stężeniu  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Katalizatorem badanego procesu elektroredukcji jonów Bi(III) była 2-tiocytozyna.

**Wyniki:** Jak wynika z rysunku 1a, wraz ze wzrostem stężenia chloranów(VII) piki SWV elektroredukcji jonów Bi(III) zdecydowanie rosną i przesuwały się w kierunku potencjałów dodatnich. Wskazuje to na znaczny udział wody w procesie elektroredukcji jonów Bi(III) w chloranach(VII). Odwracalność procesu elektrodowego rośnie wraz ze spadkiem aktywności wody [6]. Podobną zależność zaobserwowano badając proces elektroredukcji jonów Bi(III) na elektrodzie rtęciowej [6]. Dodatek  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  2-tiocytozyny do roztworu elektrolitu powoduje wzrost prądu pików elektroredukcji jonów Bi(III) jak również zmniejszanie się szerokości pików SWV w połowie ich wysokości (Rys. 1b). Oznacza to wzrost odwracalności jonów Bi(III) w obecności 2-tiocytozyny. Ze wzrostem stężenia chloranów(VII) obserwuje się nieznaczne podwyższenia prądów pików SWV elektroredukcji Bi(III). Należy zaznaczyć, że dla roztworów o znacznie mniejszej aktywności wody piki maleją.



**Rys.1 a)** Piki SWV elektroredukcji  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Bi(III) w  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (○);  $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (○);  $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (○);  $8 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (○) chloranach(VII); **1b)** oraz z dodatkiem  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  2-tiocytozyny odpowiednio dla tych samych stężeń chloranów(VII).

Obecność 2-tiocytozyny, a także zmiana aktywności wody wpływa na odwracalność elektroredukcji jonów Bi(III), co wynika również z przebiegu krzywych voltamperometrii cyklicznej (Rys. 2 a, b). Dodatek  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  2-tiocytozyny do roztworu elektrolitu zasadowego powoduje zmniejszenie odległości pomiędzy pikami anodowym i katodowym ( $\Delta E_{a-k}$ ) w porównaniu z odległością zarejestrowaną dla roztworu jonów Bi(III) we wszystkich roztworach chloranów(VII), co potwierdza wzrost odwracalności procesów elektroredukcji jonów Bi(III) [6].



**Rys.2 a)** Krzywe CV elektroredukcji  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  Bi(III) w 2 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  (o), 4 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  (o); 6 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  (o) chloranach(VII); **2 b)** oraz z dodatkiem  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  2-tiocytozyny odpowiednio dla tych samych stężeń chloranów(VII).

**Tabela 1** Zmiany  $\Delta E_{a-k}$  dla procesu elektroredukcji  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  Bi(III) w 1-8 mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  chloranach(VII) oraz w obecności  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  dm $^{-3}$  2-tiocytozyny od szybkości polaryzacji v.

chlorany(VII)/ mol $\cdot$ dm $^{-3}$	$\Delta E/V$							
	v/mV $\cdot$ s $^{-1}$							
	5	10	20	50	100	200	500	1000
1	0,0425	0,0429	0,0450	0,0454	0,0410	0,0382	0,0579	0,0607
2	0,0407	0,0409	0,0410	0,0426	0,0425	0,0309	0,0286	0,0276
3	0,0400	0,0400	0,0401	0,0350	0,0333	0,0313	0,0348	0,0409
4	0,0389	0,0386	0,0365	0,0300	0,0301	0,0383	0,0326	0,0438
5	0,0356	0,0359	0,0306	0,0300	0,0321	0,0427	0,0434	0,0450
6	0,0338	0,0330	0,0384	0,0305	0,0304	0,0360	0,0364	0,0403
7	0,0335	0,0334	0,0335	0,0346	0,0355	0,0440	0,0438	0,0484
8	0,0379	0,0367	0,0340	0,0354	0,0367	0,0434	0,0446	0,0421

Niewielkie zmiany  $\Delta E_{a-k}$  wraz ze zmianą szybkości polaryzacji (szczególnie przy niskich szybkościach polaryzacji elektrody (Tabela 1) wskazują, że etapem kontrolującym szybkość procesu elektroredukcji jonów Bi(III) w obecności 2-tiocytozyny, przy zmiennej aktywności wody jest reakcja chemiczna tworzenia się kompleksów aktywnych Bi-TC [8].



**Wnioski:** Przeprowadzone badania wskazują, że na szybkość elektrodredukcji Bi(III) w chloranach(VII) wpływa obecność 2-tiocytozyny jak i aktywność wody. Obniżenie aktywności wody daje podobny efekt jak wzrost stężenia 2-tiocytozyny. Istotną rolę odegra tu kompleks aktywny Bi-TC, który pośredniczy w przeniesieniu elektronów [9]. Fakt tworzenia kompleksu w warstwie adsorpcyjnej elektrody-AgLAFE związany jest z adsorpcją 2-tiocytozyny na elektrodzie, która zwiększa aktywność elektrody nie ograniczając jej powierzchni [9].

**Literatura:**

1. W. Kitajewska, *J. Clin. Health.*, 1 (2014) 4102.
2. D. Miller, D. Kimberly, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66 (2016) 271.
3. E.J. Park, *Annals of Coloproctology*, 36 (2021) 357.
4. K. Sykut K., Dalmata G., Nowicka B., Saba J. J., *Electroanal. Chem.*, 90 (1978) 299.
5. K. Sykut, G. Dalmata, J. Nieszporek, *Electroanalysis*, 10 (1998) 458.
6. A. Nosal-Wiercińska, *Electrochim. Acta.*, 55 (2010) 5917.
7. B. Baś, *Analytica Chimica Acta*, 570 (2006) 195.
8. O.A. Petrii, R.R. Nazmutdinov, M.D. Bronshtein, G.A. Tsirlina, *Electrochimica Acta*, 52 (2007) 3493.
9. A. Nosal-Wiercińska, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1013.

## MOŻLIWOŚCI I WYZWANIA W OZNACZANIU POCHODNYCH WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH

**A. KRZYSZCZAK, B. CZECH**, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Oznaczanie pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach środowiskowych stanowi wyzwanie dla analityka, między innymi ze względu na złożoność matryc środowiskowych (np. próbki pyłu zawieszonego w powietrzu), co wiąże się z koniecznością zastosowania wieloetapowej procedury przygotowania próby do analizy, jak również niską zawartość analitów w oznaczanych matrycach (w próbkach pyłu zawieszonego w powietrzu jest to zakres  $\text{pg m}^{-3}$ – $\text{ng m}^{-3}$  [1]). Jednakże, wespół z wyzwaniami eksperymentom towarzyszą także możliwości, dzięki którym m.in. metody oznaczania pochodnych WWA staną się udoskonalone i „dostępniejsze” dla naukowców, łatwiejsze w przeprowadzeniu, co pozwoli na szybkie analizy oraz stałe i powszechne monitorowanie próbek środowiskowych pod kątem zanieczyszczenia toksycznymi i mutagennymi pochodnymi WWA.

**Wprowadzenie:** W ostatnich latach zainteresowanie oznaczaniem WWA w próbkach środowiskowych wzrasta [2,3], głównie ze względu na potwierdzone ich toksyczne, kancerogenne i mutagenne właściwości [4,5]. WWA zbudowane są z co najmniej dwóch pierścieni aromatycznych. Natomiast pochodne WWA różnią się od związków rodzimych posiadaniem dodatkowej grupy karbonylowej lub nitrowej przyłączonej do jednego z pierścieni aromatycznych, czy też atomu azotu, siarki lub tlenu zajmującego miejsce węgla w jednym z pierścieni aromatycznych [6]. Oznaczanie tlenowych i azotowych pochodnych WWA w próbkach środowiskowych stanowi bardzo szeroki temat, a cały szereg opublikowanych dotychczas artykułów naukowych opisujących sposoby ekstrakcji i oznaczania omawianych analitów, świadczy o bogactwie tych metod i ich zróżnicowaniu. Tlenowe pochodne WWA oznacza się głównie metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas GC/MS [6-8]. Natomiast metody oznaczania azotowych pochodnych WWA są bardziej zróżnicowane (Tab.1.). Niemniej w obydwu przypadkach stosowane metody przygotowania próbki obejmują różne techniki ekstrakcji (Tab.1.). Są to przeważnie: ekstrakcja za pomocą aparatu Soxhleta [8,9], ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami (UAE) [10,11], przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE) [6,12] oraz ekstrakcja wspomaganą mikrofalami (MAE) [13]. Techniki te różnią się wymaganym czasem ekstrakcji oraz ilością rozpuszczalnika niezbędnego do przeprowadzenia eksperymentu [1]. Niezwykle istotny jest również dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, który będzie posiadał odpowiednie właściwości fizykochemiczne (np. temperatura wrzenia, prężność par) i stosowne powinowactwo do oznaczanych związków. Ze względu na złożoność matrycy i niskie stężenie

analitów, oprócz metody ekstrakcji, procedura przygotowania próbek do badań zawiera etapy oczyszczania ekstraktów (za pomocą ekstrakcji do fazy stałej SPE [14] lub rozdział dzięki chromatografii cieczowej LC [15]), derywatyzację analitów [7] oraz zatężanie lub całkowite odparowywanie i przeprowadzenie związków do innego rozpuszczalnika [1].

**Tabela 1.** Metody oznaczania i sposoby ekstrakcji tlenowych i azotowych pochodnych WWA w próbkach pyłu zawieszonego w powietrzu.

<b>Tlenowe pochodne WWA</b>			
Metoda ekstrakcji	Liczba oznaczanych związków	Metoda oznaczania	Literatura
Ekstrakcja mieszaniną dichlorometanu (DCM) i metanolu (MeOH), odparowanie, derywatywizacja N,O-bis-(trimetylsilil) trifluoroacetamidem (BSTFA)	7	GC/MS, jonizacja strumieniem elektronów	[7]
Ekstrakcja metodą Soxhleta za pomocą DCM (24 godziny), odparowanie, frakcjonowanie za pomocą szklanej kolumny chromatograficznej wypełnionej bezwodnym żelem krzemionkowym, elucja n-heksanem, mieszaniną n-heksan: DCM (6:4), DCM, 30% aceton/n-heksan (v/v), odparowanie do 1 mL	12	GC/MS, tryb SIM (Selected Ion Monitoring)	[8]
Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem ASE (za pomocą DCM), oczyszczanie ekstraktów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) (tlenek glinu+krzemionka), rozpuszczenie pozostałości w izooktanie	9	GC/NCI/MS, ujemna jonizacja chemiczna	[6]
Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem ASE (za pomocą DCM), odparowanie, doprowadzenie do objętości końcowej 1 mL	8	GC/NCI/MS, SIM	[16]
Ekstrakcja za pomocą mieszaniny DCM/MeOH (3:1, V:V) wspomagana ultradźwiękami (UAE), dodatek bezwodnego siarczynu(VI) sodu do ekstraktu w celu odwodnienia próbki, odparowanie	3	GC-MS	[10]
<b>Azotowe pochodne WWA</b>			
Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem ASE (za pomocą DCM), odparowanie, doprowadzenie do objętości końcowej 1 mL	17	GC/NCI-MS, SIM	[12]
Ekstrakcja metodą Soxhleta za pomocą DCM i eteru naftowego (24 godziny), odparowanie, przeprowadzenie analitów do heksanu, SPE- elucja przez aminopropylową kolumnę za pomocą 20% DCM w heksanie, odparowanie, izolacja analitów za pomocą chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz	26	GC/MS	[9]
Ekstrakcja za pomocą mieszaniny benzen/etanol (3/1, v/v) wspomagana ultradźwiękami, filtracja, oczyszczanie ekstraktów za pomocą NaOH, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> oraz wody destylowanej, odparowanie, rozpuszczenie w MeOH, filtracja,	2	HPLC* z detektorem chemiluminescencyjnym	[11]
Ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) za pomocą DCM, filtracja, odparowanie, rozpuszczenie w MeOH, dodatek NaBH <sub>4</sub> i wodnego roztworu CuCl <sub>2</sub> , ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, dodatek wody, oczyszczanie za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz (używając DCM), odparowanie, dodatek acetonitrylu	5	LC** z detektorem fluorescencyjnym	[13]

Ekstrakcja metodą Soxhleta za pomocą DCM, odparowanie, rozpuszczenie w DCM, ekstrakcja SPE-elucja za pomocą n-heksanu, odparowanie, rozpuszczenie w MeOH, dodatek wodnego roztworu chlorku miedzi(II), stałego NaBH <sub>4</sub> oraz wody destylowanej, ekstrakcja benzenem, odparowanie, dodatek bezwodnika heptafluorobutyłowego, ogrzewanie, dodatek wodnego roztworu amoniaku.	6	GC-ECD (detektor wychwytu elektronów)	[17]
---	---	---------------------------------------	------

\* HPLC-wysokosprawna chromatografia cieczowa; \*\* LC-chromatografia cieczowa

Omawiając oznaczanie pochodnych WWA w próbkach pyłu zawieszonego w powietrzu nie sposób nie wspomnieć o etapie poboru materiału do analiz. Sienna [8] w swojej pracy zaproponowała następujący sposób postępowania: przed procedurą zbierania pyłu atmosferycznego, filtry zostały poddane kondycjonowaniu, umieszczając je w szczelnej komorze na okres 24-48 godzin, w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności. Po czym filtry zostały zważone (masa początkowa). Następnie po etapie kolekcjonowania pyłu atmosferycznego, filtry zostały ponownie wykondycjonowane i zważone [8]. Ren i in. [7] przeprowadzili pobieranie próbek na wstępnie wyprażonych w 450°C przez 8 godzin filtrach z włókna szklanego (Whatman 42). Etap ten pozwala na usunięcie organicznych zanieczyszczeń, które mogą znajdować się na filtrze [12]. Po próbkowaniu, filtry zostały zawinięte szczelnie w aluminiową folię i do momentu analizy były przechowywane w -18 °C [7]. Wang i in. [10] wyprażali filtry z włókna szklanego w temperaturze 780°C, a próbki były przechowywane w -20°C [10]. Natomiast Albinet i in. [12] wypalali filtry w 500 °C przez 12 godzin. Inną matrycą środowiskową są próbki gleb, w których WWA i ich pochodne również wymagają stałego monitorowania. Najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji jest przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem [18,19,20]. Jako rozpuszczalnik stosowany jest DCM [18], jak również mieszaniny, np. CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>/DCM/CF<sub>3</sub>COOH [19] oraz n-heksan/aceton [20,21]. Otrzymane ekstrakty wymagają oczyszczenia za pomocą frakcjonowania przez kolumnę wypełnioną żelalem krzemionkowym [19] lub dodatkowo zawierającą bezwodny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [20]. Ze względu na niskie stężenia pochodnych WWA w glebach, próbki przed analizą są zateżane. Przykładowe zawartości pochodnych WWA znajdują się w Tab.2.

**Tabela 2.** Zawartości pochodnych WWA w próbkach gleb.

Lokalizacja	Suma WWA (średnia±SD lub zakres) [µg g <sup>-1</sup> ]	Suma tlenowych pochodnych WWA (średnia±SD lub zakres) [µg g <sup>-1</sup> ]	Literatura
Chiny	0.352 ± 0.283	0.108 ± 0.0667	[18]
Szwajcaria	4.2 ± 0.34	22.0 ± 1.7	[19]
Szwecja	164.45 ± 69.89	1767.54 ± 557.76	[20]
Australia	4.314- 100.931	0.357- 2.790	[21]
	2.508- 392.932	0.377- 11.536	
	1.395-8.741	0.503-0.804	
	0.2013- 11.176	0.354-9.185	

**Wnioski:** Przeprowadzony powyżej przegląd literaturowy przedstawia niektóre wyzwania stojące przed naukowcami zajmującymi się oznaczeniami jakościowymi i ilościowymi związków wielopierścieniowych, jakimi są WWA i ich pochodne. Zróżnicowanie i mnogość związków obecnych w ekstraktach, a także stężenia poszczególnych analitów na poziomie  $\text{pg m}^{-3}$  lub  $\text{ng m}^{-3}$  (pył atmosferyczny) lub  $\text{ng g}^{-1}$  (gleby) wymagają wprowadzenie kolejnych etapów oczyszczania lub zateżenia próbek, a każdy etap wiąże się z możliwością utraty części analitu. Jednakże, toksyczne i kancerogenne właściwości WWA i pochodnych, jak również wymóg monitorowania ich poziomu w próbkach środowiskowych motywuje do kolejnych optymalizacji, udoskonalania metod ich oznaczania oraz obniżania ich granicy wykrywalności i oznaczalności.

### **Literatura:**

1. Z. Nyiri, M. Novák, Z. Bodai, B. S. Szabó, Z. Eke, G. Záray, T. Szigeti, *J Chromatogr A*, 1472 (2016) 88.
2. H. Zheng, C. Qu, J. Zhang, S.A. Talpur, Y. Ding, X. Xing, S. Qi, *Environ Geochem Health*, 41 (2019) 907.
3. P.S. Khillare, V.K. Sattawan, D.S. Jyethi, *Environ Technol*, 41 (2020) 842.
4. R.K. Rajpara, D.R. Dudhagara, J.K. Bhatt, H.B. Gosai, B.P. Dave, *Marine Pollution Bulletin*, 119 (2017) 231.
5. N. Peng, Y. Li, Z. Liu, T. Liu, C. Gai, *Sci Total Environ*, 565 (2016) 1201.
6. J. Ringuet, E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, E. Villenave, A. Albinet, *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12 (2012) 8877.
7. Y. Ren, B. Zhou, J. Tao, J. Cao, Z. Zhang, C. Wu, J. Wang, J. Li, L. Zhang, Y. Han, L. Liu, C. Cao, G. Wang, *Atmospheric Research*, 183 (2017) 322.
8. M. María del Rosario Sienra, *Atmos Environ*, 40 (2006) 2374.
9. H.A. Bamford, J.E. Baker, *Atmos Environ*, 37 (2003) 2077.
10. J. Wang, H. Xu, B. Guinot, L. Li, S.S.H. Ho, S. Liu, X. Li, J. Cao, *Atmos Res*, 192 (2017) 1.
11. T.T. Hien, L.T. Thanh, T. Kameda, N. Takenaka, H. Bandow, *Atmos Environ*, 41 (2007) 7715.
12. A. Albinet, E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, E. Villenave, *Sci Total Environ*, 384 (2007) 280.
13. A.I. Barrado, S. García, Y. Castrillejo, E. Barrado, *Atmos Environ*, 67 (2013) 385.
14. P. Castells, F.J. Santos, M.T. Galceran, *J Chromatogr A*, 1010 (2003) 141.
15. K.F. Souza, L.R.F. Carvalho, A.G. Allen, A.A. Cardoso, *Atmos Environ*, 83 (2014) 193.
16. A. Albinet, E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, E. Villenave, J.-L. Jaffrezo, *Atmos Environ*, 42 (2008) 43.
17. M.P. Tsakas, I.E. Sitaras, P.A. Siskos, *Chem Ecol*, 26 (2010) 251.
18. B.A. Musa Bandowe, C. Wei, Y. Han, J. Cao, C. Zhan, W. Wilcke, *Sci Total Environ*, 690 (2019) 1268.
19. W. Wilcke, M. Kiesewetter, B.A. Musa Bandowe, *Environ Pollut*, 184 (2014) 385.
20. S. Lundstedt, B.A.M. Bandowe, W. Wilcke, E. Boll, J.H. Christensen, J. Vila, M. Grifoll, P. Faure, C. Biache, C. Lorgeoux, M. Larsson, K. Frech Irgum, P. Ivarsson, M. Ricci, *Trends Analyt Chem*. 57 (2014) 83.
21. O. Idowu, K.T. Semple, K. Ramadass, W. O'Connor, P. Hansbro, P. Thavamani, *Sci Total Environ*, 699 (2020) 134303.

## **ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI W OCENIE METABOLITÓW ROŚLINNYCH**

**M. KRYSA<sup>1</sup>, M. JĘDREK<sup>2</sup>, J. MATYS<sup>1</sup>, D. KIDAJ<sup>3</sup>, A. SROKA-BARTNICKA<sup>1,3</sup>,** <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmacji, Zakład Biofarmacji, ul. Witolda Chodźki 4A, 20-093 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Wydział Medyczny, ul. Kazimierza Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa, <sup>3</sup>UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

**Abstrakt:** Niniejsza praca zawiera syntetyczny opis podstawowych etapów przygotowania tkanki roślinnej do badań spektroskopowych, przeprowadzania pomiarów oraz analizy danych spektralnych, jak również podstawowe analizy statystyczne wykorzystywane w spektroskopii FTIR. Ponadto przedstawione są możliwe do zbadania metabolity roślinne wraz z ich charakterystycznymi pasmami.

**Wprowadzenie:** Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) jest techniką jest techniką wykorzystywaną do potwierdzania wiązań chemicznych w próbkach. Jest to niedestrukcyjna i nieinwazyjna technika stosowana powszechnie do identyfikacji czystych substancji, jak również w badaniach tkanek pochodzenia roślinnego, zwierzęcego, bakterii oraz grzybów. [1]–[4]. Niniejsza praca dotyczy zastosowania spektroskopii FTIR w analizie metabolitów roślinnych.

Przygotowanie tkanki roślinnej: W badaniach z wykorzystaniem spektroskopii FTIR mogą być stosowane – owoce, liście, łodygi, czy korzenie [5]–[8]. Procedura przygotowania rozpoczyna się od zamrożenia pobranej do badań tkanki w ciekłym azocie. Utrzymanie niskiej temperatury jest niezbędne. Pozwala zapobiec powstawaniu dużych kryształów lodu wewnątrz komórek, co mogłoby skutkować ich rozerwaniem. Tkanek powinny być przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . W zależności od gęstości tkanki, próbkę należy pokroić na skrawki o grubości 7-20  $\mu\text{m}$ . W zależności od gęstości tkanki, próbkę należy pokroić na skrawki o grubości 7-20  $\mu\text{m}$ . W tym celu wykorzystywane jest urządzenie zwane kriomikrotomem. Do pomiarów prowadzonych w trybie transmisyjnym stosuje się szkiełka, które nie pochłaniają promieniowania podczerwonego (szkiełka KBr i  $\text{CaF}_2$ ).

Pomiar i obróbka danych: Warunki pomiaru najczęściej są determinowane przez zastosowany model (rodzaj) spektroskopu. Najważniejszym parametrem przy akwizycji pojedynczych widm jest rozdzielczość spektralna. Najczęściej stosowanymi rozdzielczościami spektralnymi są  $4\text{ cm}^{-1}$  i  $8\text{ cm}^{-1}$ . Pierwsza z nich wykorzystywana jest do wnikliwej i dogłębnej analizy zmian w badanej tkance. Może być stosowana w badaniach tkanek charakteryzujących się niewielkimi zmianami spektralnymi w porównaniu z tkanką kontrolną. Po przeprowadzeniu pomiarów uzyskane dane poddaje się wstępnej analizie. Pierwszym krokiem jest przeprowadzenie linii bazowej. Jest to kluczowy etap w przypadku analizy półilościowej. Linia bazowa powinna być przeprowadzona tak samo w przypadku wszystkich badanych widm. Kolejny etap to normalizacja widm, przeprowadzana w celu wyeliminowania ewentualnych fluktuacji. Analiza jakościowa tkanek różniących się znacząco pod względem chemicznym i strukturalnym sprowadza się

do porównania widm próbki badanej z widmem próbki kontrolnej. Jednakże w przypadku badań tkanek roślinnych z reguły czynniki doświadczalne działające na roślinę nie wpływają znacząco na skład chemiczny jej tkanek. W takich przypadkach wyznacza się drugą pochodną otrzymanych widm. W przypadku tkanek roślinnych można przeprowadzić również analizę ilościową. Jest to metoda przydatna w sytuacji, kiedy czynnik doświadczalny nie zmienia składu chemicznego rośliny, a jedynie ilość metabolitów obecnych w badanej tkance. W celu przeprowadzenia analizy ilościowej zwykle stosuje się tzw. procedurę dekonwolucji, która pozwala rozdzielić widmo na poszczególne składowe pasma. Porównanie pola powierzchni pod pasmami umożliwia określenie ilości badanych substancji w analizowanej tkance, dzięki czemu uzyskuje się wiele cennych informacji na temat metabolomu rośliny.

Analiza statystyczna: Kolejny etap jaki należy wykonać to analiza statystyczna. Kluczowym aspektem jest stwierdzenie, czy różnice są istotne statystycznie, czy jest to standardowa fluktuacja, która często występuje w badanych tkankach. Do przeprowadzenia analizy statystycznej wymagana jest odpowiednio duża grupa badana i kontrolna. Najczęściej stosowanymi metodami statystycznymi są analiza głównych składników (PCA) oraz analiza częściowych najmniejszych kwadratów (PLS).

Wykrywanie lipidów: Pasma odpowiadające lipidom znajdują się w następujących zakresach spektralnych:  $3030\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1750\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ,  $1490\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$ ,  $1260\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1170\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1085\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 820\text{ cm}^{-1}$ . W regionie  $3030\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  występuje pasmo przy ok  $3010\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające wiązaniu  $=\text{C-H}$  w nienasyconych lipidach, pasmo odpowiadające  $2955\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające asymetrycznym drganiom rozciągającym  $\text{CH}_3$  w lipidach. Pasma przypisane  $2930\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające asymetrycznym drganiom rozciągającym  $\text{CH}_2$  w lipidach. Pasma odpowiadające około  $2880\text{ cm}^{-1}$  przypisane jest do symetrycznych drgań rozciągających  $\text{CH}_3$  w lipidach oraz pasmo przypisane przy  $2850\text{ cm}^{-1}$  jest to symetryczne drgania rozciągających  $\text{CH}_2$  w lipidach. Wyznaczenie stosunku z pola powierzchni pod pasmem asymetrycznych drgań  $\text{CH}_3$  do  $\text{CH}_2$ , bądź symetrycznych drgań  $\text{CH}_3$  do  $\text{CH}_2$  można uzyskać dodatkowe informacje. Po porównaniu stosunku próby badanej do próby kontrolnej obserwuje się zmianę długości lipidów w próbkach (oprócz obserwacji ogólnej zmiany ilości lipidów). W regionie  $1750\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$  znajduje się pasmo odpowiadające drganiom rozciągającym  $\text{C=O}$  w estrach. W regionie  $1490\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$  występuje pasmo odpowiadające drganiom zginającym  $\text{CH}_3$  lipidów. W regionie  $1260\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  występują asymetryczne drgania rozciągające  $\text{PO}_2^-$  odpowiadające fosfolipidom. W regionie około  $1170\text{ cm}^{-1}$  znajdują się drgania rozciągające asymetryczne odpowiadające wiązaniom  $\text{CO-O-C}$  w estrach. Region  $\sim 1085\text{ cm}^{-1}$  odpowiada symetrycznym drganiom  $\text{PO}_2^-$  fosfolipidów. Ponadto w regionie około  $820\text{ cm}^{-1}$  można znaleźć drganie asymetryczne rozciągające  $\text{P-O}$  fosfolipidów [9].

Wykrywanie białek: Pasmami o najwyższej intensywności, odpowiadającym białkom to pasma Amidu I i Amidu II. Pasma Amidu I odpowiada głównie drganiom rozciągającym wiązania  $\text{C=O}$ . Ponadto wkład przypisywany jest także drganiom rozciągającym  $\text{CN}$ , drgania deformacyjne  $\text{CCN}$  oraz drgania zginające  $\text{NH}$ . Za intensywność pasma Amidu II najbardziej przyczyniają się drgania zginające  $\text{NH}$  oraz drgania rozciągające  $\text{CN}$ . W mniejszym stopniu przyczyniają się

do tego drgania zginające wiązań CO oraz drgania rozciągające wiązań CC i NC. Zarówno pasmo Amidu I jak i II informuje o strukturze drugorzędowej białka., jednak w przypadku Amidu II analiza nie dostarcza łatwych do interpretacji danych. Przeciwnie jest w przypadku pasma Amidu I, które dostarcza informacji na temat struktury drugorzędowej białka.  $\alpha$ -helisy są widoczne przy długości około  $1654\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -kartki przy około  $1633\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1684\text{ cm}^{-1}$ , a struktury zakręcające przy długości około  $1672\text{ cm}^{-1}$ . Po wykonaniu dekonwolucji danego pasma można porównać stosunek pola powierzchni pod pasmem  $\alpha$ -helisy do  $\beta$ -kartki otrzymany dla próbki badanej i próbki kontrolnej i zbadać zmiany struktury drugorzędowej białek [10].

Wykrywanie węglowodanów: Pasma odpowiadające węglowodanom znajdują się w zakresie spektralnym  $1460\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  (odpowiadające wiązaniom CH i OH),  $1160\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  (odpowiadające drganiom rozciągającym C-O) oraz  $960\text{-}730\text{ cm}^{-1}$  (odpowiadające deformacjom wiązania CH). Pasma odpowiadające węglowodanom są jednak na tyle mało specyficzne, że nie umożliwiają odróżnienia rodzaju, czy długości węglowodanów produkowanych przez roślinę. Przy analizie ilościowej możliwe jest jedynie określenie jak zmieniła się ilość węglowodanów przez nią syntetyzowanych [9].

Wykrywanie metabolitów specyficznych dla roślin: Za pomocą spektroskopii FTIR, w połączeniu ze spektroskopią Ramana, można zaobserwować różnice w strukturze celulozy uzyskanej z roślin [11]. Stosunkowo trudne jest natomiast zwizualizowanie flawonoidów. Związane jest to głównie z faktem, że pasma charakterystyczne dla flawonoidów pokrywają się z pasmami odpowiadającymi metabolitom pierwotnym, których stężenie jest zwykle większe od stężenia flawonoidów. Flawonoidy mogą być badane za pomocą spektroskopii FTIR poprzez ekstrakcję alkoholami, dzięki czemu eliminowane są wszystkie substancje rozpuszczalne w wodzie. Pasmami charakterystycznymi dla flawonoidów są między innymi pasma odpowiadające nasyconym alifatycznym kwasom karboksylowym ( $1740\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ), flawonom ( $1670\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ ) oraz kombinacji drgań rozciągających C=O i C=C  $\gamma$ -pyronów we flawonoidach ( $1535\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$ ) [12].

**Wnioski:** Spektroskopia FTIR umożliwia wykrycie metabolitów pierwotnych i wtórnych w tkankach roślinnych, jak również zmian w ich stężeniu po zadziałaniu na roślinę konkretnymi czynnikami doświadczalnymi. Technika ta umożliwia wykazanie zmiany stężenia fosfolipidów, ilości lipidów oraz zmian długości łańcuchów lipidowych. Może być stosowana do analizy ogólnej ilości białek, jak również zmian w ich strukturze drugorzędowej. Spektroskopia w podczerwieni nie umożliwia natomiast dokładnej analizy węglowodanów, a jedynie pozwala na zbadanie zmiany ich ilości w tkance roślinnej. Ponadto możliwe jest badanie struktury celulozy oraz analiza jakościowa i ilościowa flawonoidów. Spektroskopia FTIR jest zatem niedestrukcyjnym dla badanej próbki ale skutecznym narzędziem do badania zmian metabolicznych w tkance roślinnej.

Praca realizowana w ramach projektu LIDER VIII (LIDER/11/0070/L-8/16/NCBR/2017)



**Literatura:**

1. K. Araki et al., *Scientific Reports*, 5 (2015) 1.
2. D. Zhao, Y. Luan, X. Xia, W. Shi, Y. Tang, and J. Tao, *Horticulture Research*, 7 (2020) 3.
3. V. Shapaval et al., *Journal of Applied Microbiology*, 114 (2013) 788.
4. A. J. Probst et al., *ISME Journal*, 7 (2013) 635.
5. M. Chylińska, M. Szymańska-Chargot, B. Kruk, and A. Zdunek, *Food Chemistry*, 196 (2016) 114.
6. F. J. Warren et al., *Plant Journal*, 84 (2015) 634.
7. E. Fernandez-Tendero, A. Day, S. Legros, A. Habrant, S. Hawkins, B. Chabbert, *Plos One*, 12 (2017) 1.
8. C. M. Rico, J. R. Peralta-Videa, and J. L. Gardea-Torresdeya, *Applied Spectroscopy*, 69 (2015) 287.
9. G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies*, (2001) 2001.
10. A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767 (2007) 1073.
11. M. Szymańska-Chargot, J. Cybulska, and A. Zdunek, *Sensors*, 11 (2011) 5543.
12. M. Pavlík, D. Pavlíková, and S. Vašíčková, *Plant, Soil and Environment*, 56 (2010) 533.

## **ZASTOSOWANIE LC-QTOF-MS W DETEKCJI ZAFALSZOWAŃ NIERAFINOWANYCH, TŁOCZONYCH NA ZIMNO OLEJÓW ROŚLINNYCH O ZNACZENIU FARMACEUTYCZNYM**

**A. SUMARA, A. STACHNIUK, A. KOZUB, A. TRZPIL, E. FORMAL,**  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład  
Patofizjologii, ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin.

**Abstrakt:** W pracy dokonano analizy nierafinowanych, tłoczonych na zimno olejów roślinnych, powszechnie wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas wspomaganą technikami chemometrycznymi. Na podstawie analizy w trybie MS scan oraz fragmentacji wybranego jonu w trybie MS/MS przedstawiono podejście analityczne pozwalające na wykrycie charakterystycznego metabolitu świadczącego o obecności słonecznikowego oleju roślinnego w mieszaninie z olejem z nasion sezamu.

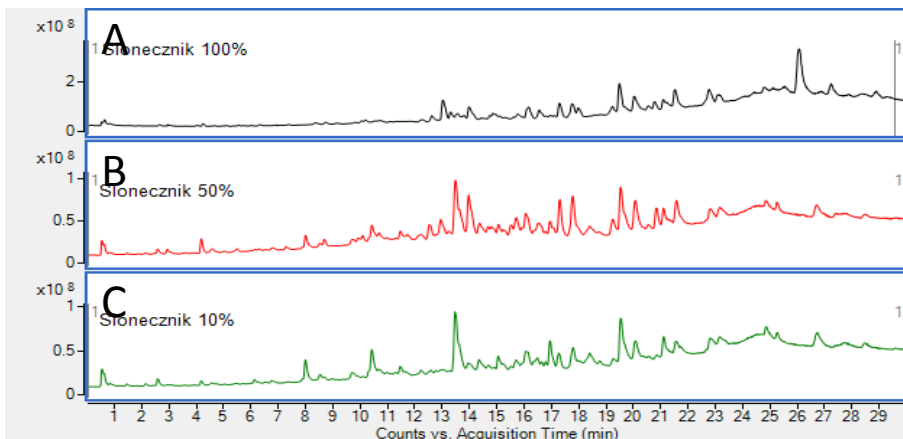
**Wprowadzenie:** Coraz większe zainteresowanie zdrową żywnością, jak również powrót do wykorzystywania roślin oraz produktów z nich uzyskiwanych w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym przyczyniło się do rozwoju technik analitycznych pozwalających na potwierdzenie autentyczności danego produktu, czy wykryciu zafałszowania odnośnie jego składu. Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas typu kwadrupol- analizator czasu przelotu (LC-QTOF) wraz z wykorzystaniem technik chemometrycznych jest jedną z najpopularniejszych metod wykorzystywanych w analizach żywności. W matrycy jaką stanowią oleje roślinne, technika ta znalazła zastosowanie między innymi w peptydomice, lipidomice oraz metabolomice. W podejściu proteomicznym oznaczono unikalne markery peptydowe specyficzne dla roślin oleistych, jak również określono białka z jakich pochodzą te markery [1]. W lipidomice przy zastosowaniu LC-QTOF oznaczano skład kwasów tłuszczowych oraz przedstawiono unikalne profile lipidomiczne w oparciu o zawartość trójglicerydów w poszczególnych gatunkach olejów. Profile lipidomiczne pozwalają na stworzenie bazy danych trójglicerydów oraz kwasów tłuszczowych, co może przyczynić się do wykrywania zafałszowań na poziomie lipidów oraz wpływa na rozwój badań prowadzonych nad autentycznością produktów oleistych [2]. Metabolomika skupia się na szczegółowej analizie profilu metabolicznego badanej próbki, na którą wpływ ma wiele zmiennych, takich jak: gatunek rośliny, miejsce uprawy, warunki hodowli w szczególności nasłonecznienie czy nawodnienie, jak również jakość gleby, na której prowadzono hodowlę. W przypadku olejów roślinnych wpływ na profil metaboliczny, ma również metoda ekstrakcji, podczas której uzyskano końcowy produkt. Wszystkie te aspekty wpływają na różnorodność profilu metabolicznego, nawet w obrębie jednego gatunku, dlatego analizy te wymagają użycia zaawansowanych technik analitycznych, takich jak spektrometria mas typu Q-TOF. Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością oraz rozdzielczością umożliwiając wyodrębnienie konkretnych jonów charakterystycznych dla danego

gatunku, które będą mogły być wykorzystywane do potwierdzenia autentyczności oraz wykrywania zafałszowań wśród olejów roślinnych. Oleje roślinne najczęściej zafałszowywane są tańszymi produktami, takimi jak olej słonecznikowy, którego cena jest kilkukrotnie niższa niż cena oleju sezamowego, który powszechnie wykorzystywany jest w przemyśle farmaceutycznym jako uzupełnienie leczenia zwyrodnienia stawów, czy przy nadciśnieniu. W pracy zaprezentowano podejście metabolomiczne pozwalające na wykrycie zafałszowania oleju z nasion sezamu, olejem słonecznikowym stosując wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas typu kwadrupol - analizator czasu przelotu oraz zaawansowane narzędzia chemometryczne.

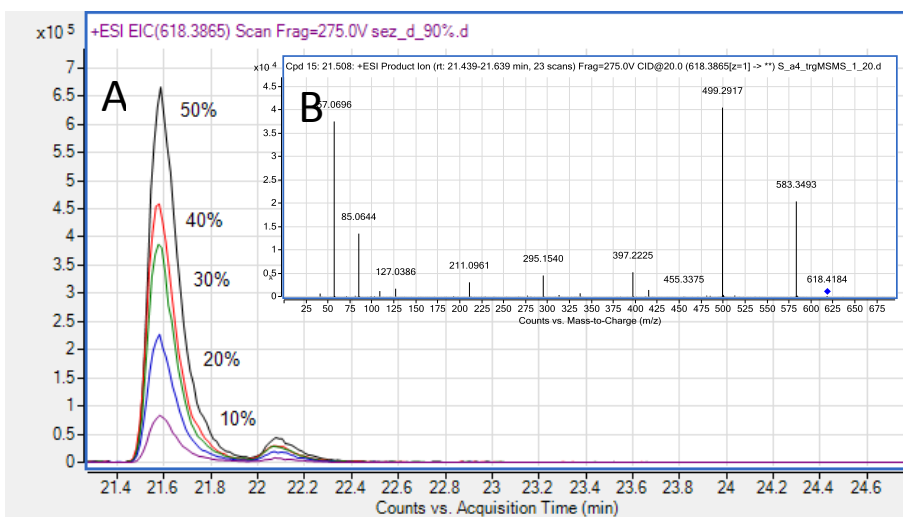
**Część eksperymentalna:** Materiał badawczy stanowiły komercyjnie dostępne oleje z nasion słonecznika oraz nasion sezamu. Do analiz przygotowano próbki oleju sezamowego z różnym udziałem procentowym oleju słonecznikowego (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%). Analizę ekstrakcji prowadzono przy zastosowaniu mieszaniny metanol : woda. Próbkę wytrząsano, a następnie odwirowano. Otrzymany ekstrakt rozcieńczono wodą i pozostawiono w temperaturze 2- 8°C. Próbkę ponownie odwirowano, a następnie przefiltrowano przez filtr strzykawkowy i poddano analizie. Analizę LC-MS oraz LC-MS/MS przeprowadzono z wykorzystaniem ultrasprawnego chromatografu cieczowego (Agilent Technology HPLC Infinity 1290) sprzężonego ze spektrometrem mas typu kwadrupol-analizator czasu przelotu (Agilent Technology 6550 iFunnel LC/QTOF). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Zorbax Extend C18 RRAT (2.1x 100mm, 1.8µm). Jako fazę ruchomą stosowano 0.1% kwas mrówkowy w wodzie (A) oraz w acetonitrylu (B). Prowadzono 30 minutową elucję gradientową, szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0.4 ml/min. W pierwszym etapie analizę prowadzono w trybie scan MS, a następnie wybrany jon poddano fragmentacji w trybie fragmentacji MS/MS. Wyniki otrzymane z analizy LC-MS poddano obróbce. Przy pomocy programu Mass Hunter Qualitative (Agilent Technologies) wyekstrahowano chromatogramy oraz widmo fragmentacyjne. Analizę chemometryczną wykonano przy użyciu programu Mass Profiler Professional (Agilent Technologies).

**Wyniki:** W wyniku analizy scan MS uzyskano profile metaboliczne analizowanych próbek. Na rysunku 1 przedstawiono chromatogramy całkowitego strumienia jonów TIC (ang. total ion current) dla oleju słonecznikowego (100%) oraz mieszaniny oleju sezamowego z 10% i 50 % udziałem oleju słonecznikowego. Zaobserwowano różnice pomiędzy chromatogramami, w szczególności pomiędzy próbką zawierającą 100% olej słonecznikowy a próbką stanowiącą mieszaninę oleju sezamowego z 50% udziałem oleju słonecznikowego. Przy zastosowaniu analizy chemometrycznej wytypowano jon, który może być potencjalnym markerem metabolicznym ( $m/z$ , 618.3865), charakterystycznym dla oleju słonecznikowego. Wyekstrahowano chromatogramy EIC (ang. Extracted Ion chromatogram) prezentując zmianę intensywności jonu  $m/z$ , 618.3865 w zależności od udziału procentowego oleju słonecznikowego w oleju sezamowym. Wykonano analizę MS/MS. Fragmentacji dokonano przy energii kolizji 20V. Nałożone na siebie chromatogramy EIC dla jonu  $m/z$ , 618.3865 wraz z jego widmem fragmentacyjnym przedstawiono na rys. 2. Na

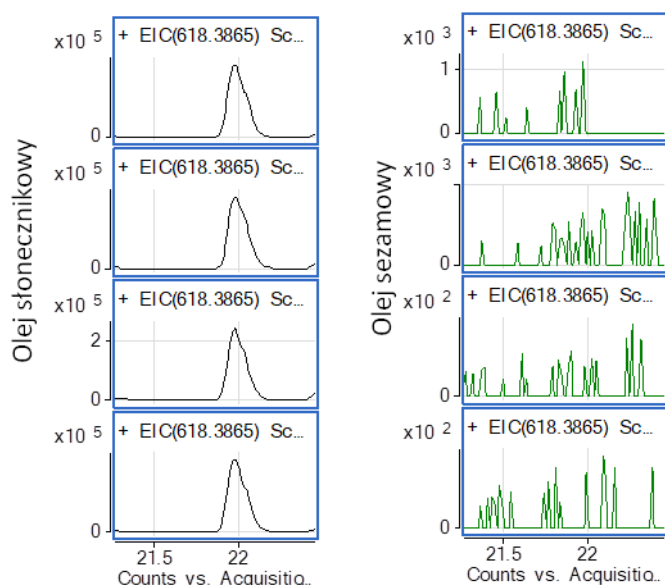
rysunku 3 przedstawiono wyekstrahowane chromatogramy EIC jonu  $m/z$  618.3865 różnicującego olej słonecznikowy od oleju sezamowe4go.



**Rys.1.** Chromatogramy TIC uzyskane dla oleju słonecznikowego (100%) (A), mieszaniny oleju słonecznikowego z 50% udziałem oleju sezamowego (B) i mieszaniny oleju sezamowego z 10% udziałem oleju słonecznikowego (C).



**Rys.2** Nałożone na siebie chromatogramy EIC jonu ( $m/z$ , 618.3865) prezentujące zmianę intensywności tego jonu w zależności od udziału procentowego oleju słonecznikowego w oleju sezamowym (A); widmo fragmentacyjne jonu  $m/z$ , 618.3865 (B).



Rys.3. Chromatogramy EIC jonu różnicującego olej słonecznikowy od oleju sezamowego,  $m/z$  618.3865.

**Wnioski:** Przeprowadzone badania wykazały, iż dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas oraz chemometrii możliwe jest wykrycie zafałszowań oleju sezamowego olejem słonecznikowym. Analiza w trybie MS scan oraz fragmentacja wybranego jonu w trybie MS/MS umożliwiła wykrycie charakterystycznego metabolitu świadczącego o obecności roślinnego oleju słonecznikowego w mieszaninie z olejem z nasion sezamu. Otrzymane widmo fragmentacyjne pozwoli w dalszych analizach na zidentyfikowanie tego jonu oraz w przyszłości może posłużyć przy tworzeniu baz danych opartych na markerach specyficznych dla olejów roślinnych.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant nr 2017/25/B/NZ9/02000.

#### Literatura:

1. K. Kotecka-Majchrzak, A. Sumara, E. Fornal, M. Montowska, Scientific Reports, 10 (2020) 222.
2. W. Wei, C. Sun, W. Jiang, X. Zhang, Y. Hong, Q. Jin, G. Tao, X. Wang, Z. Yang. Triacylglycerols fingerprint of edible vegetable oils by ultra-performance liquid chromatography-Q-ToF-MS. Lwt, 112 (2019) 212.

## ANALIZA SPEKTORSKOPOWA KURDLANU ( $\beta$ -1,3-D-GLUKANU)

G. KALISZ<sup>1</sup>, M. JĘDREK<sup>1,2</sup>, B. GIEROBA<sup>1</sup>, A. SROKA-BARTNICKA<sup>1,3</sup>,

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Biofarmacji, Chodźki 4A, 20-093 Lublin; <sup>2</sup>Collegium Medicum Wydział Medyczny Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego, ul. Dewajtis 5, 01-815 Warszawa, <sup>3</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, 20-400 Lublin.

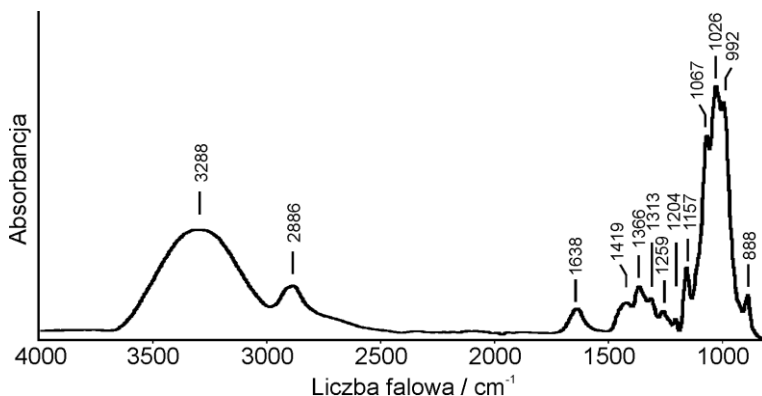
**Abstrakt:**  $\beta$ -glukany są polisacharydami pochodzenia naturalnego wytwarzanymi przez bakterie, grzyby i rośliny. Dzięki ich właściwościom znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach: od przemysłu do produkcji żywności i leków.  $\beta$ -1,3-D-glukan (kurdlan) produkowany przez bakterie z gatunku *Agrobacterium* dzięki swojej złożonej strukturze trzeciorzędowej posiada zdolność tworzenia biopolimerów. Kurdlan jest nietoksyczny, bezwonny i elastyczny, pełni rolę wypełniaczy w jedzeniu jako zarejestrowany dodatek w USA, Korei, Tajwanie i Japonii. Stanowi też obiecującą bazę do różnych zastosowań medycznych. W pracy zaprezentowano analizę kurdlanu przy użyciu niedestrukcyjnych metod spektroskopowych: spektroskopii Ramana i FT-IR.

**Wprowadzenie:**  $\beta$ -glukany stanowią powszechną grupę polisacharydów złożonych z monomerów D-glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ -glikozydowymi, występujących w wielu organizmach zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych [1]. Kurdlan, czyli liniowy  $\beta$ -1,3-D-glukan wykryty w bakterii *Agrobacterium* biovar 1 (wcześniej *Alcaligenes facelias* var. *myxogenes*), posiada strukturę trzeciorzędową wynikającą z obecności wiązań 1 $\rightarrow$ 3 i 1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych [2]. Jego nazwa odzwierciedla właściwość tworzenia struktur żelowych, które są bezwonne, nietoksyczne, nadające się do sterylizacji i przechowywania i z tego względu postać ta została zaakceptowana przez m. in. Food and Drug Administration (FDA) i jest obecnie szeroko stosowana w różnych dziedzinach życia [2, 3]. Jako substancja o właściwościach żelujących posiada unikalne cechy osiągane zależnie od temperatury sieciowania zastosowanej na etapie produkcji [4]. Tekstura tworzonych przez niego produktów przypomina tłuszcz zwierzęcy, w związku z czym z powodzeniem jest on stosowany jako niskoenergetyczny wypełniacz jedzenia. Polimery otrzymane przez żelowanie kurdlanu mają zdolność do absorpcji, uwalniania i retencji związków chemicznych, co sprawia że są często stosowane w biotechnologii oraz farmacji [5]. Zmiana temperatury procesu skutkuje zmianami strukturalnymi w obrębie jego potrójnie helikalnej struktury przestrzennej, gdzie im wyższa temperatura żelowania, tym twardszy jest produkt tego procesu [5]. Zdolność absorbowania wody przez glukany była wykorzystywana w przemyśle w celu uelastyczniania materiałów budowlanych i ceramiki [1]. Dodatkowo jest szeroko stosowany jako modulator odpowiedzi biologicznej [6], najczęściej wspomagająco w układzie immunologicznym [1]. Pozytywne efekty zastosowania glukanów w aspekcie medycznym wynikają również z ich właściwości antynowotworowych [7], przeciwinfekcyjnych [8], przeciwzapalnych [8], przeciwwakrzepowych [9] i przeciwradiacyjnych [1].

Jednocześnie będąc naturalnymi biopolimerami ulegają biodegradacji, bez pozostawienia szkodliwych dla środowiska odpadów. Glukany w świetle obecnych trendów jednoczesnego rozwoju technik biotechnologicznych przy pozyskiwaniu materiału ze źródeł naturalnych, budzą coraz większe zainteresowanie i są wartościowym przedmiotem badań ich potencjalnych zastosowań.

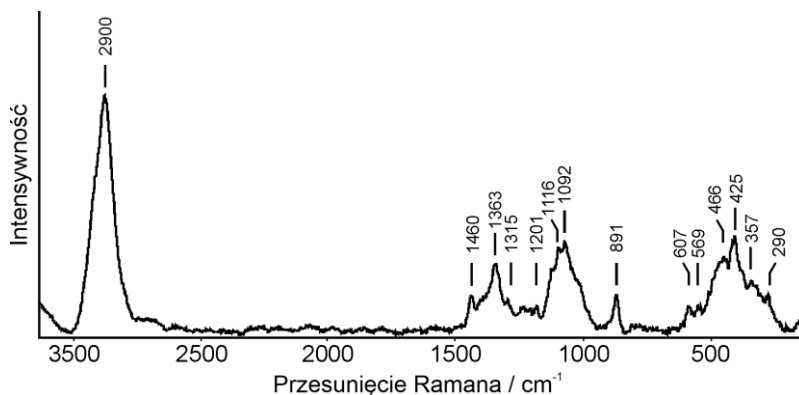
**Część eksperymentalna:** Analizie poddany został 8% kurdlan ( $\beta$ -1,3-D-glukan, Wako Pure Chemical Industries, Japonia). Pomiar absorpcji podczerwieni przeprowadzono z użyciem spektrometru FT-IR Nicolet 5700 Continuum (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wyposażonego w moduł całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. attenuated total reflectance – ATR) GladiATR (Pike Technologies, Madison, WI, USA). Widma zarejestrowano w zakresie  $4000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  i zaprezentowano jako uśredniony wynik 120 pomiarów. Pomiar z użyciem spektrometru Ramana zostały przeprowadzone za pomocą DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wyposażonego w laser o długości fali  $532\text{ nm}$  i detektor CCD (Sentech, Ebina, Kanagawa, Japonia). Zapis widm prowadzono w zakresie  $150\text{--}3150\text{ cm}^{-1}$  z wykorzystaniem obiektywu  $\times 10$  i przesłony  $50\mu\text{m}$  w temperaturze pokojowej.

**Wyniki:** W tabeli 1 zestawiono wartości liczb falowych i przesunięć Ramana widm ośmioprocentowego kurdlanu uzyskanych eksperymentalnie w temperaturze pokojowej. Rys. 1 przedstawia widmo FT-IR kurdlanu otrzymane poprzez uśrednienie 120 pomiarów absorpcji podczerwieni, z wykorzystaniem ATR. Charakterystyczne dla tego polisacharydu jest pasmo drgań wskazujących na obecność wiązań  $\beta$ -glikozydowych łączących monomery D-glukozy, widoczne przy liczbie falowej  $888\text{ cm}^{-1}$ . Obecność grup OH, zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych obserwuje się w zakresie  $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  z wartością szczytową przy  $3288\text{ cm}^{-1}$ . Drgania zginające grup CH,  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$  są możliwe do zaobserwowania w pasmach przy  $1313$ ,  $1366$ ,  $1419$  oraz  $2886\text{ cm}^{-1}$  [5]. W zakresie  $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  obecne są pasma drgań rozciągających wiązań C-O, C-C i zginających COH [10].



Rys. 1. Widmo ATR FT-IR kurdlanu.

Na rysunku 2 zostało przedstawione widmo kurdlanu uzyskane przy użyciu spektroskopii Ramana z zaznaczeniem najistotniejszych pasm. Charakterystyczne dla polisacharydów drgania pojawiają się w zakresie 990-1200  $\text{cm}^{-1}$ , przypisane wiązaniom  $\beta$ -glikozydowym w pozycjach 427, 891, 1092 oraz 1116  $\text{cm}^{-1}$ , odpowiadając drganiom rozciągającym CC i CO oraz C-O-C [11]. Pasma 1200-1440  $\text{cm}^{-1}$  odpowiada za drgania deformacyjne oraz zginające grup OH i CH. Pasma przy 1460  $\text{cm}^{-1}$  przypisane jest drganiom zginającym  $\text{CH}_2$  w grupie  $\text{CH}_2\text{OH}$ , natomiast 607 i 1363  $\text{cm}^{-1}$  drganiom zginającym i deformacyjnym grup CH.



Rys. 2. Widmo ramanowskie kurdlanu.

Tabela 1. Obserwowane częstości drgań (w  $\text{cm}^{-1}$ ) widm Ramana i FTIR wraz z przypisaniami odpowiednich wiązań.

Przesunięcie Ramana	Przypisanie	Liczby falowe	Przypisanie
290	$\delta$ C-C-C	888	wiązanie $\beta$ -glikozydowe
357	$\delta$ C-C-C	992	C-O, C-C
425	$\tau$ HCC wiązanie $\beta$ -glikozydowe	1026	$\nu$ C-O
466	$\tau$ C-C=O	1067	$\nu$ C-O
607	$\tau$ CH	1157	$\nu$ C-O-C
891	$\delta$ HCC, $\delta$ HCO, $\delta$ CH, wiązanie $\beta$ -glikozydowe	1204	$\nu$ C-O, C-O-C
1092	$\nu$ CC, $\nu$ CO	1313	$\tau$ $\text{CH}_2$
1116	$\nu$ COC	1366	$\tau$ CH, $\text{CH}_3$
1201	$\delta$ CCH	1419	$\tau$ $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$
1315	$\delta$ CH, $\delta$ OH	1638	C=O
1363	$\delta$ CH	2886	$\nu$ C-H
1460	O- $\text{CH}_3$ , HCH, HOC, $\delta_{\text{as}}$ CH, $\tau$ $\text{CH}_2$	3288	$\nu$ OH
2900	$\nu$ CH		

Drgania: rozciągające ( $\nu$ ), deformacyjne ( $\delta$ ); zginające ( $\tau$ ) symetryczne (s) i asymetryczne (as)



**Wnioski:** Glukany, w tym kurdlan, jako naturalne polimery stanowią materiał o bardzo szerokim wachlarzu zastosowań - od przemysłu, przez produkcję żywności, po zastosowania biomedyczne i farmaceutyczne. Spektroskopia Ramana i FT-IR są wartościowymi metodami analitycznymi w ocenie struktury chemicznej kurdlanu zarówno jako substratu, jak i produktów jego żelowania, pozwalając na ocenę ich właściwości fizyko-chemicznych.

Projekt realizowany w ramach grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej POWROTY/2017-4/14 (POIR.04.04.00-00-4398/17-00).

### **Literatura:**

1. M. McIntosh, B.A. Stone, V.A. Stanisich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68 (2005) 163.
2. T. P. West, *Fermentation*, 6 (2020) 16.
3. H. Zhang, K. Nishinari, M.A.K. Williams, T.J. Foster, I.T. Norton, *Int. J. Biol. Macromol.*, 30 (2002) 7.
4. T. Harada, K. Okuyama, A. Konno, A. Koreeda, A. Harada, *Carbohydr. Polym.*, 24 (1994) 101.
5. B. Gieroba, A. Sroka-Bartnicka, P. Kazimierzczak, G. Kalisz, A. Lewalska-Graczyk, V. Vivcharenko, R. Nowakowski, I. Pieta, A. Przekora, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020) 6154.
6. T. Harada, A. Harada, *Polysaccharides in medical applications*, Dekker New York, 1996.
7. K.M.I. Bashir, J.S. Choi, *Int. J. Mol. Sci.*, 18 (2017) 1906.
8. J.A. Reynolds, M.D. Castello, D.G. Harrington, C.L. Crabbs, C.J. Peters, J.V. Jemski, G.H. Scott, N.R. Di Luzio, *Infect. Immun.*, 30 (1980) 51.
9. H. Vancraeynest, R. Charlet, Y. Guerardel, L. Choteau, A. Bauters, M. Tardivel, N. François, L. Dubuquoy, D. Soloviev, D. Poulain, B. Sendid, S. Jawhara *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, 311 (2016) H725.
10. A. Synytsya, M. Novak *Ann. Transl. Med.*, 2 (2014) 17.
11. G. Kalisz, A. Przekora, P. Kazimierzczak, B. Gieroba, M. Jedrek, W. Grudzinski, W. Gruszecki, G. Ginalska, A. Sroka-Bartnicka, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 1.

## OZNACZANIE ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH W OPARCIU O TECHNIKĘ CHROMATOGRAFII PŁYNEM NADKRYTYCZNYM

**A. WESOŁOWSKA<sup>1</sup>, A. PASTUSZKA<sup>2</sup>, J. KUTKOWSKA<sup>2</sup>,** <sup>1</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Bakcyl”, ul. Akademicka 19, Lublin 20-033; <sup>2</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, Lublin 20-033.

**Abstrakt:** Chromatografia cieczowa w stanie nadkrytycznym (ang. supercritical fluid chromatography) (SFC), jest metodą analityczną, która łączy w sobie właściwości techniki chromatografii gazowej oraz cieczowej. W technice SFC w trakcie procesu analizy wykorzystuje się ciekły dwutlenek węgla, stanowiący fazę ruchomą, co prowadzi do wytwarzania wysokiego ciśnienia w przebiegu strumienia. Metoda ta, stanowi alternatywę dla klasycznej chromatografii gazowej i wykorzystywana jest zwłaszcza w kontekście związków, które w danym materiale występują w niskich stężeniach, bądź charakteryzują się dużą masą cząsteczkową. Obecnie technika ta, znajduje szerokie zastosowanie w farmacji a także przemyśle kosmetycznym jako metoda pozwalająca na wyodrębnienie wielu składników aktywnych zawartych w produktach leczniczych bądź surowcach kosmetycznych.

**Wprowadzenie:** Praca ma charakter przeglądowy a jej celem jest opis wykorzystania metody chromatografii płynem nadkrytycznym (ang. supercritical fluid chromatography) (SFC) do oznaczania związków bioaktywnych oraz charakterystyka tej techniki. Zastosowanie płynów nadkrytycznych zostało po raz pierwszy opisane w 1962 roku. Wówczas zauważono, że podczas zwiększania ciśnienia i ogrzewania niektórych płynów poza ich punkt krytyczny wykazują one szczególne zachowanie, a mianowicie zachowują się jak eluent chromatograficzny (tj. płyn wymywający substancje zaadsorbowane na fazie stałej podczas chromatografii) [2]. Po pierwsze lepkość oraz dyfuzyjność takiego płynu są bardzo zbliżone do lepkości gazu co skutkuje wyższą wydajnością separacji przy dużej prędkości fazy ruchomej i przy zachowaniu bardzo niskiego ciśnienia. Co więcej, ich gęstość i zdolność solwatacji są zbliżone do cieczy co zapewnia bardzo dobrą rozpuszczalność i szybki transport analitów [4]. Spośród wszystkich dostępnych płynów nadkrytycznych (fluorowęglowodory, amoniak lub dwutlenek węgla) to właśnie dwutlenek jest najchętniej wykorzystywany, ze względu na szereg swoich właściwości [5][4][3]. Początkowo SFC była metodą używaną do analizy związków niepolarnych (węglowodory lub materiały lipofilowe) ze względu na niską siłę elucji czystego CO<sub>2</sub>. Jednak dodatek rozpuszczalników organicznych (tzw. modyfikatorów) silnie zwiększył rozpuszczalność związków zarówno niepolarnych jak i polarnych takich jak małe węglowodany [1]. Rozpuszczalnikami są najczęściej krótkołańcuchowe alkohole: metanol, etanol, izopropanol lub czasami acetonitryl. Taka mieszanina niekoniecznie jest płynem nadkrytycznym, ponieważ jej ciśnienie może zawierać się powyżej ciśnienia krytycznego, a temperatura często poniżej

temperatury krytycznej. Nie powoduje to żadnych problemów przy chromatografii, ponieważ zachowane są zalety płynów nadkrytycznych [5][4]. Uznano, iż SFC może z powodzeniem zastąpić NPLC (ang. Normal Phase Liquid Chromatography) unikając w ten sposób stosowania dużych ilości rozpuszczalników organicznych, które są toksyczne i drogie [1]. Dostępność wysoce wydajnych narzędzi potrzebnych do analitycznego rozdzielania substancji techniką chromatografii płynem nadkrytycznym (SFC) przyczyniła się do wzrostu badań w ostatnich latach. SFC ma zasadnicze znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego, ponieważ analiza leków jest potrzebna na każdym etapie procesu ich opracowywania. Podczas procesu syntezy i przechowywania leków mogą pojawić się zanieczyszczenia i / lub produkty degradacji, które powinny być rygorystycznie monitorowane razem z aktywnymi składnikami farmaceutycznymi (API). Celem takiej analizy farmaceutycznej jest określenie jakości substancji leczniczych. Analiza farmaceutyczna za pomocą SFC dodatkowo dostarcza użytecznych informacji o czystości, zawartości i trwałości materiałów wyjściowych z których produkowane są leki oraz aktywnych składników farmaceutycznych. Również pomiar stężeń leków w matrycach biologicznych (takich jak surowica, osocze, krew, moczu i ślina) jest ważnym aspektem opracowywania produktów leczniczych. Takie dane mogą mieć zasadniczy wpływ na odkrycie nowych substancji czynnych, a także na wprowadzenie zmian w dopuszczonych produktach leczniczych. Wyniki badań toksykokinetycznych na zwierzętach, a także próby kliniczne, w tym badania biorównoważności są wykorzystywane do podejmowania ważnych decyzji gwarantujących bezpieczeństwo i skuteczność leku lub produktu leczniczego [2][5][6][7]. Od dawna było wiadomo, że lipidy oraz pigmenty karotenoidowe są dobrze rozpuszczalne w fazach ruchomych dwutlenku węgla pod ciśnieniem co nie stanowiło problemu analizy tych związków z wykorzystaniem SFC. Dzięki udoskonaleniu tej techniki inne związki bioaktywne takie jak alkaloidy, kumaryny, węglowodany, lignany, polifenole czy zasady nukleinowe i nukleozydy można poddać analizie SFC. Postępy w technice sprawiają, że produkty naturalne są obecnie pierwszą domeną zastosowań analitycznego SFC. Produkty naturalne są również częścią domeny zastosowań nauk o żywności, która zajmuje czwarte miejsce pod względem znaczenia w skali analitycznej techniką SFC. Większość prac z tego zakresu dotyczy analizy lipidów nie tylko tych występujących w olejach roślinnych, ale także w produktach mlecznych; karotenoidów i witamin lipofilnych [9][5][8]. Związki bioaktywne zwane metabolitami wtórnymi często mają działanie lecznicze i farmakologiczne. W przeciwieństwie do uniwersalnych makrocząsteczek metabolizmu pierwotnego (np. monosacharydów, polisacharydów, aminokwasów, białek i lipidów), które są powszechnie obecne we wszystkich organizmach, metabolity wtórne mają znacznie bardziej ograniczoną dystrybucję w naturze. Organizm (mikroorganizm, roślina) może wytwarzać te związki, aby chronić siebie np. przed patogenami lub mogą one odgrywać podstawową rolę w jego codziennym życiu. Do tej pory poznane wtórne metabolity mające właściwości lecznicze to woski, kwasy tłuszczowe, alkaloidy, terpenoidy, fenole (proste fenole i flawonoidy), glikozydy i fitosterole [3]. W celu ekstrakcji związków bioaktywnych przy pomocy SFC należy przeprowadzić trzystopniowy proces. Obejmuje on poniższe etapy:

- 1) Lokalna desorpcja substancji rozpuszczonych i ich solubilizacja.
- 2) Wewnętrzna dyfuzja substancji rozpuszczonej przez fazę stałą aż do jej powierzchni.
- 3) Zewnętrzna dyfuzja substancji rozpuszczonej przez folię [10][3].

W matrycach, takich jak materiały roślinne, szybkość ekstrakcji może być ograniczona przez etap solubilizacji lub dyfuzji. Również zmiana obszaru geograficznego zebranej biomasy, sezonu zbiorów, użytej / badanej części morfologicznej, a także klimatu i systemu ekologicznego może zmienić skład ekstraktu, a tym samym jego zdolności bioaktywne. Ponadto zmiany bioaktywności mogą być spowodowane brakiem spójności w gromadzeniu, przechowywaniu i przygotowaniu surowca. Dlatego, aby osiągnąć skuteczny i odpowiedni wynik ekstrakcji, wymagana jest staranna kontrola warunków analitycznych i optymalizacja każdego etapu, w szczególności pobieranie próbek powinno być dokładnie kontrolowane [10][3]. Za pomocą analizy opartej na chromatografii płynem nadkrytycznym wykazano, że wiele związków wyekstrahowanych ze źródeł naturalnych posiada szereg zastosowań bioaktywnych m.in. takich jak działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i inne. Jedną z najlepiej poznanych bioaktywności jest antyproliferacyjne działanie polifenoli. Związki fenolowe ekstrahowane z *Rosmarinus officinalis* mają działanie przeciwnowotworowe [12]. Głównie ze względu na obecność związków fenolowych, takich jak kwas rozmarynowy, karnozowy, karnozol, rozmanol, epirosmanol i karnozan metylu. Badania farmakologiczne przeprowadzone na *Codia verbenacea* wykazały działanie przeciwzapalne, a efekt ten przypisano obecności  $\alpha$ -kariofilenu i trans-kariofilenu. Innym przykładem są właściwości przeciwwirusowe uzyskane z gatunków tymianku (*Thymus vulgaris*, *Thymus hymalis* i *Thymus zygis*), które wynikają z obecności takich substancji bioaktywnych jak tymol, karwakrol i borneol [3][11][12].

**Wnioski:** Pomimo, iż chromatografia cieczowa w stanie nadkrytycznym została poznana i opracowana już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, to dopiero niedawna ewolucja technologiczna korzystnie wpłynęła na uzyskanie wysokowydajnej analizy i ekstrakcji związków z użyciem SFC. Spośród wielu dostępnych płynów nadkrytycznych to dwutlenek węgla jest najczęściej wykorzystywany m.in. dzięki swoim właściwościom oraz niskim kosztom produkcji. SFC w ubiegłych latach była najczęściej wykorzystywana do analizy składu produktów leczniczych i leków, jednak postępy technologiczne spowodowały spadek tej kategorii badań, kosztem analizy związków bioaktywnych pochodzenia naturalnego. Za pomocą chromatografii płynem nadkrytycznym możliwa jest nie tylko analiza, ale również ekstrakcja tych związków, co przyczynia się do rozwoju nauki w tym medycyny. Przy pomocy SFC dowiedziono, iż wiele tego typu związków ma działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, fagocytotyczne, przeciwutleniające a nawet przeciwnowotworowe.

#### Literatura:

1. E. Lesellier, C. West, *Journal of Chromatography A*, 1382 (2015) 2.
2. V. Desfontainea, D. Guillaumea, E. Francotteb, L. Novákovác, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113 (2015) 56.

3. R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Trends in Analytical Chemistry, 76 (2016) 40.
4. C. West Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography. Trends in Analytical Chemistry, 120 (2019) 115648.
5. C. West, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410 (2018) 6441.
6. A. Grand-Guillaume Perrenoud, C. Hamman, M. Goel, J.-L. Veuthey, D. Guil-larme, S. Fekete, Journal of Chromatography A, 1314 (2013) 288.
7. E. Lemasson, S. Bertin, C. West, Journal of Separation Science, 54 (2015) 212.
8. J. Won Leea, T. Nagaib, N. Gotohc, E. Fukusakia, T. Bamba, Journal of Chromatography B, 33 (2014) 193.
9. B. Li, H. Zhao, J. Liu, W. Liu, S. Fan, G. Wu, R. Zhao, Journal of Chromatography A, 1425 (2015) 287.
10. V. Camel, Analyst, 126 (2001) 1182.
11. E.B. Parisotto, E.M.Z. Michielin, F. Biscaro, S.R.S. Ferreira, D.W. Filho, R.C. Pedrosa, The Journal of Supercritical Fluids, 61 (2012) 101.
12. A.D.P. Sánchez-Camargo, A. Valdés, G. Sullini, V. García-Cañas, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Journal of Functional Foods, 11 (2014) 293.

## **TECHNIKA GF AAS JAKO NARZĘDZIE DO IDENTYFIKACJI I CHARAKTERYSTYKI NANOCZĄSTEK METALI W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH**

**R. OLCHOWSKI, R. DOBROWOLSKI**, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Analitycznej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.

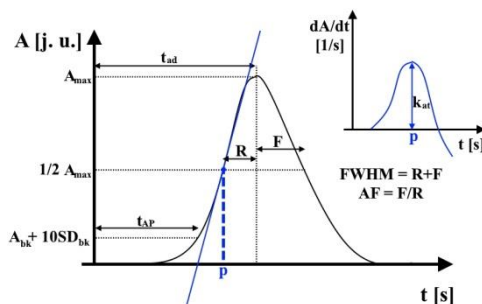
**Abstrakt:** Niniejsza praca stanowi przegląd obecnego stanu wiedzy dotyczącego wykorzystania techniki absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją w piecu grafitowym do identyfikacji i charakterystyki nanocząstek metali (tj. srebra i złota) występujących na niskim poziomie stężeń/zawartości w próbkach biologicznych i środowiskowych. Technika ta w połączeniu z bezpośrednią analizą ciała stałego umożliwia analizę próbek o skomplikowanej matrycy pod kątem obecności nanocząstek metali bez zmiany ich formy, poprzez eliminację wieloetapowej procedury przygotowania próbki. Dokonano charakterystyki parametrów sygnału AAS wykorzystywanych podczas rozróżniania formy jonowej metalu od jego nanocząstek oraz określania rozmiarów nanocząstek metalu, takich jak opóźnienie atomizacji, szybkość atomizacji, czas pojawienia się, szerokość pików w połowie wysokości oraz współczynnik asymetrii pików.

**Wprowadzenie:** Ze względu na dynamiczny rozwój nanotechnologii nanocząstki (NPs, ang. nanoparticles) metali, a zwłaszcza srebra, są obecnie szeroko wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu, ze względu na swoje właściwości oraz niski koszt produkcji. Nanocząstki srebra (Ag NPs) są dobrymi przewodnikami elektryczności, łatwo ulegają reakcjom redoks oraz posiadają właściwości katalityczne, antibakteryjne i antygrzybicze, dlatego są stosowane w różnych dziedzinach, np. elektronice, bioczułnikach, optyce, kosmetykach, tkaninach odzieżowych, środkach do prania czy opakowaniach żywności. Ponadto, Ag NPs służą do dezynfekcji narzędzi medycznych oraz do sporządzania opatrunków przyspieszających gojenie się ran (środki terapeutyczne). Jednakże Ag NPs, podobnie jak inne nanocząstki metali, są wysoce reaktywne i ze względu na swoje niewielkie rozmiary łatwo przenikają przez błony biologiczne do komórek, w których mogą ulec przemianie do silnie toksycznej formy jonowej. Wpływ nanocząstek srebra na organizmy żywe, w tym ludzi, nie jest jak dotąd dobrze poznany. Dlatego istotny jest monitoring Ag NPs i innych nanocząstek metali w próbkach biologicznych, środowiskowych i żywności. Dostępnych jest kilka metod identyfikacji oraz charakterystyki nanocząstek metali, tj. mikroskopia elektronowa, czy spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie w trybie pojedynczej cząstki (spICP-MS, ang. single particle inductively coupled plasma – mass spectrometry), lecz są one drogie i nieodpowiednie do analizy niskich stężeń/zawartości nanocząstek metali w próbkach o skomplikowanej matrycy. Poza tym, większość z nich jest opartych o wieloetapowe procedury przygotowania próbek przed analizą, podczas których może dojść do transformacji badanych nanocząstek metalu. Obiecującą techniką do identyfikacji

i charakterystyki nanocząstek metali obecnych w niewielkich stężeniach/zawartościach w próbkach o złożonej matrycy jest absorpcyjna spektrometria atomowa z atomizacją w piecu grafitowym (GF AAS, ang. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) zwłaszcza w połączeniu z modulem wysokorozdzielczym i bezpośrednią analizą ciała stałego. Po odpowiedniej optymalizacji warunków pomiarowych pozwala ona na szybką i dość taną identyfikację oraz charakterystykę nanocząstek metali w próbkach biologicznych i środowiskowych bez ryzyka ich przemiany w inne formy w trakcie przygotowania próbek do analizy [1-3].

Identyfikacja i charakterystyka nanocząstek metali: Rozróżnienie między formą jonową określonego metalu a jego nanocząstkami oraz charakterystyka nanocząstek tego metalu z wykorzystaniem techniki GF AAS są możliwe dzięki analizie sygnałów AAS uzyskanych w odpowiednich warunkach pomiarowych (po optymalizacji programu czasowo – temperaturowego). W tym celu wprowadzono dodatkowe parametry opisu sygnału w GF AAS, oprócz typowych tzn. wysokość pików, pole powierzchni pod pikiem (Rys. 1):

- opóźnienie atomizacji (ang. atomization delay) ( $t_{ad}$ ) – czas w s liczony od rozpoczęcia etapu atomizacji do pojawienia się maksimum pików,
- szybkość atomizacji (ang. atomization rate) ( $k_{at}$ ) – nachylenie krzywej dopasowanej wielomianu w pierwszym punkcie przegięcia [1/s],
- czas pojawienia się (ang. appearance time) ( $t_{AP}$ ) – czas w s liczony od początku etapu atomizacji do momentu, gdy absorbancja przekroczy kryterium  $10\sigma$  (tzn. jej wartość przekroczy średnią absorbancję dla ślepej próby instrumentalnej, powiększoną o 10 odchyłeń standardowych pomiarów ślepej próby),
- FWHM (ang. full width at a half maximum) – szerokość dopasowanego pików w połowie wysokości [s],
- współczynnik asymetrii dopasowanego pików (ang. assymetry factor) (AF) – stosunek między szerokością części opadającej (F) i szerokością części wznoszącej (R) w połowie maksimum głównego pików sygnału absorbancji [2], [4].



**Rys. 1.** Parametry sygnału analitycznego w GF AAS (A – absorbancja,  $A_{max}$  – wysokość pików,  $A_{bk}$  – średnia wartość absorbancji dla ślepej próby instrumentalnej,  $SD_{bk}$  – odchylenie standardowe dla pomiarów ślepej próby,  $t_{ad}$  – opóźnienie atomizacji,  $t_{AP}$  – czas pojawienia się,  $k_{at}$  – szybkość atomizacji,  $dA/dt$  – pierwsza pochodna absorbancji po czasie, p – pierwszy punkt przegięcia, FWHM – szerokość pików w połowie wysokości, AF – współczynnik asymetrii, R – szerokość części wznoszącej pików, F – szerokość części opadającej pików) [4]

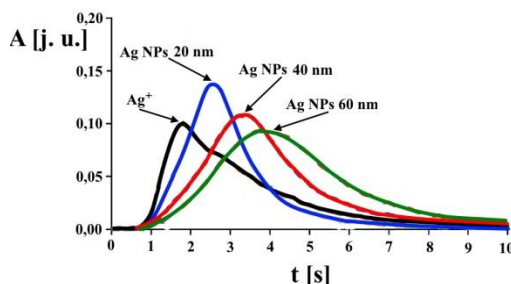
N. S. Feichtmeier i in. [2] wykorzystali technikę GF AAS z modułem wysokorozdzielczym i bezpośrednią analizą ciała stałego do identyfikacji nanocząstek srebra obecnych w próbkach żywności. Rozróżnienie jonowego srebra od nanocząstek srebra było możliwe dzięki badaniu opóźnienia atomizacji. Okazało się, że srebro w formie jonowej i nanocząstki srebra o rozmiarach 20-80 nm charakteryzowały się różnymi wartościami  $t_{ad}$  (często  $t_{ad}(Ag^+) > t_{ad}(Ag\ NPs)$ ). W celu optymalizacji pomiarów GF AAS autorzy wprowadzili: różnicę w  $t_{ad}$  dla jonów  $Ag^+$  i nanocząstek srebra ( $\Delta t_{ad}$  [s]) oraz względną złożoną niepewność dla tej różnicy ( $u_c$  [%]):

$$\Delta t_{ad} = t_{ad}(Ag^+) - t_{ad}(Ag\ NPs) \quad (1)$$

$$u_c = \sqrt{RSD^2(t_{ad}(Ag^+)) + RSD^2(t_{ad}(Ag\ NPs))} \quad (2)$$

gdzie RSD to względne odchylenie standardowe [%]. Optymalizację parametrów pomiarowych prowadzono tak, aby wartość bezwzględna  $\Delta t_{ad}$  była jak największa, a wartość  $u_c$  była jak najmniejsza. Optymalizacji poddano temperaturę atomizacji, tempo ogrzewania przed etapem atomizacji, temperaturę pirolizy oraz masę próbki. Generalnie jony srebra łatwiej ulegają atomizacji niż nanocząstki srebra, dlatego  $\Delta t_{ad}$  powinna być ujemna. Jednakże w przypadku niektórych próbek zaobserwowano sytuację odwrotną (tzn.  $\Delta t_{ad} > 0$ ), co wiązało się z silniejszym oddziaływaniem jonów  $Ag^+$  z matrycą próbki niż nanocząstek srebra. Spowolnienie odparowania i atomizacji jonów  $Ag^+$  umożliwiło zastosowanie niskiej temperatury spopielenia w piecu grafitowym, prowadzące do niecałkowitego rozkładu matrycy próbki.

N. Feichtmeier i K. Leopold [3] zastosowali szybkość atomizacji ( $k_{at}$ ) do rozróżnienia rozmiarów nanocząstek srebra obecnych w próbkach biologicznych. Autorzy zaobserwowali, że wartość  $k_{at}$  maleje nieliniowo ze wzrostem rozmiarów Ag NPs. Z kolei J. Gruszka i wsp. [5] zbadali wpływ różnych związków chemicznych na stabilność termiczną jonów  $Ag^+$  i Ag NPs oraz możliwość wykorzystania wartości  $t_{ad}$  do określenia rozmiarów nanocząstek srebra (Rys. 2). Okazało się, że zastosowanie cytrynianu sodu zwiększyło stabilność termiczną jonów  $Ag^+$  i Ag NPs, a także różnicę  $t_{ad}$  między obiema formami srebra. Ponadto, najlepsze rozróżnienie zarówno między jonami  $Ag^+$  a Ag NPs, jak i rozmiarów Ag NPs uzyskano dla atomizacji z platformy Lwow'a w temperaturze 975°C przy użyciu  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/L cytrynianu sodu w roli stabilizatora.



**Rys. 2.** Sygnały AAS dla  $Ag^+$  oraz Ag NPs o różnych rozmiarach dla stężenia srebra 5  $\mu\text{g/L}$  ( $T_{atomizacji}$ : 975°C,  $T_{pirolizy}$ : 450°C) [5]

Uzyskano liniową zależność  $t_{ad}$  od rozmiaru nanocząstek srebra dla badanego układu. Poza tym autorzy podkreślili fakt, że dla każdego spektrometru należy



dokonać nowej optymalizacji przedstawionych parametrów, gdyż są one w dużym stopniu zależne od mocy elektrycznej pieca grafitowego oraz szybkości grzania.

A. Brandt i K. Leopold [4] badali zależność parametrów opisujących sygnał GF AAS ( $t_{ad}$ ,  $k_{at}$ ,  $t_{AP}$ , FWHM oraz AF) od stężenia złota w badanej próbce (5-45  $\mu\text{g/L}$ ) oraz od formy złota (jonowa lub nanocząstki o rozmiarach 5-100 nm) w określonych warunkach pomiarowych. W przypadku jonów Au(III) zaobserwowano wzrost  $t_{ad}$  ze wzrostem stężenia złota w badanej próbce (związany z tworzeniem *in situ* coraz większych agregatów Au), a w przypadku nanocząstek złota wartość  $t_{ad}$  była niezależna od stężenia złota. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku  $t_{AP}$ , tzn. dla jonów Au(III) wartość  $t_{AP}$  była stała niezależnie od stężenia złota w próbce, a dla Au NPs wartość  $t_{AP}$  malała wraz ze wzrostem stężenia złota. Z kolei wartość  $k_{at}$  rosła wraz ze wzrostem stężenia złota w próbce niezależnie od formy złota. Jednakże większe wartości  $k_{at}$  obserwowano dla Au NPs o mniejszych rozmiarach (większa powierzchnia właściwa i więcej atomów Au może być jednocześnie odparowanych do fazy gazowej w określonych warunkach). Ponadto, obie formy złota generowały asymetryczne sygnały AAS, przy czym większe wartości FWHM obserwowano dla nanocząstek złota (wolniejsze odparowanie atomowego złota). Autorzy tym samym dowiedli, że jonowa forma złota ulega atomizacji według innego mechanizmu niż nanocząstki złota.

**Wnioski:** Technika GF AAS jest odpowiednim narzędziem do identyfikacji i charakterystyki nanocząstek srebra i złota występujących na niskim poziomie stężeń/zawartości w próbkach o skomplikowanej matrycy. Szczególnie interesujące jest zastosowanie techniki GF AAS w połączeniu z bezpośrednią analizą ciała stałego, co eliminuje etap przygotowania próbki i tym samym minimalizuje zmiany formy nanocząstek określonego metalu. Kilka różnych parametrów służących do opisu sygnału AAS jest wykorzystywanych podczas rozróżnienia formy jonowej metalu od jego nanocząstek oraz określenia rozmiarów nanocząstek metalu. Przed pomiarami konieczna jest optymalizacja warunków pomiarowych w taki sposób, aby było możliwe rozdzielenie sygnałów AAS pochodzących od różnych form badanego metalu (jonowej od nanocząstek oraz nanocząstek o różnych rozmiarach) w jak największym stopniu. Optymalne warunki pomiarowe zależą nie tylko od rodzaju analizowanej próbki, lecz także od wykorzystywanego spektrometru GF AAS. Zastosowanie techniki GF AAS do identyfikacji i charakterystyki nanocząstek innych metali w szerokiej praktyce analitycznej w próbkach biologicznych i środowiskowych wymaga przeprowadzenia dalszych badań, a przede wszystkim walidacji zaproponowanych procedur analitycznych.

### Literatura:

1. J. Malejko, B. Godlewska-Żyłkiewicz, Wiadomości Chemiczne, 69 (2105) 847.
2. N. S. Feichtmeier, N. Ruchter, S. Zimmermann, B. Sures, K. Leopold, Anal. Bioanal. Chem., 408 (2016) 295.
3. N. S. Feichtmeier, K. Leopold, Anal. Bioanal. Chem., 406 (2014) 3887.
4. A. Brandt, K. Leopold, Spectr. Chim. Acta Part B: Atom. Spectr., 150 (2018) 26.
5. J. Gruszka, E. Zambrzycka-Szelewa, J. S. Kulpa, B. Godlewska-Żyłkiewicz, J. Anal. At. Spectrom., 33 (2018) 2133.

## DETEKCJA WŁAŚCIWOŚCI BIOAKTYWNYCH *CLITORIA TERNATEA* L. ZA POMOCĄ BIOAUTOGRAFII BEZPOŚREDNIEJ

H. NIKOLAICHUK, I.M. CHOMA, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chromatografii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Połączenie chromatografii cienkowarstwowej (TLC – thin-layer chromatography) i bioautografii bezpośredniej (DB – direct bioautography) zostało wykorzystane do poszukiwania i badania właściwości bioaktywnych *Clitoria ternatea* L.. Stosując TLC-DB, wykazano właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne wobec *Bacillus subtilis* oraz hamujące acetylcholinesterazę, lipazę, tyrozynazę i  $\alpha$ -glukozydazę ekstraktu z kwiatu *Clitoria ternatea* L.

**Wprowadzenie:** *Clitoria ternatea* L. (*C. ternatea*) z rodziny *Fabaceae*, nazywana również groszkiem motylkowym, jest bardzo dobrze znaną rośliną stosowaną w medycynie Ayurwedyjskiej. Istnieje ponad 50 rodzajów *C. ternatea*, które głównie występują w Azji, Ameryce środkowej, Meksyku, oraz na Karaibach. *C. ternatea* została szeroko przebadana pod kątem różnych właściwości farmakologicznych. Stosunkowo dobrze udokumentowane są działania neurofarmakologiczne, takie jak zwiększanie poziomu acetylcholiny, działanie nootropowe i antystresowe, przeciwdepresyjne i przeciwłękowe, przeciwdrgawkowe i uspokajające. *C.ternatea* ma właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgorączkowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe jak i moczopędne. Ponadto jest stosowana jako miejscowy środek znieczulający, lek przeciwcukrzycowy i substancja hamująca agregację płytek krwi [1]. Jak sugerują badania A. Prasansuklab, *C.ternatea* może być potencjalnym lekiem w terapii przeciw wirusowi SARS-CoV-2 dzięki zawartości glukozydu flawanoidowego tj. 3-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1/2)-[ $\alpha$ -ramnopiranozylo(1/6)]- $\beta$ -glukopiranozydu kemferolu [2]. Celem pracy jest detekcja właściwości bioaktywnych *C. ternatea* za pomocą bioautografii bezpośredniej połączonej z chromatografią cienkowarstwową. TLC-DB jest skuteczną i niedrogą metodą do szybkiego i precyzyjnego wykrywania substancji biologicznie czynnych w złożonych mieszaninach, takich jak ekstrakty roślinne [3-4]. TLC-DB umożliwia wykrywanie inhibitorów enzymów takich jak: acetylcholinoesteraza, lipaza, tyrozynaza i  $\alpha$ -glukozydaza oraz związków przeciwbakteryjnych i przeciwutleniaczy. Każdy z wyżej wymienionych związków pełni istotną rolę w organizmie człowieka i wpływa na samopoczucie oraz stan zdrowia. Na przykład, zgodnie z hipotezą cholinergiczną, inhibitory acetylcholinoesterazy są potencjalnymi lekami w chorobie Alzheimera [5]; inhibitory enzymu  $\alpha$ -glukozydazy są potencjalnymi lekami w terapii cukrzycy 2 typu [8]; inhibitory lipazy mogą być skuteczne w leczeniu otyłości [7] zaś inhibitory tyrozynazy mogą być przydatne jako środki wybielające skórę w kosmetykach oraz w leczeniu niektórych chorób skóry związanych z przebarwieniami (poziomem melaniny) [6].

**Część eksperymentalna:** Ekstrakt (0.1g/mL) z kwiatu *C. ternatea* został przygotowany metodą maceracji w metanolu. Maceracja trwała 72 godziny, po tym

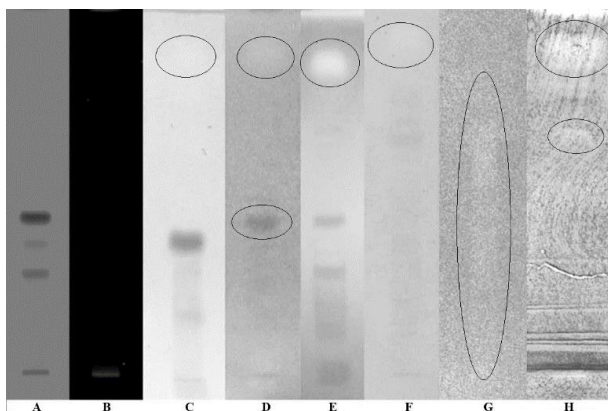
czasie ekstrakt został odfiltrowany i przechowywany w fiolce z ciemnego szkła w temperaturze  $-8^{\circ}\text{C}$ . Próbkki o objętości  $5\mu\text{L}$  nanoszono na płytki z żelalem krzemionkowym  $10\text{cm} \times 20\text{cm}$  (silica gel F<sub>254</sub>, Merck, Niemcy) jako 8mm pasma, za pomocą aplikatora Linomat 5 (CAMAG, Szwajcaria) z prędkością  $150\text{nL/s}$ . Płytki chromatograficzne zostały rozwinięte za pomocą fazy ruchomej: octan etylu: metanol: woda (77/13/10 v/v) na dystans 8cm w komorze kanapkowej DS (Chromdes, Polska). Odparowanie fazy ruchomej następowało poprzez pozostawienie rozwiniętej płytki przez 30 min na powietrzu. Zdjęcia chromatogramów w wysokiej rozdzielczości przy długości fali 254nm, 366nm oraz przy świetle widzialnym zostały zrobione za pomocą kamery do wizualizacji TLC (CAMAG, Szwajcaria). Rozwinięte, suche i sfotografowane płytki zostały poddane detekcji mikrochemicznej, biologicznej i biochemicznej (TLC-DB). Do oznaczenia przeciwutleniaczy był stosowany test DPPH, do oznaczenia substancji przeciwbakteryjnych – test *Bacillus subtilis*, do oznaczenia inhibitorów enzymów – testy acetylocholinoesterazy (AChE), lipazy, tyrozynazy i  $\alpha$ -glukozydazy. Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania testów zamieszczono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Testy stosowane w TLC-DB.

Test	Składniki	Wykonanie
DPPH [4]	- 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl (40mg) - metanol (20mL)	Płytkę spryskano roztworem DPPH Detekcja: VIS po 30 min.
AChE [5]	<u>Roztwór substratu:</u> -octan-2-naftyli (25mg) -etanol (100mL) <u>Roztwór enzymu:</u> -20U enzymu AChE -0.05M wodny roztwór TRISu, pH 7.8 (150mL) -albumina osocza wołowego (150mg) <u>Roztwór do wizualizacji:</u> -Fast Blue B salt (40mg) -woda (100mL)	Płytkę spryskano roztworem substratu i enzymu, a następnie poddano inkubacji przez 20min w $T=37^{\circ}\text{C}$ w wilgotnej atmosferze. Po inkubacji płytkę spryskano roztworem do wizualizacji. Detekcja: VIS.
Tyrozynaza [6]	<u>Roztwór substratu:</u> -L-DOPA(0.1183 g) -0.02 M buforu fosforanowego pH=6.8 (49.5mL) -Triton X (0.5 mL) <u>Roztwór enzymu:</u> -400U enzymu tyrozynazy -0.02 M buforu fosforanowego (pH=6.8) (1mL)	Płytkę spryskano roztworem substratu i enzymu, a następnie poddano inkubacji przez 10min w temperaturze pokojowej, w wilgotnej atmosferze. Po inkubacji płytka jest gotowa do wizualizacji. Detekcja: VIS.
Lipaza [7]	<u>Roztwór substratu:</u> -octan-1-naftyli (150mg) -etanol (100mL) <u>Roztwór enzymu:</u> -500U enzymu lipazy -0,05M wodny roztwór TRISu, pH 7,4 (50mL) -albumina osocza wołowego (50mg) <u>Roztwór do wizualizacji:</u> -Fast Blue B salt (50mg) -woda (100mL)	Płytkę spryskano roztworem substratu i enzymu, a następnie poddano inkubacji przez 20min w $T=37^{\circ}\text{C}$ w wilgotnej atmosferze. Po inkubacji płytkę spryskano roztworem do wizualizacji. Detekcja: VIS.

<p><math>\alpha</math>-Glukozydaza [8]</p>	<p><u>Roztwór substratu:</u> -2-naftylo <math>\alpha</math>-glukopiranozyd (60mg) -etanol (50mL) <u>Roztwór enzymu:</u> -1000U enzymu <math>\alpha</math>-glukozydazy -bufor octanowy, pH 7.8 (50mL) <u>Roztwór do wizualizacji:</u> -Fast Blue B salt (100mg) -woda (100mL)</p>	<p>Płytkę spryskano roztworem substratu i enzymu, a następnie poddano inkubacji przez 10min przy T=37°C w wilgotnej atmosferze. Po inkubacji płytkę spryskano roztworem do wizualizacji. Detekcja: VIS.</p>
<p><i>Bacillus subtilis</i> [9]</p>	<p><u>Zawiesina <i>Bacillus subtilis</i>:</u> -8.0 x 10<sup>7</sup> CFU/mL w bullionie Muller-Hinton <u>Roztwór do wizualizacji:</u> -MTT (0.2%) -Triton X</p>	<p>Płytkę zanurzone w zawiesinie <i>B. subtilis</i>, a następnie poddano inkubacji przez 17 godzin w T=37°C w wilgotnej atmosferze. Po inkubacji płytkę spryskano roztworem do wizualizacji. Detekcja: VIS</p>

**Wyniki:** Biologiczna aktywność *C. ternatea* została zbadana za pomocą testów biologicznych opisanych w Tabeli 1. Wyniki przedstawiono na tzw. bioautogramach czyli chromatogramach TLC-DB (Rysunek 1). Żółte plamki na fioletowym tle świadczą o obecności związków o charakterze antyoksydacyjnym (test DPPH, Rys. 1G). Białe strefy inhibicji na różowym tle wskazują na obecność inhibitorów enzymów. Związki o działaniu przeciwbakteryjnym dają kremowe strefy hamowania wzrostu bakterii na fioletowym tle. Antyoksydanty, inhibitory enzymów oraz substancje przeciwbakteryjne widoczne na bioautogramach zaznaczono elipsami. Na podstawie otrzymanych chromatogramów TLC-DB można stwierdzić, że metanolowy ekstrakt *C. ternatea* ma silne właściwości przeciwutleniające (Rys. 1G) i przeciwbakteryjne wobec *Bacillus subtilis* (Rys. 1H). *C. ternatea* zawiera inhibitory AChE (Rys. 1C),  $\alpha$ -glukozydazy (Rys. 1E), tyrozynazy (Rys. 1D) oraz lipazy (Rys. 1F). Strefy hamowania enzymów widoczne są w górnej części płytki dla R<sub>f</sub> ok. 0.8-0.9. Interesujący jest test inhibicji tyrozynazy (Rys. 1D) – ciemna strefa (zaznaczona kółkiem) przy R<sub>f</sub> ok. 0.4 może świadczyć o zawartości związków, które zwiększają działanie tyrozynazy.



**Rys. 1.** Zestawienie testów TLC-DB dla *C. ternatea*. Kolejno: A) 254 nm; B) 366 nm; C) test AChE (VIS); D) test tyrozynaza (VIS); E) test  $\alpha$ -glukozydaza (VIS); F) test lipaza (VIS); G) test DPPH (VIS); H), test *B. subtilis* (VIS).

**Wnioski:** Za pomocą metody TLC-DB określono wstępnie właściwości i potencjał biologiczny *C. ternatea*. Kwiat *C. ternatea* jest bogatym źródłem substancji bioaktywnych, i może być stosowany pomocniczo w leczeniu chorób cywilizacyjnych takich jak choroba Alzheimera, otyłość i cukrzyca.

**Literatura:**

1. P.K. Mukherjee, J. Ethnopharmacology, 120 (2008) 291.
2. A. Prasansuklab, J. Traditional and complementary medicine, 11 (2021) 144.
3. I.M. Choma, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 2684.
4. A. Marston, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 2676.
5. Y. Zhongduo, J. Sep. Sci., 32 (2009) 3257.
6. J. Taibon, Planta Med., 81 (2015) 1198.
7. A.M.S. Hassan, Phytochem. Anal., 23 (2012) 405.
8. M. Jamshidi-Aidji, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 42 (2019) 266.
9. E.M. Grzelak, AOAC Int., 94 (2011) 1567.

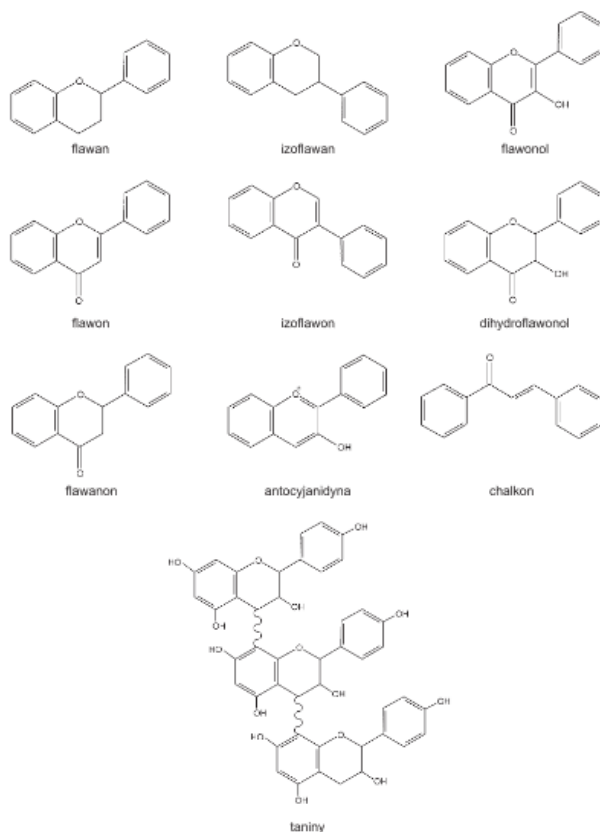
## WYKORZYSTANIE TECHNIK CHROMATOGRAFII W ANALIZIE FLAWONOIDÓW

S. STEFANEK<sup>1</sup>, W. PIĄTEK<sup>1</sup>, A. PASTUSZKA<sup>2</sup>, J. KUTKOWSKA<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Bakcył”, ul. Akademicka 19, 20-400 Lublin; <sup>2</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii i Genetyki, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

**Abstrakt:** Flawonoidy to grupa metabolitów wtórnych wszechobecnych w królestwie roślin. Do klasy tej zalicza się ponad 4000 związków różniących się właściwościami chemicznymi i biologicznymi. Ze względu na ich różnorodne funkcje biologiczne i zastosowania, niezbędne są szybkie i precyzyjne metody identyfikacji i analizy ilościowej tych związków chemicznych. W tym celu wykorzystywane są instrumentalne metody analityczne, w tym różnorodne techniki chromatograficzne (HPLC, GC, HILIC).

**Wprowadzenie:** Flawonoidy należą do klasy roślinnych metabolitów wtórnych o strukturze polifenolowej. Struktura chemiczna tych związków oparta jest na układzie C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, co oznacza, że szkielet węglowy budują dwa pierścienie benzenowe połączone mostkiem trójwęglowym (o charakterze piranu lub pironu) [1]. Biosynteza związków flawonoidowych jest złożonym procesem [2]. W warunkach naturalnych, w roślinach flawonoidy występują zwyczajowo w dwóch formach – jako wolne cząsteczki (aglikony) lub w kompleksie z resztami cukrowymi (glikozydy) [1]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 4000 flawonoidów, a liczba ta stale rośnie ze względu na wielką różnorodność strukturalną wynikającą z różnych wzorów hydroksylacji, metoksylacji, glikozylacji i acylacji. [3] Naturalne flawonoidy można podzielić na podstawowe klasy: flawony, flawanole, flawanony, izoflawony, katechiny, antocyjanidyny, auronony i chalkony (Rys.1) [4]. Aglikony flawonoidowe posiadają lekko kwaśne pH. Te, które mają wiele niepodstawionych grup hydroksylowych lub ugrupowań cukrowych, są substancjami polarnymi i rozpuszczalnymi w polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Obecność cukru sprawia, że flawonoidy ulegają hydratacji, podczas gdy mniej polarne izoflawony, flawanony i silnie metoksyloowane flawony i flawanole są lepiej rozpuszczalne w eterze lub chloroformie. Flawonoidy odgrywają ważną rolę w fizjologii roślin i są składnikami diety wielu roślinożerców i zwierząt mięsożernych, w tym ludzi [3]. Ponadto, związki te spełniają w przyrodzie szereg bardzo ważnych funkcji, m.in. chronią rośliny przed atakiem pasożytów, szkodliwym działaniem promieniowania UV a także stanowią najważniejszą grupę pigmentów roślinnych o barwie od czerwonego do złotego. Potwierdzono także udział izoflawonów w nawiązywaniu efektywnych oddziaływań symbiotycznych pomiędzy roślinami motylkowatki a bakteriami z rodzaju *Rhizobium* niezbędnych w procesie wiązania azotu z atmosfery. Co więcej, udowodniono korzystny wpływ flawonoidów na organizm człowieka. Wykazują one działanie antyoksydacyjne, chroniąc przed rozwojem choroby wieńcowej serca. Przypisuje się im funkcje przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe [2].



**Rys.1.** Przykłady budowy strukturalnej cząsteczek zaliczanych do grupy związków flawonoidowych [4].

Najczęściej stosowaną metodą rozdzielania związków fenolowych w związku z ich polarną budową, jest chromatografia cieczowa (HPLC). Dobór eluentów, czasu analizy, gradientu, czy temperatury kolumny są ustalane w oparciu o preferencje badającego i złożoności rozdzielanej mieszaniny flawonoidów [4]. W celu rozdzielania flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej najczęściej wykorzystywanym komponentem jest układ faz normalnych lub chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie. Znacznie rzadziej używa się odwróconego układu faz. Fazą stacjonarną w tym przypadku najczęściej jest żel krzemionkowy, zaś faza ruchoma to mieszaniny rozpuszczalników, takich jak heksan, octan etylu, chloroform, benzen oraz eter etylowo-metylowy. W przypadku chromatografii odwróconego układu faz stosuje się nie co odmienne substancje. Rozdzielanie substancji na cienkich warstwach fazy stacjonarnej wykonywane jest zazwyczaj wielokrotnie, poprzez rozwijanie chromatogramu kilkukrotnie [5]. Wspomniano już, że najbardziej pożądaną metodą wykorzystywaną do rozdzielania flawonoidów jest metoda HPLC. Jednakże w ostatnich latach pojawiła się nowa generacja chromatografii, a mianowicie ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa [6]. W przypadku tej

metody stosowane są kolumny wypełnione złożem o średnicy poniżej 2  $\mu\text{m}$ . Takie analizy wykonuje się wykorzystując wysokie ciśnienie (400 – 1000 Ba) i zwiększony przepływ fazy ruchomej. Zabieg ten znacznie podwyższa czułość i rozdzielczość, jednocześnie skracając czas w porównaniu z tradycyjną metodą HPLC. Istotne jest to, że dzięki tej metodzie udało się rozróżnić 5 izomerów malonylowych glikozydów chryzoeriolu w liściach lubinu wąskolistnego [4].

Warto wspomnieć także o chromatografii gazowej (GC). Główna zaleta GC polega na wysokiej czułości wykrywania prawie wszystkich lotnych związków chemicznych lub związków nielotnych, które są łatwo derywatyzowane. Obecna technologia separacji wykorzystuje kolumny kapilarne z topionej krzemionki do GC w celu uzyskania wysokiej rozdzielczości. Jednak metody oparte na GC są pracochłonne, ponieważ derywatacja - w większości przypadków ukierunkowana na tworzenie pochodnych trimetylosililoeteru (TMS) - jest nieunikniona w celu zwiększenia lotności flawonoidów i poprawy ich stabilności termicznej. Należy zauważyć, że w przypadku flawonoidów z więcej niż jednym podstawnikiem hydroksylowym metylacja może dać kilka pochodnych, co utrudnia ilościowe oznaczenie. Zwykle w GC flawonoidy są hydrolizowane i przekształcane w ich pochodne TMS, wstrzykiwane na niepolarną kolumnę w trybie dzielonym lub bez rozszczepienia i rozdzielane liniowym programem temperaturowym 30–90 minut do 300 ° C. N, O-bis- (trimetylosililo) -trifluoroacetamid (BSTFA) i N- (tert-butylo-dimetylosililo) -N-metylotrifluoroacetamid (TBDMS) to najczęściej stosowane środki derywatyzujące, a EI – MS w wybranym trybie monitorowania jonów z do wykrywania często używana jest temperatura źródła do 250 ° C. Do detekcji zwykle stosuje się jon molekularny  $[M + H]^+$  oraz fragmenty utworzone przez utratę  $\text{CH}_3$  lub  $\text{CO}$  oraz reakcje retro-Dielsa-Aldera (RDA). GC w identyfikacji aglikonów jako pochodnych sililowanych metodą selektywnej detekcji masowej można uznać za dość akceptowalną w identyfikacji fenoli [7]. Dodatkowo, bardzo interesującą metodą jest chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Może ona stanowić idealną alternatywę dla analizy substancji polarnych lub związków semipolarnych, oferując komplementarną selektywność w porównaniu z chromatografią cieczową w układzie faz odwróconych (RP LC). HILIC wykorzystuje fazę ruchomą składającą się z rozpuszczalników polarnych, zwykle acetonitrylu i wody, ze większą zawartością rozpuszczalnika organicznego. W trybie HILIC separacja opiera się na różnym rozkładzie między fazą ruchomą bogatą w acetonitryl, a warstwą wzbogaconą w wodę zaadsorbowaną na polarnej fazie stacjonarnej. Jednak mechanizm retencji jest trybem mieszanym i podział między te dwie fazy może zachodzić wraz z adsorpcją, wymianą jonową, tworzeniem wiązań wodorowych, dipol-dipol i inne interakcje mogą odgrywać rolę w retencji, w zależności od konkretnych zastosowanych warunków. Złożoność tego mechanizmu może objawiać się odmienną selektywnością różnych faz HILIC. Separacje HILIC mogą dodatkowo znacząco zwiększyć czułość w połączeniu ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie. Wraz z rosnącą popularnością HILIC metoda ta była w ostatnich latach przedmiotem kilku recenzji [3].



**Wnioski:** Opracowanie nowych technik rozdziału i identyfikacji flawonoidów z organizmów roślinnych sprzyja poznaniu ich właściwości i możliwości zastosowania w wielu gałęziach przemysłu. Związki te mają przede wszystkim działanie prozdrowotne - antyoksydacyjne, przeciwzapalne, a także przeciwnowotworowe. Opublikowane badania potwierdziły, że niektóre flawonoidy hamowały wzrost komórek raka jelita, a inne działały przeciwrzodowo [1]. Związki te posiadają zapewne o wiele szerszą pulę właściwości, dlatego tak ważne jest odpowiednie dobranie techniki i parametrów rozdziału chromatograficznego, w celu ich zbadania. Wraz ze wzrostem popularności stosowania leków ziołowych zawierających flawonoidy, ważną kwestią jest określenie składu i standaryzacja, ponieważ prawie niemożliwe jest porównanie jakiegokolwiek aktywności biologicznej bez charakterystyki chemicznej ekstraktu roślinnego. Z tego powodu ważne jest, aby naukowcy pracujący w tej dziedzinie byli świadomi podczas doboru odpowiedniej analizy i korzystali w tym celu z odpowiednich metod [3].

### **Literatura**

1. M. Machowski, D. Kaliszewska, A. Kiss, BIULETYN Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 4 (2010) 27.
2. M. Jaszczółt, G. Boczkaj, A. Lewandowski, A. Skrzypczak, A. Królicka, M. Kamiński, Postępy chromatografii, 3 (2010) 147.
3. A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrzyńska, Journal of Chromatographic Science, 54 (2015) 516.
4. P. Hernández-Rodríguez, L.P. Baquero, H.R. Larrota, Bioactive Compounds, 14 (2019) 256.
5. J. Molineau, M. Meunier, A. Noireau, L. Fougère, A.M. Petit, C. West, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 412 (2020) 6595.
6. D. Mutch, P. Kachlicki, Biotechnologia, 2 (2019) 65.
7. M. Stefova, S. Kulevanova, T. Staflov, HPLC analysis of flavonoids. Encyclopedia of Chromatography, 2013.

## WPLYW JONÓW METALI CIĘŻKICH NA STRUKTURĘ PODWÓJNEJ WARSTWY ELEKTRYCZNEJ ZEOLITU NaX I JEGO KOMPOZYTU Z WĘGLEM NaX-C

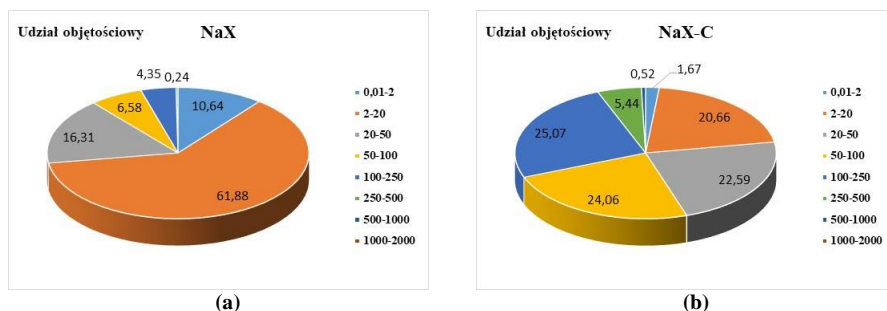
M. MEDYKOWSKA<sup>1</sup>, M. WIŚNIEWSKA<sup>1</sup>, K. SZEWCZUK-KARPISZ<sup>2</sup>,  
R. PANEK<sup>3</sup>, <sup>1</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii,  
Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej,  
Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin, <sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana  
Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Zakład Fizykochemii  
Materiałów Porowatych, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, <sup>3</sup>Politechnika  
Lubelska, Wydział Budownictwa i Architektury, Katedra Geotechniki,  
ul. Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin.

**Abstrakt:** Celem badań eksperymentalnych było określenie wpływu adsorpcji jonów metali ciężkich Pb(II) i Zn(II), a także ich mieszaniny Pb(II)+Zn(II) na parametry elektrokinetyczne cząstek zeolitu NaX i jego kompozytu NaX-C rozproszonych w ośrodku wodnym. Przeprowadzono pomiary zarówno gęstości ładunku powierzchniowego, jak i potencjału dzeta obu ciał stałych w pojedynczych oraz mieszanych układach obu adsorbatów. Umożliwiło to określenie najbardziej prawdopodobnej struktury podwójnej warstwy elektrycznej tworzącej się na granicy faz w badanych suspensjach. Ma to niebagatelne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu wiązania jonów metali ciężkich na powierzchni materiałów zeolitowych, co ma duży wpływ na proces ich usuwania z fazy wodnej.

**Wprowadzenie:** Adsorpcja zachodząca na granicy faz ciało stałe-roztwór jest procesem powszechnie wykorzystywanym w różnych gałęziach przemysłu. Ten typ adsorpcji występuje między innymi podczas oczyszczania cieczy ze składników niepożądanych i toksycznych. Mechanizm adsorpcji jest zależny od wielu czynników [1-3]. Parametry, które mają decydujące znaczenie dla jego przebiegu to: właściwości badanego adsorbentu, stężenie adsorbentu, właściwości roztworu (pH, siła jonowa), obecność innych substancji oraz wartość temperatury. W układzie składającym się z ciała stałego, adsorbentu i rozpuszczalnika mogą występować różnego rodzaju oddziaływania – takie jak oddziaływania elektrostatyczne, tworzenie wiązań chemicznych oraz mostków wodorowych, a także oddziaływania hydrofobowe oraz van der Waalsa. Zastosowania praktyczne procesu adsorpcji wymagają dokładnego poznania jego mechanizmu, w czym bardzo pomocne są pomiary elektrokinetyczne suspensji w obecności różnych adsorbatów. Dotyczą one głównie wyznaczenia gęstości ładunku powierzchniowego ( $\sigma_0$ ) oraz potencjału dzeta ( $\zeta$ ) cząstek ciała stałego rozproszonych w ośrodku ciekłym w funkcji pH roztworu. Z kolei uzyskane krzywe umożliwiają określenie punktu ładunku zerowego (pzc - ang. point of zero charge) i punktu izoelektrycznego (iep – ang. isoelectric point) adsorbentu. Te wszystkie parametry charakteryzują podwójną warstwę elektryczną (pwe) tworzącą się na granicy faz ciało – stałe-roztwór. Dodatkowo potencjał dzeta jest parametrem, który można wykorzystać do określenia sił oddziaływania (odpychania lub przyciągania) cząstek układu dyspersyjnego, które determinują jego trwałość. Wielkość tą definiuje się jako

potencjał elektrokinetyczny występujący na granicy między związaną – unieruchomioną na powierzchni, a swobodnie poruszającą się warstwą cieczy. Innymi słowy jest to potencjał występujący w obszarze tzw. płaszczyzny poślizgu, która ulokowana jest między częścią jonów związanych nieruchomo w warstwie adsorpcyjnej i częścią swobodnych przeciwjonów obecnych w warstwie dyfuzyjnej. Potencjał dzeta jest bardzo dobrym wskaźnikiem stabilności układu koloidalnego. Wysoka wartość bezwzględna potencjału elektrokinetycznego gwarantuje dużą trwałość układu koloidalnego (skuteczne zapobieganie agregacji cząstek). Natomiast niewielkie wartości bezwzględne potencjału  $\zeta$  skutkują występowaniem wyraźnej tendencji do destabilizacji układu, co jest istotne dla efektywnego wydzielenia adsorbentu wraz z zaadsorbowanymi zanieczyszczeniami z fazy wodnej [4]. Mając to na uwadze przeprowadzono badania gęstości ładunku powierzchniowego i potencjału dzeta w wodnych suspensjach zawierających dwa typy ciał stałych: zeolit syntetyczny NaX i jego nowatorski kompozyt z węglem NaX-C w obecności wybranych jonów metali ciężkich Pb(II) i Zn(II). Pomiary te prowadzono w pojedynczych i mieszanych układach obu adsorbatów. Oba adsorbenty powstały z wysokowęglowego popiołu lotnego, powstałego w wyniku konwencjonalnego spalania węgla kamiennego i pochodzącego z Elektrociepłowni Janikowo. Zatem metoda hydrotermalna syntezy tego typu materiałów zeolitowych przyczynia się do zagospodarowania uciążliwego i toksycznego odpadu, jakim jest popiół lotny.

**Część eksperymentalna:** Skład pierwiastkowy materiałów zeolitowych określony został przy pomocy półilościowej energodispersyjnej fluorescencji rentgenowskiej na spektrometrze Epsilon 3 firmy Panalytical (Tabela 1). Aparat wyposażony był w lampę RTG Rh (9W, 50 kV, 1 mA), 4096-kanałowy analizator widma oraz wysokorozdzielczy półprzewodnikowy detektor SDD chłodzony ogniwem Peltier'a. Otrzymane wyniki uwzględniały LOI (ang. loss-on-ignition) – oznaczanie strat prażenia, mające na celu określenie zawartości niespalonego węgla. Z kolei rozmiar cząstek ciał stałych wyznaczono w oparciu o zjawisko dyfrakcji laserowej na aparacie Mastersizer 3000 firmy Malvern (Rys. 1). Badanie przeprowadzono w środowisku wodnym z wykorzystaniem przystawki HYDRO EV. Pomiar parametrów teksturalnych (ASAP, Micromeritics Instrument Corporation) wskazał, że powierzchnie właściwe zeolitu NaX oraz kompozytu NaX-C wynoszą odpowiednio 728 i 272m<sup>2</sup>/g, natomiast średnie rozmiary porów - 1,7 i 2,6 nm.



**Rys.1.** Udział objętościowy cząstek o określonej średnicy w suspensji wodnej uzyskany dla (a) zeolitu NaX oraz (b) kompozytu NaX-C.

**Tabela 1.** Skład chemiczny zeolitu Na-X i kompozytu NaX-C.

Ciało stałe	Związek											
	Na <sub>2</sub> O	MgO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	TiO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	LOI	C
Na-X	7,32	1,69	23,41	41,12	0,02	0	0,71	7,48	0,05	1,31	16,88	0
NaX-C	3,53	1,21	14,37	28,19	0,05	0,48	1,34	2,21	1,05	9,33	38,23	31,46

Gęstość ładunku powierzchniowego ( $\sigma_0$ ) ciał stałych przy braku i w obecności jonów metali ciężkich o stężeniach 10 ppm (Pb(II) oraz Zn(II), a także ich mieszaniny) określono metodą miareczkowania potencjometrycznego. W technice tej jest ona wyznaczana w oparciu o różnicę w objętości zasady, jaką należy dodać do suspensji (przy braku lub w obecności adsorbatów) oraz do roztworu elektrolitu podstawowego w celu osiągnięcia określonej wartości pH. Parametr ten wyliczono korzystając ze wzoru [5]:

$$\sigma_0 = \frac{\Delta V \cdot c_b \cdot F}{m \cdot S_w} \quad (1)$$

gdzie:  $\Delta V$  – różnica w objętości zasady, jaką należy dodać, aby uzyskać określone pH suspensji i elektrolitu podstawowego,  $c$  – stężenie zasady,  $F_c$  – stała Faradaya,  $m$  – masa ciała stałego w suspensji,  $S_w$  – powierzchnia właściwa ciała stałego.

Wyznaczanie ładunku powierzchniowego rozpoczęto od miareczkowania roztworu elektrolitu podstawowego (NaCl o stężeniu 0,001 mol/dm<sup>3</sup>), uzyskując w ten sposób krzywą wzorcową. Miareczkowanie prowadzono z wykorzystaniem roztworu NaOH o stężeniu 0,1 mol/dm<sup>3</sup> w zakresie pH 3-10, stosując naważkę ciała stałego wynoszącą 0,03 g dla NaX oraz 0,07 g dla NaX-C (na 50 cm<sup>3</sup> roztworu). Potencjał dzeta ciał stałych wyznaczono metodą mikroelektroforezy (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). W oparciu o zmierzoną ruchliwość elektroforetyczną ( $U_e$ ) wyliczono potencjał dzeta cząstek przy wykorzystaniu równania Henry'ego [6]:

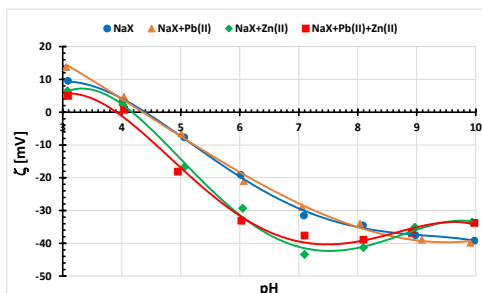
$$U_e = \frac{2\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{3\eta} f(\kappa a) \quad (2)$$

gdzie:  $\eta$  – lepkość fazy ciekłej,  $\varepsilon$  – przenikalność elektryczna,  $1/\kappa$  – grubość podwójnej warstwy elektrycznej,  $a$  – promień cząstki ciała stałego.

Przygotowywano 200 cm<sup>3</sup> odpowiedniej suspensji dodając 0,01g ciała stałego do roztworu elektrolitu podstawowego. Pomiar prowadzono w zakresie pH 3-10 przy stężeniu jonów metali ciężkich wynoszącym 10 ppm. W badanych układach nie obserwowano wytracania wodorotlenków metali. Pojedynczy wynik stanowił średnią 5 pomiarów, błąd pomiarowy nie przekraczał 5%.

**Wyniki:** Przebieg krzywych miareczkowania potencjometrycznego wskazał, że punkty pH<sub>pzc</sub> zeolitu NaX i kompozytu NaX-C przypadają odpowiednio przy wartościach pH 9 i 8,5. Zatem wykazują one zasadowy charakter, co jest spowodowane obecnością w ich warstewce powierzchniowej dodatnio naładowanych kationów (zarówno jedno- jak i dwuwartościowych), które posiadają znakomite właściwości jonowymiennie. Dodatek kationów metali ciężkich powodował obniżenie gęstości ładunku powierzchniowego materiałów zeolitowych w całym badanym zakresie pH, a największy efekt był obserwowany w przypadku mieszanych układów adsorbatów. Jest to zachowanie typowo obserwowane

w obecności prostych kationów nieorganicznych, a mechanizm ich wiązania oparty jest na tworzeniu dodatkowej liczby ujemnie naładowanych grup powierzchniowych, co skutkuje obniżeniem wartości  $\sigma_0$ .



Rys. 2. Potencjał dzeta cząstek NaX w obecności jonów Pb(II), Zn(II) oraz Pb(II)+Zn(II).

Na Rys. 2 zaprezentowano zmiany potencjału dzeta cząstek NaX w obecności jonów Pb(II), Zn(II) oraz Pb(II)+Zn(II). Dla kompozytu NaX-C uzyskano podobne zależności, niemniej jednak różnice między suspensjami zawierającymi poszczególne adsorbaty oddzielnie i razem, nie były tak wyraźne. Punkt  $pH_{iep}$  zeolitu NaX przypada przy wartości pH ok. 4,3 i różni się znacząco od wartości  $pH_{pzc}$ . Wynika to z mikroporowatej struktury tego adsorbentu, która jest powodem przenikania się pwe utworzonych na przeciwległych ściankach porów, co skutkuje zmianą składu jonowego warstwy dyfuzyjnej. Ponadto w przypadku układów zawierających jony Zn(II) oraz Pb(II)+Zn(II) obserwowany jest spadek potencjału dzeta w zakresie pH 3-7, a następnie w miarę wzrostu pH ma miejsce jego wyraźne podwyższenie. Może mieć to związek z tzw. efektem przeładowania (odwrócenia ładunku) podwójnej warstwy elektrycznej, co jest wynikiem występowania większej ilości przeciwjonów w obszarze płaszczyzny poślizgu niż jonów na powierzchni.

**Wnioski:** Adsorpcja jonów metali ciężkich: Pb(II) i Zn(II) z roztworów zarówno pojedynczych jak i mieszanych adsorbatów wpływa zauważalnie na strukturę podwójnej warstwy elektrycznej utworzonej na granicy faz ciało stałe-ciecz. Dla obu materiałów zeolitowych (NaX i NaX-C) zaobserwowano obniżenie gęstości ładunku powierzchniowego i potencjału dzeta w obecności adsorbatów w stosunku do suspensji pod ich nieobecność. Dodatkowo odnotowano przesunięcie punktów  $pH_{pzc}$  i  $pH_{iep}$  w stronę niższych wartości pH. Świadczy to o tym, że wiązanie prostych jonów nieorganicznych w warstewce powierzchniowej odbywa się na drodze oddziaływań chemicznych, a także jonowymiennych, co skutkuje zmianami składu jonowego zarówno warstwy powierzchniowej jak i płaszczyzny poślizgu.

Prace zostały zrealizowane w ramach projektu Lider finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, nr umowy LIDER/19/0072/L-9/NCBR/2018.

#### Literatura:

1. M. Nowacka, rozprawa doktorska: Charakterystyka elektrokinetyczna i stabilność dyspersji wybranych układów tlenkowych, Poznań, 2013.
2. J. Keller, R. Staudt, Gas adsorption equilibria, Springer US, 2005.

3. M. Paderewski, Procesy adsorpcyjne w inżynierii chemicznej, WNT, Warszawa, 1999.
4. B. Buszewski, P. Pomastowski, Wiadomości Chemiczne 69 (2015) 9.
5. W. Janusz, Decker M (ed) Surfactant science, Dekker Inc, New York, 1994.
6. R. J. Hunter, Zeta potential in colloid science. Academic Press, New York, 1981.

## **WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE ORAZ STABILNOŚĆ HYBRYDOWYCH SORBENTÓW DO USUWANIA JONÓW CEZU**

**J. BOK-BADURA, A. JAKÓBIK-KOLON**, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii, ul. Bolesława Krzywoustego 6, 44-100 Gliwice.

**Abstrakt:** Zbadano właściwości fizyczne hybrydowych sorbentów do usuwania jonów cezu, które mogą mieć wpływ na ich użytkowanie. Wyznaczono stopień pęcznienia sorbentów w wodzie dejonizowanej oraz roztworach cezu o różnym stężeniu, a także stopień pęcznienia sorbentów w roztworze jonów cezu po dłuższym czasie kontaktu. Zbadano objętościowy stopień pęcznienia oraz gęstość nasypową suchego i mokrego sorbentu w wodzie dejonizowanej i roztworze jonów cezu.

**Wprowadzenie:** W 2019 roku w rejestrze Państwowej Agencji Atomistyki znajdowały się 2634 zamknięte źródła promieniotwórcze (będące w eksploatacji) zawierające izotop cezu 137. Źródła te sklasyfikowane są w trzech kategoriach w zależności od ich przeznaczenia czy aktywności radiacyjnej [1]. Praca z materiałami promieniotwórczymi, ich zabezpieczanie oraz postępowanie z odpadami promieniotwórczymi są ściśle regulowane przez międzynarodowe rozporządzenia i poddawane okresowej kontroli. Cez-137 ze względu na długi okres połowicznego rozpadu (30 lat) i wysoką rozpuszczalność stanowi poważne zagrożenie dla środowiska i ludzi [2]. Radioaktywny cez może zostać uwolniony do środowiska na przykład w wyniku awarii elektrowni jądrowej. Jest on również składnikiem płynnych odpadów radioaktywnych. Radioaktywny cez może również pochodzić z produkcji i testowania broni jądrowej lub produkcji i stosowania radioizotopów w medycynie i przemyśle [2,3]. W zależności od rodzaju powstałych odpadów (stałe, gazowe, ciekłe) dobiera się odpowiednie metody ich unieszkodliwiania bądź zabezpieczania. Jednakże ze względu na to, że aktywność nuklidów promieniotwórczych może być zmniejszona jedynie poprzez ich rozpad, głównym celem przetwarzania i składowania wszystkich rodzajów odpadów promieniotwórczych jest ich właściwa segregacja, redukcja ich objętości, zestalanie i przechowywanie w taki sposób, aby były bezpieczne dla ludzi i środowiska [4,5]. Jedną z technik umożliwiających redukcję objętości bądź zestalanie, a właściwie unieruchomienie substancji na stałym nośniku jest adsorpcja. Celem naszych badań było wytworzenie oraz zbadanie możliwości zastosowanie hybrydowych sorbentów do usuwania jonów cezu. Proponowane sorbenty jako substancję aktywną zawierają błękit pruski, który znany jest z wysokiego powinowactwa do jonów cezu oraz jako matrycę pektynę, która pozwala na nadanie sorbentom właściwości użytkowych [6]. W niniejszej pracy przedstawiono właściwości fizyczne sorbentów takie jak stopień pęcznienia, objętościowy stopień pęcznienia czy gęstość nasypową, które mają wpływ na ich właściwości użytkowe oraz stabilność.

**Część eksperymentalna:** Badaniom poddano hybrydowe sorbenty nieorganiczno-biopolimerowe zawierające 10% (S1), 30% (S2) i 50% (S3) błękitu pruskiego, otrzymane według opisanej wcześniej procedury [6]. Stopień pęcznienia, czyli krotność zwiększenia masy lub objętości suchego sorbentu przez kontakt z określonym roztworem zbadano w wodzie oraz roztworach jonów cezu o stężeniu: 100, 120, 200, 300, 400 i 500 mg/l i  $\text{pH} = 6$ . 20 mg suchych sorbentów wprowadzono do 10 ml roztworu cezu o odpowiednim stężeniu bądź do 20 ml wody demineralizowanej. Po ustaleniu równowagi (24 h,  $22^\circ\text{C}$ ) sorbenty odsączono, osuszono za pomocą bibuły filtracyjnej i zważono. Stopień pęcznienia ( $S_{in.}$ ) obliczono ze wzoru:

$$S_{in.} = \frac{m_m - m_s}{m_s}$$

gdzie:  $m_s$  - masa suchego sorbentu [g],  $m_m$  - masa spęczniałego sorbentu [g].

Dla każdego sorbentu wykonano 3 pomiary. Dodatkowo wyznaczono pęcznienie sorbentu składającego się z samej pektyny (P). Sprawdzone także stabilność sorbentów w roztworach o różnym stężeniu jonów cezu poprzez wyznaczenie ich stopnia pęcznienia po 4 dniach kontaktu z badanymi roztworami. Wyznaczono także objętościowy stopień pęcznienia sorbentów w wodzie demineralizowanej oraz w roztworze jonów cezu (120 mg/l,  $\text{pH} = 6$ ,  $22^\circ\text{C}$ ). Objętość zajmowaną przez suchy sorbent ( $V_s$ ) wyznaczono poprzez wprowadzenie 0,5 g suchego sorbentu do cylindra miarowego i odczytanie zajmowanej przez niego objętości. Następnie sorbent wprowadzono do 50  $\text{cm}^3$  wody dejonizowanej lub do 50  $\text{cm}^3$  roztworu jonów cezu. Sorbenty pozostawiono do ustalenia równowagi. Po 24 godzinach sorbenty odsączono i osuszono bibułą filtracyjną. Spęczniałe sorbenty wprowadzono ponownie do cylindra miarowego i odczytano objętość zajmowaną przez sorbent spęczniały ( $V_m$ ). Dla każdego sorbentu wykonano 3 pomiary. Objętościowy stopień pęcznienia ( $S_v$ ) sorbentów wyznaczono ze wzoru:

$$S_v = \frac{V_m - V_s}{V_s}$$

gdzie:  $V_s$  – objętość zajmowana przez suchy sorbent [ $\text{cm}^3$ ];  $V_m$  – objętość zajmowana przez sorbent po spęcznieniu [ $\text{cm}^3$ ].

Na podstawie powyższych wyników wyznaczono także gęstości nasypowe suchych sorbentów ( $d_{ns.}$ ) i sorbentów spęczniałych w wodzie dejonizowanej ( $d_{nm(aq.)}$ ) i roztworze jonów cezu ( $d_{nm(Cs)}$ ):

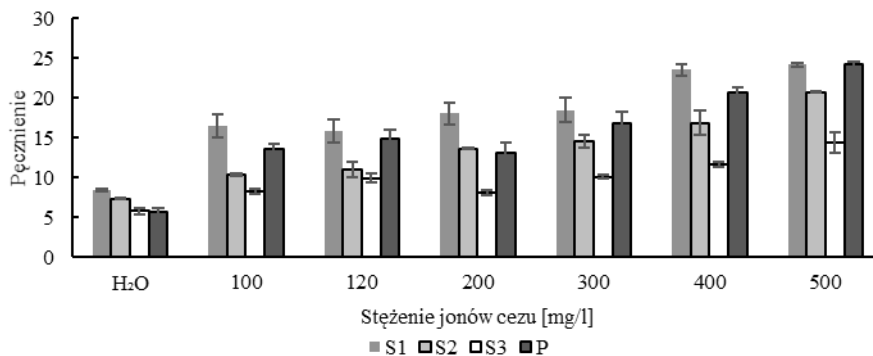
$$d_{ns} = \frac{m_s}{V_s} [\text{g}/\text{cm}^3]$$

$$d_{nm} = \frac{m_m}{V_m} [\text{g}/\text{cm}^3]$$

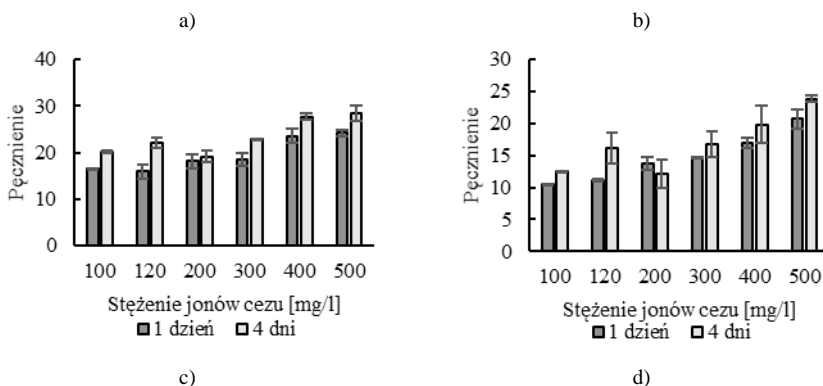
gdzie:  $m_s$  – masa suchego sorbentu [g],  $m_m$  – masa spęczniałego sorbentu,  $V_s$  – objętość zajmowana przez suchy sorbent [ $\text{cm}^3$ ];  $V_m$  – objętość zajmowana przez sorbent po spęcznieniu [ $\text{cm}^3$ ].

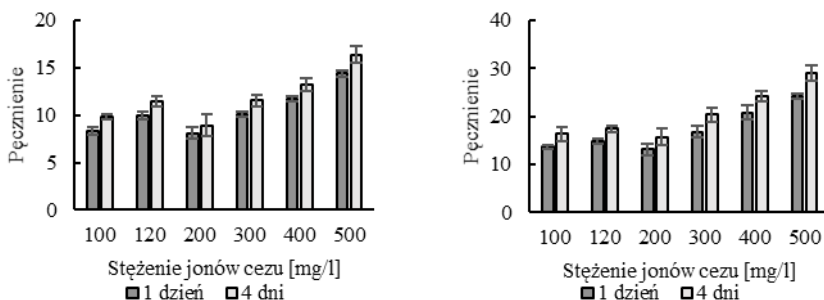


**Wyniki:** Na rysunku 1 przedstawiono stopnie pęcznienia hybrydowych sorbentów S1, S2, S3 oraz sorbentu pektynowego (P) w wodzie demineralizowanej oraz roztworach jonów cezu o różnym stężeniu. Wszystkie sorbenty wykazują najmniejszy stopień pęcznienia w wodzie dejonizowanej. Największe pęcznienie w wodzie wykazuje sorbent S1 ( $8.4 \pm 0.1$ ). Generalnie stopień pęcznienia wszystkich sorbentów wzrasta wraz ze wzrostem stężenia jonów cezu w roztworze, przy czym od stężenia 300 mg/l wzrost jest coraz większy. Największe pęcznienie wszystkie sorbenty wykazują w roztworze o stężeniu 500 mg/l (S1 –  $24,2 \pm 0,2$ , S2 –  $20,8 \pm 0,1$ , S3 –  $14,4 \pm 1,3$ , P –  $24,2 \pm 0,5$ ). Największe pęcznienie we wszystkich roztworach wykazuje sorbent z najniższym dodatkiem błękitu pruskiego (S1), a najmniejsze sorbent z najwyższym dodatkiem błękitu pruskiego (S3).



**Rys. 1.** Stopień pęcznienia hybrydowych sorbentów S1, S2, S3 oraz sorbentu pektynowego P w wodzie demineralizowanej oraz roztworach jonów cezu o różnym stężeniu.

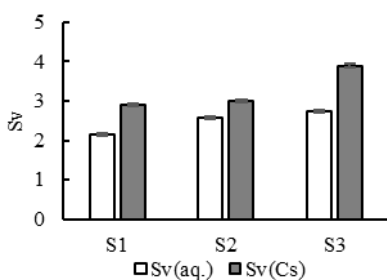




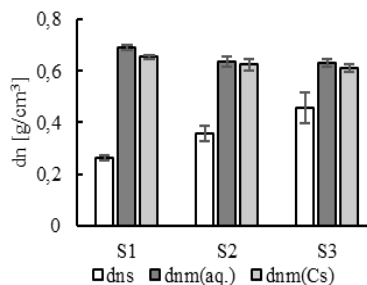
Rys. 2. Stopień pęcznienia hybrydowych sorbentów: a) S1, b) S2, c) S3 oraz d) sorbentu pektynowego P w roztworach jonów cezu o różnym stężeniu po 1 dniu i 4 dniach.

Dodatkowo zbadano stabilność sorbentów poprzez zbadanie ich stopnia pęcznienia po 4 dniach kontaktu z roztworami jonów cezu. Wyniki przedstawiono na rysunku 2. W większości przypadków obserwuje się wzrost stopnia pęcznienia po 4 dniach kontaktu sorbentu z roztworami (wzrost średnio o około 20%).

Na rysunku 3 przedstawiono objętościowy stopień pęcznienia ( $S_v$ ) badanych sorbentów w wodzie i roztworze jonów cezu o stężeniu 120 mg/l i pH = 6. Podobnie jak w przypadku masowego współczynnika pęcznienia, objętościowe stopnie pęcznienia hybrydowych sorbentów różnią się w zależności od ilości dodatku błękitu pruskiego. W przypadku każdego sorbentu objętościowy stopień pęcznienia jest wyższy w roztworze jonów cezu (najwyższy 3,9 dla sorbentu S3). Gęstości nasypowe hybrydowych sorbentów (Rys. 4) są stosunkowo niskie ze względu na okrągły i równy kształt ziaren sorbentu. Gęstości nasypowe spęczniałych sorbentów są około 3 razy większe niż sorbentów suchych.



Rys. 3. Objętościowy stopień pęcznienia ( $S_v$ ) hybrydowych sorbentów w wodzie oraz w roztworze jonów Cs.



Rys. 4. Gęstości nasypowe suchych i spęczniałych sorbentów w wodzie i roztworze jonów Cs.

**Wnioski:** Wykazano, że na pęcznienie sorbentu wpływ ma stężenie jonów cezu oraz czas kontaktu sorbentu z badanym roztworem. Badania wykazały także różnice w objętościowych stopniach pęcznienia oraz gęstościach nasypowych sorbentów w wodzie demineralizowanej oraz w roztworze zawierającym jony cezu. We wcześniejszych badaniach przedstawiono także wpływ pH na pęcznienie sorbentów [6]. Badane parametry mają wpływ na stabilność pracy sorbentów, co ma

znaczenie w przypadku projektowania np. badań w układzie dynamicznym. Zmiany objętości sorbentów w kolumnie pod wpływem napływającego roztworu bądź na skutek czasu trwania eksperymentu mogą wpływać na otrzymane wyniki. Przeprowadzone badania pozwalają na dobranie najlepszych warunków prowadzenia kolejnych eksperymentów.

Praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach grantu PRELUDIUM nr 2017/27/N/ST8/02854.

### **Literatura:**

1. Raport roczny. Działalność Prezesa Państwowej Agencji Atomistyki oraz ocena stanu bezpieczeństwa jądrowego i ochrony radiologicznej w Polsce w 2019 roku, [www.paa.gov.pl/strona-156-raport\\_roczny\\_prezesa.html](http://www.paa.gov.pl/strona-156-raport_roczny_prezesa.html) (dostęp: 17.02.2021).
2. ATSDR, Toxicological Profile for Cesium. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, [www.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=578&tid=107](http://www.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=578&tid=107) (dostęp: 17.02.2021).
3. B. Işik, A. E. Kurtoğlu, G. Gürdağ, G. Keçeli, J. Hazard. Mater., 21 (2021) 403.
4. J. Wang, S. Zhuang, Rev. Environ. Sci. Bio/Technology, 18 (2019) 231.
5. H. Yang, H. Li, J. Zhai, L. Sun, Y. Zhao, H. Yu, Chem. Eng. J., 246 (2014) 10.
6. J. Bok-Badura, A. Jakóbiak-Kolon, A. Kazek-Kesik, K. Karoń, Materials, 2020, 2160.

## SYNTEZA POLIMEROWYCH MIKROSFER Z DODATKIEM METAKRYLOWEJ POCHODNEJ TIONAFTALENU

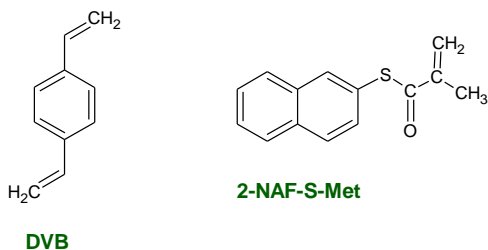
J. BEDNARCZYK<sup>1</sup>, K. FILA<sup>2</sup>, B. PODKOŚCIELNA<sup>1</sup>, <sup>1</sup>UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin; <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny, Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** W pracy przedstawiono syntezę polimerowych mikrosfer siarkowych na bazie diwinylobenzenu (DVB) z dodatkiem aromatycznego tiometakrylanu-2-metyloprop-2-enotionianu *S*-naftalen-2-ylu (2-NAF-S-Met). Zaprezentowano wybrane właściwości fizykochemiczne siarkowych mikrosfer, m.in. analizę pasm obecnych na widmach w podczerwieni (ATR FT-IR) i badania pęcznienia w różnych rozpuszczalnikach organicznych oraz w wodzie destylowanej. Następnie wykonano badania termiczne nowych materiałów metodą Różnicowej Kalorymetrii Skaningowej (DSC) oraz zdjęcia mikrosfer za pomocą mikroskopu optycznego.

**Wprowadzenie:** Funkcjonalne polimery zawierające heteroatom w swojej strukturze (w szczególności azot, siarkę lub tlen) posiadają szeroki zakres zastosowań, od takich obszarów jak przechowywanie i separacja gazów, chromatografia, medycyna, po katalizę i magazynowanie energii [1]. Wśród nich szczególną rolę odgrywają polimery zawierające siarkę. Stanowią one bardzo zróżnicowaną pod względem budowy chemicznej grupę związków wielkocząsteczkowych, o różnorodnych i interesujących właściwościach pozwalających na ich zastosowanie, zarówno w skali laboratoryjnej, jak i w przemyśle. Obecność siarki w strukturze polimeru zwiększa bowiem szeroką gamę właściwości materiałowych, wśród których możemy wyróżnić dobre właściwości mechaniczne, elektryczne i optyczne, adhezję, termoodporność i biokompatybilność etc. [2, 3]. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się syntezie i badaniu właściwości polimerów zawierających w swojej strukturze ugrupowania tio(met)akrylanowe. Grupa tych polimerów jest interesująca ze względu na możliwość transformacji obecnej w łańcuchu grupy tioestrowej w inne grupy funkcyjne poprzez reakcje wymiany tiol-tioester [4, 5]. Zastosowanie powyższej reakcji dla aromatycznych tiometakrylanów jest szczególnie istotne jako technika modyfikacji surowców termoutwardzalnych i tworzyw termoplastycznych ze względu na to, że posiadają one zmniejszoną stabilność wiązania tioestrowego, a tym samym wyższą zdolność do reakcji przenoszenia tioestru [6]. Jako odwracalna reakcja, która tworzy i rozrywa wiązania kowalencyjne, wymiana tiol-tioester może być potencjalnie użyteczna w projektowaniu nowych, funkcjonalnych biomateriałów. Innym ważnym zastosowaniem monomerów zawierających siarkę jest wprowadzenie ich bezpośrednio do matrycy polimerowej w celu uzyskania skutecznych wymiennaczy jonowych, które w dalszym etapie mogą być wykorzystane do usuwania kluczowych jonów metali ciężkich, np. Hg(II) czy Pb(II) z zanieczyszczonej wody [7, 8].

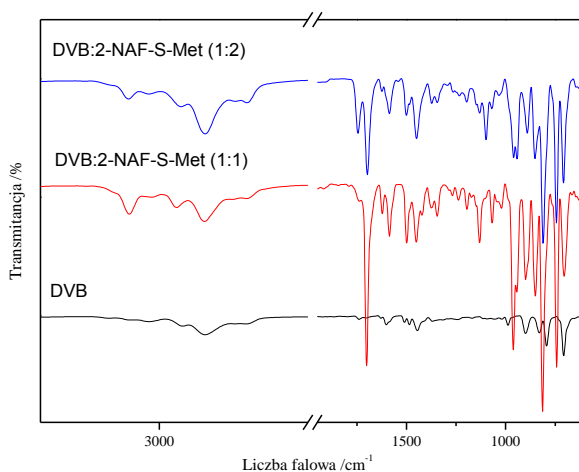
**Część eksperymentalna:** Syntezę polimerów na bazie DVB i 2-NAF-S-Met wykonano metodą polimeryzacji suspensyjnej. Kopolimeryzację mieszaniny

reakcyjnej przeprowadzono w środowisku wodnym z dodatkiem stabilizatora zawiesiny – alkoholu poliwinylowego (APV). Proces ten przeprowadzono przy różnych stosunkach molowych monomerów – DVB:2-NAF-S-Met, (1:1 i 1:2). Dla porównania przygotowano również homopolimer DVB. Jako inicjator polimeryzacji użyto 2,2'-azobis(izobutyronitryl) (AIBN) w ilości 1% w/w oraz zastosowano toluen i dekan-1-ol jako rozpuszczalniki porotwórcze. Proces polimeryzacji prowadzono przez 8 h w temperaturze 85°C. Na rysunku 1 przedstawiono struktury chemiczne monomerów stosowanych do syntezy mikrosfer polimerowych.



Rys.1. Monomery użyte w polimeryzacji emulsyjno-suspensyjnej.

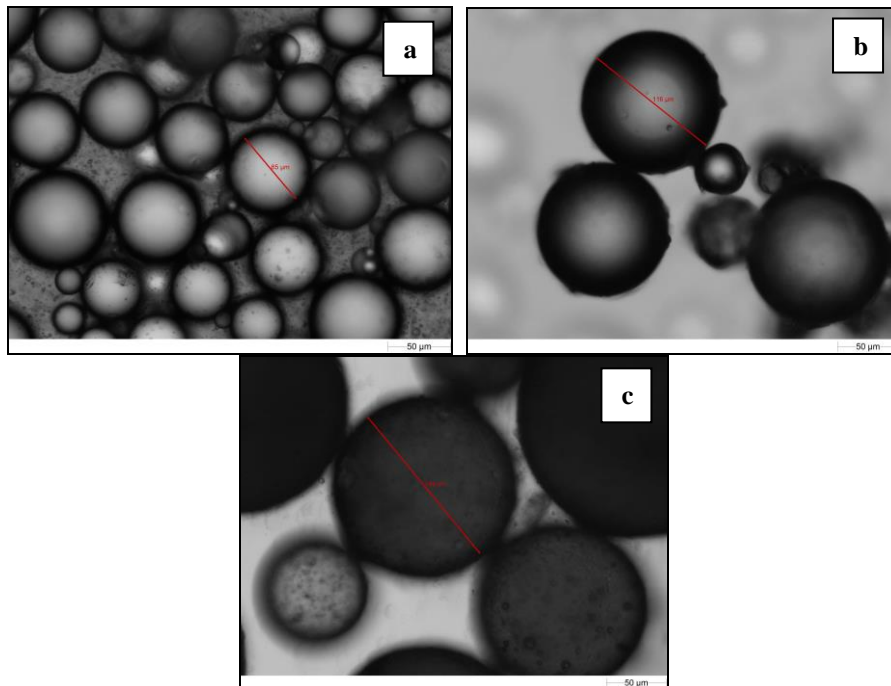
**Wyniki:** Wyniki analizy spektroskopowej ATR FT-IR otrzymanych mikrosfer polimerowych zaprezentowano na rysunku 2.



Rys.2. Widma ATR FT-IR otrzymanych mikrosfer.

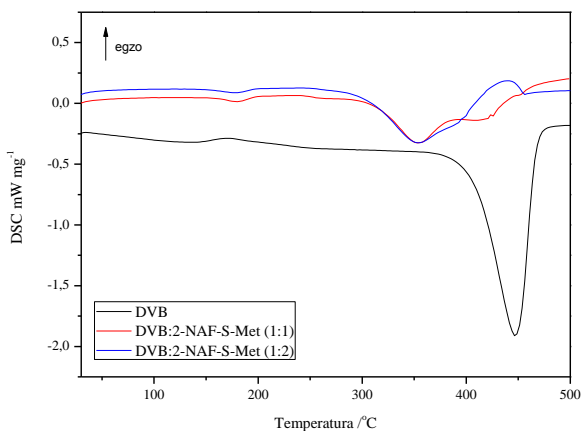
Przedstawione widma w podczerwieni wskazują na obecność charakterystycznych pasm pochodzących od drgania rozciągającego pierścienia aromatycznego występujące w zakresie 3018-3050 cm<sup>-1</sup>, drgania asymetrycznego (2923-2971 cm<sup>-1</sup>) i symetrycznego (2849-2854 cm<sup>-1</sup>) grupy -CH<sub>2</sub>, a także drgania deformacyjnego grupy fenylovej przy 704-743 cm<sup>-1</sup>. Dodatkowo, oprócz wymienionych powyżej pasm absorpcji występujących w zsyntetyzowanych mikrosferach, na widmach IR

z dodatkiem 2-NAF-S-Met można dostrzec drgania rozciągające grupy tioestrowej (S-C=O) w zakresie  $1697\text{-}1744\text{ cm}^{-1}$ , drgania ugrupowań –COS przy  $811\text{-}813\text{ cm}^{-1}$ , a także drgania rozciągające grupy –C-S w zakresie  $639\text{-}655\text{ cm}^{-1}$ . Na rysunku 3 przedstawiono zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu optycznego. Zsyntetyzowane mikrosfery posiadają kulisty kształt i ich wielkość jest zależna od ilości pochodnej tiometakrylanowej. W porównaniu do czystego polimeru DVB, dwukrotny dodatek 2-NAF-S-Met spowodował zwiększenie średnicy mikrosfer polimerowych o ponad  $80\text{ }\mu\text{m}$ .



**Rys.3.** Zdjęcia mikrosfer wykonane przy użyciu mikroskopu optycznego Malvern: **a** – DVB, **b** – DVB: 2-NAF-S-Met (1:1), **c** – DVB:2-NAF-S-Met (1:2).

Analiza termiczna polimerowych mikrosfer metodą Różnicowej Kalorymetrii Skaningowej (DSC) pozwoliła na wyznaczenie takich parametrów jak, m.in. początkowa ( $T_p$ ) i maksymalna temperatura rozkładu ( $T_{maks}$ ). Rysunek 4 przedstawia krzywe DSC dla otrzymanych mikrosfer. Dodatek tioestru 2-NAF-S-Met spowodował obniżenie stabilności termicznej polimerowych mikrosfer.



**Rys.4.** Krzywe DSC dla polimerów: DVB, DVB:2-NAF-S-Met (1:1) i DVB:2-NAF-S-Met (1:2).

Przeprowadzono również pomiary współczynników pęcznienia dla otrzymanych mikrosfer z dodatkiem 2-NAF-S-Met, a wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 1. Materiały te najlepiej pęcznią w dichlorometanie (25–75%), natomiast nie zaobserwowano ich pęcznienia w wodzie destylowanej.

**Tabela 1.** Pomiary pęcznienia uzyskanych mikrosfer na bazie DVB.

Polimer	Współczynnik pęcznienia, B w wybranych rozpuszczalnikach, %			
	Tetrahydrofuran (THF)	Dichlorometan	Aceton	Woda destylowana
DVB	33	40	50	0
DVB:2-NAF-S-Met (1:1)	25	25	17	0
DVB:2-NAF-S-Met (1:2)	50	75	17	0

**Wnioski:** W wyniku polimeryzacji suspensyjnej otrzymano mikrosfery na bazie diwinylobenzenu i metakrylowej pochodnej 2-naftalenotiolu o średnicy w zakresie 65–149  $\mu\text{m}$ . Szczegółowa analiza spektroskopowa metodą ATR FT-IR potwierdziła prawidłowy przebieg reakcji kopolimeryzacji. Na widmach zauważono między innymi pojawienie się charakterystycznego pasma od grupy tioestrowej (1697–1744  $\text{cm}^{-1}$ ), drgania rozciągającego grupy C-S (639–655  $\text{cm}^{-1}$ ), a także stwierdzono zwiększenie intensywności pasma pochodzącego od pierścienia aromatycznego (3018–3050  $\text{cm}^{-1}$ ). Badania termiczne wskazują, iż mikrosfery DVB z dodatkiem 2-NAF-S-Met wykazują dobrą stabilność termiczną. Maksymalny rozkład polimerów następuje w zakresie temperatur 300–460°C.

#### Literatura:

1. H. Mutlu, P. Theato, *Macromol. Rapid Commun.*, 41 (2020) 2000181.
2. A. Kultys, *Sulfur-containing polymers*, *Encycl. Polym. Sci. Technol.* 4 (2001) 336.

3. G.Z. Li, R.K. Randev, A.H. Soeriyadi, G. Rees, C. Boyer, Z. Tong, T.P. Davis, C.R. Becer, D.M. Haddleton, Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts, *Polym. Chem.*, 1 (2010) 1196.
4. S. Aksakal, C.R. Becer, *Polym. Chem.*, 7 (2016) 7011.
5. C. Wang, S. Mavila, B.T. Worrell, W. Xi, T.M. Goldman, C.N. Bowman, *ACS Macro Lett.*, 7 (2018) 1312.
6. K. Fila, M. Goliszek, B. Podkościelna, M. Podgórski, *Eur. Polym. J.*, 136 (2020) 109918.
7. K. Fila, Y. Bolbukh, M. Goliszek, B. Podkościelna, M. Gargol, B. Gawdzik, *Adsorption*, 25(3) (2019) 429.
8. F. He, W. Wang, J. Moon, J. Howe, E.M. Pierce, L. Liang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4 (2012) 4373.



## SYNTEZA I BADANIA KOMPOZYTÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH

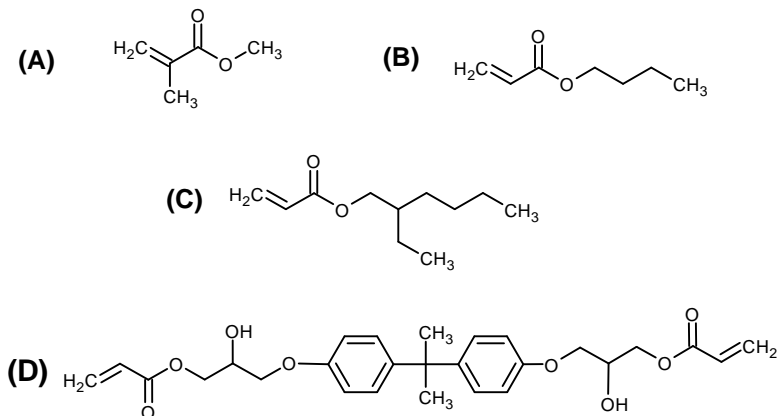
**K. MLYNARCZYK, B. PODKOŚCIELNA**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin.

**Abstrakt:** Przedmiotem niniejszej pracy jest synteza kompozytów o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, a także badanie ich właściwości fizykochemicznych. W celu przygotowania kompozytów zastosowano polimeryzację rodnikową z wykorzystaniem inicjatora UV. Głównym monomerem był diakrylan bisfelonu A (BPA.DA), a jako rozcieńczalników aktywnych użyto akrylanu 2-etyloheksyłu (AEH), metakrylanu metylu (MMA) i akrylanu butylu (BA). Tlenek cynku (ZnO) stanowił przeciwdrobnoustrojowy wypełniacz. Ocenie poddano wpływ rozpuszczalników na proces starzenia kompozytów. Zmiany w strukturze analizowano za pomocą widm ATR/FT-IR.

**Wprowadzenie:** Tlenek cynku znajduje szerokie zastosowanie nie tylko w przemyśle, jako dodatek do farb, czy też stabilizator tworzyw sztucznych. Posiada udowodnione działanie antibakteryjne, wspomaga gojenie ran, dzięki czemu jest stosowany zarówno w kosmetologii, jak i medycynie [1]. Tlenek cynku stosowany jako wypełniacz w kompozytach używanych jako tymczasowe wypełnienia w stomatologii wykazuje silne właściwości przeciwbakteryjne m. in. wobec szczepów *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* [2]. ZnO stosowany jest również do tworzenia nanostruktur wykorzystywanych do transportowania substancji czynnych leków w organizmie. Lek umieszczany jest w nanokulkach, liposomach, a także nanorurkach i wprowadzany do organizmu. Dzięki zastosowaniu takiego rozwiązania, lek może uwalniać się stopniowo w całym organizmie. Tlenek cynku ma działanie wysuszające, dlatego stosowany jest jako dodatek do leków przyspieszających gojenie się ran. Bardzo dobrze pochłania promieniowanie UV, dlatego też jest składnikiem kremów do opalania. Ze względu na nietoksyczność jest stosowany do wytwarzania substancji wykorzystywanych do oznaczania komórek biologicznych. Kompozyty polimerowe składają się przynajmniej z dwóch składników, które różnią się składem i rodzajem chemicznym. Oddziałują ze sobą, jednak nie rozpuszczają się w sobie. Otrzymany materiał jest spójny i jednolity, jednakże można zauważyć widoczną granicę między składnikami wyjściowymi. Z roku na rok zyskują coraz większe znaczenie. Charakteryzują się łatwością, wszechstronnością wykorzystania, dużą wytrzymałością mechaniczną, małym ciężarem właściwym, a także przenikalnością dla promieniowania rentgenowskiego. W dalszym ciągu trwają zaawansowane badania nad poszukiwaniem nowych możliwości syntezy i specjalnych zastosowań materiałów kompozytowych, które mogą posiadać m.in. właściwości przeciwdrobnoustrojowe [4].

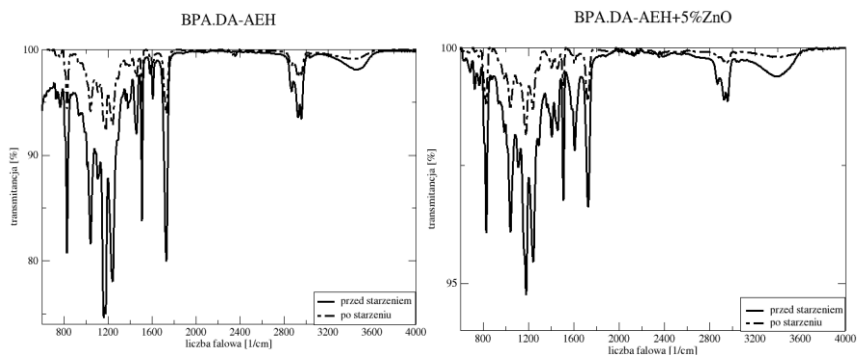
**Część eksperymentalna:** Przeprowadzono polimeryzację w masie monomeru sieciującego BPA.DA, oraz rozcieńczalników aktywnych z ZnO w roli nieorganicznego wypełniacza (Rys. 1). Jako fotoinicjator zastosowano Irgacure 651. W kompozytach użyto zmiennych ilości ZnO: 1%, 2% i 5% wagowych. Wykonano także próbkę niezawierającą tlenku cynku. Zachowano stały stosunek wagowy

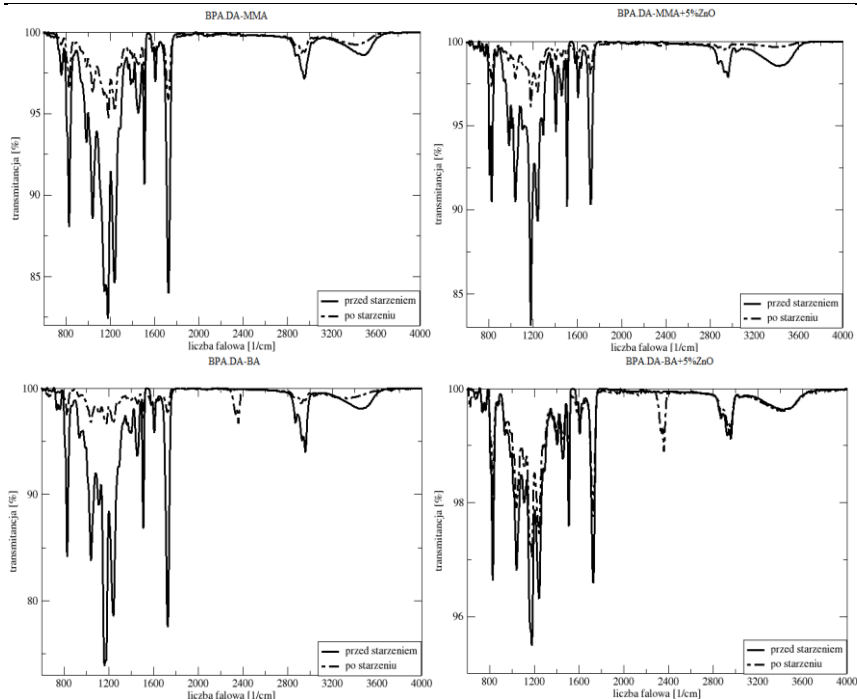
BPA.DA do rozcieńczalnika aktywnego (70:30 wt. %). Polimeryzację wykonano w specjalnych formach szklanych o wymiarach 10 x 12 cm. W celu potwierdzenia budowy kompozytów wykonano analizę ATR/FT-IR. Przeprowadzono także badania starzeniowe kompozytów w acetonie.



Rys. 1. Wzory strukturalne monomerów użytych do polimeryzacji A- MMA, B- BA, C- AEH, D- BPA.DA.

**Wyniki:** Na Rys. 2 przedstawiono widma kompozytów bez dodatku ZnO, jak również zawierające 5% wag. ZnO. Na widmach zaobserwowano sygnał pochodzący od drgania rozciągającego -OH przy długości fali 3450  $\text{cm}^{-1}$ . Sygnał odpowiadający długości fali 2946  $\text{cm}^{-1}$  pochodzi od drgań rozciągających grupy -CH, 1459  $\text{cm}^{-1}$  od drgań zginających -CH, natomiast pasmo przy długości fali 1758  $\text{cm}^{-1}$  to sygnał pochodzący od drgań grupy karbonylowej C=O. Na Rys. 2 przedstawiono widma ATR-FTIR dla kompozytów przed i po starzeniu w acetonie. Jak można zauważyć intensywność sygnałów po kontakcie z rozpuszczalnikiem obniżyła się. Świadczy to o częściowej destrukcji kompozytów pod wpływem tego medium.





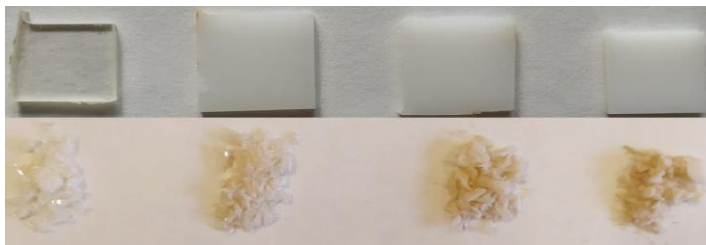
Rys. 2. Widma ATR/FT-IR otrzymanych kompozytów.

Dodatkowo wykonano również badania pęcznienia kompozytów. Tabela 1 przedstawia wartości współczynników pęcznienia, które obliczono ze wzoru:

$$B\% = 100\% * (m_k - m_0) / m_0$$

gdzie:  $m_0$  – masa suchej próbki,  $m_k$  – masa spęcznionej próbki.

Badania starzeniowe zakończono po 3 tygodniach, gdyż próbki poddane działaniu acetonu uległy rozpadowi. Dla kompozytów, w których rozcieńczalnikiem aktywnym był AEH najwyższą wartość współczynnika pęcznienia B% otrzymano dla BPA.DA-AEH+1%ZnO (30,74%), w kompozytach z dodatkiem MMA dla BPA.DA-MMA+5%ZnO (37,51%), a dla kompozytów z BA dla BPA.DA-BA+2%ZnO (36,45%). Rys.3. przedstawia kompozyty przed i po badaniach starzeniowych.



Rys. 3. Kompozyty BPA.DA-BA przed i po badaniach starzeniowych.

**Tabela 1.** Współczynniki pęcznienia kompozytów w czasie.

Kompozyt/Czas	Tydzień 1	Tydzień 2	Tydzień 3
BPA.DA-AEH	11,22%	20,38%	8,90%
BPA.DA-AEH+1%ZnO	16,43%	30,74%	12,83%
BPA.DA-AEH+2%ZnO	13,07%	21,89%	9,86%
BPA.DA-AEH+5%ZnO	8,30%	27,65%	18,03%
BPA.DA-MMA	13,20%	19,36%	26,59%
BPA.DA-MMA+1%ZnO	18,14%	29,54%	29,48%
BPA.DA-MMA+2%ZnO	15,17%	25,76%	30,39%
BPA.DA-MMA+5%ZnO	16,83%	31,30%	37,51%
BPA.DA-BA	19,94%	19,13%	24,18%
BPA.DA-BA+1%ZnO	16,51%	33,07%	15,75%
BPA.DA-BA+2%ZnO	13,08%	36,45%	23,76%
BPA.DA-BA+5%ZnO	13,93%	32,86%	18,23%

**Wnioski:** Przy wykorzystaniu polimeryzacji UV otrzymano sztywne kompozyty zawierające ZnO jako specjalny dodatek i wypełniacz. Strukturę kompozytów potwierdzono za pomocą widm ART/FT-IR. Wykonano badania pęcznienia oraz starzeniowe polimerów w acetonie. Zaobserwowano, że po teście starzeniowym malała intensywność poszczególnych pasm, co potwierdza, że pod wpływem działania acetonu, kompozyty ulegały rozkładowi. Badania starzeniowe pozwoliły określić procent ubytku masy poszczególnych kompozytów w czasie. W kolejnym etapie pracy kompozyty przebadane zostaną pod kątem ich zdolności przeciwdrobnoustrojowej na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS.

**Literatura:**

1. T. Strachowski, Szkoła i Ceramika, 4 (2012) 28.
2. A. Szram, K. Półtorak, M. Podlewska, J. Sokołowski, M. Łukomska-Szymańska, Protetyka Stomatologiczna, 5 (2015) 476.
3. A. Bardel, LAB Laboratoria, Aparatura, Badania, 4 (2015) 31.
4. Z. Okulus, Otrzymywanie oraz charakterystyka dentystycznych materiałów kompozytowych, rozprawa doktorska, Politechnika Poznańska, Poznań 2016.

## **BADANIE TERMICZNE POLIMEROWYCH BLEND OPARTYCH NA BISFENOLU-A I MMA**

**K. WNUCZEK, B. PODKOŚCIELNA, A. PUSZKA**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin.

**Abstrakt:** W pracy przedstawiono syntezę i badania właściwości blend polimerowych. Otrzymano 4 nowe materiały metodą polimeryzacji w masie z użyciem inicjatora UV. Zastosowano metakrylan metylu (MMA) jako aktywny rozpuszczalnik, a monomerem sieciującym był bisfenol A (BPA.GDA). W charakterze modyfikatora zastosowano dostępny handlowo poliwęglan (PC). Szczegółowo omówiono wpływ różnych ilości PC na właściwości fizykochemiczne otrzymanych materiałów. Przeprowadzono analizy termiczne: DSC (skaningowa kalorymetria różnicowa) oraz TG (termogravimetria).

**Wprowadzenie:** Poliwęglany to polimery, które są szeroko stosowane w wielu gałęziach przemysłu. Charakteryzują się one doskonałymi właściwościami mechanicznymi i termicznymi. Te termoplastyczne polimery są wykorzystywane do produkcji specjalistycznych artykułów i przedmiotów. Od kilkudziesięciu lat zapotrzebowanie na poliwęglany rośnie, ponieważ są one wykorzystywane również przy produkcji przedmiotów codziennego użytku. Poliwęglan na bazie bisfenolu A zdominował rynek od końca lat pięćdziesiątych XX wieku [1]. Polimerowe blendy odegrały ważną rolę w procesie opracowywania nowych materiałów o specjalnych właściwościach. Celem ich projektowania jest uzyskanie mieszanki polimerowej o cechach fizyko-chemicznych lepszych niż składniki wchodzące w skład blendy. Ostatnio, duże znaczenie zdobyły blendy zawierające wysokowydajne tworzywa termoplastyczne, ze względu na ich potencjalne zastosowanie w przemyśle. Właściwości blend zależą od ilości zmieszanych monomerów/polimerów [2]. Od wielu lat reakcje polimeryzacji UV były wykorzystywane w przemyśle przy produkcji lakierów i powłok ochronnych czy farb drukarskich. Szybkość polimeryzacji to jedna z głównych zalet utwardzania inicjatorów UV, która prowadzi do powstania materiałów w temperaturze otoczenia [3]. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) jest jedną z technik wykorzystywanych do badań właściwości termicznych, w tym temperatury zeszklenia, topnienia czy ustalania stopnia krystalizacji polimeru. Badania z wykorzystaniem DSC są niezbędne aby określić m.in. stopień utwardzania materiału. Analiza termogravimetryczna jest szeroko stosowana do badania kinetyki degradacji termicznej polimerów i oceny stabilności termicznej [4-5].

**Część eksperymentalna:** Przygotowano roztwór poliwęglanu poprzez dodatek odpowiedniej ilości PC do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  następnie całość mieszano przez 0.5 godziny w temperaturze pokojowej do rozpuszczenia się PC. Następnie, do odważonego monomeru (BPA.GDA) dodano odpowiednią ilość aktywnego rozpuszczalnika (MMA) w stosunku wagowym 7:3. Monomery mieszano w zlewce w temperaturze pokojowej do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Kolejnym krokiem było dodanie roztworu poliwęglanu do monomerów. Całość wstawiono do suszarki w celu

odparowania rozpuszczalnika (przez 20 minut w 30°C). Na koniec do próbki dodano obliczoną ilość inicjatora UV (2% w/w). Zawartość zlewki wiano do szklanych form o wymiarach 10 mm x 8 mm x 2 mm i polimeryzowano pod lampą UV przez 40 minut. Ilości wszystkich substancji podano w tabeli 1. Po wyjęciu z pod lampy UV próbki ogrzewano w temperaturze 80°C przez 30 minut. Tak przygotowane blendy poddano testom fizyko-chemicznym.

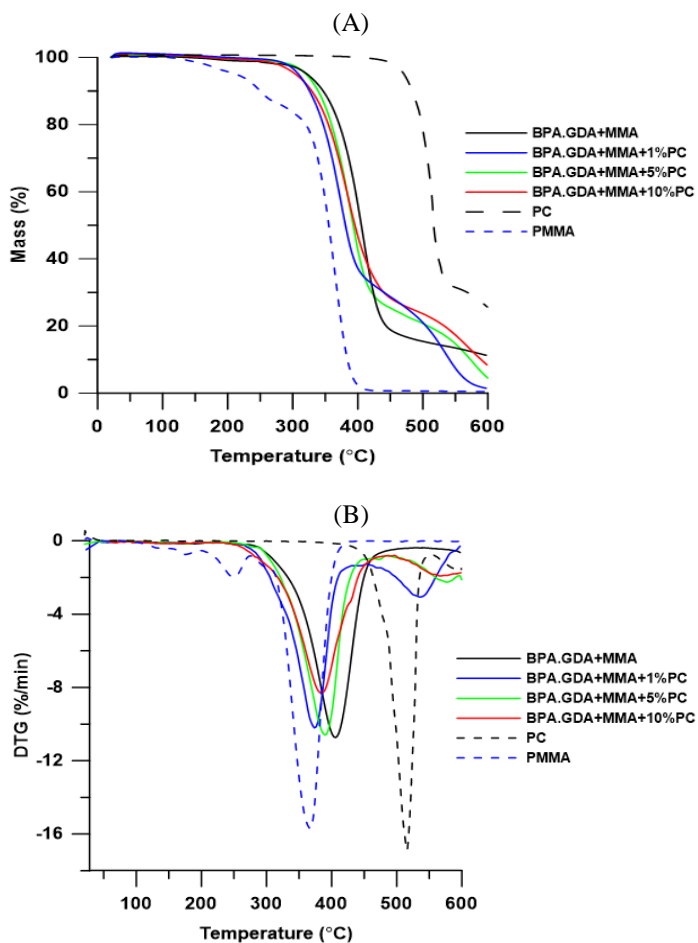
**Tabela 1.** Ilość składników użytych do syntezy blend BPA.GDA+MMA.

	BPA.MMA+MMA	BPA.MMA+MMA +1%PC	BPA.MMA+MMA +5%PC	BPA.MMA+MMA +10%PC
MMA [g]	3	3	3	3
BPA.GDA [g]	7	7	7	7
PC [wt.%]	0	1	5	10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [cm <sup>3</sup> ]	0	1	2	4
Inicjator [g]	0.200	0.202	0.210	0.220

**Wyniki:** Stabilność termiczna PMMA jest stosunkowo niska bo rozkład rozpoczyna się poniżej 200°C. Blendy BPA.GDA+MMA charakteryzuje się większą stabilnością termiczną. Wynika to z obecności wprowadzenia pierścieni aromatycznych z BPA.GDA, które posiadają wyższą energię dysocjacji. Masa resztkowa wzrastała wraz ze wzrostem procentowego udziału PC w blendach. Jak widać na podstawie kształtu krzywych DTG, rozkład termiczny otrzymanych mieszanek przebiegał w kilku etapach. Pierwszy etap ( $T_{max}$  w przedziale 374-391°C odpowiadający 73-75% ubytku masy) odpowiadał prawdopodobnie za rozkład fragmentów materiału składającego się z MMA i BPA.GDA, natomiast drugi szczyt ( $T_{max}$  w zakresie 536-567°C, co odpowiada 16-26% ubytku masy) odpowiadał głównie za rozkład poliwęglanu. Wraz ze wzrostem ilości PC intensywność pików na krzywej DTG przy  $T_{max}$  zmniejszała się. Krzywe DSC z pierwszego cyklu ogrzewania pokazują zarówno zmiany endotermiczne jak i egzotermiczne. Piki endotermiczne (z  $T_m$  w przedziale 62-72°C) są odpowiedzialne za topnienie krystalicznej postaci PMMA. Ta przemiana jest nieodwracalna, podczas chłodzenia nie zachodzi krystalizacja PMMA i nie obserwuje się pików topnienia w drugim przebiegu ogrzewania. Pojemność cieplna tych przemian dla serii blend zmniejsza się wraz ze wzrostem ilości PC w materiale. Temperatura rozkładu czystego PMMA wynosi od 104 do 122°C i zależy od masy molowej otrzymanego polimeru, natomiast dla PMMA wynosi około 72°C. Piki egzotermiczne dla mieszanek BPA.GDA+MMA+1%PC i BPA.GDA+MMA+5%PC są odpowiedzialne za rekrytalizację PMMA, podczas gdy egzotermiczne piki dla innych blend są odpowiedzialne za reakcje sieciowania. Krzywe DSC z drugiego ogrzewania nie wykazują zmian egzotermicznych i endotermicznych (co wskazuje na to, że materiały są amorficzne), natomiast przejścia szkliste można wyraźnie zobaczyć tylko dla mieszanek BPA.GDA MMA+1%PC, BPA.GDA+MMA+5%PC.

Tabela 2. Dane analizy TG.

	T <sub>5%</sub>	T <sub>10%</sub>	T <sub>50%</sub>	T <sub>max</sub>			Masa resztkowa (%)
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	
PC	471	484	516	-	516	-	25.58
PMMA	213	272	355	180	250	367	0.40
BPA.GDA+MMA	323	347	406	407	-	-	11.12
BPA.GDA+MMA+1%PC	309	326	381	374	536	-	1.39
BPA.GDA+MMA+5%PC	321	339	393	391	577	-	4.50
BPA.GDA+MMA+10%PC	304	329	395	384	567	-	8.23

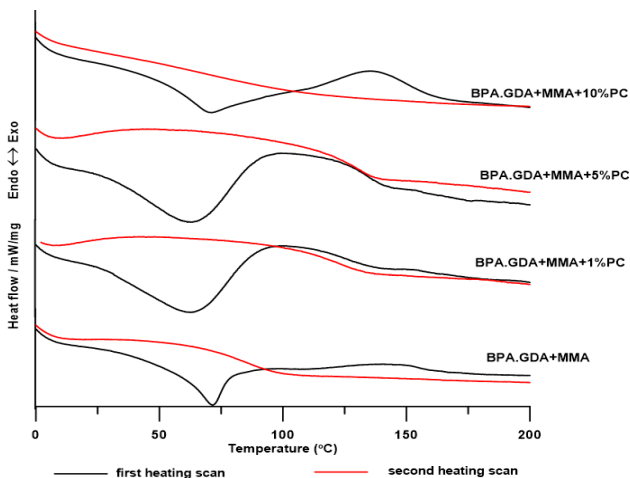


Rys. 1. Krzywe TG (A) i DTG (B) dla otrzymanych blend.

**Tabela 3.** Dane analizy DSC.

Sample	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_g^1$ (°C)	$T_g^2$ (°C)	$T_p$ (°C)	$\Delta H_p$ (J/g)
PC	-	-	-	-	-	149	-	-
BPA.GDA+MMA	72	11.7	-	-	-	92	140	3.1
BPA.GDA+ MMA+1%PC	62	20.9	101	8.7	127	120	-	-
BPA.GDA+MMA+5%PC	62	14.1	107	12.1	131	128	-	-
BPA.GDA+MMA+10%PC	71	15.0	-	-	-	-	136	8.1

$T_m$ ,  $T_c$ ,  $T_p$  – temperatura topnienia, krystalizacji i usieciowania.  
 $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_c$ ,  $\Delta H_p$  – pojemności ciepłe odpowiednio topnienia, krystalizacji i sieciowania.



**Rys. 2.** Krzywe DSC dla otrzymanych blend.

**Wnioski:** Podczas fotopolimeryzacji UV uzyskano nowe blendy na bazie metakrylanu metylu i bisfenolu A z dodatkiem handlowego poliwęglanu. Dane DSC potwierdziły, że wszystkie materiały są amorficzne, natomiast piki endotermiczne (w zakresie 62-72°C) są odpowiedzialne za topnienie krystalicznej postaci PMMA. Na podstawie analizy termogravimetrycznej można stwierdzić, że dodatek PC do mieszanek zwiększył ich odporność termiczną.

**Literatura:**

1. J.H. Park, J.C. Hyun, W.N. Kim, Macromolecular Research, 10 (2002) 135.
2. S. Zheng, Q. Guo, Y. Mi, Polymer, 44 (2003) 867.
3. Z. Huang, W. Shi, Eur. Polym. J., 42 (2006) 1506.
4. V. Sarannya, S.S. Rishwana, R. Mahalakshmy, A.R. Mahendran, R. Surender, C.T. Vijakumar, J. Elastomers Plast., 52(6) (2020) 495.
5. D. Zhang, D. Jia, S. Chen, J Therm Anal Calorim, 98 (2009) 819.



## ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH BLEND POLIMEROWYCH DOMIESZKOWANYCH WYBRANYM POLIMEREM SIARKOWYM

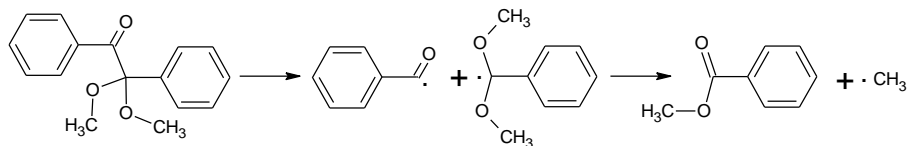
M. GARGOL<sup>1</sup>, B. PODKOŚCIELNA<sup>1</sup> <sup>1</sup>UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 5, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** W pracy przedstawiono syntezę blend polimerowych wzbogaconych różną ilością domieszki polimeru siarkowego, którym był polisulfon aromatyczny. Związek ten otrzymano w reakcji polikondensacji, a następnie wykorzystano w syntezie blend opartej na fotoinicjowanej polimeryzacji aromatycznej żywicy epoksyakrylowej i rozpuszczalnika aktywnego. Blendy poddano dynamicznej analizie mechanicznej (DMA) oraz pomiarze twardości na twardościomierzu Shore'a. Wykonano także analizę DSC otrzymanych próbek w celu określenia ich odporności termicznej.

**Wprowadzenie:** Chemia tworzyw sztucznych to stale prężnie rozwijająca się gałąź przemysłu chemicznego. Jest to spowodowane możliwościami uzyskania materiałów, które z powodzeniem zastępują materiały droższe, bądź trudniejsze w przeróbce. Poza tym liczba modyfikacji różnych polimerów stwarza niemal nieograniczoną liczbę związków nadających się do otrzymania tworzyw będących użytecznymi w każdej możliwej sferze przemysłu, a przez co w życiu codziennym. Jedną z metod modyfikacji istniejących już polimerów, bądź tworzyw jest projektowanie różnego rodzaju połączeń, jak np. kompozyty czy blendy polimerowe. Są to mieszanki polimerów, w których główną fazą jest polimer bądź kopolimer, natomiast domieszką jest monomer lub polimer, który rozpuszcza się w tej matrycy i poprawia wybrane właściwości kompozycji [1,2].

**Część eksperymentalna:** Przeprowadzono syntezę blend polimerowych na drodze wolnorodnikowej fotopolimeryzacji w masie. W skład kompozycji wchodziły następujące odczynniki:

- ✓ diakrylan glicerolu bisfenolu A (BPA.DA) – główny monomer;
- ✓ N-winylo-2-pirolidon (NVP) – rozpuszczalnik dla polisulfonu oraz drugi monomer;
- ✓ 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (Irgacure® 651) – fotoinicjator;
- ✓ polisulfon bisfenolu A (PSU-BPA) – (dodatek nadający kopolimerowi charakter blendy).



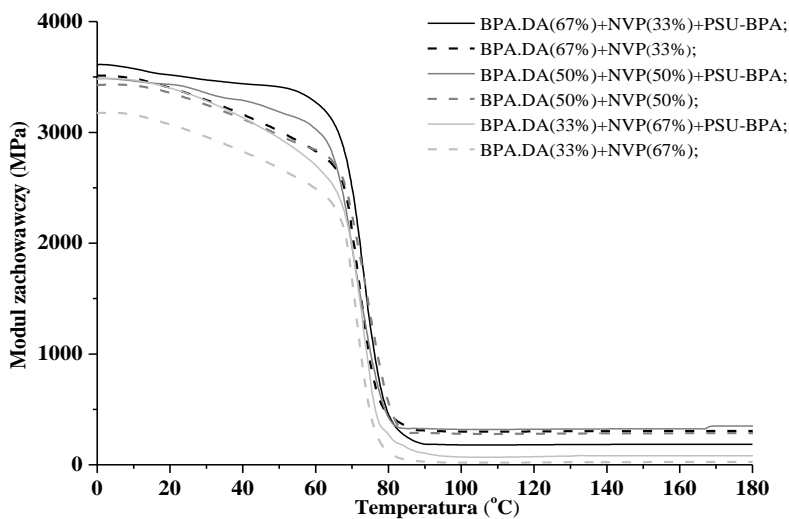
**Rys. 1.** Schemat powstawania rodników inicjujących proces fotopolimeryzacji na skutek fotolizy 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenonu.

Celem pracy było otrzymanie trzech blend polimerowych zawierających 5% wag. PSU-BPA opartych na mieszaninie dwóch monomerów: BPA.DA oraz NVP zmieszanych ze sobą w różnym stosunku wagowym (67:33; 50:50 oraz 33:67). Pierwszym etapem syntezy blend było rozpuszczenie PSU-BPA w obliczonej ilości NVP. Proces ten trwał przez 24 godziny w temperaturze otoczenia w zamkniętym naczyniu. Następnie do powstałego roztworu PSU-BPA dodano ogrzany lekko BPA.DA i po wymieszaniu kompozycji dodano fotoinicjator polimeryzacji w ilości 2% wag. próbki. Mieszaninę po odpowietrzeniu w lekko rozgrzanej suszarce elektrycznej (max. 60°C) przelano do szklanej formy i wstawiono do komory, gdzie podczas dwudziestominutowego naświetlania promieniami UV prowadzona była fotopolimeryzacja. W ten sposób w celu porównania wybranych właściwości zsyntezowano trzy próbki blend oraz trzy próbki matryc polimerowych, które nie zawierały polisulfonu. Tabela 1 przedstawia procentowy skład wagowy wszystkich składników w poszczególnych próbkach.

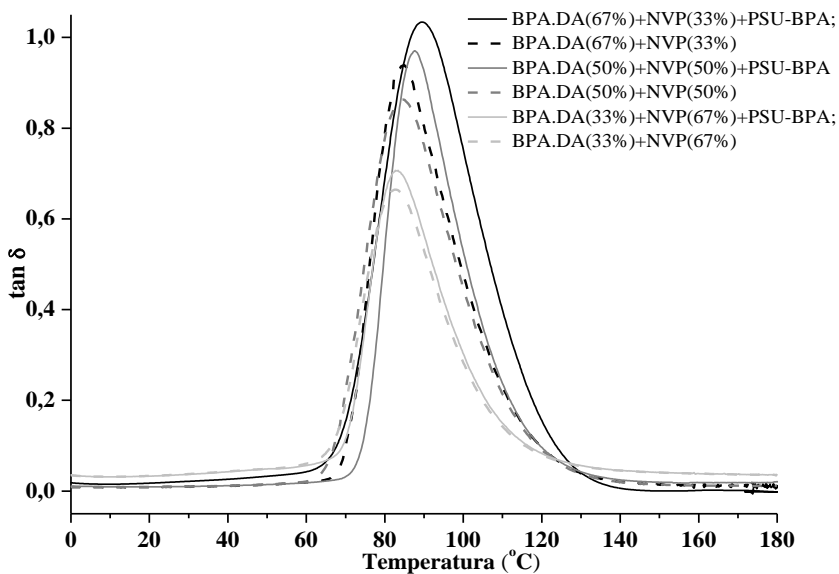
**Tabela 1.** Skład sporządzonych próbek blend i kopolimerów wyrażony w % wagowych.

Symbol próbki	BPA.DA (% wag.)	NVP (% wag.)	PSU-BPA (% wag.)	Irgacure® 651 (% wag.)
1 a	67	33	5	2
1 b	67	33	0	2
2 a	50	50	5	2
2 b	50	50	0	2
3 a	33	67	5	2
3 b	33	67	0	2

**Wyniki:** Dynamiczną analizę mechaniczną (DMA) wykonano przy użyciu aparatu DMA Q800 firmy T.A. Twardości próbek zostały porównane z wykorzystaniem twardościomierza Shore'a (Zwick). Analiza DSC wykonana została na różnicowym kalorymetrze skaningowym 204 F1 Phoenix (Netzsch) w atmosferze argonu.



Rys. 2. Modul zachowawczy dla otrzymanych próbek blend w funkcji temperatury.



Rys. 3. Krzywe tangensa  $\delta$  otrzymanych blend w funkcji temperatury.

Tabela 2. Wyniki dynamicznej analizy mechanicznej i pomiaru twardości próbek.

Symbol próbki	$T_g$ (°C)	$\text{tg } \delta_{\text{max}}$	Twardość (°Sh)
1 a	89.5	1.034	81
1 b	85	0.940	80
2 a	87.6	0.971	77

2 b	84.4	0.863	75
3 a	83.4	0.706	71
3 b	82.7	0.665	67

Wyniki analizy DMA przedstawione są na Rys 1 oraz 2, a także w Tabeli 1. Przebieg krzywych ukazujących zmianę modułów zachowawczych pokazuje, że najszybszy spadek tego parametru jest odnotowany dla próbek zawierających 33% wag. NVP i 67% wag. BPA.DA. W każdej parze próbek moduł zachowawczy jest wyższy dla blend niż dla ich odpowiedników bez polisulfonu. Po osiągnięciu temp. zeszklenia przez każdy materiał na krzywych modułu zachowawczego obserwuje się plateau. Rysunek 1 ilustruje krzywe  $\tan \delta$  dla trzech blend oraz odpowiadających im trzech kopolimerów. Temperatura, dla której zanotowano  $\max \tan \delta$  odpowiada temperaturze zeszklenia ( $T_g$ ), natomiast maksymalna wartość  $\tan \delta$  jest określona jako współczynnik tłumienia materiału [3]. Zarówno temperatura zeszklenia jak i  $\tan \delta_{\max}$  przejawia taką samą tendencję jak moduł zachowawczy próbek, tzn. największe wartości tych parametrów obserwowane są dla próbek o składzie: 67% wag. BPA.DA i 33% wag. NVP, a najmniejsze dla próbek o przeciwnym stosunku wagowym monomerów. Dodatek polisulfonu do każdej próbki wpływa na wzrost omawianych parametrów. Wartości współczynnika tłumienia zawierają się w przedziale: 0.665 – 1.034, natomiast zakres temperaturowy  $T_g$  wynosi od 82.7 do 89.5°C. Twardość próbek została obliczona jako średnia wartość z pięciu pomiarów wykonanych na twardościomierzu. Próbka 67% BPA.DA + 33% NVP + 5% PSU-BPA jest najtwardsza, z kolei najmniejszą twardością cechuje się próbka o składzie 33% BPA.DA + 67% NVP. Tabela 1 przedstawia wartości maksimów efektów endotermicznych na krzywych DSC odpowiadających maksymalnym temperaturom rozkładu. Dane zawarte w tabeli pokazują, że dodatek PSU-BPA przesunął wartości  $T_d$  w kierunku wyższych temperatur.

**Wnioski:** W artykule omówiono wybrane właściwości trzech blend polimerowych zawierających polisulfon aromatyczny rozproszony w matrycach polimerowych różniących się między sobą stosunkiem masowym rozpuszczalnika aktywnego i żywicy akrylowej. Próbki otrzymano przy pomocy polimeryzacji fotoinicjowanej. Dane uzyskane podczas analizy DMA potwierdzają, że domieszka w postaci 5% wag. PSU.BPA wpływa na poprawę wybranych właściwości próbek. Obserwuje się wyższe wartości  $\tan \delta$  oraz wyższe wartości temperatur zeszklenia niż w przypadku próbek bez polisulfonu. Taką samą zależność obserwuje się w przypadku analizy DSC, gdzie zauważamy, że dodatek polisulfonu zwiększa opór cieplny próbki. Poza tym poprawa omawianych parametrów jest zauważalna dla próbek, w których udział BPA.DA w składzie chemicznym jest większy niż udział NVP. Podsumowując, dodanie nawet niewielkiej ilości związku chemicznego z rodziny polimerów siarkowych jakim jest polisulfon pozwala na otrzymanie materiałów o znacznie lepszych parametrach, a przez to szerszym spektrum wykorzystania.

#### Literatura:

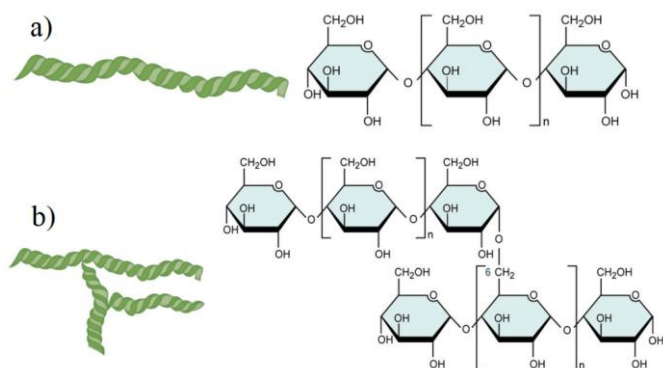
1. A. Bartnicki, M. Gargol, B. Podkościelna, J. Nowak, B. Gawdzik, Proceeding of SPIE 10830A, (2018).
2. M.T. De Meuse, High Temperature Polymer Blend, Woodhead Publishing, (2014) 165.
3. P. Pączkowski, A. Puszka, B. Gawdzik, Green Polymers, 12 (2020) 2966.

## SYNTEZA KOMPOZYTÓW POLIMEROWYCH Z DODATKIEM SKROBI

**K. SOWA, B. PODKOŚCIELNA**, UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin.

**Abstrakt:** Celem pracy była synteza i optymalizacja procesu tworzenia biodegradowalnych kompozytów polimerowych poprzez dodatek oraz zmianę ilości biowypełniacza – w postaci skrobi. Kompozyt polimerowy składał się z dimetakrylanu glikolu trietylenowego (TEGDMA) oraz metakrylanu metylu (MMA) w stosunku wagowym 7:3 oraz inicjatora UV. Dokonano porównania wyraźnych cech materiału przy użyciu mikroskopu optycznego oraz zbadano twardość otrzymanych kompozytów za pomocą metody Shore’a. W celu potwierdzenia prawidłowej budowy chemicznej biokompozytów dla każdej z syntez przeprowadzono analizę ATR/FTIR.

**Wprowadzenie:** Skrobia jest polisacharydem, który występuje we wszystkich organizmach roślinnych. Złożona jest ona z łańcuchów reszt glukozy, które połączone są wiązaniami glikozydowymi. W jej składzie dominują dwa polisacharydy tj. amyloza i amylopektyna (Rys. 1). Różnią się one zarówno właściwościami, jak i budową. Amylopektyna posiada właściwości klejotwórcze, a pod wpływem jodu zabarwia się na kolor jasnofioletowy, natomiast amyloza tworzy z nim ciemnoniebieskie kompleksy. Skrobia pełni bardzo ważne funkcje dla naszych organizmów, dlatego też zaliczana jest do błonnika pokarmowego. W celu zwiększenia jej potencjalnych zastosowań stosuje się różne modyfikacje, które polepszają jej właściwości [1].

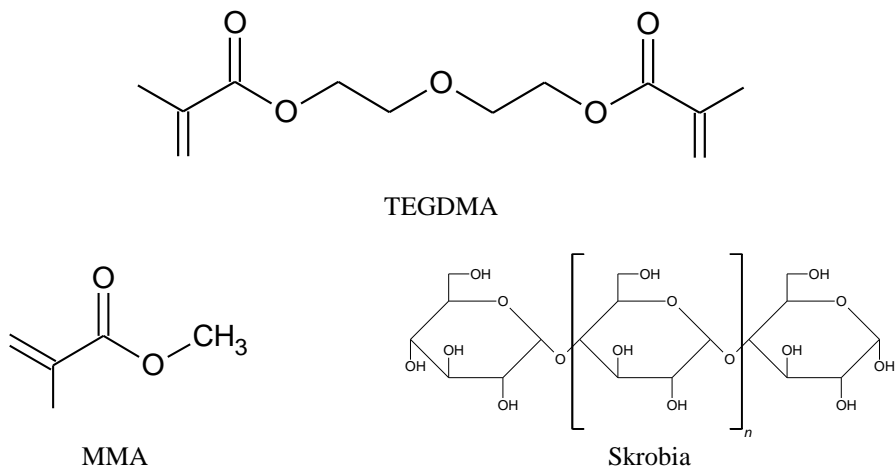


**Rys. 1.** Struktura budowy amylozy (a) i amylopektyny (b) [2].

Ten naturalny polimer jest wytwarzany przez naturę a więc jest odtwarzalny i szeroko dostępny. Możemy go stosować jako dodatki w różnych materiałach polimerowych, w tym kompozytach, w celu zwiększenia ich biodegradowalności. Zadawalającym efektem stosowania takich odtwarzalnych materiałów w polimerach jest ograniczenie uwalniania pierwiastków chemicznych lub gazów do atmosfery,

a także rozkładanie tworzyw przez mikroorganizmy. Reasumując, takie zastosowanie rozwiązuje problem związany z zagospodarowaniem tworzyw sztucznych, które zostały już zużyte [3].

### Część eksperymentalna:



Rys. 2. Wzory strukturalne TEGDMA, MMA i skrobi.

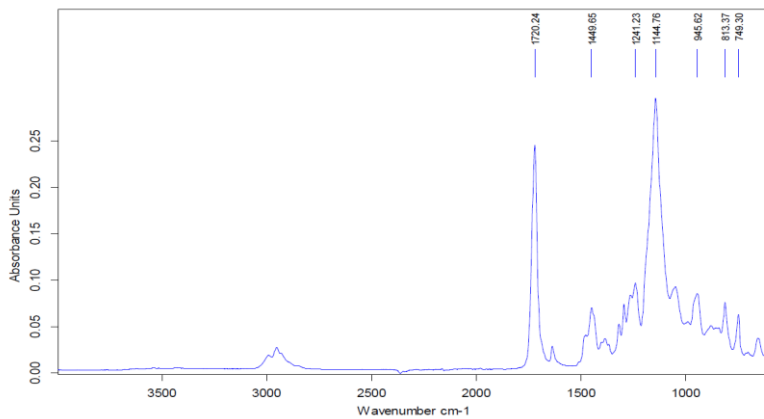
W pierwszym etapie eksperymentu otrzymano biokompozyty przy użyciu inicjatora UV z dimetakrylanu glikolu trietylenowego w charakterze monomeru sieciującego, metakrylanu metyłu i inicjatora oraz z dodatkiem różnej ilości skrobi: 0%, 5%, 10%, 20%, 50% oraz 100% wagowych. Na Rys. 3 przedstawione są próbki biokompozytów otrzymane przy użyciu polimeryzacji w bloku o wymiarach 1 na 6 cm.



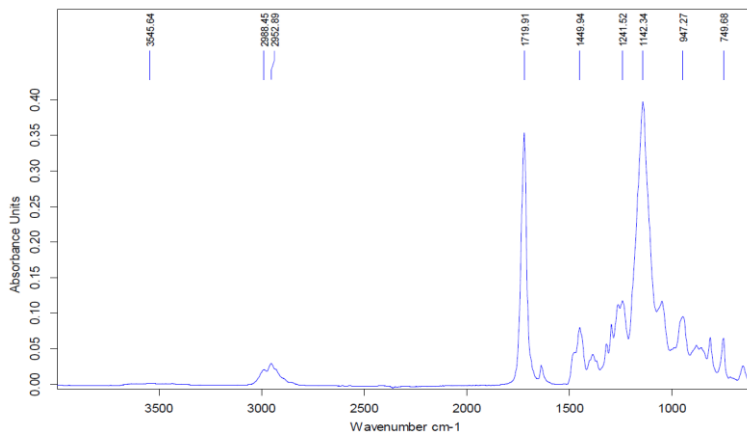
Rys. 3. Zdjęcie otrzymanych kompozytów na bazie TEGDMA + MMA z różną zawartością % skrobi.

Następnie dokonano charakterystyki wybranych właściwości otrzymanych biokompozytów. Analizę twardości w skali Shore'a wykonano za pomocą twardościomierza Firmy Hildebrand w Laboratorium Katedry Chemii Polimerów UMCS. Analizę ATR/FTIR przeprowadzono przy zastosowaniu Spektrofotometru TGA-IR TENSOR 27 (Bruker).

**Wyniki:**



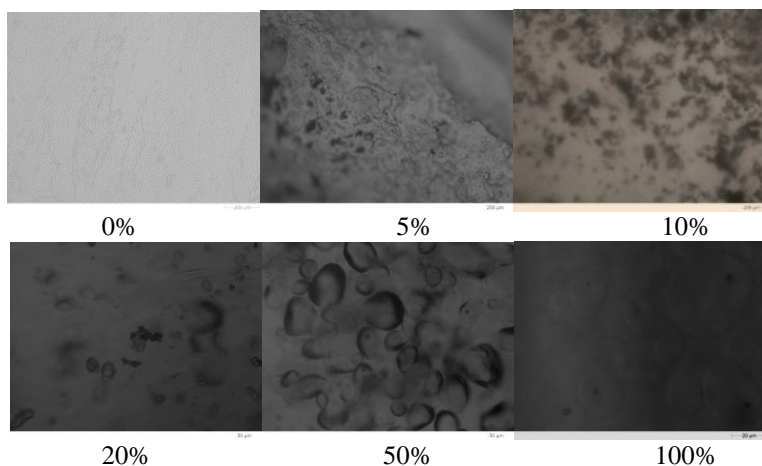
a) 0% skrobi



b) 100% skrobi

**Rys. 4.** Widma ATR-FTIR wybranych materiałów.

Widma ATR/FTIR dla wybranych kompozycji przedstawiono na Rysunku 3. FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2988, 2952, 2853, 2951, 2953 (rozciągające C–H grupy metylowych i metylenowych), 1720-1721 (rozciągające C=O grupy estrowej); 1449-1450 ( $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$  deformacyjne asymetryczne); 1241 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  deformacyjne nie w płaszczyźnie); 946, 813, 951 ( $=\text{C}-\text{H}$  deformacyjne nie w płaszczyźnie); 749-750 ( $-\text{CH}_2-$  deformacyjne nie w płaszczyźnie). Na Rysunku 4 przedstawiono zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu optycznego Malvern Morphologi G3 (W. Brytania). Zdjęcia uszeregowano wraz ze wzrastającym procentem wagowym skrobi. Wraz ze zwiększającą się ilością biopolimeru (skrobi) materiał kompozytowy stawał się coraz mniej przezroczysty. W Tabeli 1 przedstawione są wyniki twardości dla badanych materiałów. Dodatek skrobi nieznacznie obniżał twardość biokompozytów.



**Rys. 5.** Zdjęcia kompozytów TEGDMA + MMA + skrobia.

**Tabela 1.** Twardość otrzymanych kompozytów.

Zawartość skrobi [%]	Twardość (°Sh) w skali D
0	86,1
5	86,0
10	86,4
20	85,6
50	83,6
100	82,8

**Wnioski:** W wyniku polimeryzacji UV otrzymano biodegradowalne i nietoksyczne biokompozyty z dodatkiem skrobi. Dokonano oceny wybranych właściwości biokompozytów w zależności od ilości biododatku. Na podstawie analizy ATR-FTIR stwierdzono, iż widma mają podobny przebieg, a dodatek skrobi zwiększał nieznacznie intensywność sygnałów grup -OH. W miarę dodawania skrobi nieznacznie obniżała się twardość materiałów kompozytowych. W końcowym efekcie otrzymano biokompozyt, który jest bardziej przyjazny dla środowiska ponieważ zawiera odnawialny i niedrogi wypełniacz. Dodatkowo, zastosowane monomery są alifatycznymi pochodnymi nie zawierającymi pierścieni aromatycznych w swojej budowie, co dodatkowo zwiększa atrakcyjność zaproponowanych materiałów do zastosowań biomedycznych.

#### Literatura:

1. W. Leszczyński, Skrobia - surowiec przemysłowy, budowa i właściwości. Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza we Wrocławiu, 2004.
2. <https://futurefoodchemist.weebly.com/amylose-or-amylopectin.html> data pobrania: 10.03.2021.
3. A. Masek, M. Lipińska, M. Zaborski, Biodegradowalne kompozyty polimerowe z surowców odnawialnych. Przetwórstwo Tworzyw. Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej, 5 (2013) 516.



## **WPLYW A-SI NA STABILNOŚĆ WODNYCH SUSPENSJI MONTMORYLONITU I KATIONOWEJ CELULOZY**

**E. GODEK, E. GRZĄDKA**, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Przedmiotem niniejszej pracy była analiza stabilności zdyspergowanych suspensji montmorylonitu metodą spektrofotometryczną. Uzyskane wyniki pokazują, że wraz ze wzrostem stężenia kationowej celulozy obserwuje się znaczny wzrost stabilności układu. Zaobserwowano także, że dodatek anionowego surfaktantu A-Si powoduje destabilizację układu.

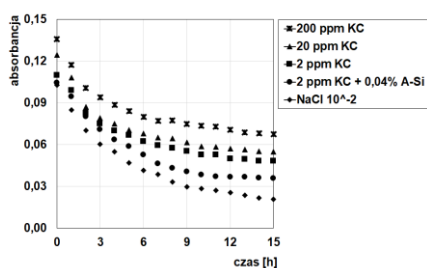
**Wprowadzenie:** Montmorylonit (MMT) jest naturalnym minerałem ilastym z grupy smektytu należących do klasy krzemianów warstwowych. Jest to uwodniony krzemian glinu, magnezu i sodu o wzorze chemicznym  $Al_2O_3 \cdot SiO_2 \cdot nH_2O$ . Ten minerał to imponujące bogactwo różnych pierwiastków [1]. Montmorylonit dzięki swojej trójwarstwowej budowie i niezliczonej ilości porów poprawia jakość wody [2], absorbuje substancje organiczne oraz ma bardzo dużą zdolność wymiany kationowej [3]. Doskonale nadaje się też do usuwania metali ciężkich. Dane literaturowe zawierają znikome informacje na temat badań właściwości stabilizacyjno-flokulacyjnych i adsorpcyjnych na powierzchni montmorylonitu. Badano jedynie optymalizację warunków adsorpcji  $CO_2$  ze spalin na powierzchni montmorylonitu [4]. Oceniano też kinetykę i izotermę adsorpcji Cu(II) przez magnetyczne nanokompozyty montmorylonitu [5]. Kationowa celuloza (KC) to rozpuszczalna w wodzie czwartorzędowa pochodna amoniowo-celulozowa. Substancja ta należy do bopolisacharydów. Kationowa celuloza znajduje szereg zastosowań w przemyśle kosmetycznym. Są to między innymi preparaty do włosów i skóry, a zwłaszcza odżywki. KC można stosować jako zagęszczacz, utrwalacz, emulgator lub dodatek do preparatach na włosy w celu polepszenia rozczesywania, podatności na układanie, utrwalania skrętu, odporności na wilgoć i wiązania składników z keratyną. W porównaniu z istniejącymi na rynku środkami, związek ten ma lepsze właściwości mechaniczne, zdecydowanie łatwiej reaguje z surfaktantami, a także ma lepszą stabilność temperaturową [6]. Dane literaturowe nie zawierają wiele informacji na temat badań właściwości tego związku pod kątem właściwości stabilizacyjno-flokulacyjnych suspensji minerałów ilastych. Przeprowadzono badania, podczas których KC była używana jako flokulant do pozyskiwania mikroalg jako alternatywa dla chitozanu, który jest drogi [7]. Badano również zdolności flokulacyjne KC z użyciem kaolinu. Badania wykazują, że KC może być stosowana jako flokulant w procesie oczyszczania ścieków [8]. Silphos A-100 (A-Si) jest anionowym środkiem powierzchniowo czynnym. Należy do grupy silikonowych estrów fosforanowych. Ze względu na swój anionowy charakter A-Si znajduje zastosowanie w sekwestrowaniu żelaza i innych jonów metali oraz wykazuje dobre właściwości jako inhibitor rdzy. Ponadto silphos®A-100 zapewnia czyszczenie i połysk twardych powierzchni. Można również dodawać go do szamponów, aby nadać włosom kondycję i połysk, a także wykorzystywać w preparatach do higieny osobistej (mydło do twarzy) [9]. Układy koloidalne zawierające zdyspergowane minerały ilaste mogłyby znaleźć wiele potencjalnych

zastosowań w przemyśle np.: kosmetycznym, ale niestety nie są długotrwale stabilne [10]. Rozwiązaniem tego problemu może być dodanie do układu substancji o dużej masie cząsteczkowej [11]. Polimery mogą powodować stabilizację i flokulację układu, a zależne jest to od charakteru chemicznego związku wielko-cząsteczkowego, jego stężenia, a także masy cząsteczkowej. Wyróżnia się stabilizację steryczną, zubożeniową i elektrosteryczną oraz flokulację mostkową i zubożeniową [12]. Najpopularniejszymi metodami analitycznymi stosowanymi do badania wpływu substancji organicznych na stabilność układów koloidalnych są turbidymetria (pomiar polega na określeniu zależności między ilością światła emitowanego przez źródło, a ilością światła docierającego do detektora po przejściu przez badany układ), spektrofotometria (technika ta opiera się na badaniu oddziaływań między wiązką światła a materią, a zasadą tej metody jest pomiar intensywności światła przed i po przejściu przez układ) oraz potencjał dzeta (wskaźnik trwałości układu koloidalnego, potencjał występujący na tzn. płaszczynie poślizgu, czyli pomiędzy warstwą sztywną, a warstwą dyfuzyjną układu) [12]. Dane literaturowe nie zawierają wielu informacji odnośnie kationowej celulozy, montmorylonitu i A-Si, dlatego też jest to temat, którym warto się zainteresować, ponieważ układ ten ma wysoki potencjał aplikacyjny w przemyśle.

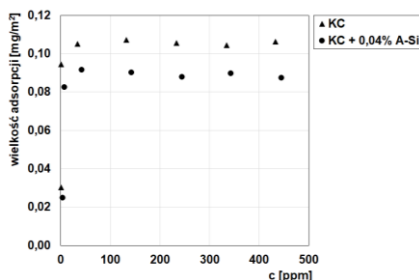
**Część eksperymentalna:** Zbadano wpływ biopolisacharydu - kationowej celulozy z dodatkiem anionowego surfaktantu A-Si na stabilność wodnych suspensji montmorylonitu metodą spektrofotometryczną UV-VIS. Mechanizm stabilności określono na podstawie badań adsorpcyjnych. Dodatkowo w celu zbadania oddziaływań pomiędzy polimerem a surfaktantem przeprowadzono pomiary potencjału dzeta i napięcia powierzchniowego.

**Wyniki:** Rys. 1 przedstawia wpływ stężenia KC na stabilność wodnej suspensji montmorylonitu. Absorbancja układu została przedstawiona w funkcji czasu. Z wykresu wynika, że suspensja montmorylonitu bez dodatku biopolisacharydu jest całkowicie niestabilna, o czym świadczą małe wartości absorbancji i jej gwałtowny spadek w czasie. Cząstki ciała stałego niestabilizowane przez polimer łatwo ulegają sedymentacji pod wpływem siły ciężkości. Dodatek związku cząsteczkowego do układu może rozwiązać ten problem. Z wykresu wynika, że wraz ze wzrostem stężenia KC wzrasta stabilność suspensji montmorylonitu, czego powodem jest efektywna adsorpcja KC na powierzchni MMT. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem odpowiedzialnym za stabilność układu jest stabilizacja steryczna, która wynika z występowania silnego odpychania pomiędzy cząstkami koloidalnymi, których powierzchnia jest całkowicie pokryta polimerem. Kationowa celuloza posiada również dodatnio naładowane grupy powierzchniowe, więc podczas adsorpcji na ujemnie naładowanej powierzchni montmorylonitu, stabilizacji przestrzennej towarzyszy efekt elektrostatyczny, wskutek czego następuje stabilizacja elektrosteryczna. Dodatek surfaktantu A-Si powoduje spadek stabilności wskutek bardzo silnych oddziaływań pomiędzy ujemnie naładowanym surfaktantem a dodatnio naładowanym polimerem. Oddziaływania pomiędzy dwoma adsorbatami są znacznie silniejsze niż pomiędzy adsorbentem i adsorbentem, czego potwierdzeniem jest spadek wielkości adsorpcji KC w obecności A-Si. Największą stabilność układu uzyskano przy stężeniu KC wynoszącym 200 ppm. Rys. 2

przedstawia wielkość adsorpcji KC pod nieobecność i w obecności A-Si na powierzchni MMT. Z wykresu wynika, że sama KC bardzo dobrze adsorbuje się na powierzchni MMT, a plateau adsorpcyjne ustala się szybko i wynosi około 0,1 mg/m<sup>2</sup>. Dodatek surfaktantu do układu powoduje spadek wielkości adsorpcji wskutek tworzenia się bardzo silnych kompleksów polimer-surfaktant. Dwa adsorbaty oddziałują ze sobą silniej niż w przypadku oddziaływania adsorbatu z adsorbentem, dzięki czemu kompleksy KC-A-Si niechętnie adsorbują się na powierzchni MMT tylko pozostają w głębi roztworu. Potwierdzeniem silnych oddziaływań polimer-surfaktant i tworzenia się kompleksów są wyniki pomiarów napięcia powierzchniowego i potencjału dzeta układu polimer-surfaktant.

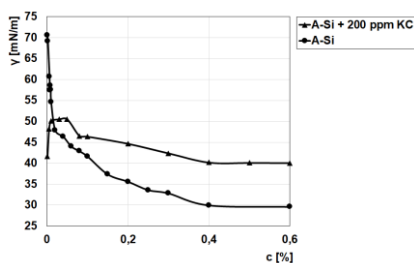


**Rys. 1.** Wpływ stężenia kationowej celulozy na stabilność wodnej suspensji montmorylonitu (0,005g), 0,01 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, pH = 7.

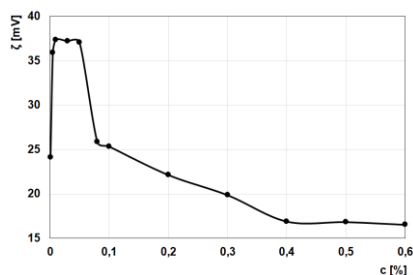


**Rys. 2.** Wielkość adsorpcji kationowej celulozy z dodatkiem A-Si (0,04%) na powierzchni montmorylonitu, 0,01 mol/dm<sup>3</sup> NaCl.

Rys. 3 przedstawia wpływ kationowej celulozy (200 ppm) na napięcie powierzchniowe A-Si. Z wykresu wynika, że w przypadku wodnego roztworu surfaktantu obserwuje się spadek napięcia powierzchniowego wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu aż do krytycznego stężenia micelizacji (CMC), którego wartość wynosi około 0,4%. W przypadku dodania do roztworu surfaktantu substancji wielkocząsteczkowej KC, następują silne oddziaływania wynikające z przyciągania pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi anionowego środka powierzchniowo czynnego z dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi kationowego polimeru, czego wynikiem jest tworzenie się międzycząsteczkowych kompleksów polimer-surfaktant, dlatego też przebieg izotermy napięcia powierzchniowego A-Si od stężenia surfaktantu w obecności KC jest zupełnie inny od przebiegu obserwowanego pod nieobecność polimeru. Rys. 4 przedstawia wpływ A-Si na potencjał dzeta kationowej celulozy (200 ppm). Wartości potencjału dzeta dla czystego roztworu KC wynosi 35 mV. Po dodaniu anionowego surfaktantu A-Si, wraz ze wzrostem stężenia następuje zobojętnianie ładunku i spadek wartości potencjału dzeta. W początkowych stężeniach obserwuje się drastyczny wzrost potencjału dzeta, analogicznie do pomiarów napięcia powierzchniowego, co może oznaczać bardzo silne oddziaływania pomiędzy polimerem i surfaktantem, a także tworzenie się kompleksów międzycząsteczkowych. Kompleksy te mają potencjał dodatni. W okolicach stężenia odpowiadającego wartości CMC dla A-Si nie obserwuje się już zmian potencjału dzeta badanego układu.



Rys. 3. Wpływ kationowej celulozy (200 ppm) na napięcie powierzchniowe A-Si.



Rys. 4. Wpływ A-Si na potencjał dzeta kationowej celulozy (200 ppm).

**Wnioski:** Kationowa celuloza ma właściwości stabilizujące i może być stosowana jako stabilizator wodnych suspensji montmorylonitu. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem odpowiedzialnym za stabilność układu jest stabilizacja elektrosteryczna, wynikająca z adsorpcji KC na powierzchni MMT. A-Si powoduje destabilizację układu wskutek silnych oddziaływań pomiędzy polimerem i surfaktantem w porównaniu z oddziaływaniami pomiędzy polimerem a adsorbentem. Potwierdzeniem powstawania kompleksów polimer-surfaktant są wyniki pomiarów napięcia powierzchniowego i potencjału dzeta.

### Literatura:

1. J.B. Dixon, D.G. Schulze, Soil mineralogy with environmental applications, Madison, WI: Soil Science Society of America, Washington, (2002).
2. K. Song, G. Sandí, Clays and Clay Minerals, 49 (2001) 119.
3. H. Wan, C. Yan, H. Xiong, G. Chen, N. Zhang, Y. Cao, X. Liu, Applied Clay Science, 194 (2020) 105695.
4. M. Khajeh, A. Ghaemi, Journal of Environmental Chemical Engineering, 8 (2020) 103663.
5. I. Fatimah, P.W. Citradewi, G. Fadillah, I. Sahroni, G. Purwianondo, R. Dong, Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(1) (2021) 10496.
6. A. M. Manuszak-Guerrini, B. Rouge, D.A. Culberson, P. Fla., W. H. Daly, Patent number: 6 071 505, United States, (2000).
7. J. Blockx, V. S. Eyley, O. Deschaume, C. Bartic, K. Muylaert, W. Thielemans, Langmuir, 23(3) (2007) 1081.
8. L. Yan, H. Tao, P.R. Banga, Clean, 37(1) (2009) 39.
9. <https://www.knowde.com/stores/siltech/products/silphos-a-100>
10. T. Sato, R. Ruch, Stabilization of colloidal dispersion by polymer adsorption, Marcel Dekker Inc., New York, (1980).
11. E. Grządka, B. Mendrek, M. Wiśniewska, S. Chibowski, B. Trzebicka, Materials Chemistry and Physics, 144 (2014) 361.
12. E. Grządka, Właściwości adsorpcyjne i elektrokinetyczne oraz stabilność układów sacharyd/surfaktant/tlenek metalu (rozprawa habilitacyjna), Uniwersytet Marii Skłodowskiej-Curie, Lublin, (2016).

## ZASTOSOWANIE POEKSTRAKCYJNEGO SUSZU KONOPNEGO (*CANNABIS SATIVA*) DO OTRZYMYWANIA KOMPOZYTÓW POLIMEROW TERMOPLASTYCZNYCH

**J. KRZESZOWIAK, A. PUSZKA**, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów, Gliniana 33, 20-614 Lublin.

**Abstrakt:** W pracy tej przedstawiono sposób otrzymywania kompozytów tworzyw termoplastycznych, tj. polietylenu o małej gęstości (LDPE), polipropylenu (PP) oraz polilaktydu (PLA) i poekstrakcyjnego suszu konopnego (*Cannabis Sativa*). Metodą wtrysku otrzymano kompozyty polimerów z biowypełniaczem w ilości 1, 2, 5 10 i 20% wagowych. Dla uzyskanych materiałów kompozytowych określono skurcz przetwórczy, twardość oraz zbadano podstawowe właściwości mechaniczne.

**Wprowadzenie:** Biokompozytami nazywamy kompozyty polimerowe, w których choć jeden ze składników jest biopochodny lub biodegradowalny. Ze względu na coraz to większą świadomość ekologiczną populacji oraz cechy tychże materiałów, takie jak biodegradowalność tworzyw czy znacznie uproszczony proces recyklingu [1], w ostatnich latach biokompozyty stały się atrakcyjnym przedmiotem badań naukowców. Ze względu na niską cenę, dużą dostępność oraz odnawialny charakter włókien naturalnych, w ostatnich latach stały się one jednym z najbardziej popularnych i najczęściej stosowanych komponentów do produkcji polimerowych materiałów kompozytowych. Z racji swoich niezwykle korzystnych właściwości mechanicznych, naturalne włókna zawarte w roślinnych wypełniaczach zaczęto rozważać jako alternatywa dla powszechnie stosowanych nieodnawialnych materiałów, jak choćby włókna szklane czy węglowe. Zastosowanie biokompozytów możemy znaleźć w wielu sektorach gospodarki jak budownictwo, przemysł żywnościowy, motoryzacyjny czy zbrojny. Szczególnie ciekawym przykładem bio-wypełniacza, ze względu na niejednorodność układu, jest konopia włóknista. Biokompozyty konopne używane są w produkcji materiałów budowlanych, m.in. płyt izolacyjnych, a układ polipropylen/*Cannabis Sativa* znalazł zastosowanie w wyrobie części samochodowych [2]. Analizując strukturę, naturalne włókna zbudowane są głównie ze związków organicznych, takich jak celuloza czy lignina. Związki te są podatne na działanie wysokiej temperatury, przez co w procesach wytwarzania kompozytów dochodzi do ich degradacji, co wpływa na wytrzymałość układu. Dlatego do produkcji kompozytów z wypełniaczem roślinnym jako matrycę stosuje się polimery termoplastyczne, takie jak polietylen (PE), polipropylen (PP) czy poli(chlorek winylu) (PCW), które cechuje m.in. wysoka wartość masowego wskaźnika szybkości płynięcia a tym samym mała lepkość układu [3]. Z uwagi na fakt, iż stosowane w przetwórstwie tworzywa poliolefinowe mają charakter hydrofobowy a wypełniacze naturalne są na ogół hydrofilowe, w celu poprawy adhezji pomiędzy polimerem a wypełniaczem stosuje się kompatybilizatory, najczęściej jest to PE-*graft*-MA (polietylen-*graft*-bezwodnik maleinowy). Stosowanie kompatybilizatorów polepsza właściwości wyrobów, ale podwyższa cenę gotowego wyrobu. Do tworzyw termoplastycznych możemy zaliczyć również alternatywny do tworzyw pochodzących z przerobu ropy naftowej

biodegradowalny i biopochodny poliester, tj. poli(kwas mlekowy) (polilaktyd – PLA). Jest on coraz częściej używany jako matryca polimerowa do produkcji kompozytów, a niektóre badania pokazują, że otrzymane z niego kompozyty wykazują większą wytrzymałość na rozciąganie oraz sztywność niż analogiczne materiały oparte na PP [4]. Oprócz tworzyw termoplastycznych, jako ośrodki polimerowe stosuje się również materiały chemoutwardzalne, tj. żywice epoksydowe, poliestrowe, czy też fenolowo-formaldehydowe. Celem tej pracy było zastosowanie poekstrakcyjnego suszu konopnego jako bio-wypełniacza w kompozytach tworzyw termoplastycznych, tj. PE, PP i PLA. W pracy skupiono się na opracowaniu odpowiedniej technologii procesu wtrysku mieszanek polimer-wypełniacz oraz określeniu całkowitego skurczu wytworzonych wyprasek. Ważnym aspektem badań było ocenienie, czy uniknięcie stosowania kompatybilizatora, tj. PE-*graft*-MA, pozwoli uzyskać kompozyty o korzystnych właściwościach mechanicznych.

**Część eksperymentalna:** Kompozyty o zawartości 1, 2, 5, 10 i 20% wag. wypełniacza przygotowano metodą wtrysku, otrzymując kształtki w postaci wiosełek (Rys.1).



**Rys. 1.** Wygląd kompozytów o zawartości 20% wag wypełniacza.

Jako matryce polimerowe stosowano:

- PE – polietylen małej gęstości MALEN E FABS 23-D022 (Lyondell Basell Orlen Polyolefins),
- PP – polipropylen MOPLen EP448S (Lyondell Basell Orlen Polyolefins),
- PLA – polilaktyd, Ingeo™ 4060D (Nature Works LCC).

**Tabela 1.** Parametry procesu wtrysku.

Matryca polimerowa	Temperatura cylindra (°C)	Temperatura formy (°C)	Czas wtrysku (s)	Siła wtrysku (N)
PE	180	50	25	9000
PP	250	75	25	10000
PLA	220	50	30	11000

Tworzywa polimerowe przed przygotowaniem kompozytów były suszone, zgodnie z zaleceniami producentów. Stosowanym bio-wypełniaczem był susz konopi siewnej, będący odpadem po ekstrakcji, który przed procesem wtrysku został rozdrobniony mechanicznie w młynku analitycznym IKA A11 Basic. Kształtki do badań z kompozytów polimerowych zostały przygotowane przy użyciu wtryskarki laboratoryjnej IM-15 Zamak Mercator, wyposażonej w cylindryczny system uplastyczniania. Odpowiednie mieszanki tworzywa i wypełniacza przed umieszczeniem w cylindrze, wymieszano wstępnie mechanicznie w zlewce.

**Wyniki:** Dla otrzymanych wyprasek, stosując poniższe wzory, wyznaczono całkowite skurcze przetwórcze, tj. liniowy skurcz przetwórczy w kierunku równoległym do kierunku wtrysku ( $S_{równ.}$ )

$$S_{równ.} = \frac{L_f - L_w}{L_f} * 100\% \quad S_{prost.} = \frac{b_f - b_w}{b_f} * 100\%$$

gdzie:

$S_{równ.}$  - liniowy skurcz w kierunku równoległym do kierunku wtrysku

$L_w$  - długość wypraski (mm)

$L_f$  - odpowiednik  $L_w$  w gnieździe formującym (mm)

Oznaczono także twardość Shore'a według skali D, a także właściwości mechaniczne przy statycznym rozciąganiu. Wyniki obliczono jako wartość średnią z pięciu analiz, przy czym określenie wymiarów kształtek oraz poszczególne badania wykonano po 30 dniach od procesu wtrysku.

**Tabela 2.** Wartości skurczy przetwórczych otrzymanych materiałów, twardość oraz właściwości mechaniczne badanych materiałów.

Material	$S_{równ.}$ (%)	Twardość Shore'a (skala D)	Wytrzymałość na rozciąganie (MPa)	Wydłużenie przy zerwaniu (%)	Moduł Younga (MPa)
PE	2,78	40,2	16,66	84,90	33,89
PE + 1%	2,78	41,8	16,95	56,88	39,06
PE + 2%	2,78	41,6	16,90	54,92	40,25
PE + 5%	2,78	43,2	16,65	27,05	44,04
PE + 10%	3,05	44,0	14,45	21,67	39,66
PE + 20%	3,33	44,0	11,96	20,54	32,59
PP	1,38	63,6	38,03	13,62	296,69
PP + 1%	2,22	64,2	35,51	7,46	329,89
PP + 2%	2,22	64,3	34,64	5,83	343,62
PP + 5%	2,22	67,6	31,81	4,92	343,46
PP + 10%	2,22	66,2	30,18	4,44	360,55
PP + 20%	2,22	65,2	25,40	3,10	335,67
PLA	0,27	75,4	67,52	3,85	568,19
PLA + 1%	0,42	76,2	64,86	3,28	563,24
PLA + 2%	0,69	75,8	62,58	2,69	537,86

PLA + 5%	0,72	75,0	50,89	2,37	509,01
PLA + 10%	0,72	76,6	41,66	2,04	478,67
PLA + 20%	0,72	75,4	37,58	2,02	482,17

Analizując wpływ dodatku bio-wypełniacza do matrycy polimerowej na skurcz przetwórczy można stwierdzić, iż na ogół dodanie wypełniacza powodowało zwiększenie skurczu wypraski, wyjątek stanowiła seria materiałów z PE, w której zwiększenie skurczu zaobserwowano dla kompozytu z 10% wag. zawartością bio-wypełniacza. W przypadku kompozytów z PP jako osnową polimerową, zmiana zawartości bio-wypełniacza nie wpływała na wartość skurczu przetwórczego. Największe względne zmiany skurczu zaobserwowano dla kompozytów otrzymanych z PLA. Większe wartości skurczu tworzyw termoplastycznych krystalicznych (PE i PP) niż amorficznych (PLA) wynikają ze znanego zjawiska gęstszego upakowania makrocząsteczek struktury krystalicznej, zachodzącego podczas procesu krystalizacji. Generalnie, twardość otrzymanych kompozytów zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości bio-wypełniacza w kompozytach z tworzyw poliolefinowych, natomiast w przypadku PLA wyraźnej zależności twardości od składu kompozytu nie zauważono. Badania wytrzymałościowe uzyskanych wyprasek pokazały, iż wraz ze zwiększaniem zawartości bio-wypełniacza zmniejszało się wydłużenie przy zerwaniu, w przypadku kompozytów z 20% wag. suszu nawet niemalże 4-krotnie (dla tworzyw poliolefinowych) i 2-krotnie dla PLA w stosunku do czystego polimeru. Właściwości mechaniczne kompozytów opartych na tworzywach poliolefinowych zmieniały się w sposób niejednorodny, wynikający głównie z charakteru chemicznego osnowy polimerowej. W przypadku amorficznego PLA, dodatek suszu obniżał wytrzymałość na rozciąganie, wydłużenie przy zerwaniu i moduł Younga. Pogorszenie parametrów wytrzymałościowych w otrzymanych kompozytach wynikał z faktu, iż susz konopny nie jest wypełniaczem mającym charakter wzmacniający uzyskiwanego materiału. Naszym celem było to, aby dodatek suszu zwiększał biodegradowalność kompozytów tworzyw olefinowych a także obniżał cenę wyrobu opartego na biodegradowalnym PLA.

**Wnioski:** Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, iż prawidłowe zaplanowanie technologii procesu wytwarzania kompozytów tworzyw termoplastycznych przy zastosowaniu odpadowego poekstrakcyjnego suszu konopnego jest jak najbardziej możliwe. Uzyskane wyniki badań skurczu oraz właściwości wytrzymałościowych pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Dodatek bio-wypełniacza w postaci suszu konopnego do polimeru wpływa na zwiększenie skurczu przetwórczego wytworzonego wyrobu,
- Wraz ze wzrostem zawartości suszu konopnego w kompozycie otrzymanym z PE i PP zwiększa się jego twardość,
- Właściwości mechaniczne kompozytów tworzyw olefinowych (PE i PP) zmieniały się w sposób niesystematyczny,
- Dodatek suszu konopnego do PLA powodował pogorszenie właściwości mechanicznych otrzymanych kompozytów.
-



**Literatura:**

1. S.Th. Georgopoulos, P.A. Tarantili, E. Avgerinos, A.G. Andreopoulos, E.G. Koukios, *Polymer Degrad. Stab.*, 90 (2005) 303.
2. J. Holbery, D. Houston, *JOM*, 60 (2006) 80.
3. S. Kuciela, *Kompozyty polimerowe na osnowie recyklatów z włóknami naturalnymi*, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Kraków 2010.
4. J. Miedzianowska, M. Masłowski, K. Strzelec, *Technologia i Jakość Wytrobów*, 63 (2018).

## **ZASTOSOWANIE HYDROKSYAPATYTU Z WYBRANYMI PODSTAWIONYMI KATIONAMI Z BLOKÓW ENERGETYCZNYCH s, p, d i f UKŁADU OKRESOWEGO – KRÓTKI PRZEGLĄD**

**A. BIEDRZYCKA, E. BRODA, E. SKWAREK**, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Hydroksyapatyt to popularny minerał, znajdujący zastosowanie w wielu dziedzinach gospodarki, głównie ze względu na korzystne właściwości. Jednakże, nie jest to materiał idealny i odznacza się słabą odpornością mechaniczną. W celu udoskonalenia jego struktury, naukowcy prowadzą szereg badań, w których poszukiwali potencjalnych modyfikacji, mogących przyczynić się do poprawienia jego właściwości. Dużą szansą na zniwelowanie negatywnych aspektów jest domieszkowanie hydroksyapatytu innymi pierwiastkami. Takie rozwiązania znalazły wiele zastosowań w przeróżnych dziedzinach gospodarki, a przede wszystkim w ortopedii, co zdecydowanie polepsza jakość wykonywanych zabiegów i usług.

**Wprowadzenie:** Hydroksyapatyt jest minerałem zbudowanym głównie z atomów wapnia i fosforu. Należy do rodziny apatytów. Jego wzór chemiczny przedstawia się następująco  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Związek ten charakteryzuje się białą barwą, a jego masa molowa równa jest 502, 31 g/ mol. Stosunek molowy Ca/P w jego strukturze wynosi 1,67, co sprawia, że wykazuje wysokie podobieństwo do fazy apatytu obecnej w ludzkich kościach i zębach. Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości, takie jak niskie koszty otrzymania, wysoka zdolność adsorpcji, stabilność, reaktywność oraz dobra biokompatybilność, jest on szeroko wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu, gospodarki oraz medycyny [1, 2]. Istnieje wiele metod otrzymywania hydroksyapatytu. Można je podzielić głównie na metody mokre, spośród których można wyróżnić metodę współstrącania, hydrotermalną, żel-zol, emulsyjną, czy też sonochemiczną, metody suche, metody wysokotemperaturowe, do których zalicza się także spalanie oraz pirolizę, syntezy ze źródeł naturalnych, np. kości i muszli oraz metody mieszane [3]. W skali laboratoryjnej oraz przemysłowej najbardziej popularne są metody mokre. Ich znaczącą zaletą jest fakt, iż w trakcie takiego procesu istnieje możliwość wprowadzenia innych pierwiastków w strukturę hydroksyapatytu. Co więcej, warunki takiej syntezy nie stanowią poważnego zagrożenia dla środowiska naturalnego. Reakcje przeprowadzane są z wykorzystaniem roztworów lub zawiesin, gdzie substratami są źródła wapnia oraz fosforu, np. kwasy, zasady, czy też sole. Ważne jest też utrzymanie odpowiedniego pH, co można osiągać poprzez dodatek wody amoniakalnej. Tak otrzymany produkt jest amorficzny i wykazuje niską krystaliczność lub jest nanometryczny [4]. Z uwagi na to, iż hydroksyapatyt wykazuje dobrą biokompatybilność jest on niezwykle popularny w medycznych zastosowaniach. Jednakże, jego największą wadą są właściwości mechaniczne, co przejawia się podatnością na pękanie oraz słabą wytrzymałością. Celem

zniwelowania negatywnych aspektów, zaproponowano modyfikacje struktury hydroksyapatytu poprzez wprowadzenie obcych pierwiastków. Można wyróżnić podstawienia niesyntetyczne, które charakteryzują się podstawieniem jonów wapnia obecnych w omawianym materiale kationami innych metali oraz podstawienia syntetyczne, gdzie następuje zastąpienie grupy hydroksylowej, bądź fosforanowej, obcym anionem. Tak przeprowadzona modyfikacja znacząco polepsza właściwości hydroksyapatytu oraz poszerza jego horyzont zastosowań [5-10]. Do możliwych podstawień w strukturze hydroksyapatytu można wykorzystać wybrane kationy z bloku energetycznego s układu okresowego. Jednym z wielu przebadanych pierwiastków jest lit. Jako niezależny element występuje w organizmie człowieka w śladowych ilościach. Znajduje zastosowanie w psychiatrii oraz leczeniu schorzeń układu krwionośnego. Wykazano także, iż pozytywnie oddziałuje na układ kostny. Dlatego też, modyfikacja struktury hydroksyapatytu jonami litu przynosi wiele korzyści w ortopedii. Takie rusztowanie powoduje efektywne namnażanie się komórek budujących kości – osteoblastów oraz wykazuje ich znaczną aktywność. Omawiana struktura wspomaga proces tworzenia się kości oraz naczyń włosowatych z nią związanych. Pomaga również w przyjęciu się implantu metalicznego. Co najważniejsze, połączenie Li – hydroksyapatyt jest biokompatybilne oraz nie wykazuje cytotoksyczności. Satisfakcjonującą zgodność z tkankami człowieka przejawia także hydroksyapatyt domieszkowany sodem. Takie pokrycie usprawnia namnażanie się komórek, z czym powiązana jest szybsza regeneracja uszkodzonej kości. Kolejnym pierwiastkiem należącym do bloku s jest potas, który w połączeniu z hydroksyapatytem wykazuje dobrą stabilność termiczną. Co więcej, taki materiał zdolny jest do adsorpcji białek na swojej powierzchni, dlatego też można go wykorzystać w postaci nośnika. Ważną rolę w organizmie ludzkim pełni także magnez. Podstawienie wspomnianym jonem przyczynia się do efektywnej regeneracji ubytków kości oraz pozwala na kontrolę procesów degradacji uszkodzonych komórek. Dodatkowo, tak zmodyfikowana struktura wykazuje działanie bakteriobójcze. Duże znaczenie w procesie regeneracji tkanek kostnych ma również połączenie hydroksyapatytu z jonami strontu. Niezależnie od stężenia tego pierwiastka, struktura nie wykazuje cytotoksyczności. Dzięki takiemu podstawieniu, materiał zyskuje lepszą wytrzymałość, a nowopowstała kość w oparciu o taką strukturę odznacza się większą gęstością [11]. Na blok energetyczny p układu okresowego składa się wiele pierwiastków, jednakże tylko wybrane z nich zostały przebadane pod kątem możliwości podstawienia w strukturze hydroksyapatytu. Połączenie glin – hydroksyapatyt odznacza się dobrą biokompatybilnością, podobnie jak materiał domieszkowany galem. Z kolei, podstawienie indem pozytywnie oddziałuje na komórki kościotwórcze, pobudzając je do zwiększonej aktywności. Bizmut w połączeniu z hydroksyapatytem wykazuje dobrą zgodność z ludzkimi osteoblastami, a także wspomaga procesy tworzenia się kości. Warto również dodać, iż taki materiał odznacza się właściwościami antybakteryjnymi oraz wysoką wytrzymałością, co umożliwia jego zastosowanie w implantach. Domieszkowanie tellurem nadaje strukturze właściwości bakteriobójczych. Jednakże, takie połączenie nie zostało do końca przebadane pod kątem biokompatybilności [11]. Grupy 3 – 12 układu okresowego tworzą blok energetyczny d. Niektóre pierwiastki pochodzące z tego obszaru również zostały przebadane pod kątem potencjalnego zastosowania jak domieszki w strukturze

hydroksyapatytu. Modyfikacje jonami srebra, głównie ze względu na swoje antybakteryjne właściwości, wykorzystuje się przede wszystkim w stomatologii oraz ortopedii celem zapobiegania ryzyka infekcji związanej z umieszczeniem implantów. Jednakże, należy zachować odpowiednie stężenie tego pierwiastka z uwagi na potencjalne toksyczne działanie na organizm człowieka. Według badaczy powinno ono wynosić mniej niż 2%. Działanie przeciwdrobnoustrojowe przejawia także połączenie cynku z hydroksyapatytem. Co więcej, taka modyfikacja jest często wykorzystywana w celu przyspieszenia aktywności komórek kościotwórczych, co związane jest z szybszą regeneracją tkanki. Z kolei, domieszkowanie jonami miedzi wykazuje, oprócz właściwości antybakteryjnych, działanie przeciwko niektórym grzybom. Umożliwia także adsorpcję białek oraz efektywnie wpływa na wzrost kości. Kolejnym pierwiastkiem możliwym do wykorzystania jako modyfikator jest mangan. Takie rozwiązanie znajduje zastosowanie w implantologii, gdzie zwiększa siłę wiązania między warstwą hydroksyapatytu a tytanowym implantem, dodatkowo zwiększając odporność na korozję. Co najważniejsze, połączenie to charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością. Wspomniany już tytan jest szeroko wykorzystywany w implantach, a jego domieszkowanie nadaje strukturze większą twardość, wytrzymałość i siłę wiązania. Znaczące właściwości przejawia natomiast połączenie żelaza i hydroksyapatytu, a mianowicie niszczy wątrobowe komórki rakowe w procesie hipertermii. Dodatkowo, aktywuje działanie osteoblastów. W onkologii duże znaczenie ma także modyfikacja hafnem z uwagi na jego antyrakowe działanie. Domieszkowanie jonami chromu jest również możliwe, jednakże należy zwrócić uwagę na ilości tego pierwiastka, gdyż stężenia powyżej ok. 0,5% mogą potencjalnie szkodzić komórkom w organizmie. Satysfakcjonujące działanie na regenerację kości wykazuje również modyfikacja kobaltem, przy czym proces ten zależy od zastosowanego stężenia. Nieco odmienne wykorzystanie przejawia połączenie hydroksyapatytu z kadmem, który znany jest ze swojej szkodliwości. Jednakże, takie rozwiązanie pozwala na poznanie mechanizmów jego działania w organizmie. Z przeprowadzonych badań na rybach wysnuto wnioski, iż zwiększone ilości kadmu uszkadzają DNA w wątrobie, ostatecznie prowadząc do śmierci. Z kolei, domieszkowanie wolframem znacząco przyczynia się do dbałości o środowisko naturalne poprzez usprawnienie procesów adsorpcji niektórych barwników obecnych w systemach wodnych [11]. Zdolnością zastąpienia jonów wapnia w strukturze hydroksyapatytu charakteryzują się również wybrane pierwiastki z bloku energetycznego f. Lantan jako domieszka wpływa przede wszystkim na stabilność i odporność materiału. Zwiększa także biokompatybilność. Natomiast, zastosowanie ceru pozytywnie oddziałuje na metabolizm wewnątrz tkanek kostnych. Co więcej, może być wykorzystany jako środek antyoksydacyjny, bądź jako sonda fluorescencyjna do obrazowania komórkowego. Istotne znaczenie w radioterapii ma prazeodym oraz samar. Dodatkowo, Sm znajduje zastosowanie jako środek do leczenia ran i infekcji stawów. Niektóre badania wykazały, iż domieszkowanie hydroksyapatytu europem nadaje materiałowi właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Co ważne, takie połączenie nabiera coraz większego znaczenia w dziedzinie nanoleków. Do medycznych zastosowań wykorzystywane są także domieszki gadolinu, dysprozu i neodymu pełniące rolę czynników kontrastujących w metodzie rezonansu magnetycznego [11].

**Wnioski:** Hydroksyapatyt to powszechnie znany materiał. Jednakże, jego właściwości nie zawsze spełniają wymagania związane z potrzebami ludzkości w wielu dziedzinach życia. Wraz z rozwojem nauki opracowano nowe rozwiązania poszerzające horyzont zastosowań wspomnianego związku. Dużo możliwości niosą ze sobą domieszki innymi pierwiastkami. W zależności od zastosowanego jonu oraz jego stężenia w strukturze hydroksyapatytu, takie rozwiązania znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach, głównie w ortopedii, czy też medycynie. Wiele modyfikowanych materiałów wykazuje także działanie antybakteryjne. Jest to ważny aspekt w nauce, gdyż takie badania znacząco przyczyniają się do poprawienia komfortu życia.

**Literatura:**

1. S. Pai, M. Srinivas, R. Selvaraj, A. Pugazhendh, *Journal of Water Process Engineering*, 38 (2020) 1.
2. B. Ghiasi, Y. Sefidbakht, S. Mozaffari-Jovin, B. Gharehcheloo, M. Mehrarya, A. Khodadadi, M. Rezaei, S. Siadat, V. Uskoković, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46 (2020) 1.
3. M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 7591.
4. A. Sobczak-Kupiec, Z. Wzorek, *Czasopismo techniczne*, 10 (2008) 310.
5. I.V. Antoniac, *Handbook of bioceramics and biocomposites*, Springer, Berlin, 2016.
6. N. Eliaz, N. Metoki, *Materials*, 10 (2017) 334.
7. A. Fihri, C. Len, R.S. Varma, A. Solhy, *Coordination Chemistry Reviews*, 347 (2017) 48.
8. J.R. Jones, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 4457.
9. M. Šupová, *Ceramics International*, 48 (2015) 9203.
10. S.M. Sallam, K.M. Tohami, A.M. Sallam, L.I.A. Salem, F.A. Mohamed, *Journal of Biophysical Chemistry*, 3 (2012) 1.
11. T. Tite, A.C. Popa, L.M. Balescu, I.M. Bogdan, I. Pasuk, J.M.F. Ferreira, G.E. Stan, *Materials*, 11 (2018) 1.

## **PREPARATYKA I CHARAKTERYSTYKA NANOKOMPOZYTÓW STOSOWANYCH DO DEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH**

**K. KUCIO, B. CHARMAS**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chromatografii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Synteza mechanochemiczna (MChS) zaliczana do metod „zielonej chemii” jest efektywną metodą preparatyki materiałów o pożądanych właściwościach fizykochemicznych, w tym fotokatalitycznych. Poniższa praca opisuje możliwość zastosowania wysokoenergetycznego mielenia w młynie planetarnym do otrzymania fotokatalizatorów aktywnych w zakresie światła widzialnego na bazie  $\text{TiO}_2$  domieszkowanego jonami kobaltu. Właściwości fotokatalityczne uzyskanych nanokompozytów zbadano w odniesieniu do wodnego roztworu Safraniny T. Dodatkowo dokonano charakterystyki strukturalnej materiałów.

**Wprowadzenie:** Od dawna ludzie borykają się z problemem zanieczyszczeń wód. Woda jest najważniejszym surowcem niezbędnym człowiekowi do życia. Już śladowe ilości zanieczyszczeń wód mogą stanowić zagrożenie dla prawidłowego rozwoju fauny i flory, jak również dla zdrowia, a nawet życia ludzi. W związku ze wzrostem poziomu życia oraz intensywnym rozwojem przemysłu i gospodarki dużą grupę zanieczyszczeń wód stanowią barwniki. Związki te nie ulegają biodegradacji w środowisku oraz często są toksyczne i kancerogenne. Dlatego ważnym aspektem działalności ludzkiej jest konieczność usuwania ich z wód. Ilość procedur wykorzystywanych do oczyszczania wód stale rośnie i obecnie jest kierowana w stronę metod o dużym znaczeniu ekonomicznym. Niestety metody te często charakteryzują się niską efektywnością, a wykorzystanie ich na skalę masową wymaga stosowania znacznych ilości materiału, co z kolei generuje wysokie nakłady finansowe. Duże znaczenie w procesach oczyszczania wód odgrywają zaawansowane procesy utleniania, w tym fotokatalityczna degradacja barwników w obecności światła widzialnego, która umożliwia całkowitą mineralizację zanieczyszczeń organicznych do prostych związków nieorganicznych [1]. Najczęściej jako fotokatalizatory wykorzystuje się półprzewodniki. Przykładem takiego materiału jest  $\text{TiO}_2$ . Tlenek ten charakteryzuje się wysoką energią pasma wzbronionego, przez co wykazuje wysoką aktywność fotokatalityczną w obecności promieniowania UV. Dąży się do tego, aby poprzez wprowadzenie odpowiedniej domieszki, obniżyć energię pasma wzbronionego półprzewodnika, co skutkowałoby możliwością skutecznego zastosowania tlenku tytanu (IV) w obecności światła widzialnego (Vis). Podczas produkcji fotokatalizatorów często stosuje się toksyczne chemikalia, które dodatkowo oddziałują negatywnie na środowisko. Jedną z metod syntezy fotokatalizatorów, która jest przyjazna dla środowiska jest mechanochemiczna synteza. Termin „mechanochemia” odnosi się do przemian chemicznych i fizyko-chemicznych zachodzących w substancjach pod wpływem energii mechanicznej [2]. Energia powstająca podczas mielenia może inicjować reakcje chemiczne. Podczas zderzenia kul mielących cząstki proszków są wielokrotnie kruszone, spłaszczane i ponownie spawane. Mechanochemiczna

synteza nie wymaga użycia rozpuszczalników, wysokiej temperatury i podwyższonego ciśnienia [3]. Celem pracy była mechanochemiczna synteza materiałów o właściwościach fotokatalitycznych umożliwiających fotodegradację Safraniny T.

**Część eksperymentalna:** Kompozyty przygotowano na bazie  $\text{TiO}_2$  (P25, Aldrich) z dodatkiem acetyloacetonianu kobaltu (acac-Co, POCH), stanowiącego źródło domieszki. Syntezę materiałów prowadzono planetarnym młynem kulowym „Pulverisette 7-premium Line” (Fritsch, Niemcy). Wszystkie próbki syntetyzowano z dodatkiem 20 ml wody redestylowanej, stosując metodę mielenia „na mokro”. Zastosowane kulki i naczynie mielące wykonane były z  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Przygotowano 6 materiałów wykorzystując różne szybkości mielenia oraz różną zawartość acac-Co: 0,2; 1 i 5% wag. w stosunku do  $\text{TiO}_2$  (Tabela 1). Mechanochemiczną syntezę prowadzono w czasie 60 minut przy różnych prędkościach obrotów młyna: 250 lub 500 obr./min. Po syntezie materiały suszono w temperaturze  $100^\circ\text{C}$  przez 12 godzin.

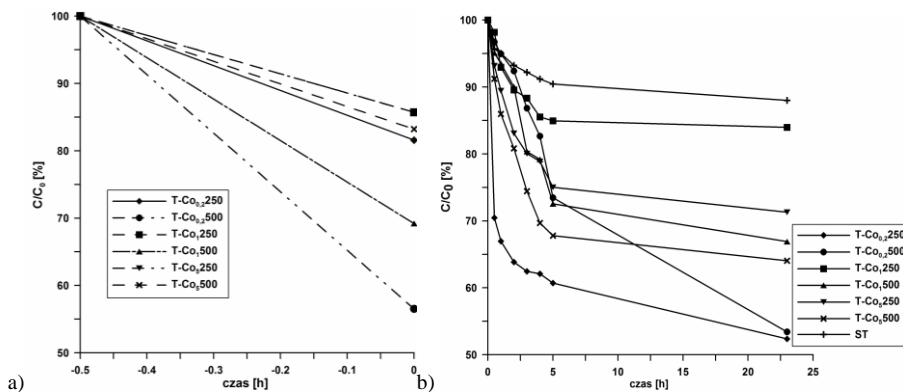
**Tabela 1.** Skład próbek, warunki syntezy mechanochemicznej oraz parametry strukturalne kompozytów.

Próbka	Skład + $\text{H}_2\text{O}$ (20 ml)	Szybkość obrotów młyna [obr./min]	$S_{\text{BET}}$ [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	$V_p$ [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]	$R_{\text{sr}}$ [nm]
T-Co <sub>0,2</sub> 250	$\text{TiO}_2 = 5$ g, acac-Co = 0,06 g	250	51,93	0,501	19,29
T-Co <sub>0,2</sub> 500		500	50,33	0,462	18,38
T-Co <sub>1</sub> 250	$\text{TiO}_2 = 5$ g, acac-Co = 0,305 g	250	45,53	0,438	19,25
T-Co <sub>1</sub> 500		500	42,38	0,465	21,95
T-Co <sub>5</sub> 250	$\text{TiO}_2 = 5$ g, acac-Co = 1,57g	250	33,43	0,367	21,94
T-Co <sub>5</sub> 500		500	33,71	0,333	19,75

Uzyskane materiały zbadano pod kątem aktywności fotokatalitycznej. Jako źródło światła widzialnego zastosowano lampę z zamocowaną żarówką ledową. Modelowe zanieczyszczenie stanowił wodny roztwór Safraniny T o stężeniu  $C = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Przed rozpoczęciem naświetlania przeprowadzono 30 minutowy etap adsorpcji barwnika na fotokatalizatorze bez dostępu światła. Po włączeniu lampy w określonych odstępach czasu pobierano stałą ilość roztworu i po separacji fotokatalizatora mierzono stężenie barwnika za pomocą spektrofotometru UV-Vis („Helios Gamma”, Spectro-Lab, Polska) przy długości fali  $\lambda = 520$  nm. Proces fotokatalizy prowadzono przez 23 godziny. Dla otrzymanych próbek wyznaczono również niskotemperaturowe izotermi adsorpcji/desorpcji  $\text{N}_2$  (Micromeritics ASAP 2405, USA). Z danych izoterm adsorpcji azotu wyznaczono parametry struktury porowatej ( $S_{\text{BET}}$ ,  $V_p$ ,  $R_{\text{sr}}$ ) oraz funkcje rozkładu objętości porów według ich średnich promieni. Dodatkowo zastosowano skaningową mikroskopię elektronową (SEM).

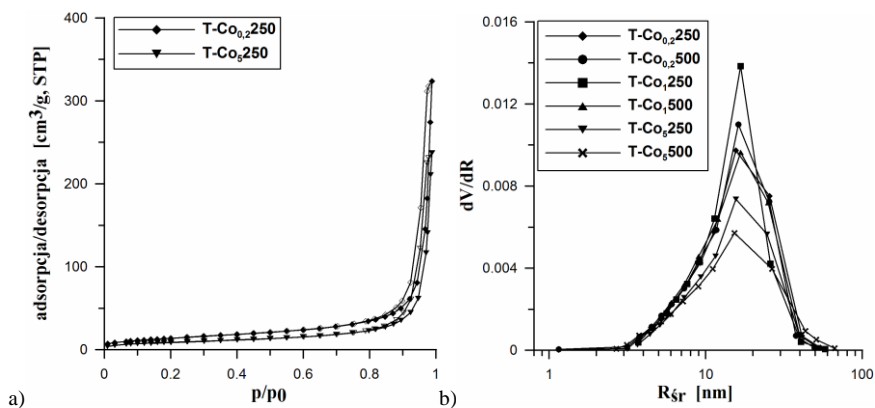
**Wyniki:** Na rysunku 1a przedstawiono krzywe odzwierciedlające etap adsorpcji barwnika na fotokatalizatorach. Porównując sam etap adsorpcji możemy zaobserwować, że próbki poddawane mechanochemicznej obróbce przy zastosowaniu szybszych obrotów (500 obr./min) adsorbowały więcej barwnika

w porównaniu do materiałów mielonych z prędkością 250 obr./min (Rys. 1a). Najwięcej barwnika zaadsorbowało się na materiale T-Co<sub>0,2</sub>500 (Rys. 1a).



**Rys.1.** Wykres ilustrujący etap 30 minutowej adsorpcji (a) oraz fotodegradacji Safraniny T (b) w obecności otrzymanych materiałów.

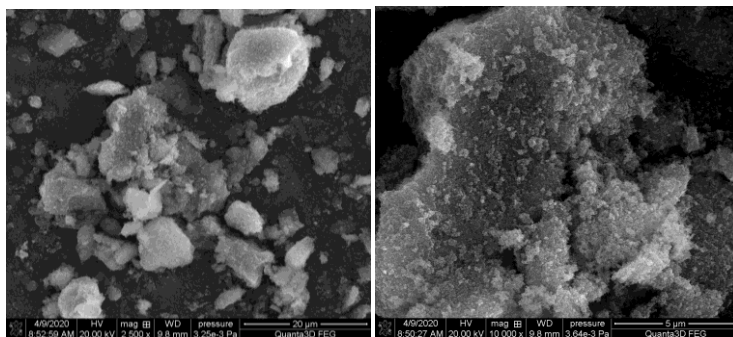
W celu zbadania jedynie aktywności fotokatalitycznej materiałów jako stężenie wyjściowe roztworu przyjęto stężenie barwnika po etapie adsorpcji (Rys.1b). Wszystkie otrzymane kompozyty wykazywały aktywność fotokatalityczną pod wpływem światła widzialnego. Jak wynika z przebiegu krzywych najszybszą degradację barwnika zaobserwowano w przypadku materiału o najniższej zawartości acac-Co poddanego mechanochemicznej obróbce z prędkością 250 obr./min. Już po 30 minutach naświetlania roztworu w obecności T-Co<sub>0,2</sub>250 stężenie ST zmniejszyło się o ~ 30%. Podczas naświetlania roztworu przez 23 godziny najlepsze wyniki uzyskano właśnie w obecności materiałów T-Co<sub>0,2</sub>250 i T-Co<sub>0,2</sub>500. Po tym czasie stężenie Safraniny T w roztworze zmniejszyło się prawie o połowę. Najmniejszą aktywność fotokatalityczną wykazywała próbka T-Co<sub>1</sub>250 (Rys.1b).



**Rys.2.** Niskotemperaturowe izotermy adsorpcji/desorpcji azotu (a) oraz funkcje rozkładu objętości porów dla wybranych materiałów.



Z danych strukturalnych, przedstawionych w Tabeli 1 wynika, że powierzchnia właściwa próbek ( $S_{BET}$ ) zmniejszała się wraz ze wzrostem zawartości domieszki w kompozycie. Acac-Co stanowi wypełnienie, które powoduje aglomerację cząstek  $TiO_2$  w procesie mechanochemicznym i w efekcie, zmniejszenie  $S_{BET}$ . Podobną zależność zaobserwowano również w przypadku całkowitej objętości porów ( $V_p$ ). Wzrost szybkości obrotów młyna nie spowodował istotnych zmian w wartościach  $S_{BET}$ . Izotermy zarejestrowane dla badanych materiałów mają podobny przebieg, dlatego na rysunku 2a pokazano jedynie przykładowe krzywe dla kompozytów  $Co_{0,2}250$  i  $T-Co_{0,2}250$ . Ich przebieg wskazuje, że zgodnie z klasyfikacją IUPAC są to izotermy typu IV, charakterystyczne dla materiałów mezoporowatych, w porach których zachodzi zjawisko kondensacji kapilarnej. Potwierdzeniem istnienia mezoporów są krzywe przedstawione na Rys. 2b, zawierające wyraźnie wykształcone maksima przy wartości promieni dominujących  $\sim 20$  nm.



Rys. 3. Zdjęcia SEM próbki T-Co,500 przy powiększeniu a) 2500x i b) 10000x.

**Wnioski:** Zastosowanie mechanochemicznej syntezy w wysokoenergetycznym młynie planetarnym umożliwia otrzymywanie materiałów wykazujących właściwości fotokatalityczne. Wszystkie otrzymane materiały wykazywały fotoaktywność w zakresie światła widzialnego. Największą aktywnością fotokatalityczną odznaczały się materiały domieszkowane najmniejszą ilością acac-Co. Próbkę  $T-Co_{0,2}250$  i  $T-Co_{0,2}500$ . Spowodowały one 4-krotnie efektywniejszy rozkład Safraniny T w porównaniu do etapu fotolizy barwnika bez udziału kompozytów. Materiały uzyskane podczas mechanochemicznej syntezy z prędkością 500 obr./min wykazywały wyższą adsorpcję barwnika w porównaniu do materiałów mielonych z szybkością 250 obr./min. Wszystkie kompozyty posiadały charakter mezoporowaty.

#### Literatura:

1. J.M. Herrmann, *Catalysis Today*, 53 (1999) 115.
2. C. Suryanarayana., E. Ivanov, V. V Boldyrev, *Materials Science and Engineering.*, 304 (2001) 151.
3. V. V. Molchanov, R. A. Buyanov, *Kinetics and Catalysis*, 42 (2001) 366.

## **WPLYW ATMOSFERY PROCESU PIROLIZY NA KREOWANIE STRUKTURY POROWATEJ WĘGLI AKTYWNYCH**

**M. ZIĘZIO, B. CHARMAS, M. RACZKIEWICZ**, UMCS, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Katedra Chromatografii, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Węgle aktywne otrzymywane są w wyniku procesu pirolizy oraz aktywacji materiałów zawierających węgiel. Produkt otrzymany w wyniku pirolizy surowca wyjściowego jest nieaktywny adsorpcyjnie oraz posiada bardzo słabo rozwiniętą powierzchnię. W celu rozwinięcia powierzchni adsorbentu przeprowadza się proces aktywacji otrzymanego karbonizatu, którą można przeprowadzić dwoma sposobami, stosując aktywację fizyczną i/lub aktywację chemiczną. Celem prezentowanych badań była analiza wpływu atmosfery procesu pirolizy na rozwój struktury porowatej węgla aktywnych. Jako prekursor do otrzymania materiałów węglowych wykorzystano szyszki świerkowe. Pirolizę prowadzono w utleniającej atmosferze dwutlenku węgla (100 ml/min) lub w obecności przegrzanej pary wodnej (0,6 ml/min) z zastosowaniem pośredniego etapu izotermicznego w 400°C (1h). Szybkość ogrzewania układu wynosiła 10°C/min. W temperaturze końcowej (800°C) próbki wygrzewano przez 2h. Węgle aktywne otrzymane w procesie pirolizy, zostały poddane dodatkowej modyfikacji hydrotermicznej przegrzaną parą wodną przy wykorzystaniu promieniowania mikrofalowego jako źródła energii. Do charakterystyki otrzymanych materiałów wykorzystano niskotemperaturową adsorpcję/desorpcję azotu oraz analizę termiczną.

**Wprowadzenie:** Węgle aktywne mogą być wytwarzane z wielu materiałów zawierających węgiel, w tym z organicznych materiałów odpadowych. Obecnie wykorzystuje się przede wszystkim odpady pochodzące z gospodarstw domowych lub z rolnictwa jak również produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego. Te stałe pozostałości są stosowane ze względu na ich niski koszt, powszechny dostęp a także znaczne ilości. Do produkcji węgla aktywnych wykorzystuje się na przykład pestki brzoskwini, oliwek, łupiny migdałów, fusy kawowe [1]. Dobór odpowiedniego materiału wyjściowego jest bardzo ważny, ponieważ od rodzaju i cech charakterystycznych użytego prekursora zależą właściwości otrzymanych materiałów węglowych, tj. struktura porowata czy ilość i rodzaj powierzchniowych grup tlenowych. Jednakże powszechnie wiadomo, że porowatość węgla aktywnego zależy nie tylko od surowca użytego jako prekursor ale również od metody aktywacji oraz przebiegu procesu pirolizy [1, 2]. Aktywacja jest kluczowym krokiem do rozwinięcia struktur porów materiałów węglowych otrzymanych w procesie karbonizacji. Można ją przeprowadzić dwoma sposobami, wykorzystując aktywację fizyczną i aktywację chemiczną [1, 3]. W przypadku aktywacji fizycznej materiał uzyskany po karbonizacji jest aktywowany w celu rozwinięcia i wzmocnienia struktury porów przy użyciu gazu utleniającego. Najczęściej stosowanymi czynnikami utleniającymi są: para wodna, dwutlenek węgla, powietrze lub mieszaniny tych gazów. Reakcja z powietrzem przebiega w sposób

egzotermiczny, dlatego trudno jest utrzymać odpowiednią, stałą temperaturę. Ponadto tlen jest agresywnym reagentem i stosowanie go jako czynnika utleniającego powoduje wiele trudności. W wielu procesach aktywacja tlenem prowadzona jest w niskich temperaturach oraz jest połączona z dodatkową obróbką parą wodną. Dlatego znacznie częściej wykorzystuje się parę wodną oraz dwutlenek węgla. Reakcje z wykorzystaniem pary wodnej lub dwutlenku węgla mają charakter endotermiczny i wymagają zakresu temperatur 700-950°C. Uważa się, że szybkość oddziaływania dwutlenku węgla z węglem w określonej temperaturze jest o 30% wolniejsza niż w przypadku reakcji z parą wodną [1, 2, 4]. Jednakże często wolniejszy przebieg reakcji umożliwi lepszą kontrolę procesu.

**Część eksperymentalna:** Jako materiał wyjściowy do otrzymania węgla aktywnych wykorzystano szyszki świerkowe (świerk pospolity *Picea abies*). Przed przystąpieniem do badań prekursor przemywano w wodzie redestylowanej oraz suszono (100°C/24h). Następnie materiał rozdrobniono mechanicznie i przesiano. Do badań wybrano frakcję 1-2 mm. Karbonizację prowadzono w atmosferze dwutlenku węgla (100 ml/min) przy naroście temperatury 10°C/min. Zastosowano pirolizę wieloetapową wprowadzając 1-godzinny etap izotermiczny w 400°C. W temperaturze końcowej (800°C) próbki wygrzewano przez 2h (procedura 1). Dla części materiału (procedura 2), aktywację w 800°C prowadzono dodatkowo w obecności przegrzanej pary wodnej (0,6 ml/min). Otrzymane w procesie pirolizy węgle aktywne, zostały poddane modyfikacji hydrotermicznej przegrzaną parą wodną przy wykorzystaniu promieniowania mikrofalowego jako źródła energii (próbki: AC-1 MKF i AC-2 MKF). Proces prowadzono w czasie 60 minut, przy 100% mocy reaktora oraz w zakresie ciśnień 77-80 atmosfer. Do charakterystyki otrzymanych materiałów wykorzystano niskotemperaturową adsorpcję/desorpcję N<sub>2</sub> oraz analizę termiczną.

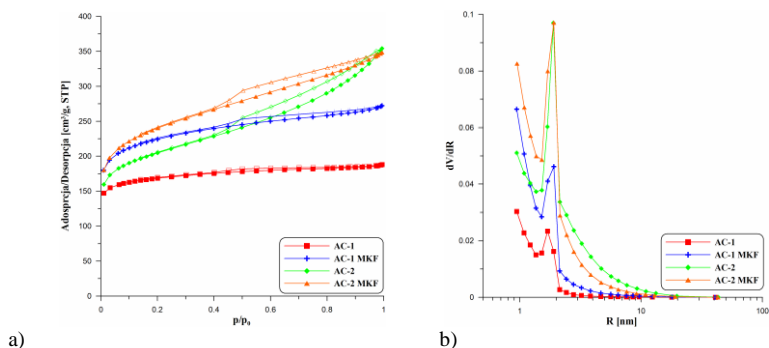
**Wyniki:** W tabeli 1 przedstawiono podstawowe charakterystyki strukturalne oraz stopień wypału (%<sub>wypału</sub>) wyznaczony dla badanych węgli aktywnych. Jak można zaobserwować %<sub>wypału</sub> dla próbki AC-2 wynosił około 88%. Tak wysoki wynik może świadczyć o znacznej stracie materiału węglowego a równocześnie sugerować dużą porowatość otrzymanych węgli aktywnych. W przypadku próbki AC-1, pirolizowanej jedynie w utleniającej atmosferze dwutlenku węgla, stopień wypału jest mniejszy i wynosi ok. 75%. Różnica wartości stopnia wypału (~13%) wskazuje, że węgiel aktywny ulega utlenianiu w obecności pary wodnej bardzo efektywnie.

**Tabela 1.** Charakterystyki strukturalne otrzymanych adsorbentów.

Nazwa próbki	$S_{BET} [m^2/g]$	$S_{mikro} [m^2/g]$	$V_p [cm^3/g]$	$V_{mikro} [cm^3/g]$	$R_{sr} [nm]$	% <sub>wypału</sub>
AC-1	630,6	505,4	0,291	0,206	0,92	74,91
AC-1 MKF	820,7	548,4	0,421	0,228	1,03	-
AC-2	735,1	416,1	0,548	0,177	1,49	87,88
AC-2 MKF	863,9	469,0	0,539	0,199	1,25	-

Można zatem stwierdzić, że dołączenie pary wodnej jako dodatkowego czynnika aktywacyjnego jest bardzo efektywne. Mniejszy rozmiar cząsteczek H<sub>2</sub>O umożliwia

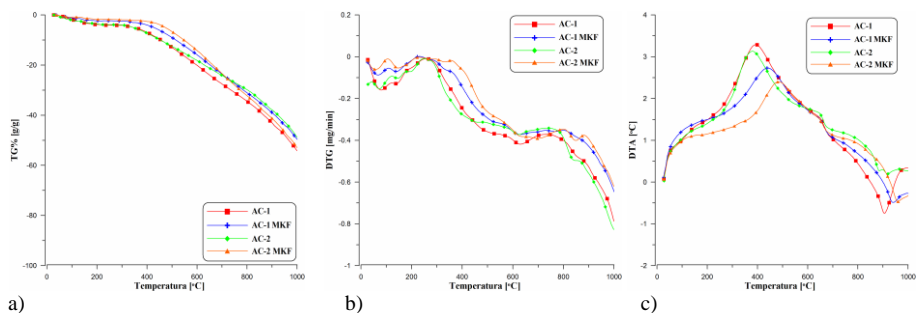
szybszą dyfuzję przez kanaliki porów jak również łatwiejszy dostęp do mikroporów. Na podstawie analizy przedstawionych wartości, można zaobserwować, że piroliza prowadzona w obecności przegrzanej pary wodnej przebiega znacznie efektywniej niż proces w atmosferze CO<sub>2</sub>. Otrzymany materiał (AC-2) charakteryzuje się bardzo dobrze rozwiniętą powierzchnią  $S_{BET} = 735,1 \text{ m}^2/\text{g}$  i objętością porów  $V_p = 0,548 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Nieco gorsze parametry uzyskano w przypadku węgla aktywnego otrzymanego zgodnie z procedurą 1 ( $S_{BET} = 630,6 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $V_p = 0,291 \text{ cm}^3/\text{g}$ ). Dodatkowa modyfikacja parą wodną przy użyciu energii mikrofal spowodowała wzrost powierzchni właściwej w przypadku wszystkich materiałów. Wszystkie otrzymane materiały węglowe charakteryzują się strukturą mikro/mezoporowatą (Tab. 1).



**Rys.1.** Niskotemperaturowe izoterm adsorpcji/desorpcji azotu (a) oraz krzywe rozkładu objętości porów (b) wyznaczone dla badanych węgli aktywnych.

Kształt izoterm (Rys. 1a) zarejestrowanych dla badanych węgli to izotermi typu IV charakterystyczne dla materiałów mezoporowatych. Wyjątek stanowi izoterma dla AC-1, bardzo zbliżona do typu I, jednak widoczna jest słabo wykształcona pętla histerezy, świadcząca o obecności niewielkiej ilości mezoporów. Po modyfikacji promieniowaniem mikrofalowym (AC-1 MKF) na izotermach (typu IV) pojawiła się dobrze wykształcona pętla histerezy świadcząca o tym, że otrzymany materiał jest mezoporowaty. Utlnienie w obecności pary wodnej spowodowało lepsze rozwinięcie struktury porowatej. Izoterma wyznaczona dla materiału AC-2 to izoterma typu IV, charakterystyczna dla materiałów mezoporowatych. Widoczna wyraźnie wykształcona pętla histerezy typu H2 wskazuje na występowanie porów o kształcie butelkowym. Ten sam typ izoterm można zaobserwować dla materiału AC-2 MKF. Kształt krzywych rozkładu objętości porów względem średnich promieni (Rys. 1b) jest charakterystyczny dla materiałów o jednorodnym rozkładzie porów o rozmiarze porów dominujących  $R_{dom} \sim 2\text{nm}$ . Jest to rozmiar graniczny mikro/mezoporów. Na rysunku 2 przedstawiono wyniki analizy termicznej dla otrzymanych materiałów. Na podstawie przebiegu krzywych TG (Rys. 2a) można zauważyć, że węgle aktywne otrzymane w wyniku pirolizy prowadzonej w atmosferze CO<sub>2</sub> lub przegrzanej pary wodnej są stabilnie termicznie do temperatury około 400°C natomiast materiały poddane dodatkowej modyfikacji promieniowaniem mikrofalowym do ~450°C. W temperaturze około 500°C rozpoczyna się proces spalania przebiegający z różną prędkością, natomiast

w 1000°C proces ten nie jest jeszcze zakończony. Potwierdzeniem tych zmian są krzywe DTG (Rys. 2b) oraz DTA (Rys. 2c). Na krzywych DTG (Rys. 2b) można zaobserwować piki, które potwierdzają stratę masy w określonym zakresie temperatur.



**Rys.2.** Przebieg krzywych TG (a), DTG (b) i DTA (c) dla otrzymanych węgli aktywnych.

Krzywe DTA (Rys. 2c) obrazują efekty energetyczne zachodzących procesów. Wraz ze wzrostem temperatury na krzywych można zaobserwować wyraźne piki, które są związane z egzotermicznym procesem spalania węgla. Jak wynika z przebiegu krzywych, maksima pików są wyraźnie „przesunięte” w lewo co oznacza, że proces spalania dla poszczególnych próbek rozpoczął się w różnej temperaturze.

**Wnioski:** Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że zastosowanie zarówno utleniającej atmosfery dwutlenku węgla jak i przegrzanej pary wodnej powoduje otrzymanie węgla aktywnych o bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni oraz strukturze porowatej. Na podstawie analizy przedstawionych danych można zaobserwować, że aktywacja z wykorzystaniem H<sub>2</sub>O jest bardziej efektywna. W porównaniu do CO<sub>2</sub>, para wodna charakteryzuje się mniejszym rozmiarem cząsteczek, co umożliwi łatwiejszą dyfuzję przez sieć porów a także łatwiejszy dostęp do mikroporów. Otrzymano materiały o  $S_{BET} = 735,1 \text{ m}^2/\text{g}$  i objętości porów  $V_p = 0,548 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Zastosowanie modyfikacji parą wodną wspomaganą energią promieniowania mikrofalowego spowodowało dodatkowe rozwinięcie powierzchni badanych węgli aktywnych. Analiza termiczna potwierdziła, że materiały te były stabilne termicznie do temperatury ~400°C-450°C. Stabilność termiczna zależała od zastosowanej atmosfery prowadzenia procesu pirolizy a także dodatkowo przeprowadzonej modyfikacji.

### **Literatura:**

1. J.F. González, S. Román, C. M. González-García, J.M.V. Nabais, A.L. Ortiz, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (2009) 7474.
2. J. Choma, M. Kloske, *Ochrona środowiska*, 2 (1999).
3. S. Román, J.F. González, C.M. González-García, F. Zamora, *Fuel Processing Technology*, 89 ( 2008 ) 715.
4. M. A. Yahya, Z. Al-Qodah, C.W. Zanariah Ngah, *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 46 (2015) 218.

## BADANIE CHEMII POWIERZCHNI WĘGLI AKTYWNYCH Z SZYSZEK ŚWIERKU (*Picea abies*) METODĄ MIARECZKOWANIA POTENCJOMETRYCZNEGO

**B. CHARMAS, M. RACZKIEWICZ, M. ZIĘZIO**, UMCS, Wydział Chemii,  
Katedra Chromatografii, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Zanieczyszczenie wody stanowi obecnie problem globalny. Jego główną przyczyną jest ciągły rozwój przemysłu, działalność człowieka oraz rolnictwo. Dlatego uwaga naukowców skupia się na opracowaniu sposobów oczyszczania wód oraz wytworzeniu materiałów, dzięki którym taki efekt może zostać osiągnięty. Szczególne miejsce zajmują tu węgle aktywne (AC). Skuteczność oczyszczania zależy głównie od charakterystyki strukturalnej i chemicznego charakteru powierzchni węgla aktywnych. Właściwości te można zmieniać przez zastosowanie różnego rodzaju modyfikacji węgla aktywnego. Celem pracy było otrzymanie węgla aktywnych przy użyciu szyszek świerkowych (*Picea abies*) jako prekursora materii węglowej. Węgle aktywne otrzymano w procesie pirolizy oraz modyfikacji parą wodną wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. Dla uzyskanych adsorbentów, na podstawie danych izoterm adsorpcji/desorpcji N<sub>2</sub> wyznaczono parametry strukturalne oraz określono powierzchniowe grupy funkcyjne metodą miareczkowania potencjometrycznego (Boehma).

**Wprowadzenie:** Węgiel aktywny (AC) to amorficzny materiał węglowy o wysokim stopniu porowatości i bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni z licznymi funkcyjnymi grupami tlenowymi [1]. W zależności od użytego prekursora węgiel aktywny zawiera ok. 85-95% węgla pierwiastkowego, zaś pozostałą część stanowią heteroatomy (najczęściej tlen, wodór i azot) oraz domieszki mineralne. Heteroatomy obecne na powierzchni węgla aktywnego pochodzą z materiału wyjściowego użytego do produkcji, metody otrzymania (aktywacji) oraz zastosowanych procesów modyfikacji. Zawartość heteroatomów może być zmieniana poprzez np. wygrzewanie w wysokich temperaturach w próżni lub atmosferze gazu obojętnego [2]. Heteroatomy związane z powierzchnią tworzą zwykle grupy funkcyjne. Na powierzchni AC są to grupy o charakterze zasadowym lub kwasowym, do których zalicza się: karboksylowe, laktonowe, fenolowe oraz karbonylowe [3]. Węgle aktywne znalazły szerokie zastosowanie w technologii oczyszczania wody. Sorbenty te są stosowane do usuwania zanieczyszczeń organicznych takich jak: związki fenolowe, farmaceutyki, pestycydy, barwniki itp. Wykorzystuje się je również do usuwania zanieczyszczeń nieorganicznych i metali ciężkich. Przebieg procesu adsorpcji zanieczyszczeń na węglu aktywnym zależy od kilku czynników, m.in. rodzaju grup funkcyjnych, wielkości i ilości porów, powierzchni właściwej, rozpuszczalności i polarności adsorbentu, temperatury i czasu kontaktu. Grupy funkcyjne znajdujące się na powierzchni AC warunkują ich właściwości adsorpcyjne, elektrochemiczne, katalityczne, utleniająco-redukujące i inne [4]. Powierzchniowe grupy tlenowe można oznaczać różnymi metodami. Do najczęściej

stosowanych metod należą metoda Boehma, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), spektroskopia fotoelektronów (XPS), termogravimetria (TGA) i programowana termodesorpcja (TPD) [5].

**Część eksperymentalna:** Do otrzymania węgla aktywnych użyto szyszki świerku pospolitego *Picea abies*. Szyszki oczyszczono wodą redestylowaną i suszono w temperaturze 100°C przez 24h. Następnie szyszki zmielono i przesiano przez sita o średnicy 2mm i 1mm. Do dalszych badań wykorzystano frakcję powyżej 1mm. Pirolizę materiału wyjściowego prowadzono w reaktorze kwarcowym w utleniającej atmosferze CO<sub>2</sub> podawanego z szybkością 70 ml/min (AC-CO<sub>2</sub>) oraz w atmosferze N<sub>2</sub> podawanego z szybkością 90 ml/min (AC-N<sub>2</sub>). Materiał ogrzewano z szybkością narostu temperatury 10°C /min do 800°C. W tej temperaturze próbki ogrzewano przez 2 godziny, po czym układ chłodzono do temperatury 20°C. Otrzymane w procesie pirolizy adsorbenty węglowe poddano modyfikacji przegrzaną parą wodną przy użyciu promieniowania mikrofalowego (MKF, Reaktor mikrofalowy Nano 2000 Plazmatronika, Polska). Proces prowadzono przez 60 minut przy 100% mocy reaktora w zakresie ciśnień 47-50 atmosfer (AC-CO<sub>2</sub>-MKF) oraz 77-80 atmosfer (AC-CO<sub>2</sub>-MKF') i (AC-N<sub>2</sub>-MKF). W celu określenia chemicznego charakteru powierzchni otrzymanych węgla aktywnych wykorzystano metodę miareczkowania potencjometrycznego Boehma. Pomiary wykonano za pomocą aparatu 716DMS Titrimo (Metrohm). Dla oceny i analizy struktury badanych węgla wyznaczono niskotemperaturowe izotermy adsorpcji-desorpcji azotu oraz krzywe rozkładu objętości porów względem ich średnich promieni.

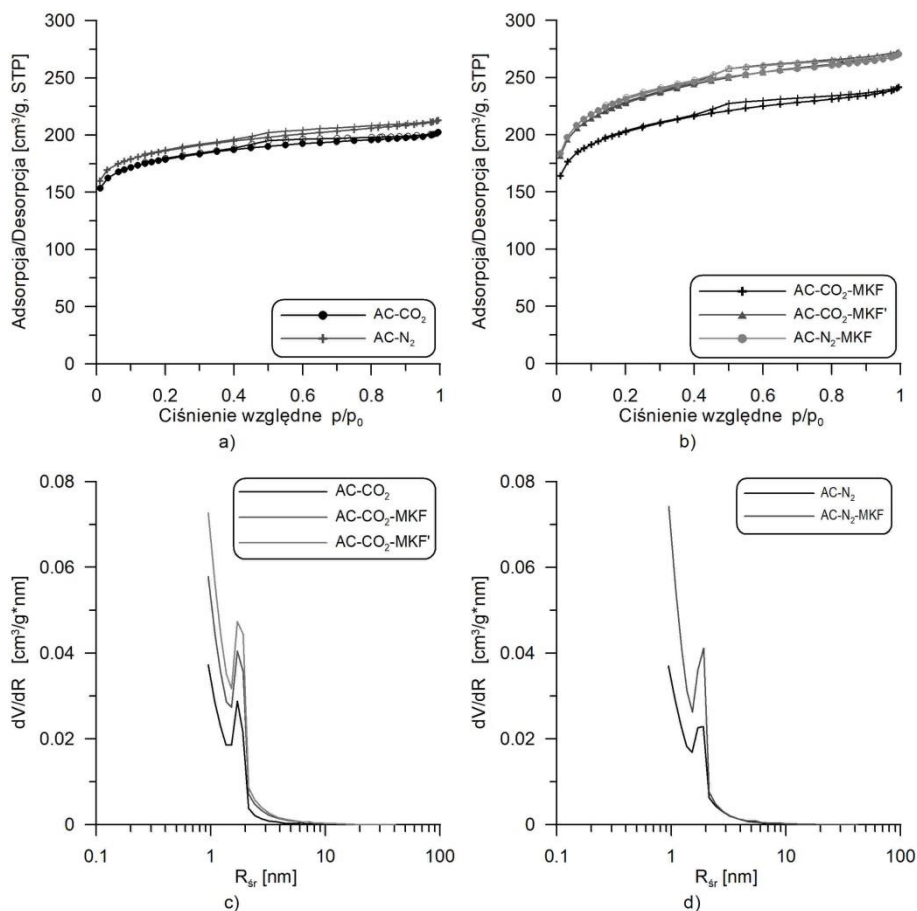
**Wyniki:** W Tabeli 1 zestawiono podstawowe parametry strukturalne otrzymanych adsorbentów węglowych. Na podstawie analizy poniższych wyników, można stwierdzić, że proces pirolizy w atmosferze N<sub>2</sub> przebiega tak samo efektywnie jak piroliza w utleniającej atmosferze CO<sub>2</sub>. Modyfikacja przegrzaną parą wodną przy użyciu promieniowania mikrofalowego dodatkowo powoduje wzrost powierzchni właściwej S<sub>BET</sub> i całkowitej objętości porów V<sub>p</sub>. otrzymane materiały charakteryzują się strukturą mikroporową. Otrzymane materiały charakteryzują się strukturą mikroporową, co doskonale widać po wartościach średniego promienia porów R<sub>sr</sub>.

**Tabela 1.** Charakterystyka strukturalna otrzymanych węgla aktywnych.

Próbka	S <sub>BET</sub> [m <sup>2</sup> /g]	V <sub>p</sub> [cm <sup>3</sup> /g]	R <sub>sr</sub> [nm]
AC-CO <sub>2</sub>	666,9	0,313	0,94
AC-CO <sub>2</sub> -MKF	740,9	0,374	1,01
AC-CO <sub>2</sub> -MKF'	821,6	0,422	1,03
AC-N <sub>2</sub>	674,0	0,329	0,98
AC-N <sub>2</sub> -MKF	835,9	0,419	1,00

Dla badanych węgla aktywnych wyznaczono izotermy typu IV (Rys. 1a i 1b), które są charakterystyczne dla materiałów porowatych. Widoczne pętle histerezy typu H2

wskazują na obecność mezoporów butelkowatych oraz szczelin między płaszczyznami o różnym wzajemnym nachyleniu. Można zauważyć, że izotermi adsorpcji/desorpcji azotu (Rys. 1b) dla modyfikowanych węgli aktywnych AC-CO<sub>2</sub>-MKF' i AC-N<sub>2</sub> mają podobny przebieg, co wskazuje na podobieństwo struktury pomimo innej atmosfery ich aktywacji.



**Rys. 1.** Izotermi adsorpcji/desorpcji azotu dla węgla AC-CO<sub>2</sub> i AC-N<sub>2</sub> (a) i dla węgla aktywnych po modyfikacji mikrofalowej: AC-CO<sub>2</sub>-MKF, AC-CO<sub>2</sub>-MKF' i AC-N<sub>2</sub>-MKF (b) oraz odpowiednie krzywe rozkładu objętości porów (c) i (d).

W Tabeli 2 przedstawiono wyniki badań tlenowych grup funkcyjnych obecnych na powierzchni otrzymanych węgli aktywnych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić obecność grup o charakterze kwasowym i zasadowym, jednak w przeważającej części są to grupy kwasowe. Spośród grup kwasowych występują tylko grupy fenolowe. Dodatkowa modyfikacja MKF spowodowała wzrost ilości grup zasadowych dla wszystkich otrzymanych węgli aktywnych. Większy wzrost



grup zasadowych uzyskano przy modyfikacji MKF przy zastosowaniu mniejszego ciśnienia 47-50 atmosfer (AC-CO<sub>2</sub>-MKF). Modyfikacja MKF spowodowała wzrost ilości kwasowych grup fenolowych dla węgla uzyskanych w procesie pirolizy w utleniającej atmosferze CO<sub>2</sub> oraz zmniejszenie ilości tych grup dla węgla uzyskanych w procesie pirolizy w atmosferze N<sub>2</sub>.

**Tabela 2.** Chemiczny charakter powierzchni węgla aktywnych.

Nazwa próbki	Grupy zasadowe [mgR/g]	Grupy kwasowe fenolowe [mgR/g]
AC-CO <sub>2</sub>	0,8888	2,0722
AC-CO <sub>2</sub> -MKF	1,5244	2,2188
AC-CO <sub>2</sub> -MKF'	0,9260	2,2501
AC-N <sub>2</sub>	0,8977	2,1441
AC-N <sub>2</sub> -MKF	1,2345	1,8961

**Wnioski:** Szyszki świerkowe (*Picea abies*) są dobrym prekursorem do produkcji węgla aktywnych. Otrzymane węgle charakteryzują się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą S<sub>BET</sub> i strukturą porów. Kształty izoterm adsorpcji/desorpcji azotu i krzywych rozkładu porów wskazują na mikro/mezoporowaty charakter badanych materiałów. Zastosowanie modyfikacji przegrzaną parą wodną wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym spowodowało znaczne rozwinięcie pola powierzchni właściwej S<sub>BET</sub>. Analiza chemii powierzchni za pomocą miareczkowania potencjometrycznego metodą Boehma wykazała, że otrzymane węgle aktywne zawierają na swojej powierzchni tlenowe grupy funkcyjne, głównie o charakterze kwasowym. Piroliza prowadzona w atmosferze N<sub>2</sub> okazała się tak samo efektywna w rozwijaniu powierzchni węgla aktywnych jak w atmosferze CO<sub>2</sub>.

#### Literatura:

1. P.W. Atkins, Chemia fizyczna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2001.
2. B. Buczek, W. Chwiałkowski, Charakterystyka powierzchni modyfikowanego węgla aktywnego wybranymi metodami, Zeszyty Naukowe/Uniwersytet ekonomiczny w Krakowie, Kraków, 2008.
3. H. Jankowska, A. Świątkowski, J. Choma, Węgiel aktywny, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1985.
4. M. Repelewicz, K. Jedynak, J. Choma, Ochrona Środowiska, 37/9 (2009) 45.
5. P.E. Fanning, M.A. Vannice, Carbon, 31 (1993) 721.

## **BADANIE WŁAŚCIWOŚCI ADSORPCYJNYCH BIEWĘGLI AKTYWNYCH W UKŁADZIE MIESZANYCH ADSORBATÓW: Pb(II), PAA, TRITON X-100**

**M. GĘCA<sup>1</sup>, M. WIŚNIEWSKA<sup>1</sup>, P. NOWICKI<sup>2</sup>**, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań.

**Abstrakt:** W pracy podano krótką charakterystykę biowęgli oraz węgla aktywnych, a także przedstawiono kierunki ich najczęstszych zastosowań. Zamieszczono również wyniki badań dotyczących możliwości adsorpcyjnego usuwania jonów ołowiu(II), poli(kwasu akrylowego) - PAA i Tritonu X-100 z jedno- i wieloskładnikowych układów adsorbatów z roztworów wodnych przy użyciu dwóch węgla aktywnych uzyskanych z ziela skrzypu polnego. Różne procedury preparatyki materiałów węglowych (odmienne sposoby przemywania po procesie ich aktywacji) doprowadziły do uzyskania adsorbentów różniących się nie tylko parametrami teksturalnymi, ale również właściwościami kwasowo-zasadowymi powierzchni. Miało to swoje bezpośrednie przełożenie na mechanizm adsorpcji i ilość związanego polimeru, surfaktantu i metalu ciężkiego, a w konsekwencji na ich efektywne wydzielenie z fazy ciekłej.

**Wprowadzenie:** Węgiel aktywny to adsorbent charakteryzujący się znacznym rozwinięciem powierzchni właściwej w przeliczeniu na jednostkę masy. Jego wyjściowe właściwości hydrofobowe pozwalają na adsorpcję głównie cząsteczek niepolarnych, jednak ze względu na łatwość modyfikacji jego powierzchni, możliwości te rozszerzają się na cząsteczki o różnym charakterze chemicznym. Węgiel aktywny może być otrzymywany z drewna, torfu, węgla kamiennego oraz brunatnego [1]. W ostatnim czasie dużą popularnością cieszą się również materiały odpadowe, takie jak pestki owoców, łupiny orzechów, trociny, odpady z przetwórstwa rolno-spożywczego oraz nadziemne części roślin. W przypadku pozyskania węgla aktywnego z prekursora pochodzenia naturalnego, czyli tzw. biomasy, określa się go mianem biowęgla. Z uwagi na wiele potencjalnych surowców mogących służyć do wytworzenia tego adsorbentu oraz na łatwość modyfikacji jego powierzchni znalazł on szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, rolnictwie oraz ochronie środowiska. Najbardziej powszechnym zastosowaniem węgla aktywnego jest jego użycie w filtrach wody. Wykorzystywany jest zarówno w butelkach i dzbankach służących do filtrowania wody kranowej jak i w dużych instalacjach ujęć wody wodociągowej. Adsorbent ten umożliwia usunięcie z roztworów wielu rodzajów zanieczyszczeń. Jony metali ciężkich, dostają się do wody najczęściej wskutek nieodpowiedniego składowania i utylizacji odpadów. Z kolei pestycydy przedostają się do zbiorników wodnych na skutek ich nieodpowiedniego i nadmiernego nawożenia [2]. Substancje humusowe występujące w glebach bogatych w próchnicę, w sposób naturalny migrują do wód gruntowych. Wszystkie te składniki nie powinny być spożywane, a więc również znajdować się

w wodzie wodociągowej. Skuteczne ich usunięcie umożliwia proces adsorpcji na powierzchni węgla aktywnego. Biowęgle stosowane są w procesie kompostowania, w którym ze względu na swoją strukturę porowatą odpowiedzialne są za zwiększenie retencji wody oraz ułatwienie dostępu tlenu do niższych warstw kompostownika. Ich obecność zwiększa również zawartość mikroelementów oraz składników odżywczych w mieszance kompostowej. Ze względu na ich naturalny charakter, składnik ten nie musi być usuwany z kompostu przed jego wykorzystaniem, co stanowi ich niewątpliwie istotną zaletę i ułatwia wykorzystanie mieszanki kompostowej [3]. Najważniejszym zastosowaniem tych adsorbentów w rolnictwie jest ich dodawanie do gleb w celu poprawy żyzności gruntów. Wpływają one na pH podłoża oraz jego pojemność wodną, a także zatrzymują na swojej powierzchni metale ciężkie, które mogą być obecne w glebach. Uniemożliwia to wbudowywanie tych pierwiastków w struktury roślin, co pozytywnie wpływa na wielkość i jakość plonów [4]. Biowęgle ograniczają również emisję tlenków azotu i węgla oraz metanu z gleb, co wpływa na zmniejszenie zawartości gazów cieplarnianych w atmosferze [5]. Węgłe aktywne ze względu na łatwość modyfikacji ich powierzchni stanowią idealne adsorbenty dla mieszanin o bardzo zróżnicowanym składzie. Dlatego są one szeroko stosowane w procesach oczyszczania ścieków. Wykorzystywane są do oczyszczania odpadów płynnych z metali ciężkich, barwników, a także oleistych składników ropy naftowej [6]. Wprowadzenie adsorpcji na węglu aktywnym jako jednego z etapów oczyszczania ścieków umożliwia usunięcie z nich wielu szkodliwych zanieczyszczeń. Oczyszczenie i separacja mieszanin gazowych na skalę przemysłową również odbywa się z wykorzystaniem węgla aktywnego. Z uwagi na możliwość jego regeneracji stanowi on adsorbent, który nie przyczynia się do zwiększania produkcji odpadów. Może być stosowany w procesach cyklicznych, w których bezpośrednio po adsorpcji następuje desorpcja, co umożliwia jego ponowne wykorzystanie w bardzo krótkim odstępie czasu. Stanowi to rozwiązanie niezwykle korzystne ze względów ekologicznych [7]. Porowate materiały węglowe znajdują również swoje zastosowanie w budowie elektrod superkondensatorów, wykorzystywanych jako magazyny energii. Im większa powierzchnia elektrody, tym większa pojemność superkondensatora. Węgłe aktywne doskonale sprawdzają się w tej funkcji nie tylko ze względu na korzystne parametry tekstualne, ale również obecność w swojej strukturze atomów o hybrydyzacji  $sp^2$ , które pozytywnie wpływają na przewodnictwo prądu elektrycznego [8]. Węgłe aktywne w ostatnim czasie są również szeroko stosowane w przemyśle kosmetycznych. Na rynku dostępnych jest wiele preparatów (maseczek, żeli, peelingów oraz kremów do twarzy, a także past do zębów) zawierających ten składnik. Kosmetyki te skutecznie zwalczają trądzik, ograniczają nadmierne wydzielanie sebum przez skórę oraz ją oczyszczają. Węgiel aktywny w pastach do zębów pełni natomiast funkcję wybielającą. Głównym celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości jednoczesnego usuwania polimeru anionowego (poli(kwasu akrylowego) – PAA), surfaktantu niejonowego (Tritonu X-100) oraz metalu ciężkiego (Pb(II)) przy użyciu biowęgla uzyskanych z ziela skrzypu polnego. Eksperymenty przeprowadzono w nowatorski sposób, ponieważ oznaczono ilościowo adsorpcję na ciele stałym każdego ze składników złożonej mieszaniny adsorbatów. Prowadzenie badań w tak skomplikowanych układach jest w pełni uzasadnione, ponieważ są one bardziej zbliżone składem do

realnych ścieków i pozwalają na zdefiniowanie mechanizmów rządzących procesami ich usuwania z fazy ciekłej.

**Część eksperymentalna:** Węgle aktywne otrzymano poprzez rozdrobnienie ziela skrzypu polnego, a następnie jego aktywację z użyciem pary wodnej, przez 60 min w temperaturze 800°C. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej ciało stałe podzielono na dwie porcje. Jedną z nich przemywano gorącą wodą demineralizowaną do obojętnego pH, w ten sposób uzyskano węgiel oznaczony jako SK\_H<sub>2</sub>O. Drugą część przemywano przez 10 min, pod chłodnicą zwrotną, wrzącym 10% kwasem solnym. Następnie sączono na lejku ze spiekem G6, a potem przemywano gorącą wodą demineralizowaną do uzyskania obojętnego pH. Uzyskany węgiel oznaczony symbolem SK\_HCl. Oba ciała stałe suszono przez 12 godzin w temperaturze 120°C. W kolejnym etapie wyznaczono wielkość adsorpcji poli(kwasu akrylowego) – PAA, Tritonu X-100 oraz jonów ołowiu(II) na powierzchni obu biowęgla. Pomiary prowadzono w jedno-, dwu- i trój-składnikowych układach adsorbatów w obecności elektrolitu podstawowego (NaCl o stężeniu 0.001 mol/dm<sup>3</sup>), z jednoczesnym określeniem ilości związanego polimeru, surfaktantu oraz metalu ciężkiego w układach mieszanych. Stężenia początkowe wszystkich składników wynosiły 100 ppm, pH roztworu było równe 5 (brak zjawiska wytrącania wodorotlenku ołowiu), a temperatura procesu 25°C. W celu wyznaczenia wielkości adsorpcji zastosowano metodą statyczną, polegającą na określeniu różnicy w stężeniu substancji przed i po procesie jej adsorpcji (trwającej 24 godziny). W przypadku polimeru oraz surfaktantu ich stężenia zostały wyznaczone z wykorzystaniem spektrofotometrii UV/VIS, przy użyciu spektrometru Carry 1000 (Varian). Absorbancja roztworów Tritonu X-100 mierzona była bezpośrednio przy długości fali 270 nm, natomiast w przypadku PAA konieczne było przeprowadzenie barwnej reakcji kompleksowania z hyaminą (pomiar przy długości fali 500 nm) [9]. Z kolei stężenie jonów ołowiu(II) oznaczono metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie, z użyciem analizatora iCAP<sup>TM</sup> 7200 ICP-OES (Thermo Scientific).

**Wyniki:** Rezultaty pomiarów wielkości adsorpcji poszczególnych adsorbatów w prostych i mieszanych układach adsorbatów zaprezentowano w tabeli 1. Warto wspomnieć, że punkty ładunku zerowego (pzc) zastosowanych węgla aktywnych przypadają przy wartościach pH 9,1 dla SK\_H<sub>2</sub>O oraz 3,6 dla SK\_HCl, co stanowi potwierdzenie odpowiednio zasadowej i kwasowej natury tych adsorbentów. Zatem w roztworach o pH 5, powierzchnia biowęgla SK\_H<sub>2</sub>O była obdarzona ładunkiem dodatnim, natomiast SK\_HCl – ujemnym. To właśnie z powodów korzystnych warunków elektrostatycznych kationy ołowiu(II) wykazywały znacznie większą adsorpcję na powierzchni węgla SK\_HCl, niezależnie od obecności pozostałych składników roztworu. Z kolei poli(kwas akrylowy) w układach mieszanych adsorbatów również wykazywał większą adsorpcję na powierzchni SK\_HCl, natomiast w przypadku gdy polimer występował samodzielnie większą wielkość adsorpcji obserwowano dla biowęgla SK\_H<sub>2</sub>O (ze względu przyciąganie elektrostatyczne PAA-ciało stałe). Niejonowy Triton X-100 niezależnie od składu roztworu posiadał porównywalne i niezbyt wysokie powinowactwo adsorpcyjne do

obu węgli aktywnych (uzyskano najniższe wartości ilości zaadsorbowanej surfaktantu spośród wszystkich badanych adsorbatów).

**Tabela 1.** Wielkość adsorpcji poszczególnych adsorbatów w różnych układach adsorpcyjnych.

Układ adsorpcyjny	Wielkość adsorpcji [mg/g]		
	Pb(II)	PAA	Triton X-100
SK_H <sub>2</sub> O + Pb(II)	51,85	-	-
SK_HCl + Pb(II)	69,02	-	-
SK_H <sub>2</sub> O + PAA	-	57,71	-
SK_HCl + PAA	-	40,26	-
SK_H <sub>2</sub> O + TRT	-	-	20,32
SK_HCl + TRT	-	-	19,29
SK_H <sub>2</sub> O + Pb(II) + PAA	99,79	72,17	-
SK_HCl + Pb(II) + PAA	148,79	195,79	-
SK_H <sub>2</sub> O + Pb(II) + TRT	97,44	-	17,67
SK_HCl + Pb(II) + TRT	106,41	-	16,57
SK_H <sub>2</sub> O + PAA + TRT	-	22,94	15,19
SK_HCl + PAA + TRT	-	28,12	18,79
SK_H <sub>2</sub> O+Pb(II)+PAA+TRT	99,71	72,85	14,36
SK_HCl+Pb(II)+PAA+TRT	183,29	187,72	13,06

Skuteczność adsorpcji poli(kwasu akrylowego) wzrastała znacząco w układach zawierających kationy ołowiu(II), co jest związane z tworzeniem kompleksów polimer-metal (o naturze zarówno wewnątrz-, jak i międzycząsteczkowej). Proces ten zachodzi bardzo efektywnie ze względu na elektrostatyczne przyciąganie ujemnie naładowanych grup karboksylowych PAA z kationami metalu ciężkiego i może prowadzić do powstawania wielowarstwy adsorpcyjnej. Obecność Tritonu X-100 negatywnie wpływała na ilość związanego polikwasu w dwuskładnikowych układach adsorbatów, co może być częściowo spowodowane ich wzajemnym oddziaływaniem konkurencyjnym, bądź blokowaniem miejsc aktywnych ciała stałego przez mniejsze cząsteczki surfaktantu.

**Wnioski:** Otrzymane węgle aktywne mogą być z powodzeniem zastosowane jako adsorbenty w procesie jednoczesnego usuwania jonów metali ciężkich, surfaktantów oraz polimerów z roztworów wodnych. Najbardziej efektywnym układem w tym względzie okazał się być SK\_HCl+Pb(II)+PAA+Titon X-100, dla którego proces adsorpcji obejmował różne mechanizmy począwszy od sił elektrostatycznych, tworzenia wiązań chemicznych (kompleksy metal-polimer) i wodorowych, a kończąc na oddziaływaniach hydrofobowych.

#### **Literatura:**

1. A. Kobyłka, Technical Issues, 4 (2016) 27.
2. M. Włodarczyk-Makuła, LAB, 2 (2015) 10.
3. K. Malińska, J. Dach, Inżynieria Ekologiczna, 36 (2014) 28.
4. L. Beesley, E. Moreno-Jimenez, J. L. Gomez-Eyles, Environmental Pollution, 158 (2010) 2282.
5. A. Medyńska-Juraszek, Soil Science Annual, 67 (2016) 151.
6. T. Stelinga, Inżynieria Ekologiczna, 2 (2000) 14.

7. W. Duliński, C. E. Ropa, *Wiertnictwo, Nafta, Gaz*, 21 (2014) 85.
8. A. Lisowska-Oleksiak, A. P. Nowak, M. Wilamowska, *Acta Energetica*, 1 (2010) 71.
9. W.B. Crummett, R.A. Hummel, *Journal of American Water Works Association*, 1 (1963) 209.

## **BIOWĘGIEL MODYFIKOWANY KWASEM ASKORBINOWYM JAKO EFEKTYWNY ADSORBENT TETRACYKLINY**

**A. TOMCZYK, K. SZEWCZUK-KARPISZ, Z. SOKOŁOWSKA**, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20 – 290 Lublin.

**Abstrakt:** Biowęgiel produkowany jest podczas procesu pirolizy różnego rodzaju biomasy. Zazwyczaj materiał ten charakteryzuje się wysoką zdolnością adsorpcyjną względem różnego rodzaju jonów i cząsteczek. W niniejszej pracy przedstawiono pojemność adsorpcyjną biowęgla oraz jego zmodyfikowanej odmiany względem powszechnie stosowanego antybiotyku – tetracykliny. Biowęgiel był otrzymany z łusek słonecznika w temperaturze 650°C, a jego modyfikację przeprowadzono za pomocą roztworu kwasu askorbinowego. Na podstawie przeprowadzonych badań, tj. charakterystyki powierzchniowej biowęgla oraz pomiarów wielkości adsorpcji tetracykliny, stwierdzono, że modyfikacja biowęgla zwiększyła powinowactwo powierzchni ciała stałego do adsorbowania antybiotyku i usuwania go ze środowisk wodnych.

**Wprowadzenie:** Obecnie ok. 100-200 000 ton antybiotyków jest konsumowanych rocznie na całym świecie [1]. W ostatnich latach substancje te były w sposób ciągły uwalniane do środowiska, bez żadnych ograniczeń. Ich stały dopływ do środowiska sprawia, że ich działanie kumuluje się i może stanowić potencjalne zagrożenie dla ekosystemów wodnych i mikroorganizmów. Tetracykliny są drugą najczęściej występującą grupą antybiotyków i są stosowane w leczeniu różnych chorób zakaźnych [2]. Ich obecność w środowisku wodnym może powodować różne reakcje alergiczne oraz rozwój patogenów opornych na antybiotyki, które mogą zagrażać funkcjonowaniu ekosystemu i zdrowiu człowieka. W związku z tym coraz częściej odczuwalna jest potrzeba wydajnego systemu umożliwiającego usuwanie tych związków ze środowiska wodnego. W tym celu opracowano wiele metod oraz technologii do oczyszczania gleb czy ścieków. Najbardziej efektywne w dekontaminacji okazały się adsorbenty pochodzenia węglowego (np. biowęgiel) [3].

Biowęgiel jest drobnoziarnistym karbonatem o wysokiej zawartości węgla, otrzymywanym w procesie pirolizy różnego rodzaju biomasy m.in. roślin energetycznych (np. miskant, wierzba), obornika bydłęcego, odpadów leśnych, biomasy rolniczej (głównie kukurydzę i rzepak), odpadów z przetwórstwa spożywczo-rolniczego (np. łuski ryżowe, słonecznikowe), w temperaturze od 100 do 900°C [3,4]. Istotnymi cechami przekładającymi się bezpośrednio na zdolności adsorpcyjne biowęgla są: dobrze rozwinięta powierzchnia właściwa, struktura porowata (pory o rozmiarach od nano- do mikrometrów) oraz duża zawartość powierzchniowych grup funkcyjnych [3,4]. Właściwości fizykochemiczne biowęgla umożliwiają jego zastosowanie jako materiału poprawiającego jakość różnego rodzaju środowisk wodnych.

**Część eksperymentalna:** Celem doświadczenia było określenie wpływu modyfikacji biowęgla na jego zdolności adsorpcyjne względem tetracykliny. Cel ten zrealizowano poprzez analizę właściwości powierzchniowych biowęgla oraz adsorpcji równowagowej w układzie biowęgiel-tetracyklina. Wszystkie pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a punkty wykresów uzyskano z uśrednienia danych. Do badań wykorzystano biowęgiel (BC) wyprodukowany przez firmę NTT (New Technology Trade) w Polsce z łusek słonecznika w temperaturze 650°C. Modyfikację biowęgla (BCV) dokonano trzema etapami. Pierwszy etap to było zmieszanie adsorbentu z 1 M wodnym roztworem kwasu askorbinowego i poddanie uzyskanej suspensji ultradźwiękom przez 15 minut. Następnie wytrząsano zawiesinę przez 24 godziny. Kolejno, suspensje przefiltrowano i przemyto trzy razy wodą zdemineralizowaną. Charakterystyka powierzchniowa BC oraz BCV obejmowała m.in. oznaczenie zawartości powierzchniowych grup funkcyjnych metodą Boehm’a, wyznaczenie zmiennego ładunku powierzchniowego za pomocą miareczkowania potencjometrycznego przy pH=10, analizę widm FTIR, a także wyznaczenie powierzchni właściwej, całkowitej objętości porów, objętości mikroporów i średniej średnicy porów za pomocą sorptomatu ASAP 2420. Widma FTIR badanych próbek zarejestrowano na spektrofotometrze FTIR (Tensor 27, Bruker) w zakresie 400 – 4000 cm<sup>-1</sup>. Adsorpcję tetracykliny przeprowadzono w temperaturze pokojowej (20°C ± 2°C). BC i BCV (50 mg) dodano do 9 mL roztworu tetracykliny (1, 3, 5, 10, 15 i 20 mg/L) i 1 mL 0,01 M roztworu CaCl<sub>2</sub>. Suspensje wytrząsano za pomocą rotatora laboratoryjnego przez 24 h. Po wytrząsaniu, mieszaniny przefiltrowano przez sączi papierowe. Stężenia niezaadsorbowanej tetracykliny analizowano za pomocą chromatografii cieczowej HPLC (UltiMate 3000, Dionex).

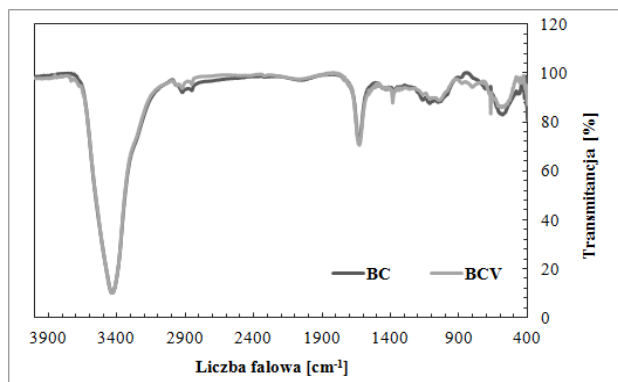
**Wyniki:** Analiza charakterystyki powierzchniowej BC i BCV została zestawiona w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Charakterystyka BC i BCV ( $Q$  – zmienny ładunek powierzchniowy,  $S_{BET}$  – powierzchnia właściwa,  $V_{cat}$  – całkowita objętość porów,  $V_m$  – objętość mikroporów,  $r_{sr}$  – średnia średnica porów)

Typ próbki	$S_{BET}$ [m <sup>2</sup> /g]	$V_{cat}$ [cm <sup>3</sup> /g]	$V_m$ [cm <sup>3</sup> /g]	$r_{sr}$ [nm]	$Q$ [cmol/kg]	Grupy fenolowe [mmol/kg]	Grupy karboksylowe [mmol/kg]	Grupy laktonowe [mmol/kg]
BC	7,02	0,06	0,04	3,5	48,9	0,70	0,10	2,10
BCV	0,13	0,001	0,001	36,4	57,7	0,40	0,40	2,30

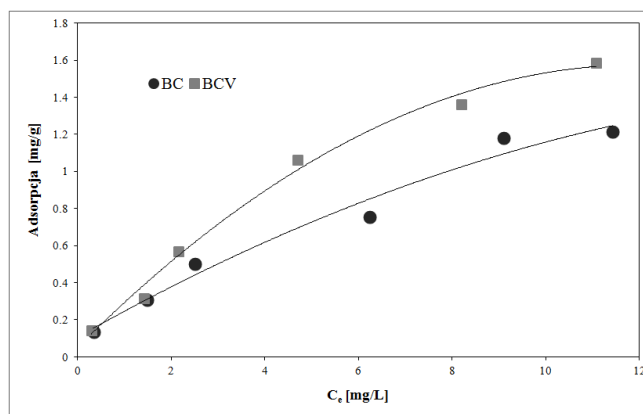
Biowęgiel z łusek słonecznika charakteryzuje się wyższą powierzchnią właściwą (7,02 m<sup>2</sup>/g), wyższą całkowitą objętością porów (0,06 cm<sup>3</sup>/g) i mikroporów (0,04 cm<sup>3</sup>/g). Natomiast modyfikacja biowęgla za pomocą kwasu askorbinowego spowodowała zwiększenie wartości zmiennego ładunku powierzchniowego o 1,18 razy, średnicy porów (o 10,4 razy) oraz zawartości powierzchniowych grup funkcyjnych (o 1,07 razy). Na Rysunku 1 przedstawiono widma w podczerwieni badanych biowęgla. Uzyskano pasma absorpcji typowe dla biowęgla.





Rys. 1. Charakterystyka widm FTIR BC oraz BCV.

Szerokie pasmo występujące w zakresie  $\sim 3000\text{--}3750\text{ cm}^{-1}$  pochodzi od drgań rozciągających grupy hydroksylowej  $\text{--OH}$ , z kolei pasmo między  $2818\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$  – od rozciągających drgań  $\text{C--H}$  grupy metylowej i metylenowej. Widma biowęgla wykazały również obecność pasma pomiędzy  $1500\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$  dotyczącego aromatycznych drgań rozciągających  $\text{C=C}$  i rozciągających  $\text{C=O}$  pochodzących od koniugowanych ketonów oraz chinonów. Wyraźny sygnał rejestrowany przy  $1387\text{ cm}^{-1}$  jest reprezentatywny dla drgań rozciągających  $\text{C--C}$  w pierścieniu aromatycznym. Pasma pomiędzy  $485\text{ a }840\text{ cm}^{-1}$  przypisano drganiom aromatycznym  $\text{C--H}$  poza płaszczyznę. W przypadku BCV pojawienie się pasma dotyczącego drgań rozciągających  $\text{C--C}$  w pierścieniu aromatycznym, wskazuje na zwiększenie zawartości związków aromatycznych w badanym materiale. Rysunek 2 przedstawia uzyskane eksperymentalne krzywe adsorpcji tetracykliny na powierzchni obu biowęgla.



Rys. 2. Eksperymentalne krzywe adsorpcji tetracykliny ( $C_e$ –stężenie równowagowe).

Do opisanie eksperymentalnych danych adsorpcji antybiotyku na biowęgłu użyto modeli izoterm adsorpcji Langmuira i Freundlicha. W Tabeli 2 załączono uzyskane

parametry dopasowania danych eksperymentalnych do modelowych izoterm adsorpcji.

**Tabela 2.** Parametry izoterm adsorpcji tetracykliny na BC i BCV

Typ próbki	Izoterma Langmuira			Izoterma Freundlicha		
	$K_L$ [L/mg]	$Q_m$ [mg/g]	$R^2$	$K_F$ [mg/g(L/mg) <sup>1/n</sup> ]	1/n	$R^2$
BC	2,03	1,10	0,96	0,05	0,71	0,96
BCV	1,44	1,29	0,95	0,07	0,74	0,98

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że izoterma Freundlicha lepiej opisuje adsorpcję tetracykliny ( $R^2 > 0.96$ ). Wartości parametru  $1/n$  były poniżej 1, co świadczyło o niejednorodności powierzchni biowęglu. Obliczona z danych eksperymentalnych skuteczność BC w usuwaniu tetracykliny ze środowisk wodnych wyniosła 38%, a BCV – 53%. Można zatem stwierdzić, że modyfikacja adsorbentu przez kwas askorbinowy miała pozytywny wpływ na zdolność adsorpcyjną adsorbentu. BCV ma większy zmienny ładunek powierzchniowy niż BC, co przekłada się na jego większą zdolność do wymiany kationów i adsorpcji większej ilości tetracykliny. Zmienny ładunek powierzchniowy pochodzi od powierzchniowych grup karboksylowych, fenolowych i laktonowych. Im większa liczba tych grup, tym wyższa wartość  $Q$  i oczywiście większa zdolność adsorpcyjna. Powierzchniowe grupy funkcyjne oddziałują z cząsteczkami antybiotyku poprzez wymianę jonową, interakcje van der Waalsa i tworzenie wiązań wodorowych. Z drugiej zaś strony tetracyklina zawiera atomy wodoru, które są kwasami Lewisa i przez to interakcje między adsorbentem i adsorbentem mogą mieć charakter reakcji kwasowo-zasadowych.

**Wnioski:** Wysoki zmienny ładunek powierzchniowy oraz wysoka ilościowa zawartość powierzchniowych grup kwasowych przyczyniają się do wysokich pojemności adsorpcyjnych biowęglu względem tetracykliny. Eksperymentalne dane adsorpcji równowagowej są dobrze opisywane przez izotermę Freundlicha. Modyfikacja kwasem askorbinowym podwyższa zdolność adsorpcyjną biowęglu otrzymanego z łusek słonecznika, dzięki czemu otrzymany materiał BCV może być wykorzystany jako efektywny adsorbent tetracykliny.

### Literatura:

1. M. Cycoń, A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget. *Front. Microbiol.*, 10 (2019) 338.
2. R. Daghri, P. Drogui. *Environ. Chem. Lett.*, 11 (2013) 209.
3. A. Tomczyk, Z. Sokołowska, P. Boguta. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19 (2020) 191.
4. D. Wang, P. Jiang, H. Zhag, W. Yuan. *Science of the Total Environment*, 723 (2020) 137775.

## ZASTOSOWANIE BIOSORBENTU I ŻYWICY JONOWYMIENNEJ DO USUWANIA JONÓW TORU

J. IWAN<sup>1</sup>, A. GŁADYSZ-PLASKA<sup>1</sup>, Z. HUBICKI<sup>1</sup>, M. KUTYŁA<sup>2</sup>,  
M. TRYTEK<sup>2</sup>, <sup>1</sup>UMCS, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra  
Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin; <sup>2</sup> UMCS,  
Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra  
Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19 20-033 Lublin

**Abstrakt:** Tor jest pierwiastkiem, którego występowanie na ziemi jest większe niż uranu. Jego najpoważniejsze wykorzystanie wiąże się z energetyką jądrową, czemu towarzyszy niestety skażenie środowiska z udziałem tego pierwiastka. Do głównych źródeł tych zanieczyszczeń należą przeróbka i składowanie paliwa jądrowego, awarie reaktorów jądrowych oraz stosowanie metod jądrowych w medycynie i przemyśle. Z uwagi na fakt, że tor może powodować w organizmie człowieka poważne uszkodzenia narządów a nawet śmierć poszukuje się różnych sposobów usuwania go ze ścieków jądrowych. W pracy porównane zostały dwa sorbenty, naturalna grzybnia i syntetyczny wymiennicz jonowy w odniesieniu do usuwania jonów toru z roztworów wodnych.

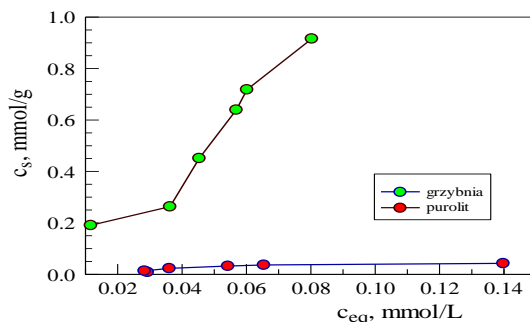
**Wprowadzenie:** Tor został odkryty w 1828 roku przez szwedzkiego chemika Jönsa Jacoba Berzeliusa [1]. Jest radioaktywnym pierwiastkiem z szeregu aktywności [2]. Znajduje się on w 3 grupie układu okresowego pierwiastków, a jego liczba atomowa wynosi 90 [2]. Występuje naturalnie w niskich stężeniach w skorupie ziemskiej. Do minerałów z których można pozyskiwać tor należą: toryt, torianit, monacyt, cyrkon oraz samarskit [3]. W czystej postaci jest srebrzystobiałym, ciężkim metalem. W formie sproszkowanej posiada właściwości piroforyczne [4]. Tor reaguje z parą wodną, węglem, azotem, tlenem i wodorem w wysokiej temperaturze. Nie ulega utlenieniu przy chwilowym kontakcie z powietrzem, natomiast przy długotrwałym działaniu powietrza, powoduje matowienie metalu. Stopień utlenienia toru w związkach wynosi +4. W roztworach wodnych jony tego pierwiastka są bezbarwne. Odporność korozyjną wykazuje czysty tor metaliczny na działanie wody, natomiast silną korozję toru wywołuje wodór nawet przy niskich temperaturach. Właściwości toru nie zależą od obróbki mechanicznej i cieplnej oraz ze względu na budowę krystaliczną jest on niepodatny na działanie napromieniowania w reaktorze [3]. Pierwiastek ten występuje w środowisku naturalnym niemalże w 100% jako izotop posiadający 142 neutrony. Inne odmiany, które mają 137, 138, 140, 141 i 144 neutronów pojawiają się w sposób znikomy, natomiast izotopy których liczba neutronów wynosi 136, 139 oraz 143 są syntezowane w sposób sztuczny. Najbardziej rozpowszechnionym oraz najtrwałszym izotopem tego pierwiastka jest Tor-232, jego czas połowicznego rozpadu wynosi około 14 milionów lat [5]. Tor posiada dwie odmiany alotropowe:  $\alpha$  – do 1400 °C oraz  $\beta$  – powyżej 1400 °C. Scentrowane krawędziowo kryształy sześciennie posiada odmiana  $\alpha$ , natomiast odmiana  $\beta$  przestrzennie scentrowane kryształy sześciennie [3]. W bliskiej przyszłości tor ma stać się bardzo energetycznym paliwem do elektrowni atomowych. Znajduje on szerokie

zastosowanie w elektronice oraz w przemyśle optycznym. Metaliczny tor używa się w lampach elektronowych do pokrywania drucików wolframowych oraz w aparatach wysokopróżniowych jako adsorbent gazów [3]. Może być on również dodawany do elementów ceramicznych, takich jak tygle, aby stały się one bardziej odporne na ciepło, a także może być dodawany do szkła refrakcyjnego, w celu uzyskania mniejszych i dokładniejszych obiektywów aparatów fotograficznych. Ponadto jest stosowany w prętach spawalniczych i żarnikach żarówek elektrycznych aby poprawić wydajność produktów [4]. Tor na ziemi jest liczniejszy oraz tańszy niż uran [6]. Jest jednym z ważniejszych zasobów w energetyce jądrowej. Podczas jego wydobywania i wykorzystania, wytwarzana jest duża ilość ścieków z udziałem tego pierwiastka [7-9]. Do głównych źródeł tych zanieczyszczeń należą przeróbka i składowanie paliwa jądrowego, awarie reaktorów jądrowych oraz stosowanie metod jądrowych w medycynie i przemyśle [8]. Jeżeli ścieki nie zostaną odpowiednio oczyszczone z radioaktywnego pierwiastka, mogą powodować poważne zanieczyszczenia wody. Skażenie radioaktywne jest mniej zauważalne niż inne zanieczyszczenia, lecz mimo to nie można lekceważyć szkód spowodowanych tymi ściekami. Spożycie substancji chemicznych zawierających tor może spowodować w organizmie człowieka poważne uszkodzenia narządów ludzkich, a w ciężkich przypadkach może wywołać raka lub nawet spowodować śmierć. Ze względu na to separacja toru(IV) odgrywa ważną rolę w rozwiązywaniu problemów związanych z zanieczyszczeniem ścieków zawierających tor. Obecnie do powszechnie stosowanych metod oczyszczenia ścieków zawierających ten radioaktywny pierwiastek należą: metoda ekstrakcji, metoda jonowymienna, metoda chemicznego wytrącania, metoda adsorpcyjna oraz metoda separacji membranowej.

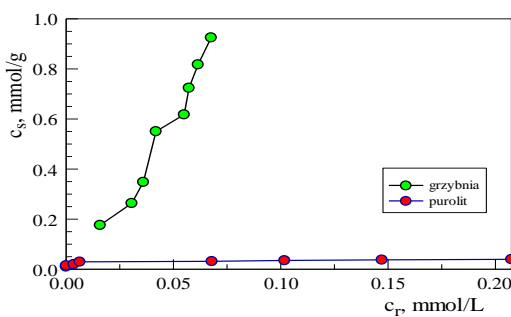
**Część eksperymentalna:** Celem pracy było zbadanie i porównanie zdolności adsorpcyjnych w stosunku do jonów toru sorbentu naturalnego otrzymanego z grzybni oraz syntetycznego handlowego wymiennicza jonowego Purolite MZ10, firmy Purolite Corporation. Otrzymano izotermy adsorpcji jonów toru na wymienionych adsorbentach w dwóch temperaturach 20 i 60°C w zakresie stężeń od 0,2 do 1 mmol/L stosując naważki 0,05g i 1g odpowiednio z grzybni i purolitu oraz 50 ml roztworu. Czas kontaktu fazy stałej z roztworem wynosił 6 godzin. Zbadano również wpływ pH na proces sorpcji w zakresie pH od 2 do 10 przy stężeniu jonów toru wynoszącym 0,5 mmol/L. Po 6 godzinach kontaktowania faz na wytrząsarce mechanicznej roztwory zostały przesączone, stosując sączi twarde. W przesączeniach oznaczono spektrofotometrycznie stężenie jonów toru metodą Arsenazo III.

**Wyniki:** Przeprowadzone badania miały na celu określenie i porównanie zdolności sorpcyjnych dwóch różnych sorbentów. Jednym z nich była grzybnia naturalna, pozyskana ze zbiorów leśnych w okolicy Lublina. Materiał ten został wcześniej wysuszony, a następnie zmielony. Kolejnym sorbentem była żywica jonowymienna Purolit MZ10. Jest to dostępny w handlu komercyjny produkt firmy Purolite Corporation. Porównując wielkość adsorpcji jonów toru na powyższych materiałach stwierdzono, że naturalna grzybnia była lepszym sorbentem niż purolit. W wyniku przeprowadzonych badań otrzymane zostały o rząd wielkości większe wartości adsorpcji. Wykorzystując popularne modele izoterm adsorpcji, czyli model

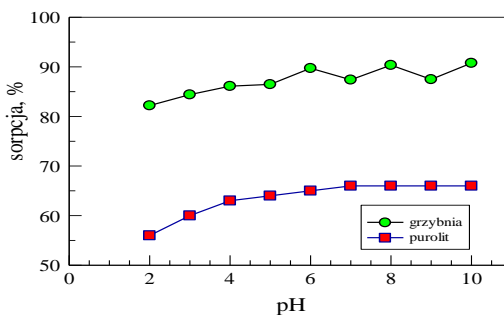
Freundlicha, Langmuira, Langmuira-Freundlicha oraz Dubinina- Radushkevicha wyliczono teoretyczne parametry adsorpcji jonów toru na poszczególnych sorbentach. Najwyższą wartość współczynnika korelacji  $R^2$  dla grzybni otrzymano w przypadku modelu Langmuira-Freundlicha i wynosił 0,96-0,98. Wycieczona teoretyczna wartość adsorpcji maksymalnej na tym materiale wynosiła prawie 0,001 mol/g. W przypadku purolitu najlepiej opisywał dane eksperymentalne model Langmuira,  $R^2=0,98$ . Wyznaczona za pomocą tego modelu wartość adsorpcji maksymalnej była bliska wartości eksperymentalnej i wynosiła  $4,98 \cdot 10^{-5}$  mol/g. Dla modelu Langmuira-Freundlicha uzyskano nieznacznie słabsze dopasowanie,  $R^2=0,9$ , natomiast wyznaczona wartość adsorpcji maksymalnej była wyższa od danych eksperymentalnych i wynosiła  $1,2 \cdot 10^{-4}$  mol/g. Kolejnym parametrem, który wyznaczony został za pomocą modeli izoterm adsorpcji był parametr heterogeniczności powierzchni, czyli parametr  $n$ . Wartość  $n$  wyznaczona za pomocą modelu Langmuira-Freundlicha dla grzybni, mieściła się w zakresie 0,1 – 1, co świadczy o dużej niejednorodności powierzchni sorbentu. W przypadku purolitu natomiast wartość tego parametru była powyżej 1, co sugeruje bardziej homogeniczną energetycznie powierzchnię. Za pomocą modelu Dubinina-Radushkevicha wyznaczona została wartość energii dla poszczególnych układów adsorpcyjnych. Wynosiła ona 16-17 kJ/mol dla grzybni i natomiast dla purolitu była nieznacznie niższa 12-13,5 kJ/mol. Otrzymane wartości energii pozwalają wyciągnąć wniosek dotyczący mechanizmu adsorpcji, w którym dominuje chemisorpcja i wymiana jonowa. Badanie izoterm adsorpcji zostało przeprowadzone w dwóch temperaturach 20 i 60°C. Z powyższych danych wynika, że adsorpcja jonów toru na badanych materiałach jest reakcją endotermiczną, gdyż stwierdzono nieznaczny wzrost adsorpcji wraz z podwyższaniem temperatury układu. Kolejnym ważnym czynnikiem, którego wpływ na proces adsorpcji jest bardzo duży jest pH roztworów. Badanie wpływu przeprowadzono w zakresie pH od 2 do 10. Stwierdzono wzrost adsorpcji do pH=3, po czym ustaliła się ona praktycznie na stałym poziomie dla wszystkich badanych układów. Interesujące są zmiany wartości pH roztworów równowagowych. W przypadku grzybni w całym zakresie pH początkowego 2-10, wartość pH w roztworach równowagowych ustalała się na poziomie 6-6,5, podczas gdy dla purolitu wartość ta była dużo niższa i wynosiła 3,5-4. Taka zmiana pH podczas procesu adsorpcji świadczy o dużym udziale reakcji wymiany z jonami hydroniowymi  $H_3O^+$  oraz hydroksylowymi  $OH^-$ , jako jonami konkurencyjnymi dla jonów toru. Na podstawie badania wpływu czasu na proces sorpcji jonów toru stwierdzono, że równowaga ustala się po upływie 1 godziny dla grzybni oraz po 2 godzinach dla purolitu.



Rys. 1. Izoterma adsorpcji jonów toru na grzybni i purolicie, T 20°C.



Rys. 2. Izoterma adsorpcji jonów toru na grzybni i purolicie, T 60°C.



Rys. 3. Wpływ pH na sorpcję jonów toru na grzybni i purolicie.

**Wnioski:** Podsumowując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że grzybnia naturalna okazała się bardziej efektywnym sorbentem dla jonów Th(IV). Otrzymano adsorpcję maksymalną na poziomie 0,001 mol/g podczas gdy dla purolitu 0,0001 mol/g. Szybciej się również ustala równowaga adsorpcji dla grzybni po upływie niespełna 1 godziny, natomiast w przypadku purolitu po 2 godzinach.

#### Literatura:

1. M. René, Nature, sources, resources, and production of thorium, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague 8, Czech Republic (2017).

2. J. G. Małecki, Historia odkryć pierwiastków chemicznych, Uniwersytet Śląski, Katowice 2018.
3. K. Lenarczyk, Możliwość wykorzystania toru w energetyce, Politechnika Warszawska, Rozprawa doktorska, 2016.
4. P. Estevenon, J. Causse, S. Szenknect, E. Welcomme, A. Mesbah, P. Moisy, C. Poinssot, N. Dacheux, In situ study of the synthesis of thorite (ThSiO<sub>4</sub>) under environmental representative conditions, Dalton Transactions, 20 (2020) 122.
5. M. Stępień, S. Gurgacz, G. Niewiński, Tor a bezpieczeństwo energetyczne. Reaktory torowe. Rynek Energii, 137 (2018) 79.
6. K. Hu, Z. Liu, T. Xiu, L. Zhou., Y. Wang, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 326 (2020) 185.
7. Z. Jiang, F. Xie, Ch. Kang, Y. Wang, L. Yuan, Y. Wang, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 321 (2019) 895.
8. K.A. Isajenko, A. Łukaszek –Chmielewska, M. Bednarek, A. Zieliński, M. Smolarkiewicz, T. Zwęgliński, Zawartość gamma radionuklidów pochodzenia naturalnego i sztucznego w glebach w powiecie puławskim, Zeszyty Naukowe SGSP 2016, Nr 60/4/2016.
9. P. Ryder, M. Nowak, Przegląd głównych minerałów pierwiastków ziem rzadkich- złoto XXI wieku, Przegląd Geologiczny, 63 (2015) 348.

## ADSORPCJA JAKO EFEKTYWNA METODA USUWANIA ZANIECZYSZCZEŃ

A. WOŁOWICZ, G. GIZA, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Zanieczyszczenie metalami ciężkimi stało się obecnie jednym z najpoważniejszych problemów środowiskowych. Oczyszczanie wód i ścieków z metali ciężkich jest przedmiotem szczególnej troski ze względu na ich odporność i trwałość w środowisku oraz zdolność akumulacji i toksyczność. W ostatnich latach, różne metody usuwania metali ciężkich ze ścieków były szeroko badane. W niniejszej pracy dokonano przeglądu aktualnych metod stosowanych do oczyszczania ścieków z metali ciężkich, ich podziału i oceny. Z literatury przedmiotu wynika, że wymiana jonowa i adsorpcja są najczęściej badanymi metodami oczyszczania ścieków zawierających metale ciężkie.

**Wprowadzenie:** Dostępność do czystej wody kontroluje większą część światowej gospodarki. Odpowiednie zaopatrzenie w wodę jest niezbędne dla rolnictwa, spożycia przez ludzi, przemysłu, a także rekreacji. Istnieje więc wielka potrzeba oczyszczania wody i ścieków ze szkodliwych zanieczyszczeń. Oczyszczanie wody na potrzeby spożycia przez ludzi polega na usuwaniu zanieczyszczeń chemicznych takich jak, na przykład metale ciężkie, zanieczyszczeń biologicznych – bakterii, wirusów oraz zawiesin i gazów [1]. Proces oczyszczania ścieków składa się na ogół z kilku etapów, które łączą w sobie procesy fizyczne, chemiczne i/lub biologiczne oraz operacje usuwania zanieczyszczeń stałych [2] (Tabela 1).

Tabela 1. Etapy oczyszczania ścieków [2].

Etap oczyszczania	Wykorzystywane procesy	Metody
wstępne oczyszczanie lub obróbka wstępna	fizyczne i mechaniczne	sedymentacja, koagulacja
oczyszczanie podstawowe	fizykochemiczne i chemiczne	wytrącanie, flokulacja
oczyszczanie wtórne lub doczyszczanie	chemiczne i biologiczne	adsorpcja, filtracja
trzeci etap oczyszczania lub końcowe oczyszczanie	fizyczne i chemiczne	utlenianie, filtracja membranowa
obróbka utworzonego szlamu	fizykochemiczne	recykling, spalanie

Istnieje wiele technik oczyszczania ścieków, które możemy podzielić na metody konwencjonalne, metody o ugruntowanej pozycji oraz stosunkowo nowe metody. Wybór danej metody uzależniony jest od właściwości ścieków i składu ścieków. Podział technik grup oczyszczania ścieków przedstawiono w tabeli 2.



**Tabela 2.** Podział dostępnych technik stosowanych do usuwania zanieczyszczeń [2-4].

Konwencjonalne	O ugruntowanej pozycji	Nowe
koagulacja/flokulacja, wytrącanie filtracja, odwrócona osmoza, adsorpcja	utlenianie, ekstrakcja, spalanie, odparowanie, wymiana jonowa, ekstrakcja rozpuszczalnikowa	biosorpcja, biomasa, adsorpcja na niekonwencjonalnych ciałach stałych, nanofiltracja

Jedną z najbardziej skutecznych i najczęściej stosowanych technik jest adsorpcja na adsorbentach różnego typu. Technika ta charakteryzuje się prostą konstrukcją urządzeń, która nie wymaga dużych nakładów finansowych, może być szeroko stosowana do usuwania zarówno zanieczyszczeń nieorganicznych jak i organicznych, a także dużą różnorodnością adsorbentów, które mogą być wykorzystywane w tej technice. Wszystkie te zalety dają adsorpcji znaczną przewagę nad pozostałymi metodami fizykochemicznymi usuwania zanieczyszczeń z wód i ścieków (tabela 3) [2, 5].

**Tabela 3.** Zalety i wady konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków [1-2, 5].

Metoda	Zalety	Wady
adsorpcja	wysoka skuteczność, możliwość usuwania szerokiej gamy zanieczyszczeń, prosta instalacja, szeroka gama dostępnych adsorbentów, możliwość automatyzacji procesu, szybka kinetyka	stopniowe pogarszanie się zdolności adsorpcyjnych adsorbentów, zużyte adsorbenty wymagają regeneracji lub utylizacji, wytwarzanie produktów odpadowych, wysokie koszty
filtracja	usuwanie wszystkich cząstek o rozmiarach większych od średnicy porów	nie jest możliwe odseparowanie cząstek o tym samym rozmiarze, mogą być wymagane duże różnice porów
wytrącanie	niski koszt inwestycyjny, prostota procesu, duża wydajność, wysoka wydajność	duże koszty operacyjne, duże ilości powstającego osadu oraz duże koszty jego usunięcia
odwrócona osmoza	średnie koszty eksploatacji, wysoka wydajność usuwania, brak dodatków chemicznych, niewielkie zmiany pH, prosta obsługa, przyjazna dla środowiska	wysokie ciśnienie, duże zużycie energii, membrany wymagają okresowej wymiany i regeneracji
koagulacja	prostota procesu, niski koszt inwestycyjny, duża różnorodność niezbędnych chemikaliów	duże ilości powstającego osadu oraz koszty jego usunięcia, brak możliwości wielokrotnego wykorzystywania chemikaliów

Separacja wybranych cząstek przy wykorzystaniu procesów adsorpcyjnych opiera się na zdolności pewnych ciał stałych do koncentrowania na swojej powierzchni określonych substancji z roztworów ciekłych lub gazowych. Ciało stałe jest nazywane adsorbentem, natomiast roztwór adsorbentem [6]. Adsorpcja jest procesem powierzchniowym, udział w procesie bierze tylko powierzchnia adsorbenta, a adsorbent nie wnika do jego struktury. Cząsteczki z fazy ciekłej mogą się łączyć z powierzchnią adsorbenta poprzez oddziaływania fizyczne lub chemiczne, w zależności od tego czy przyleganie do powierzchni zachodzi ze względu na siły fizyczne czy adsorbent jest chemicznie związany z adsorbentem [6-8]. Obok adsorpcji wymiana jonowa odgrywa również istotną rolę w usuwaniu zanieczyszczeń. Wymieniacze jonowe są wielocząsteczkowymi, najczęściej stałymi, nierozpuszczalnymi w wodzie i wielu innych rozpuszczalnikach

substancjami zdolnymi do wymiany własnych ruchliwych jonów na jony pochodzące z otaczającego je elektrolitu. Z chemicznego punktu widzenia substancje te są polikwasami, polizasadami lub polikwasami i polizasadami. Jony adsorbentu są przyciągane elektrostatycznie do centrów aktywnych znajdujących się na powierzchni adsorbenta lub w jego porach, natomiast jony zajmujące te miejsca przechodzą do roztworu [8-10]. Adsorpcja jest zależna od wielu czynników, zwłaszcza od temperatury, pH oraz warunków redoks. Jednak kluczowym czynnikiem jest powierzchnia właściwa adsorbenta. Im jest ona większa, tym adsorbent ma większą zdolność do adsorpcji zanieczyszczeń. Z tego względu za najlepsze adsorbenty uznaje się substancje porowate lub materiały o dużej powierzchni na jednostkę objętości [7]. Ze względu na wielkość porów adsorbenty możemy podzielić na mikroporowate (promień efektywny  $< 1,5 \cdot 10^{-9}$  m), mezoporowate (promień efektywny od  $1,5 \cdot 10^{-9}$  do  $2 \cdot 10^{-7}$  m) oraz makroporowate (promień efektywny  $> 2 \cdot 10^{-7}$  m). Innym kryterium podziału jest pochodzenie adsorbentów. Na tej podstawie wyróżniamy sorbenty: naturalne, półsyntetyczne, syntetyczne, pochodzenia naturalnego o zmienionej strukturze (adsorbenty modyfikowane) oraz odpady rolnicze, produkty uboczne pochodzące z przemysłu czy biosorbenty (Tabela 4) [11-12].

**Tabela 4.** Przykłady sorbentów [11-12].

Rodzaj adsorbenta	Przykłady
mikroporowate	zeolity, węgle aktywne
mezoporowate	żel krzemionkowy
makroporowate	sadza
naturalne	trociny, drewno
pochodzenia naturalnego o zmienionej strukturze	aktywowane węgle, tlenek glinu, żel krzemionkowy
syntetyczne	polimerowe adsorbenty, zeolity, glinokrzemiany
odpady rolnicze i produkty uboczne przemysłowe	pestki, łuski, skórki, plewy, popioły lotne
biosorbenty	grzyby, bakterie, algi, glony

**Tabela 5.** Przykłady wymienniczy jonowych wykorzystanych do usuwania metali ciężkich.

Metal	Jonit	Procent usunięcia,	Pojemność maksymalna	Literatura
Cu(II) Zn(II)	Chelex 100, iminodioctowe GF	% R <sub>Cu(II)</sub> = 68 % % R <sub>Zn(II)</sub> = 84 %	55,88 mg Cu(II)/g -	[14-15]
	Amberlite IRC 748, iminodioctowe GF	% R <sub>Cu(II)</sub> = 65 % % R <sub>Zn(II)</sub> = 82 %	69,85 mg Cu(II)/g 28,12 mg Zn(II)/g	
Ni(II) Co(II)	Purolite S 950 aminofosfonowe GF	-	18,42 mg Ni(II)/g 5,39 mg Co(II)/g	[16]
Ni(II) Co(II)	Amberlite IRC 748 iminodioctowe GF	% R <sub>Zn(II)</sub> = 5 %	43,95 mg Ni(II)/g 42,40 mg Co(II)/g	[17]
	Ionac SR 5 iminodioctowe GF	% R <sub>Zn(II)</sub> = 5 %	47,46 mg Ni(II)/g 44,17 mg Co(II)/g	
	Dowex M 4195 bispikoliloaminowe GF	% R <sub>Zn(II)</sub> = 25 %	41,01 mg Ni(II)/g 49,47 mg Co(II)/g	

Pb(II) Cd(II) Zn(II)	Jonit magnetyczny na bazie GMA/DVB	%R = 90% (po 20 min)	476,5 mg Pb(II)/g 224,8 mg Cd(II)/g 107,9 mg Zn(II)/g	[18]
Cu(II) Pb(II) Cd(II) Ni(II)	Fiban X-1 włókna	-	48,26 mg Cu(II)/g 157,47 mg Pb(II)/g 76,43 mg Cd(II)/g 43,36 mg Ni(II)/g	[19]

GF –grupy funkcyjne, GMA/DVB –kopolimer metakrylanu glicydyli i diwinylobenzenu

Do najczęściej stosowanych adsorbentów w procesach usuwania zanieczyszczeń zalicza się: węgle aktywne, zeolity, żel krzemionkowy, polimerowe żywice jonowymienne oraz aktywowany tlenek glinu z uwagi na ich dużą selektywność oraz pojemność adsorpcyjną, niski koszt, dobrą wytrzymałość mechaniczną, szybką kinetykę adsorpcji oraz możliwość łatwej regeneracji [11-12]. Zarówno adsorpcja, jak i wymiana jonowa znajdują bardzo szerokie zastosowanie w wielu procesach związanych z oczyszczaniem roztworów wodnych min. w procesach uzdatniania wody, regulacji smaku i zapachu w oczyszczalniach ścieków, w usuwaniu wody z rozpuszczalników organicznych, w usuwaniu związków azotu ze ścieków i wód gruntowych, w usuwaniu jonów metali i zanieczyszczeń organicznych ze ścieków, w odzysku reagentów w przemyśle itp. [5, 10, 12-13]. Ze względu na wiele zalet adsorpcja i wymiana jonowa są jednymi z najbardziej skutecznych i popularnych metod usuwania zanieczyszczeń, w szczególności jonów metali ciężkich. O dużym problemie zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi świadczą liczne prace badawcze i przeglądowe poświęcone skuteczności ich usuwania na adsorbentach różnego typu [14-19]. Wybrane, nieliczne przykłady przedstawiono w Tabeli 5.

**Wnioski:** Niebezpieczne zanieczyszczenie ścieków metalami ciężkimi jest jednym z najważniejszych problemów środowiskowych na całym świecie. Aby sprostać coraz bardziej rygorystycznym przepisom środowiskowym, opracowano szeroki zakres technologii oczyszczania w celu usuwania metali ciężkich ze ścieków. Z przeglądu literatury wynika, że wymiana jonowa i adsorpcja są efektywnymi i selektywnymi metodami oczyszczania ścieków zawierających metale ciężkie. Adsorpcja przy użyciu tanich adsorbentów i biosorbentów jest uznawana za skuteczną i ekonomiczną metodę oczyszczania ścieków o niskim stężeniu metali ciężkich i może stanowić alternatywę dla adsorpcji zanieczyszczeń na węglach aktywnych.

### Literatura:

1. S. Sharma, A. Bhattacharya, Applied Water Science, 7 (2017) 1043.
2. G. Crini, E. Lichtfouse, Environmental Chemistry Letters, 17 (2019) 145.
3. M. N. Rashed, Organic Pollutants – Monitoring, Risk and Treatment, InTech, Croatia 2013.
4. P. Devi, P. Singh, S. K Kansal, Inorganic Pollutants in Water, Elsevier, USA 2020.
5. V. J. Inglezakis, S. G. Pouloupoulos, Adsorption, Ion Exchange and Catalysis: Design of Operations and Environmental Applications, Elsevier, USA 2006.
6. C. Tien, Introduction to Adsorption: Basic, Analysis, and Application, Elsevier, USA 2018.
7. Y. Artioli, Encyclopedia of Ecology, Academic Press, USA 2008.
8. E. F. Mohamed, Removal of organic compounds from water by adsorption and photocatalytic oxidation, Thèse En vue de l'obtention du Doctorat de L'Universite de Toulouse, France 2011.
9. S. K. Guntilake, Journal of Multidiscipline Engineering Science Studies, 1 (2015) 12.
10. V. Yargeau, Metropolitan Sustainability: Understanding and Improving the Urban Environment, Woodhead Publishing Ltd., United Kingdom 2012.

11. M. Biegańska, Wykorzystanie kory wierzby plecionkarskiej *Salix americana* do adsorpcji metali ciężkich, Praca doktorska, Poznań 2011.
12. A. L. Kowal, M. Świdarska-Bróz, *Oczyszczanie wody: Podstawy teoretyczne i technologiczne, procesy i urządzenia*, PWN, Warszawa 2009.
13. A. M. Anielak, *Wysokoefektywne metody oczyszczania wody*, PWN, Warszawa 2015.
14. L.Ch. Lin, R.S. Juang, *Chemical Engineering Journal*, 112 (2005) 211.
15. L.Ch. Lin, R.S. Juang, *Chemical Engineering Journal*, 132 (2007) 20516.
16. A. Deepatana, M. Valix, *Journal of Hazardous Materials*, 137 (2006) 925.
17. F.D. Mendes, A.H. Martins, *International Journal of Mineral Processing*, 74 (2004) 359.
18. A.A. Atia, A.M. Donia, A.M. Yousif, *Separation and Purification Technology*, 61 (2008) 348.
19. V.S. Soldatov, V.M. Zelenkovskii, L.A. Orlovskaya, *Reactive and Functional Polymers*, 71(2011) 49.

## **NANOCZĄSTKI W KOSMETYKACH JAKO POTENCJALNE ZRÓDŁO ZAGROŻEŃ DLA CZŁOWIEKA I ŚRODOWISKA**

**K. GRAŹ<sup>1</sup>, E. GRABIAS<sup>2</sup>,** <sup>1</sup>Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu, Instytut Nauk Inżynieryjno - Technicznych, Katedra Inżynierii Materiałowej, ul. Konstantynów 1H, 20-708 Lublin, <sup>2</sup>Politechnika Lubelska, Wydział Budownictwa i Architektury, Katedra Geotechniki, ul. Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin.

**Abstrakt:** W artykule przedstawiono charakterystykę nanocząstek pod kątem zastosowania ich w kosmologii oraz zagrożenia, które mogą powodować dla człowieka i środowiska. Zbadano potencjalne możliwości otrzymania nanocząstek dla wybranych grup kosmetyków łatwo dostępnych na rynku. Pomiar rozkładu wielkości otrzymanych cząstek podkładów do twarzy (kosmetyk 1 i 2) i lakieru do paznokci (kosmetyk 3) wykonano za pomocą analizatora wielkości cząstek - DLS.

**Wprowadzenie:** W ostatnich latach dużym zainteresowaniem naukowców cieszą się nanotechnologie i ich produkty czyli nanocząstki. Nanocząstki to jednak nie tylko korzyści, ale również pewne ryzyko, zarówno dla człowieka jak i całego środowiska naturalnego. Zarówno małe rozmiary jak i duży stosunek powierzchni do objętości pozwalają na wręcz niezauważalne przez człowieka pokonywanie barier ustrojowych. Po wnikięciu do organizmu nanocząstki mogą swobodnie w nim krążyć, wchodzić w interakcje z układami biologicznymi, a nawet wnikać do pojedynczych komórek, unikając przy tym fagocytozy. Większość zanieczyszczeń dostających się do organizmu jest niszczona albo neutralizowana przez makrofagi, czyli komórki obronne organizmu. Niestety często nanocząstki są wyjątkowo mało podatne na ten proces. Choć mechanizmy oddziaływania nanocząstek na ludzki organizm i środowisko naturalne nie zostały jeszcze do końca poznane, a aktualny stan wiedzy na temat toksyczności nanocząstek jest wciąż bardzo ubogi, zgodnie z oficjalnym stanowiskiem Komisji Europejskiej rozwoju nanotechnologii nie należy hamować, lecz należy dolożyć wszelkich starań, aby projektowaniu nowych nanomateriałów towarzyszyła kompleksowa ocena zagrożeń. Zwłaszcza, że nanoprodukty to nie tylko lekka, odporna na zabrudzenie odzież, samoczyszczące się powierzchnie szklane czy nowoczesne regenerująco-odżywcze kosmetyki, ale to także szansa na produkcję sztucznych włókien nerwowych, nanomarkerów kontrastowych dla nieinwazyjnych zabiegów medycznych czy wreszcie przełom w leczeniu wielu schorzeń, takich jak choroba Alzheimera, choroby nowotworowe, jaskra itp. Wśród licznych korzyści, należy pamiętać, że narażenie na nanocząstki może stać się poważnym zagrożeniem. Wobec gwałtownego rozwoju nanotechnologii należy zadbać o wypracowanie właściwych kryteriów szacowania ryzyka, które zabezpieczą przed potencjalnym szkodliwym działaniem wynikającym ze specyficznych właściwości substancji w postaci nanocząstek [1]. Obecnie nanotechnologia w kosmologii jest nową i szybko rozwijającą się dziedziną, wprowadzaną do oferty przez wiele znanych firm kosmetycznych. Jednocześnie nanotechnologia jest jednym z trendów obecnych we współczesnej kosmetyce, obok kosmetyków naturalnych, opartych na naturalnych nośnikach, nie zawierających środków konserwujących [2]. Duża popularność i rosnące zastosowanie

nanotechnologii w kosmetyce spowodowały konieczność opracowywania innowacyjnych systemów testowych do oceny bezpieczeństwa kosmetyków. Wykorzystanie nanomateriałów w produktach kosmetycznych jest uregulowane rozporządzeniem PE z dnia 30 listopada 2009, które określa również mechanizmy zgłaszania, etykietowania i oceny bezpieczeństwa produktów kosmetycznych zawierających nanomateriały [3]. W 2011 r. Komisja Europejska opublikowała zalecenie (2011/696/UE) zawierające proponowaną definicję terminu nanomateriał, dedykowaną do celów regulacyjnych. "Nanomateriał" oznacza naturalny, będący produktem ubocznym lub wytworzony celowo materiał zawierający cząstki w stanie niezwiązanym lub w postaci agregatu albo aglomeratu, w którym 50% lub więcej cząstek ma wymiary zewnętrzne w zakresie wielkości 1-100 nm [4]. Produkty kosmetyczne bazujące na nanomateriałach są skuteczniejsze od tradycyjnych kosmetyków m.in. zapewniają lepszą ochronę przed promieniowaniem UV, zapobiegają niekorzystnym reakcjom składników produktu oraz przeciwdziałają tworzeniu się reaktywnych form tlenu. Jednym z obszarów największego zainteresowania kosmetykologii w ostatnich latach jest przenikanie i dostarczanie aktywnych składników w głąb skóry, gdyż dzięki nanomateriałom substancje czynne są transportowane w miejsce docelowe i uwalniane w określonym czasie. Zastosowanie nanotechnologii do produkcji kosmetyków, obok wielu zalet budzi także duże wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa. Łatwość penetracji do głębszych warstw skóry powoduje, że nanocząstki łatwo dostają się do krwioobiegu, skąd są transportowane po całym organizmie, oraz mogą się kumulować w tkankach lub narządach wywołując negatywne skutki zdrowotne [5]. Materiały w skali nano mogą wykazywać nowe właściwości fizykochemiczne, które są zupełnie odmienne od materiału o tym samym składzie chemicznym w skali mikro, np. cząstki mikro- i nano tlenku tytanu – Tab.1 Nanocząstki tlenku tytanu i tlenku cynku to pierwsze nanomateriały, które były stosowane w przemyśle kosmetycznym, głównie w kosmetykach przeciwsłonecznych. Pomimo udoskonalonych obecnie formuł filtrów przeciwsłonecznych, trwają nieustanne badania nad modyfikacją cząsteczek tlenku tytanu i tlenku cynku w celu uzyskania jeszcze bardziej zadawalającego efektu w zakresie ich skuteczności i bezpieczeństwa [6]. Nanocząstki srebra także znalazły szerokie zastosowanie w produktach kosmetycznych, głównie dzięki właściwościom bakteriobójczym. Znajdują się one w składzie m.in. antyperspirantów, kremów do twarzy i stóp oraz szamponów i żeli pod prysznic.

**Tabela 1.** Porównanie właściwości cząstek tlenku tytanu w zależności od ich wielkości [5].

Cecha	Skala makro	Skala nano
Wielkość ziaren	0,1-0,3 $\mu\text{m}$	1-100 nm
Powierzchnia właściwa	$\approx 12 \text{ m}^2/\text{g}$	nawet $>300 \text{ m}^2/\text{g}$
Barwa	biała	przezroczysta
Reaktywność chemiczna	bez zmian	
Absorpcja promieniowania UV	średnia	wysoka
Aktywność fotokatalityczna	niska	wysoka
Hydrofilowość	średnia	bardzo wysoka
Zdolność antybakteryjna	niska	wysoka
Główne zastosowanie	pigment	fotokatalizator

Celem pracy było potwierdzenie obecności nanocząstek w trzech wybranych kosmetykach, które są łatwo dostępne na rynku. Wybrane kosmetyki poddano analizie rozkładu wielkości cząstek za pomocą analizatora DLS.

**Część eksperymentalna:** Jako materiał badawczy wybrano trzy rodzaje kosmetyków: podkłady do twarzy dwóch różnych firm oraz lakier do paznokci. Kosmetykiem nr 1 był podkład do twarzy firmy Maybelline Affinitone, kosmetykiem nr 2 był podkład do twarzy firmy L'oreal Paris True Match, natomiast kosmetykiem nr 3 użytym do analizy był lakier do paznokci Wet n wild. Badania kosmetyków rozpoczęto od ekstrakcji cząstek za pomocą rozpuszczalnika. Następnie analizowane preparaty poddano działaniu łaźni ultradźwiękowej w celu pozbycia się aglomeratów. Po czym tak przygotowane próbki umieszczono kolejno w kuwetach pomiarowych DLS DTS0012 i wykonano pomiary rozkładu wielkości cząstek. Oznaczenie rozkładu wielkości cząstek wykonano za pomocą analizatora DLS Zetasizer Nano Zs firmy Malvern. Dla każdego materiału badawczego wykonano po 5 pomiarów. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 25°C, stosując wodę destylowaną jako fazę rozpraszającą pod kątem 173°, przy długości fali 633 nm. Pozostałe parametry pomiaru: lepkość 0,887 cP, współczynnik załamania światła RI=1,330. Metoda DLS (ang. Dynamic Light Scattering) jest metodą analityczną polegającą na dynamicznym rozpraszaniu światła. Pozwala ona na pomiar cząstek w zakresie 0,5 – 10000 nm. Wiązka lasera padająca na próbkę oddziałuje z nią i wytwarza promieniowanie rozproszone zbierane następnie przez detektor. Pomiary tą metodą nie powodują zniszczenia próbki ani zmian strukturalnych w próbce. Najczęściej metodę DLS stosuje się do pomiaru wielkości cząstek w fazie ciekłej.

**Wyniki:** Otrzymane wielkości cząstek podkładów do twarzy i lakieru do paznokci przedstawiono poniżej kolejno w Tab. 2 – podkład do twarzy firmy Maybelline Affinitone, Tab. 3 – podkład do twarzy firmy L'oreal Paris True Match oraz Tab. 4 - lakier do paznokci.

**Tabela 2.** Wielkości uzyskanych cząstek kosmetyku nr 1 - podkład do twarzy firmy Maybelline Affinitone zbadanych za pomocą analizatora DLS [opracowanie własne].

Numer pomiaru	Wielkość cząstek Pik 1 [nm]	Wielkość cząstek Pik 2 [nm]	Zawartość w [%] Pik 1 danej wielkości cząstek	Zawartość w [%] Pik 2 danej wielkości cząstek
1	197,6	0,0	100,0	0,0
2	276,8	30,58	92,7	7,3
3	321,9	54,61	81,6	18,4
4	424,3	73,73	76,2	23,8
5	408,5	80,28	71,8	28,2
średnia	325,8	47,84		

**Tabela 3.** Wielkości uzyskanych cząstek kosmetyku nr 2 - podkład do twarzy firmy L'oreal Paris True Match zbadany za pomocą analizatora DLS [opracowanie własne].

Numer pomiaru	Wielkość cząstek Pik 1 [nm]	Wielkość cząstek Pik 2 [nm]	Zawartość w [%] Pik 1 danej wielkości cząstek	Zawartość w [%] Pik 2 danej wielkości cząstek
1	229,4	0,0	100,0	0,0
2	245,9	0,0	100,0	0,0
3	254,4	0,0	100,0	0,0
4	255,0	0,0	100,0	0,0
5	234,3	0,0	100,0	0,0
średnia	243,8	0,0		

**Tabela 4.** Wielkości uzyskanych cząstek kosmetyku nr 3 - lakier do paznokci zbadanego za pomocą analizatora DLS [opracowanie własne].

Numer pomiaru	Wielkość cząstek Pik 1 [nm]	Wielkość cząstek Pik 2 [nm]	Zawartość w [%] Pik 1 danej wielkości cząstek	Zawartość w [%] Pik 2 danej wielkości cząstek
1	400,9	0,7576	92,0	8,0
2	336,3	0,7058	93,1	6,9
3	408,5	1,193	73,7	24,6
4	308,5	0,6436	77,4	8,0
5	388,1	5560	96,7	3,3
średnia	368,5	1112,7		

**Wnioski:** Przeprowadzone badania wykazały, że kosmetyki wybrane do eksperymentu zawierają w swoim składzie nanocząstki różnych substancji. Wartości średnie rozkładu wielkości cząstek dla poszczególnych preparatów wynosiły odpowiednio dla podkładu Maybelline - 325,8 nm i 47,8 nm., dla podkładu do twarzy firmy L'oreal Paris True Match - 243,8 nm oraz dla lakieru do paznokci – 368,5nm i 1112,7nm. Obecność tak dużych cząstek w lakierze do paznokci przekłada się zapewne na fakt, że istnieje tendencja do aglomeracji cząstek. Najmniejsze cząstki udało się zanotować w kosmetyki nr 1 – podkładzie do twarzy firmy Maybeline. Z uwagi na ciągłe wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa produktów kosmetycznych bazujących na nanotechnologii, należy przeprowadzić dalsze szczegółowe badania dotyczące toksyczności i dróg migracji nanocząstek w produktach kosmetycznych [1-6].

#### Literatura:

1. R. W. Kelsal, I. W. Hamley, M. Geoghegan, Nanotechnologie, PWN, Warszawa 2008.
2. A. Bazan, A. Przepiórkowska, Świat Przemysłu Kosmetycznego, 3 (2011) 54.
3. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych.
4. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/commission\\_recommendation.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/commission_recommendation.pdf).
5. A. Szlecht, G. Schroeder, Zastosowanie nanotechnologii w kosmetologii. Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna, Cursiva, Poznań 2010.
6. B. Park, S. Bronock, Better and Safer Sunscreens: Nanotechnology and Developments in Ultra Violet Absorber Technology, Nano. The Magazine for Small Science, 8 (2009) 26.



## **ZASTOSOWANIE CHLOROFILU W KOSMETOLOGII**

**K. WOJCIECHOWSKA, P. GŁAZ, D. STRASZAK, A. ROSIŃSKA**, UM w Lublinie, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin.

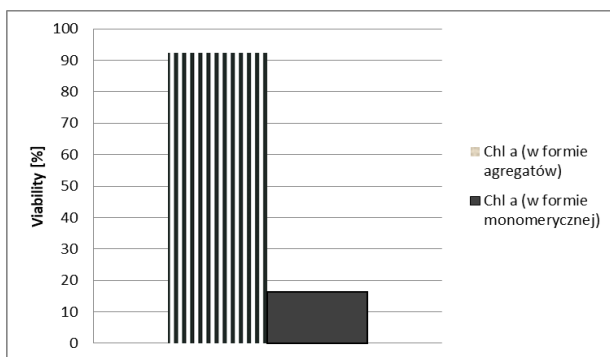
**Abstrakt:** Chlorofil jest powszechnie stosowany w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym, a w ostatnich latach coraz częściej w medycynie i kosmetologii. Najnowsze badania ukierunkowane są na zastosowanie Chl w terapii przeciwnowotworowej i jako silnego antyutleniacza, neutralizującego wolne rodniki i zapobiegającego peroksydacji lipidów. Chlorofil wykazuje silne właściwości ochronne na komórki, tworzy kompleksy z aromatycznymi mutagenami, neutralizując ich negatywne działania. Wiele lat badań poświęcono próbom stworzenia wodnego roztworu chlorofilu. Agregacja Chl w wodzie utrudnia jego zastosowanie w preparatach kosmetycznych. Pożądane w przemyśle kosmetycznym są substancje łatwo rozpuszczalne w wodzie, wysoko biokompatybilne i biodostępne. Ze względu na właściwości cząsteczek Chl często, jako zamienniki są stosowane jego pochodne, zwane chlorofilinami.

**Wprowadzenie:** Chlorofil (Chl) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych pigmentów roślinnych, najbardziej rozpowszechnionym typem jest chlorofil a. Odpowiada za zieloną barwę roślin. Chl pełni istotne funkcje w procesie fotosyntezy, pochłania promieniowanie słoneczne i przekształca je w energię chemiczną, jednocześnie redukując CO<sub>2</sub> do tlenu [1]. Chlorofile absorbują promieniowanie z zakresu światła widzialnego, główne pasma absorpcji są zlokalizowane w zakresie od 400 do 800 nm. Uwarunkowane jest to budową cząsteczki, w której obecne są na przemian wiązania podwójne i pojedyncze [2]. Chlorofil jest powszechnie stosowany w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym, a w ostatnich latach coraz częściej w medycynie i kosmetologii [3, 4]. Pod względem chemicznym chlorofil jest estrem chlorofiliny z dwoma alkoholami: fitolem i metanolem. Za właściwości hydrofobowe odpowiada łańcuch fitolu, który zapewnia zakotwiczenie i odpowiednie położenie Chl w błonie tylakoidu. Centralnie zlokalizowany atom magnezu odpowiada za agregację cząsteczek Chl [2]. Chlorofil jest stosowany, jako związek światłouczulający w terapii fotodynamicznej (PDT), która polega na działaniu wiązki laserowej. Znajduje zastosowanie w przypadku pojawienia się raka skóry i trądziku pospolitego. Najnowsze badania ukierunkowane są na zastosowanie Chl w terapii przeciwnowotworowej i jako silnego antyutleniacza, neutralizującego wolne rodniki i zapobiegającego peroksydacji lipidów [3, 5, 6]. Terapia PDT znalazła również zastosowanie w kosmetologii. Jest to najnowsza generacja peelingów pozwalających na otrzymanie skutecznych i trwałych efektów zabiegowych. Zastosowanie chlorofiliny, jako substancji fotouczulającej pozwala na terapię zmian spowodowanych starzeniem się skóry, w tym utratą jędrności i elastyczności skóry, zmarszczek. Emitowane światło IPL powoduje uwalnianie wolnych rodników, które stymulują komórki skóry do regeneracji. Chlorofil należy do substancji nietrwałych i wrażliwych na tlen atmosferyczny, promieniowanie UV, niskie pH i reakcje enzymatyczne [1]. Molekuła ma charakter silnie hydrofobowy. Cząsteczki Chl

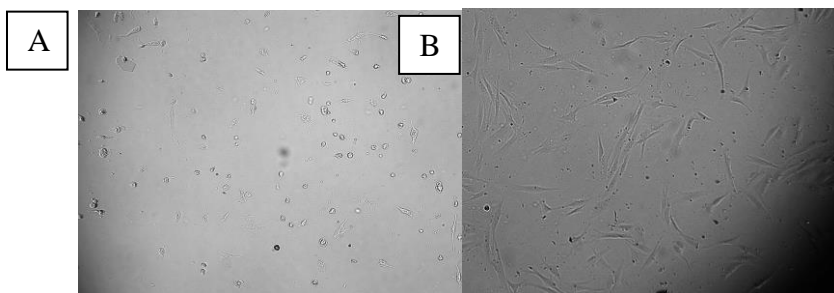
ulegają agregacji w środowisku wodnym, nawet w stężeniach osiągających wartości mikromolowe. Agregacja Chl w wodzie utrudnia jego zastosowanie w preparatach kosmetycznych. Pożądane w przemyśle kosmetycznym są substancje łatwo rozpuszczalne w wodzie, wysoko biokompatybilne i biodostępne. Ze względu na właściwości cząsteczek Chl często, jako zamienniki są stosowane jego pochodne, zwane chlorofilinami. Chlorofilina sodowo-miedziowa jest szeroko stosowaną substancją ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, wykazuje silnie działanie antymutagenne i antyutleniające [4]. Jednym z podstawowych surowców stosowanych w kosmetologii są algi. Charakteryzują się zawartością wielu cennych minerałów jak i chlorofilu d. Cząsteczki chlorofilu oprócz działania antyoksydacyjnego, zapobiegają fotouszkodzeniom skóry, a także przyspieszają gojenie ran i regenerację naskórka. Bardzo często, jako bogate źródło Chl są stosowane zielenice z rodzaju *Chlorella*, które skutecznie opóźniają procesy starzenia się skóry [7, 8].

**Część eksperymentalna:** Zastosowanie chlorofilu w kosmetologii jest utrudnione ze względu na jego hydrofobowy charakter. Badaniu poddano normalne ludzkie fibroblasty (BJ). Aby uzyskać chlorofil a w postaci monomerów zastosowano środek powierzchniowo czynny. Chlorofil bezpośrednio dodany do pożywki hodowlanej grupuje się w agregaty. Do umieszczonych w naczyniu hodowlanym fibroblastów dodano roztwór chlorofilu w pożywce w formie monomerów i roztwór agregatów chlorofilu a w pożywce. Tak przygotowane naczynie hodowlane inkubowano przez 24 h w odpowiednich warunkach hodowlanych. Odczytu dokonano po wykonaniu testu na żywotność komórek MTT.

**Wyniki:** Chlorofil wykazuje silne właściwości ochronne na komórki, tworzy kompleksy z aromatycznymi mutagenami, neutralizując ich negatywne działania. Potwierdzona jest korelacja pomiędzy spożywaniem warzyw a zmniejszonym ryzykiem wystąpienia nowotworu [4]. W komórce roślinnej chlorofil pełni funkcje ochronne przed negatywnymi skutkami promieniowania. Chl jest zlokalizowany wewnątrz komórek roślinnych w błonach tylakoidów chloroplastu. Na właściwości fotoprotekcyjne Chl wpływa jego budowa molekularna. W zależności od wielkości i organizacji chlorofilu mogą występować cząstki monomeryczne posiadające zdolność do przenoszenia energii, bez zdolności fotoprotekcyjnych i dimery bądź większe agregaty zdolne do wygaszania pochłoniętej dawki energii [3]. Chlorofil w formie monomerów wykazuje bardzo silne właściwości cytotoksyczne, żywotność komórek spada poniżej 20%. Natomiast chlorofil w formie zagregowanej nie wpływa znacząco na żywotność fibroblastów. Osadza się na brzegu naczynia hodowlanego.



**Rys. 1.** Wpływ formy zagregowanej i monomerycznej chlorofilu a na żywotność fibroblastów po 24 h inkubacji.



**Rys. 2.** Porównanie fibroblastów po 24 h inkubacji, A-forma monomeryczna chlorofilu, B – forma zagregowana chlorofilu.

Badania poświęcone wodnym roztworom chlorofilu, wykazały, że zastosowanie odpowiedniego środka powierzchniowo czynnego znacznie ułatwia jego rozpuszczalność. Chlorofil w formie zagregowanej nie wykazuje działań niepożądanych i drażniących, dlatego jako cząsteczka o szerokim marginesie bezpieczeństwa jest pożądana w kosmetykach. Stosowanie chlorofiliny jest znacznie lepiej przebadane niż czysty chlorofil. Chlorofilina N-Cu wykazuje znaczące działanie antyoksydacyjne. Zdolność fotodynamiczna atomów metali chlorofilin jest uporządkowana Fe-CHL > Mg-CHL > Cu-CHL, co oznacza, że Fe-CHL wykazuje najwyższą aktywność. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Romana-Souza i zespół, oliwa z oliwek, w której obecny jest kwas oleinowy i polifenole, jak i chlorofil wykazuje działanie antyoksydacyjne, które może być skuteczne w terapii odleżyn, starzenia się skóry, ran przewlekłych i zmian cukrzycowych, w których często występuje nadmierna produkcja RFT i mediatorów stanu zapalnego [9]. Zastosowanie chl w kosmetyce wynika z jego zdolności do absorbowania energii słonecznej. Potwierdzone jest działanie antyoksydacyjne chlorofilu jak i jego pochodnych. Neutralizują tlen singletowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru. Dodatkowo Chl zapobiega peroksydacji lipidów, co potwierdzono na śledzionowych limfocytach myszy [4]. Chlorofil wykazuje również działanie przeciwbakteryjne. Rozpuszczalne w wodzie pochodne chlorofilu znalazły zastosowanie w leczeniu miejscowym trudno gojących się ran. Niektóre z doniesień potwierdzają

stymulowanie fibroblastów do wzrostu po zastosowaniu chlorofilu. Najnowsze badania potwierdziły hamujący wpływ chlorofiliny na hialuronidazę. Jako inhibitory hialuronidazy chlorofiliny mogą wpływać na ilość kwasu hialuronowego w macierzy zewnątrzkomórkowej skóry, a tym samym zapobiegając rozkładowi HA skutecznie opóźnić proces starzenia się skóry. Preparat aplikowany na skórę w trakcie badanie był skuteczny i dobrze tolerowany również przez skórę trądzikową i skórę z objawami trądziku różowatego. Potwierdzono również pozytywny wpływ na plamy soczewicowate, pojawiające się na skórze wraz z wiekiem. Chlorofilina jest również stosowana, jako środek dezodorujący. Skutecznie kontroluje zapach ciała u pacjentów geriatrycznych, stosowana w postaci dezodorantu [10].

**Wnioski:** Chlorofil jest nowoczesnym i stosunkowo rzadko stosowanym składnikiem aktywnym, znacznie częściej jest stosowany, jako barwnik spożywczy i produktów kosmetycznych. Niestety wielokrotnie producenci stosują zamiennie nazwy chlorofil i chlorofilina. Badania nad aktywnością i biodostępnością chlorofilu pozwolą na poszerzenie jego zastosowań. Brak działań niepożądanych może pozwolić na znacznie szersze zastosowanie nawet dla cer wrażliwych i alergicznych. Największą przeszkodą jest trudna rozpuszczalność chlorofilu w wodzie, dlatego tak ważne są badania poszukujące nowych sposobów na zwiększenie jego biodostępności. Zastosowanie cząsteczek chlorofilu w kosmetologii może mieć wielokierunkowe działanie. Chł może neutralizować wolne rodniki opóźniając proces starzenia się skóry i redukując zmiany zapalne w trądziku pospolitym i różowatym, stymulować skórę do regeneracji i odnowy, tym samym przyspieszając proces gojenia się ran.

### **Literatura:**

1. K. Solymosi, B. Mysliwa-Kurdziel, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17 (2017) 1194.
2. O. Bołonkowska, A. Pietrosiuk, K. Sykłowska-Baranek, *BIULETYN Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 1 (2011) 1.
3. E. Janik-Zabrotowicz, M. Arczewska, M. Zubik, K. Terpilowski, T. H. Skrzypek, I. Swietlicka, M. Gagos, *Biomolecules*, 9 (2019) 881.
4. T. Negishi, H. Rai, H. Hayatsu, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376 (1997) 97.
5. E. Janik-Zabrotowicz, M. Arczewska, I. Swietlicka, K. Terpilowski, *Molecules*, 25 (2020) 5059.
6. S. Nasra, M. Radyc, I. Gomaad, T. Syrovetsa, T. Simmeta, W. Fayade, M. Abdel-Kader, *International Journal of Pharmaceutics*, 568 (2019) 118528.
7. E. Posz, A. Pinkowska, A. Stebel, *Polish Journal of Cosmetology*, 19 (2016) 36.
8. S. Bogusz, E. Posz, A. Stebel, *Polish Journal of Cosmetology*, 19 (2016) 182.
9. B. Romana-Souzaa, B. Oliveira Saguiea, N. Pereira de Almeida Nogueirab, M. Paesb, S. dos Santos Valençac, G. Correa Atellad, A. Monte-Alto-Costa, *Food Research International*, 131 (2020) 108984.
10. G. D. Di'az, Q. Li, R. H. Dashwood, *Cancer Research*, 63 (2003) 1254.

## SPIRULINA - WŁAŚCIWOŚCI I WYKORZYSTANIE W KOSMETOLOGII

**D. PIETRASIK, K. RUBINOWSKA**, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Biologii Środowiskowej, Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin.

**Abstrakt:** Gatunek spirulina (*Arthrospina*) to gram-ujemne, nietoksyczne, fotosyntetyzujące cyjanobakterie o strukturze wielokomórkowej i charakterystycznym niebiesko-zielonym kolorze. W ostatniej dekadzie spirulinę zaczęto wykorzystywać w bardzo wielu gałęziach przemysłu, w tym farmaceutycznym, spożywczym oraz kosmetycznym. Podyktowane jest to bogactwem związków bioaktywnych w tych organizmach, do których zaliczamy m.in.: polisacharydy (kwas alginowy, kwas D-mannouronowy, laminaryny, fukoidyny), alkohole (sorbitol, mannitol), sole mineralne (magnezu, manganu, miedzi, cynku, sodu, potasu, siarki, chloru), karotenoidy i niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe. W przemyśle kosmetycznym algi można uznać za gotowy kosmetyk, ponieważ nie wymagają one specjalnej obróbki przed ich zastosowaniem do celów pielęgnacyjnych. Najczęściej wykorzystywane są w formie liofilizowanej lub zmikronizowanej, suchych proszków i jako ekstrakty (lipidowe lub wodne). Coraz częściej pojawiają się również w składzie kosmetyków naturalnych przeznaczonych do różnych rodzajów cery. Bogactwo w jej składzie substancji aktywnych zapewnia działanie antyoksydacyjne, rewitalizujące, nawilżające, ochronne, oczyszczające i rozświetlające zarówno na skórę jak i jej przydatki.

**Wprowadzenie:** Algi (*Algae*) to plechowate, najczęściej samożywne organizmy żyjące w środowisku wodnym. Powszechnie występują we wszystkich strefach geograficznych, zarówno w wodach słodkich, słonych, chłodnych i ciepłych. Zgodnie z systematyką należą do królestwa jądrowych (*Eukaryota*), jednak niektórzy przedstawiciele mogą należeć do gromady sinic (*Cyanobacteriaceae*) królestwa bezjądrowych (*Prokaryota*). Spirulina (*Arthrospira*) jest rodzajem należących do rzędu *Oscillatoriales*, rodziny *Oscillatoriaceae* [1], swobodnie pływających sinic, występujących w postaci cylindrycznych, wielokomórkowych lewoskrętnych kolonii [2]. Charakterystyczny kształt skręconej helisy, łatwy do rozpoznania, jest cechą szczególną tego mikroorganizmu. Spirulina charakteryzuje się niebieskozielonym kolorem i osiąga wielkość niespełna 0,3 mm [3]. Jej nazwa pochodzi właśnie od jej spiralnego kształtu i mikroskopijnej wielkości. Ze względu na obecność w jej składzie barwników aktywnych fotosyntetycznie, takich jak zielony chlorofil oraz karotenoidy, *Arthrospira* mogą przeprowadzać proces fotosyntezy. Niektóre z nich zawierają również barwnik fikoerytrynę, nadający im kolor czerwony lub różowy [4, 5]. Jako osobny mikroorganizm spirulina została wyizolowana przez P. Turpina dopiero w 1827 roku. Jednak istnieje dokumentacja potwierdzająca, że właściwości spiruliny były doceniane już przez starożytne cywilizacje. Głównie wykorzystywano ją w formie pokarmu, ze względu na właściwości odżywcze wpływające na zdrowie i kondycję fizyczną [2]. Dane literaturowe dowodzą, że już starożytni Aztekowie zbierali glony z jeziora Texcoco w Meksyku, natomiast rdzenni mieszkańcy Afryki zamieszkujący

okolice jeziora Czad spożywali spirulinę jako podstawowy składnik codziennej diety, ze względu na powszechność występowania na obszarze ich czystych, niczym nieskażonych słonowodnych jezior [6, 7]. W latach 60-tych ubiegłego wieku wykonano pierwszą analizę biochemiczną składu *Arthrospira platensis*, natomiast pod koniec lat 70-tych rozpoczęła się masowa hodowla alg, czego konsekwencją było wprowadzenie w 1979 r. w Stanach Zjednoczonych na rynek pierwszego suplementu na jej bazie [8]. Do najbardziej znanych gatunków spiruliny zalicza się słodkowodną *Arthrospira platensis* oraz morską *Arthrospira maxima*, a także *Arthrospira pacifica*, która, w porównaniu z dwoma pierwszymi gatunkami, ma znacznie mniejsze znaczenie w przemyśle kosmetycznym [8]. *A. platensis* i *A. maxima* występują naturalnie w jeziorach tropikalnych i subtropikalnych o wysokim pH i ciepłej temperaturze [9]. *A. maxima* spotykana jest najczęściej w Ameryce Środkowej, natomiast obszarem występowania *A. platensis* jest Afryka, Ameryka Południowa i Azja. Znany jest jeszcze jeden rodzaj spiruliny, zaliczany do endemitów, występujący na Hawajach – *A. pacifica* [2]. Dzięki temu, że spirulina rozwija się w jeziorach o odczynie zasadowym, w których przetrwanie innych mikroorganizmów jest trudne lub niemożliwe, istnieje małe prawdopodobieństwo jej skażenia lub zanieczyszczenia. Populacja glonów rośnie szybko, osiąga maksymalne zagęszczenie, a następnie obumiera, gdy wyczerpią się dostępne składniki odżywcze. Nowy cykl życiowy rozpoczyna się, gdy rozkładające się glony uwalniają składniki pokarmowe lub gdy do jeziora wpływa ich więcej z zewnątrz. Wysoki poziom promieniowania słonecznego w tropikach także korzystnie wpływa na wzrost. Spirulina wykazuje optymalny wzrost między 35 a 38°C [1].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wartości odżywczych spiruliny oraz możliwości jej zastosowania jako cennego źródła substancji aktywnych mających wielotorowy wpływ na stan skóry i jej przydatków. Ponadto zostaną podane przykłady zastosowania spiruliny w recepturach kosmetycznych polskich producentów kosmetyków naturalnych. Spirulina jest zaliczana do tzw. superfoods, uznana przez FDA (Food and Drug Administration) za pełnowartościowe i najbogatsze w składniki odżywcze pożywienie na świecie. Przeprowadzone liczne badania pozwoliły dogłębnie poznać skład i działanie spiruliny, co pozwoliło stwierdzić, że spirulina jest niesamowicie bogata w liczne substancje, które wykazują pozytywne działanie na organizm ludzki stosowane zarówno wewnątrz, jak i zewnątrz. Światowa Organizacja Zdrowia opisała spirulinę jako najlepszy produkt żywnościowy dla człowieka, natomiast UNESCO uznało, że jest to pożywienie przyszłości. Z kolei według NASA spirulina jest najlepszym pokarmem do hodowania w kosmosie podczas długoterminowych misji kosmicznych [1]. Zawartość białka w suchej masie spiruliny stanowi nawet 65–79% i jest kompletnym źródłem tej grupy związków, zawiera 20 podstawowych aminokwasów, w tym 8 egzogennych (izoleucyna, leucyna, lizyna, fenyloalanina, treonina, tryptofan, walina, metionina) i 12 endogennych (m.in. prolina, seryna, alanina). Natomiast zawartość związków lipidowych szacuje się na 7%. Wśród nich przeważają NNKT (niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe), a w szczególności kwas  $\gamma$ -linolenowy [2]. W zależności od gatunku *Arthrospira* zawartość kwasów tłuszczowych może się różnić. Poniższa tabela porównuje zawartości kwasów tłuszczowych u 2 gatunków *A. maxima* i *A. platensis* [10].

**Tabela 1.** Zawartość wybranych kwasów tłuszczowych w komórkach *A. maxima* i *A. platensis* [10]

Kwas tłuszczowy	<i>Arthrospira maxima</i> (% wszystkich kwasów tłuszczowych)	<i>Arthrospira platensis</i> (% wszystkich kwasów tłuszczowych)
Palmitynowy	63	25,8
Oleopalmitynowy	2	3,8
Oleinowy	1	1,7
Stearynowy	4	16,6
Linolowy	9	12
$\gamma$ -linolenowy (GLA)	13	40,1
$\alpha$ -linolenowy	Śladowe ilości	Śladowe ilości

Ponadto *Arthrospira* jest bogatym źródłem wielu innych cennych związków, m.in. witamin z grupy B, witaminy A, C, oraz E, należącej do naturalnych antyoksydantów. Najczęściej oznaczanymi minerałami w jej składzie są potas, wapń, magnez, selen, fosfor, miedź, żelazo i cynk. Ponadto jest źródłem kwasu foliowego, kwasu pantotenowego i inozytolu [11, 12]. Istotne w składzie spiruliny są również barwniki takie jak karotenoidy i chlorofil [13], które znajdują potencjalnie zainteresowanie w sektorze kosmetycznym. Składniki te sprawiają, że alga ta jest nowym, atrakcyjnym składnikiem, zwłaszcza w ekokosmetykach przyjaznych dla środowiska. Najnowszym trendem jest stosowanie spiruliny w suplementach diety jako „nutrikosmetyku”, który nie tylko pomaga w zapobieganiu chorobom (m.in. układu krążenia, cukrzyca), ale też uwydatnia naturalne piękno skóry, paznokci i włosów [11].

**Tabela 2.** Zawartość wybranych witamin w spirulinie [14].

Witamina	Zawartość (mg/kg)
Pro- witamina A (beta-karoten)	700-1700
E (tokoferol)	50-190
B1	34-50
B2	30-46
B6	5-8
B12	1,5-2
B3 (niacyna)	130
B5 (kwas pantotenowy)	4,6-25
B9 (kwas foliowy)	0,5
H (biotyna)	0,05
C	Śladowe ilości

Cechą szczególną spiruliny jest wysoki poziom zawartości białek (65–79%) bogatych w liczne, wolne aminokwasy, m.in. alaninę, argininę, kwas asparzynowy i glutaminowy, glicynę, leucynę, lizynę, metioninę, prolinę, serynę, walinę i inne [15]. Wymienione aminokwasy obok takich składników jak kwas piroglutaminowy (PGA) i jego sól sodowa (12%), mocznik (7%), amoniak, kwas moczowy, glikozamina, kreatynina składają się na tzw. NMF (Natural Moisturizing Factor) – czyli substancje zaliczane do naturalnych czynników nawilżających, których rola skupia się na zachowaniu odpowiedniego poziomu nawodnienia i nawilżenia

warstwy rogowej naskórka [16]. Preparaty z zawartością tej mieszaniny substancji aktywnych świetnie sprawdzają się przy pielęgnacji cery suchej oraz w sytuacji, gdy wilgotność powietrza jest niska (np. zimą, w ogrzewanych lub klimatyzowanych pomieszczeniach), kiedy skóra jest najbardziej narażona na wysuszenie. Ponadto zawarte w spirulinie polisacharydy (ksylozy, ramnozy, galaktozy i inne) stymulują proces podziału komórek i wspomagają procesy keratynizacji i odnowienia warstwy rogowej naskórka, spowalniając tym samym procesy starzenia się skóry. Natomiast witaminy, minerały i białka zawarte w tych algach mogą dodatkowo przyczynić się do poprawy stanu naturalnej mikroflory bakteryjnej i nawilżenia skóry [17, 18]. Ważnym aspektem związanym ze starzeniem się skóry jest redukcja peptydów w macierzy zewnątrzkomórkowej skóry właściwej. Peptydy to krótkie łańcuchy reszt aminokwasowych, które biorą udział w kilku procesach fizjologicznych, takich jak stany zapalne, odpowiedź immunologiczna i przebudowa skóry oraz stymulują syntezę białek strukturalnych (kolagenu i elastyny) [19]. Z tego powodu kosmetyki bogate w peptydy mogą zapobiegać powstawaniu zmarszczek i pierwszych oznak starzenia. Aby udokumentować działania przeciwstarzeniowe spiruliny, w 2006 roku francuski zespół badawczy opatentował preparat dermatologiczny *Ekstrakt peptydowy spiruliny*, wykazujący pozytywny wpływ na stymulację proliferacji fibroblastów oraz na syntezę glikozaminoglikanów i kolagenu [20]. Duża koncentracja naturalnych barwników, takich jak zielonego chlorofilu i niebieskiej fikocyjaniny, a także karotenoidów, wpływa na właściwości antyoksydacyjne spiruliny, a także na jej działanie przeciwzapalne, łagodzące i antyalergiczne [21]. Z lipidów występujących w spirulinie na szczególną uwagę zasługuje kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA). Jego niedobór powoduje osłabienie bariery ochronnej naskórka, a także wpływa na jego suchość i łuszczenie, może stymulować dermatozy, zwiększoną skłonność do zaskórników, wyprysków, a także podrażnienie i zaczerwienienie skóry. Ten NNKT przyczynia się do odbudowy i ochrony warstwy hydrolipidowej naskórka, przywracając równowagę, chroni skórę przed infekcjami i likwiduje stany zapalne. Ponadto łagodzi podrażnienia i zaczerwienienia skóry oraz przeciwdziała suchości i łuszczeniu się naskórka [2]. Spirulina to także znaczące źródło witamin z grupy B, które zapewniają odpowiednie nawilżenie i jędrność skóry oraz dbają o jej gładkość, prowitaminy A w postaci  $\beta$ -karotenu o działaniu rewitalizującym, odżywczym i spowalniającym procesy starzenia, witaminy E, nazywanej też „witaminą młodości”, która wykazuje silne działanie antyoksydacyjne, jako silny antyutleniacz charakteryzując się właściwościami nawilżającymi i ujędrniającymi skórę [22]. Bogactwo minerałów, takich jak wapń, cynk, żelazo, potas, selen, magnez, fosfor i inne, korzystnie wpływa na procesy metaboliczne, przekładając się na szybszą regenerację skóry, utrzymanie nawilżenia i odżywienia. Dlatego kosmetyki ze spiruliną działają kompleksowo na skórę i mogą być stosowane nie tylko na twarz, ale także na całe ciało, ponadto dedykowane są do różnego typu cer [8]. Spirulina jest szczególnie polecana do pielęgnacji skóry suchej, spierzchniętej, dojrzałej i alergicznej [2], natomiast ze względu na zdolność regulowania pracy gruczołów łojowych znalazła także zastosowanie w kosmetykach do cery tłustej i trądzikowej. W pielęgnacji tych rodzi cery wspomaga likwidację łojotoku, podrażnień oraz zaczerwienień skóry [23]. Po zastosowaniu produktu kosmetycznego ze spiruliną możemy zaobserwować poprawę wyglądu skóry, która nabiera blasku i odpowiedniego kolorytu, jest



ujędniona i wyraźnie odżywna. Rozjaśnieniu ulegają przebarwienia, a także blizny, np. potrądzikowe. Polepsza się krążenie w drobnych naczynkach krwionośnych – odżywiając tym samym wszystkie komórki skóry [24]. Spirulina klasyfikowana jest jako czysty półprodukt do wyrobu kosmetyków. Najczęściej można ją spotkać w postaci sproszkowanej lub zbitej (tabletki), którą również po rozdrobnieniu można połączyć z innymi składnikami i stosować zewnętrznie. Forma proszku umożliwia zastosowanie jej w połączeniu np. z wodą lub hydrolatem [1], co dodatkowo wzmocni jej działanie. Do najbardziej rozpowszechnionych kosmetyków z dodatkiem spiruliny należą przede wszystkim maseczki na twarz, które mają zapewnić poczucie świeżości, nawilżenia i przyjemnego napięcia, a także produkty do pielęgnacji włosów (odżywki, szampony, maski, wcierki). Spirulinę stosuje się w kosmetykach pielęgnacyjnych, do kąpieli, ujędrniających i wyszczuplających, w których wpływa na przywrócenie skórze elastyczności i sprężystości, odbudowuje jej strukturę i odżywia [25]. Sproszkowana spirulina może służyć również jako dodatek do kosmetyków, które możemy wykonać samodzielnie w domu. Przykładowo, łącząc glinę z hydrolatem, możemy dodać odrobinę sproszkowanej spiruliny, co przyczyni się do zwiększenia efektywności kosmetyku. Na polskim rynku spirulinę w kosmetykach wykorzystują m.in. firmy BeBio czy Hagi Cosmetics. W serii BeBio znajdziemy balsam do ciała, który dzięki zawartości ekstraktu ze spiruliny wykazuje działanie łagodzące, regenerujące i nawilżające oraz żel pod prysznic o podobnych właściwościach. Hagi Cosmetics oferuje w swoim asortymencie wegański puder do kąpieli ze spiruliną, zalecany do skóry suchej oraz naturalne mydło ze spiruliną do pielęgnacji skóry z problemami. Na stronach obu firm możemy przeczytać szczegółowy opis produktów z dodatkiem spiruliny, jak oddziałują na skórę i dla jakiego rodzaju cery są dedykowane [26, 27].

**Wnioski:** Możliwość szerokiego spektrum działania spiruliny powoduje, że konsumenci wykazują coraz większe zainteresowanie produktami z jej dodatkiem. Klienci są obecnie coraz bardziej świadomi i wymagający względem składu i działania kosmetyków, preferując zwłaszcza kosmetyki, które w składzie mają naturalne produkty. Aby sprostać ich oczekiwaniom, producenci coraz częściej wprowadzają innowacyjne rozwiązania do swoich wyrobów kosmetycznych i dzięki temu zyskują większe zainteresowanie wśród nabywców ich produktów. Spirulina spełnia wszystkie warunki stawiane obecnie półproduktom do wyrobu kosmetyków naturalnych, ponadto różnorodność i ilość składników aktywnych, jeszcze bardziej zwiększa jej znaczenie w przemyśle kosmetycznym. Ponadto charakteryzuje się ona bogactwem metabolitów, istotnych nie tylko pod względem pielęgnacyjnych, ale także odgrywa ważną rolę prozdrowotną i leczniczą. Pod względem zawartości barwników, NNKT, witamin i niezbędnych biopierwiastków przewyższa wszystkie ich znane źródła pokarmowe. Dlatego spirulina uznawana jest za jeden z najbardziej wartościowych organizmów o działaniu odżywczym, przeciwzapalnym, antyoksydacyjnym, przeciwstarzeniowym i antyalergicznym. Dzięki jej stosowaniu zarówno w formie dodatku do żywności, suplementu diety, czy zewnętrznie w formie preparatu kosmetycznego, można skutecznie działać profilaktycznie, zapobiegając chorobom cywilizacyjnym i opóźniając procesy starzenia się skóry.

**Literatura:**

1. R.A. Soni, K.R. Sudhakar, R.S. Rana, Trends in Food Science & Technology, 69 (2017) 157.
2. B. Jękot, B. Muszyńska, T. Mastelerz, B. Piórecka, Botanika Farmaceutyczna, 11 (2014) 607.
3. M. Pascaud Bull. Inst. Océano, Monaco, 1993.
4. B.K. Tiwari, D.J. Troy „Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications”, Academic Press 2015.
5. S.M. Hoseini, K. Khosravi-Darani, M.R. Mozafari, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 13 (2013) 1231.
6. K. Se-Kwon „Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances” 1st Edition, Academic Press, 2015.
7. G. Abdulqader, L. Barsanti, M. Tredici, Journal of Applied Phycology, 12 (2000) 493.
8. J. Braz, Microbiology, 43 (2012) 12.
9. L.H.A. Cavalcante-Silva, C.B.B. da Matta, M.V. De Araújo, J.M. Barbosa-Filho, D.P. de Lira, B.V. De Oliveira Santos, G.E.C. De Miranda, M.S. Alexandre-Moreira, Marin Drugs, 10 (2012) 1977.
10. M. Pascaud, Bulletin de l'Institut océanographique (Monaco), 20 (1993) 49.
11. A. Pieleś, Algi i alginiany – leczenie, zdrowie i uroda. Wydawnictwo internetowe e-bookowo, 2010.
12. Y. Ling-Ling, Z. Qing-Jun, W. Yao, G. Yan, W. Yi-Qiang, International Journal of Ophthalmology, 5 (2012) 5.
13. W. Harald, W. Tietze „Micro Food Macro Blessing Fourth Edition Spirulina Spirulina”, Tietz Publishing, Australia, 2004.
14. J. Falquet „The nutritional aspects of spirulina”, Antenna Technologies, 2004.
15. S. Klasik, J. Burczyk, M. Zych, Przegląd Naukowy, 7 (2009) 12.
16. M. Kucia, Kosmetologia Estetyczna, 6 (2017) 571.
17. S. Delsin, D. Mercurio, M. Fossa, P.M. Campos, Clinical Pharmacology Biopharmaceutics, 4 (2015) 1000144.
18. A. De Lucia, C. Zappelli, M. Angelillo, A.L. Langellotti, V. Fogliano, M. Cucchiara, G.M. Colucci, F. Apone, H&PC Today, 13 (2018) 60.
19. I.M. Michalek, K. Lelen-Kaminska, F.L.C. Dos Santos, Australasian Journal of Dermatology, 60 (2019) 267.
20. C. Bodeau „Preparing a Peptide Extract of Spirulina, Useful in Nutraceutical and Cosmetic Compositions for e.g., Controlling Aging of the Skin, Comprises Extraction of Lipids Then Enzymatic Hydrolysis” French Patent No. FR2857978, 27 October 2006.
21. K. Karwowska, M. Skotnicka, M. Pieszko, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 1 (2020) 129.
22. M. Kumar, M.K. Sharma, A. Kumar, Journal of Health Science, 51 (2005) 424.
23. B. Bednarczyk-Cwynar, K. Majewska, D. Olender, A. Pawełczyk, K. Sowa-Kasprzak, J. Żwawiak „Skarby natury w kosmetyce” tom 1, MedParm Polska, 2014.
24. C. Souza, P.M.B.G.M. Campos, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 104 (2017) 52.
25. I. Ragusa, G.N. Nardone, S. Zanatta, Walter Bertin and Emanuele Amadio, Cosmetics, 2021.
26. [hagi.com.pl](http://hagi.com.pl).
27. [sklep.bebio.pl/spirulina](http://sklep.bebio.pl/spirulina).

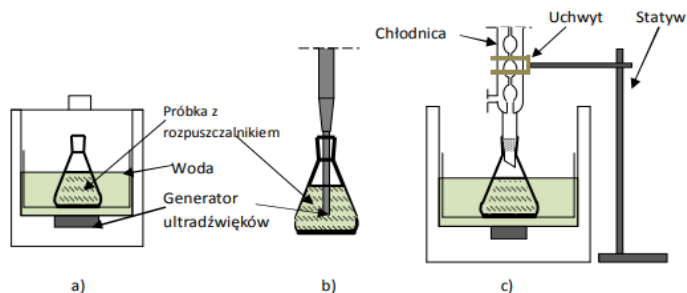
## **TECHNIKI EKSTRAKCJI SUROWCÓW ROŚLINNYCH WYKORZYSTYWANYCH W KOSMETOLOGII**

**K. WÓJCIK<sup>1</sup>, A. PASTUSZKA<sup>2</sup>, J. KUTKOWSKA<sup>2</sup>,** <sup>1</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Bakcyl”, ul. Akademicka 19, Lublin 20-033, <sup>2</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, ul. Akademicka 19, Lublin 20-033.

**Abstrakt:** Dziedzina kosmetologii prężnie się rozwija a wraz z nią zapotrzebowanie na coraz to nowsze ekstrakty i substancje aktywne, w tym pochodzenia roślinnego. Powszechnie stosowane metody ich pozyskiwanie, tj.: tłoczenie mechaniczne oraz tradycyjna ekstrakcja rozpuszczalnikowa nie pozostają bez wad. Pierwsza cechuje się niską wydajnością (60-80%) oraz ryzykiem wzrostu aktywności enzymów, które mogą powodować niepożądane reakcje oraz zagrożenie ze strony warunków tlenowych, które przyczyniają się do utleniania olejów. Natomiast druga niesie ryzyko zanieczyszczenia surowca związkami organicznymi oraz utraty cennych właściwości ze względu na warunki temperaturowe (blisko 100°C). Nawet wysoka wydajność procesu (95-99%) nie jest wystarczającą rekompensatą zwłaszcza, że tradycyjna ekstrakcja rozpuszczalnikowa nie jest przyjazna dla środowiska. W celu rozwiązania tego problemu, uwagę poświęca się nowym technologiom, które zapewniają wysoką wydajność procesu oraz czystość pozyskiwanego surowca. Należą do nich: ekstrakcja rozpuszczalnikowa wspomagana ultradźwiękami (ang. Ultrasound-assisted extraction- UAE), ekstrakcja płynem nadkrytycznym (ang. Supercritical Fluid Extraction- SFE), ekstrakcja micelarna (ang. Micelar Mediated Extraction- MME) oraz rozdział na micelach (ang. Micelle-Mediated Separatio-MMS).

**Wprowadzenie:** Ekstrakcja to proces polegający na wyodrębnieniu grupy lub poszczególnych związków chemicznych z ich pierwotnej matrycy. Stosuje się ją również w celu uzyskania ich odpowiedniego stężenia (zateżenia). Wybór techniki ekstrakcji zależy od właściwości fizyko-chemicznych substancji ekstrahowanych i matrycy, a także końcowego celu stosowania procesu. W przypadku surowców roślinnych stosuje się ekstrakcje do próbek stałych lub semistałych [1]. Praca ma charakter przeglądowy, a jej celem jest przybliżenie oraz przedstawienie technik ekstrakcji surowców roślinnych wykorzystywanych w recepturach produktów kosmetycznych. Dobranie odpowiedniej metody pozyskiwania substancji aktywnej wpływa na finalne działanie całego kosmetyku. Z tego też względu należy zapoznać się z budową chemiczną oraz właściwościami pożądanej substancji oraz dobrać odpowiednią technikę pod kątem oczekiwanego rezultatu. Zastosowanie dodatkowych czynników wspomagających ekstrakcję zwiększa wydajność izolacji oraz redukuje zużycie lotnych i szkodliwych rozpuszczalników oraz energii [2]. Ekstrakcja rozpuszczalnikowa wspomagana ultradźwiękami (UEA) jest stosowana do próbek stałych oraz semistałych. Jej ogromną zaletą jest możliwość przeprowadzenia wydajnego procesu w temperaturze pokojowej, dzięki czemu mogą zostać zachowane drogocenne właściwości surowca roślinnego. Polega ona na wymieszaniu próbki z rozpuszczalnikiem ekstrahującym i umieszczeniu mieszaniny

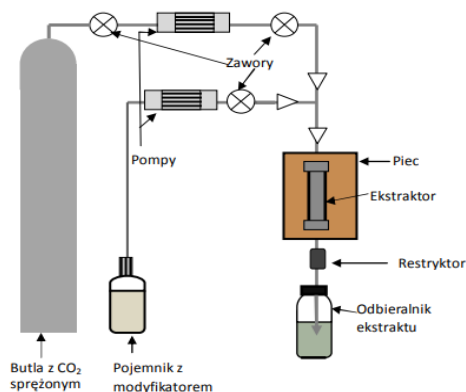
w łaźni ultradźwiękowej. Alternatywą jest zastosowanie sond generujących ultradźwięki (Rys.1) [3]. Rozchodzenie się fal dźwiękowych w cieczy jest związane z cyklami zagęszczenia i rozrzedzenia. Proces ekstrakcji przyspieszają zjawiska wtórne, które są efektem zmiennych ciśnień akustycznych. Największe znaczenie w procesie przenoszenia mas ma kawitacja, czyli proces dynamicznego tworzenia się, wzrostu i zaniku pęcherzy parowo-gazowych w cieczy. Dodatkowo, tarcie na powierzchniach międzyfazowych i absorpcja energii fali akustycznej oraz związane z nimi wydzielanie ciepła wraz z kawitacją sprawiają, że wspomaganie ekstrakcji ultradźwiękami zwiększa rozpuszczalność, dyfuzję, penetrację rozpuszczalnika i transport analitu co skraca czas ekstrakcji i zwiększa jej wydajność. Do niedogodności tego procesu zaliczamy: konieczność odseparowania powstałego ekstraktu od pozostałości oraz powstawanie reaktywnych składników [1]. Wśród zalet UEA, warto wspomnieć, że jest ona metodą efektywną i szeroko stosowaną w ekstrakcji surowców roślinnych ponieważ w porównaniu do klasycznych metod pozyskiwania surowców z roślin jest ona szybsza i sprawniejsza [3].



**Rys.1.** Ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami, a,c – w łaźni ultradźwiękowej i b – z zastosowaniem sondy generującej ultradźwięki [2].

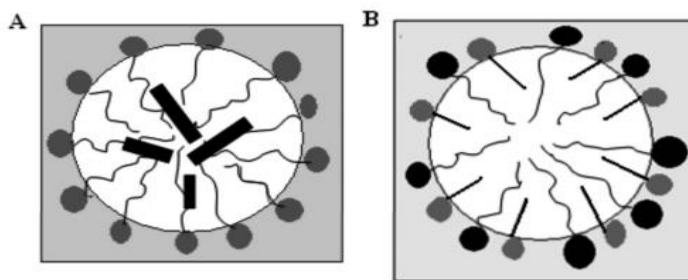
Ekstrakcja płynem nadkrytycznym wykorzystuje gaz, który wykazuje właściwości pośrednie między cieczą a gazem. Najczęściej jest nim dwutlenek węgla ponieważ ma niską temperaturę krytyczną (31,1°C) oraz ciśnienie krytyczne (7,38 MPa), jest nietoksyczny, niepalny. Dwutlenkiem węgla można ekstrahować tylko niepolarne i średniopolarne związki ponieważ on sam jest związkiem niepolarnym. Ekstrakcję SFE można przeprowadzić statycznie i dynamicznie, a metodę dobiera się ze względu na strukturę próbki- o zwartej strukturze matrycy oraz łatwo penetrowanej przez płyn. Płyn w stanie nadkrytycznym przepuszcza się przez próbkę w sposób ciągły, a ekstrakt zbiera się w odbieralniku (Rys. 2). Podczas korzystania ze sposobu dynamicznego możliwa jest recyrkulacja rozpuszczalnika wtórnego do próbki zanim zostanie on zebrany. Dobór warunków ekstrakcji SFE powinien uwzględniać parametry procesu (ciśnienie, temperaturę, szybkość przepływu w procesie dynamicznym, czas ekstrakcji, wielkość próbki i pojemność ekstraktora) oraz właściwości chemiczne i fizyczne matrycy (np. postać fizyczna, jednorodność, rozpuszczalność, zdolność do adsorpcji i desorpcji analitów). Metoda ta nie wymaga dużych temperatur oraz zapewnia brak kontaktu surowca z tlenem dzięki czemu może on zachować swoje właściwości i wysoką jakość. Dodatkowo, metoda ta jest

w pełni bezpieczna i przyjazna dla środowiska co w dzisiejszych czasach jest niezwykle ważne [1,4].



Rys.2. Schemat zestawu do ekstrakcji płynem (CO<sub>2</sub>) w stanie nadkrytycznym [2].

Ekstrakcja micelarna (MME) przebiega z udziałem związków powierzchniowo czynnych (surfaktantów). Technika ta wykorzystuje zdolność do solubilizacji poprzez powstające agregaty. Oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne powodują utworzenie asocjatów, w skład których wchodzi cząsteczki związku powierzchniowo czynnego co prowadzi do solubilizacji analitów (Rys. 3). Rozdział fazy micelarnej oraz wodnej uzyskuje się podczas procesu wirowania. Faza micelarna charakteryzuje się mniejszą objętością w stosunku do fazy wodnej. W celu ułatwienia ich rozdziału stosuje się łaźnie lodowe, które powodują wzrost lepkości utworzonych agregatów przez co warstwa micelarna mocniej przylega do dna i ścianek probówki. Po usunięciu fazy wodnej badana warstwa organiczna jest poddawana rozpuszczeniu a następnie oznaczeniu. Na wydajność ekstrakcji micelarnej wpływają: rodzaj i stężenie surfaktantu, pH badanej próbki, dodatek elektrolitu, czas wytrąsania, ogrzewania i wirowania oraz rodzaj odczynnika chelatującego [6]. Ekstrakcja MME wspaniale sprawdza się w pozyskiwaniu surowców naturalnych do kosmetyków dla cer atopowych. Stosowane w niej rozpuszczalniki są amfoterycznymi związkami powierzchniowo czynnymi dzięki czemu nie powodują one dermatologicznych i toksykologicznych problemów skórnych. Rozpuszczalniki te są również biodegradowalne, a co za tym idzie- bezpieczne dla środowiska. Metoda ta umożliwia obróbkę surowca w niskiej temperaturze (25°C) oraz wysokiej czystości, dzięki czemu pozyskane ekstrakty roślinne są bogate w substancje o wysokiej jakości i skuteczności działania [7].



**Rys.3.** Schemat solubilizacji, A-solubilizacja substancji hydrofobowych, B-solubilizacja substancji hydrofobowej zawierającej jedną grupę polarną [8]

Alternatywą procesu z udziałem miceli jest tzw. rozdział na micelach, obejmujący dwa etapy: MME oraz CPC (ang. Cloud Point Concentration). Metoda ta polega na zastosowaniu rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, którym jest roztwór surfaktanta o stężeniu niższym niż krytyczne stężenie micelarne CMC (ang. Critical Micelle Concentration). Przy tym stężeniu powstają agregaty o rozmiarach koloidalnych, które mogą ekstrahować substancję hydrofobową lub niepolarną z materiału roślinnego. CPC wykorzystuje się do zatężania otrzymanej substancji w MME. Najczęściej w metodzie CPC są surfaktanty niejonowe, co wymaga dodatkowego ogrzewania w celu rozdzielenia faz. Technika ta pozwala na otrzymanie stężonego roztworu ekstrahenta dzięki wykorzystaniu małej objętości fazy z detergentem [8].

**Wnioski:** Techniki stosowane w ekstrakcji surowców naturalnych z roślin powinny być ekonomiczne, bezpieczne dla środowiska oraz umożliwiać uzyskanie wysokiej jakości pożądanego związku. Warto pamiętać, że kosmetyki naturalne, w których najczęściej wykorzystuje się takie surowce są skierowane do osób z indywidualnymi potrzebami (min. atopia) przez co należy zwrócić szczególną uwagę na pozyskiwanie ich w jak najczystszej i bezpiecznej postaci. Wspomniane powyżej techniki spełniają te warunki, dzięki czemu stanowią alternatywę dla klasycznych metod ekstrakcji, podczas których pozyskiwano substancje o niezadowalającej jakości, czystości czy też ze zbyt niską wydajnością, jednocześnie generując większe koszty oraz zanieczyszczenie środowiska.

#### Literatura:

1. P. Stepnowski i in., Techniki separacyjne, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, 30 (2010) 115.
2. Z. Dong i in., Food Chem., 149 (2014) 54.
3. C. Da Porto i in., Ultrasonic Sonochemistry, 3 (2013)1076.
4. S. Bakier, Postępy techniki przetwórstwa spożywczego, 6 (2017) 66.
5. W. Chaoting i in., Ultrasonics Sonochemistry, 3 (2018) 538.
6. I. Kiszkiel, M. Hryniewicka, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2 (2011) 104.
7. A. Mularz, Roślinne ekstrakty micelarne stosowane jako składniki aktywne w pielęgnacji skóry atopowej, Biotechnologia.pl, (2020).
8. A. Tomaszkiwicz-Potępa i in., Możliwość zastosowania związków powierzchniowo-czynnych do ekstrakcji substancji aktywnych z materiału roślinnego, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Kraków (2010).

## TATUAŻ, TUSZE I IGIĘŁY

**K. KOWALSKA, E. SKWAREK, J. ORZEŁ**, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 3, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Przedmiotem badań była analiza metodą XRF (X-Ray Fluorescence - Fluorescencyjna analiza rentgenowska) różnego rodzaju tuszy oraz analiza SEM (Scanning Electron Microscope - Skaningowy mikroskop elektronowy) igieł wykorzystanych do tatuażu: nowych i po użyciu. Wykorzystano kolorowe tusze (wyższej, jakości), czarne tusze (wyższej i niższej, jakości) oraz tusze zakupione na Ali Express. Udało się ustalić skład pierwiastkowy zebranych tuszy.

**Wprowadzenie:** Tatuaż od zarania dziejów stanowił nieodłączny element kultury człowieka. Zmieniało się jego zastosowanie i identyfikacja, oraz sposoby wykonywania. Przechodzimy od prymitywnych igieł do zaawansowanych narzędzi, od ochry do wielorakich pigmentów [1]. Poprzez wzrost popytu na „nowy” sposób ozdabiania ciała wzrosło zainteresowanie lekarzy tematem występujących często skutków ubocznych, tj. reakcje alergiczne. Miejscem docelowym wprowadzenia tuszu jest skóra właściwa, – czyli około 2 mm w głąb skóry. Prócz podstawowych składników, które powinny zawierać tusze, czyli woda, gliceryna, alkohol i pigment często możemy tam znaleźć np. rozpuszczalniki organiczne, sole metali ciężkich, ale także środki przeciwzapalne. Jednym ze sposobów eliminacji niepożądanych czynników jest tworzenie farb, które nie wymagają rozcieńczenia przez tatuatora. Coraz bardziej powszechne stają się tatuaże świecące w ciemności lub pod wpływem światła UV. Problemem nie jest tu tylko skład (mowa o dwutlenku tytanu czy węglanie ołowiu), ale także kwestia estetyczna. Wielu dermatologów zwraca szczególną uwagę na częste występowanie alergicznych reakcji skóry u posiadaczy tatuażu. Barwnikami powodującymi najczęściej efekty niepożądane są te w odcieniach czerwieni i żółci, najprawdopodobniej ze względu na dużą zawartość niklu. Nawet, jeżeli skład jest dobrze znany i poprawny to nie zawsze możemy przewidzieć, czy dana substancja nie ulegnie rozkładowi, a produkty tej reakcji nie będą niosły ze sobą negatywnych skutków dla naszego organizmu. Nawet 30% tuszu zaaplikowanego pod skórę pozostaje w organizmie, na co wskazuje m.in. zabarwienie okolicznych węzłów chłonnych [2]. Jednym z krajów, który najwcześniej zgłębił temat zagrożeń, jakie niesie ze sobą tatuaż była Dania. Zauważono, że reakcje immunologiczne wywołane przez barwniki wchodzące w skład tuszy stanowią obecnie nową, niezbadaną jeszcze jednostkę chorobową. Część z reakcji wywoływana jest głównie przez związki o niewielkiej masie cząsteczkowej naniesione na igle pod skórę, jak i na zewnętrzną jej warstwę. Najczęściej występujące alergeny to: barwniki oraz konserwanty. Przeprowadzono ankietę, a następnie badania na losowej grupie osób posiadających tatuaż. Przewlekłe reakcje skórne, czyli utrzymujące się przynajmniej od kilku miesięcy stwierdzono u 5,9% - 6,0% badanych osób. Ostre stany alergiczne potwierdzono u 4,3% - 12,5% badanych. Gdy wydzielono grupy tatuatorów i osób zażywających kąpiele słoneczne procent osób z chorobami skóry wzrósł do 15% - 23%. Przeprowadzono również

badanie, gdzie 74 osoby ze zmianami skórными poddano testom alergicznym na barwniki azowe i u 5,4% stwierdzono wynik pozytywny. Zdarza się również, że substancja, która nie powoduje żadnych reakcji w badaniu na powierzchni skóry, uczula po wstrzyknięciu w głębsze warstwy. Jedynym sposobem, aby ostatecznie stwierdzić, czy dany tusz nadaje się do użytku jest przedstawienie jego dokładnego składu na opakowaniu bądź w kartach charakterystyki, co często nie jest przestrzegane [3]. Warto zwrócić uwagę, że bezpieczniejszą opcją tatuażu jest ten, który został wykonany przy użyciu czarnego tuszu, ponieważ kolorowe (tj.: czerwony, żółty, zielony) zazwyczaj zawierają większe stężenie metali ciężkich – najczęściej występujące: kadm, ołów i rtęć [4]. Tusze do tatuażu można zdefiniować, jako nierozpuszczalne pigmenty zdyspergowane w środowisku wodnym, często zawierające alkohol, glicerynę i/lub oczar wirginijski oraz dodatkowe spoiwa i dodatki. Ich skład zmieniał się z biegiem lat, aby zaspokoić potrzeby konsumentów o bardziej jaskrawe, trwałe kolory, konieczność długiego okresu trwałości i zapobieganie sedymentacji składników podczas długich sesji tatuowania. Doprowadziło to do zastąpienia początkowo stosowanych pigmentów nieorganicznych, tj. głównie tlenków metali z dodatkiem sadzy, bardziej jaskrawymi związkami organicznymi, jako barwnikami. Jednak niektóre tlenki metali, takie jak  $TiO_2$ , są nadal w użyciu ze względu na niską zdolność absorpcji i wysoki współczynnik załamania światła, co czyni go najbardziej odpowiednim spośród wszystkich białych barwników do rozjaśniania kolorów. Na podstawie rozporządzenia kosmetycznego UE rezolucja Rady Europy 2008 w sprawie wymagań i kryteriów bezpieczeństwa tatuażu i trwałych pigmentów, których nie należy stosować ze względu na potencjalną toksyczność, wydała dokument określający dozwolone stężenie zanieczyszczeń (takich jak metale ciężkie lub policykliczne węglowodory aromatyczne) [5]. Igły wykorzystywane podczas tatuowania dzielą się na igły do konturowania (od 1,7 mm do 1,9 mm długości ostrza), do wypełnień (od 0,9 mm do 1,2 mm długości ostrza) oraz do wykonywania cieni. Wszystkie typy różnią się od siebie budową. Wykonane są z odpornej na korozję i niewywołującej reakcji alergicznych stali chirurgicznej. W naszych badaniach wykorzystaliśmy igły typu „Round Liner”. To igły o okrągłym przekroju, służące do tatuowania konturów. W jednym zestawie może być od jednej do czternastu igieł. Według tatuatorów najbardziej uniwersalny jest zestaw 8 igieł w okręgu (w naszych próbkach mamy 9). Igła nadaje się do użytku przez 8-10 godzin. Używając igieł ich składniki - szczególnie Ni i Cr podczas użytku mogą przedostawać się do skóry czy też węzłów chłonnych, co również może powodować niebezpieczne alergie [6].

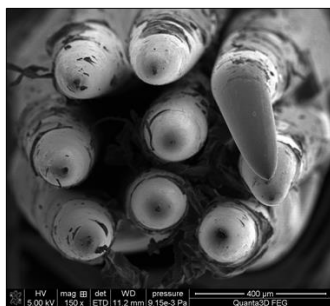
**Wyniki:** W badaniach zastosowano: kolorowe tusze wyższej, jakości firmy World Famous Tattoo Ink (USA), czarne tusze wyższej, jakości firmy Japan Black (nowy i używany), czarne tusze niższej, jakości firmy Solong Tattoo TM i Tadoo Ink, tusze zakupione na Ali Express firmy Tadooine Ink (Chiny) i Premium Tadooine Ink (Chiny), igły do wykonywania tatuaży: 1 nowa i 1 używana. Zastosowana aparatura i metodyka pomiarów: XRF - spektrometr ED-XRF typu Epsilon 5 (PANalytical) oraz mikroskop SEM wysokorozdzielczy skaningowy mikroskop elektronowo jonowy Quanta 3D FEG firmy FEI. W tabeli 1 różnice w składzie i ilości pierwiastków mogą wynikać z koloru tuszu. Jednak charakterystyczny pierwiastek



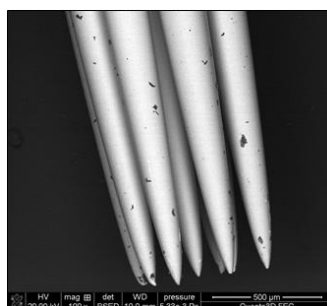
Ti, który dodawany jest w celu rozjaśnienia koloru znajduje się w każdym tuszu, a najwięcej jest go w tuszu żółtym. Niemniej ilość metali ciężkich (szczególnie tak powszechnie znanych jak ołów i rtęć) w próbkach w tabeli 1 nie jest duża. W tabeli 2 zaskakująca jest duża w składzie pierwiastkowy Al., P, S, Fe, Br, I, W. Niemniej różnorodność pierwiastków jest dużo mniejsza w porównaniu do próbek czarnych tuszy niskiej jakości i zakupionych na AliExpress. W porównaniu czarnych tuszy wyższej jakości z tymi o niższej jakości zawartość ołowiu i potasu jest niższa, ogółem zaś ilość pierwiastków jest podobna. W tuszu czerwonym zakupionym na AliExpress mamy największą zawartość żelaza, co jest charakterystyczne dla tego koloru. Porównując wyniki obu czarnych tuszy zakupionych na AliExpress mamy do czynienia z pewnym zaskoczeniem, ponieważ tusz, który ma na swojej etykiecie napis „premium” powinien być lepszy a ma większą zawartość metali tj.: Pb, K, Fe, Cu, Zn. Na podstawie zdjęć igieł widzimy zasadniczą różnicę w wyglądzie igieł używanych i nieużywanych. Wśród zużytych igieł jedna jest złamana, są podniszczone i oblepione starym tuszem, który zapewne przeszkadza w wykonaniu estetycznego tatuażu.

**Tabela 1.** Kolorowe tusze wyższej jakości.

Tusze	żółty	pomarańczowy	zielony	czerwony
Pierwiastek chemiczny	Procent masowy %	Procent masowy %	Procent masowy %	Procent masowy %
P	0,094	0,068	0,136	0,150
S	0,134	0,039	0,190	0,079
Cl	4,475	0,216	3,183	0,292
K	0,009	0,004	0,011	0,004
Ti	19,009	18,418	15,361	0,118
Cr	0,003	0,000	0,000	0,007
Fe	0,016	0,045	0,060	0,100
Cu	0,004	0,000	2,664	0,004
Br	0,134	0,041	0,110	0,072
Zr	0,038	0,891	0,549	0,071
W	0,074	0,077	0,080	0,084
Hg	0,000	0,000	0,002	0,000
Ba	0,000	0,083	0,000	0,000
Pb	0,000	0,011	0,000	0,000
V	0,000	0,000	0,218	0,002
As	0,000	0,000	0,001	0,001
Si	0,000	0,000	0,000	0,131
Mn	0,000	0,000	0,000	0,002



**Rys.1.** Zdjęcie SEM końcówek oraz początkowych powierzchni bocznych igieł używanych w powiększeniu 100-krotnym



**Rys.2.** Zdjęcie SEM końcówek oraz początkowych powierzchni bocznych igieł używanych w powiększeniu 150-krotnym.

**Tabela 2.** Czarne tusze wyższej jakości.

Tusze	Czarny nowy	Czarny używany
Pierwiastek chemiczny	Procent masowy %	Procent masowy %
Al	0,129	0
P	0,165	0,095
S	0,781	0,375
Cl	0,107	0,107
K	0,011	0,013
Cr	0,002	0,002
Fe	0,009	0,011
Cu	0,003	0,003
Br	0,692	0
Zr	0,009	0,006
I	0,022	0
W	0,063	0,076

**Wnioski:** Aspekt chemiczny badań tuszy do tatuaży jest bardzo interesujący i dotyczyć może dużej grupy społecznej ludzi. Pokazano wyniki analizy XRF na zawartość metali i niektórych niemetali w tuszach o różnych kolorach i pochodzeniu oraz zdjęcia igieł nowych i używanych zrobionych na mikroskopie SEM. W przyszłości może być rozszerzony o inne metody badań np.: spektroskopie FTIR, UV-VIS dotyczące barwników czy inne skupiające się na zmianie powierzchni składu pierwiastkowego igieł po użyciu.

#### Literatura:

1. A. Jelski, *Tatuaż*, Wydawnictwo Kontrowers, 1993.
2. M. Świerczyńska, *Kwartalnik Chemiczny*, 2 (2016) 2.
3. Ministry of Environment and Food of Denmark *Allergy and Tattoos*, 2017.
4. A. Dembska, D. Rogala, A. Spychała, I. Hajok, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 23 (2017) 7.
5. Safer tattooing. Overview of current knowledge and challenges of toxicological assessment, EDQM, 2017.
6. M. Snopek, *Tatuaż. Element współczesnej kultury*, 2010.

## **MECHANIZMY WZROSTU WŁOSA ORAZ SUBSTANCJE AKTYWNE ZAWARTE W PRODUKTACH KOSMETYCZNYCH SŁUŻĄCE DO JEGO STYMULACJI**

**P. GLAZ<sup>1</sup>, D. STRASZAK<sup>1</sup>, K. WOJCIECHOWSKA<sup>1</sup>, M. PAWLICKA<sup>2</sup>,  
M. KOŁODZIEJCZYK<sup>3</sup>,** <sup>1</sup>UM w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra  
i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, ul. Chodźki 4a,  
20-093 Lublin, <sup>2</sup>UM w Lublinie, Wydział Lekarski, Zakład Genetyki Nowotworów  
z Pracownią Cytogenetyczną, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin,  
<sup>3</sup>UM w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Biologii z Genetyka,  
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Cykl wzrostu włosa składa się z trzech etapów, z czego ostatni etap – telogen to okres spoczynkowy mieszka włosowego, w związku z tym włos w tej fazie cyklu ulega naturalnemu wypadaniu. Telogen trwa zwyczajowo u człowieka około 3 miesiące, a fizjologicznie w tej fazie cyklu znajduje się około 10-30% wszystkich włosów owłosionej skóry głowy. Zrozumienie mechanizmów wpływających na neogenezę i wzrost włosa umożliwi przeprowadzenie badań nad substancjami wpływającymi na białka regulatorowe, a w ten sposób umożliwi pozyskanie efektywnych metod leczenia łysienia i zapobiegania nadmiernemu wypadaniu włosów. W pracy omówiono cykl włosa u człowieka, fizjopatologie łysienia oraz możliwości aktywnego wpływania na ten proces za pomocą substancji aktywnych.

**Wprowadzenie:** Cykl wzrostu włosa to przejście od okresu aktywnego wzrostu włosa poprzez jego inwolucję do fazy jego spoczynku. Cykl włosa rozpoczyna się anagenem, następnie przechodzi w katagen kończąc się telogenem, a w konsekwencji nowym anagenem. Włos anagenowy charakteryzuje się bardzo licznymi podziałami komórkowymi. Etap anagenu dzieli się na siedem stadiów. Pierwszy etap dotyczy intensywnego różnicowania komórkowego w zawiązce włosa. Drugie stadium dotyczy niezróżnicowanych komórek zawiązka włosa, które rosną wokół brodawki i rozpoczynają proces tworzenia opuszki. W konsekwencji mieszek ulega wydłużaniu, stadium trzecie anagenu charakteryzuje się ukształtowaniem macierzy. Czwarte stadium anagenu to rozpoczęcie tworzenia włosa do poziomu gruczołu łojowego zaś piąte do powierzchni naskórka. W szóstym stadium włos sięga powyżej linii naskórka, charakterystyczne dla ostatniego siódmego etapu jest wysoka aktywność mitotyczna opuszki [1]. Faza inwolucji – katagen może charakteryzować się podobieństwem do anagenu lub telogenu. Włos katagenowy charakteryzuje się mniejszą grubością oraz zanikaniem pochewki, a w wyniku procesu rogowacenia coraz bardziej widoczna staje się kolba włosa przechodzącego w telogen. U schyłku okresu katagenu opuszka zanika a uwydatnia się brodawka. Komórki rogowaciejące, które budują macierz oddzielają się od niej tworząc kolumnę nierosnącego włosa telogenowego. Włos telogenowy jako w pełni zrogowaciały zakotwiczony jest za pomocą kolby, a jego wypadanie zależne jest od tego jak mocne jest to przytwierdzenie. Wielokrotnie zdarza się, że dopiero rosnący nowy włos w tym samym mieszku włosowym doprowadzi do wypchnięcia poprzedniego [1,2].

**Część eksperymentalna:** Przebieg cyklu włosowego w odniesieniu do owłosionej skóry głowy przedstawiono w Tabeli 1. Opisano je następująco: nazwa fazy cyklu, czas trwania, procentowa zawartość włosów w danej fazie.

**Tabela 1.** Przebieg cyklu włosowego [2].

Nazwa fazy cyklu	Czas trwania	Procentowa zawartość włosów w danej fazie
Anagen	3-5 lat	60%
Katagen	3 tygodnie	1-3%
Telogen	3 miesiące	10-30%

Mieszek włosowy zakotwiczony jest w skórze właściwej i częściowo tkance podskórnej, zbudowany z nabłonka stanowiącego pochwę mieszka i tkanki łącznej - brodawki mieszka. Zniszczenie nabłonka jest procesem odwracalnym, zaś brodaki nieodwracalnym. W wyniku działania ektodermy i mezodermy podczas życia płodowego powstaje około 5 milionów mieszków włosowych. Kompleks białkowy –bCAT (beta catenin) i LEF1 (lymphocyte enhancer factor) aktywuje geny kodujące odpowiedzialne za powstawanie mieszków włosowych. W warunkach normalnych powstanie kompleksu blokuje białko GSK3 (glucogen synthesis kinase), które odpowiedzialne jest za niszczenie bCAT. Białka z rodziny Wnt, których funkcją jest regulacja interakcji między komórkami w embriogenezie chronią bCAT, w wyniku czego jest w stanie powstać kompleks bCAT-LEF1, a w konsekwencji wytworzyć się mieszek włosowy. Za pobudzanie komórek macierzystych do podziałów w trakcie trwania embriogenezy i w czasie cyklu włosowego jest odpowiedzialna mezodermalna brodawka włosowa. Substancje modulatorowe takie jak hormony androgenowe lub ligandy receptorów steroidowych wpływają na brodawkę włosa lub są przez nią wydzielane. Mechanizmy wpływające na neogenezę i wzrost włosów są odpowiedzialne za aktywność leków, substancji aktywnych dostępnych w kosmetykach, których zadaniem jest zapobieganie łysieniu, lub wzmaganie procesów aktywnego wzrostu włosa [3]. W Tabeli 2. zestawiono najczęściej wykorzystywane substancje aktywne dostępne w produktach kosmetycznych lub leczniczych w użytku zewnętrznym w celu zapobiegania łysieniu, bądź wspomaganie aktywny wzrost włosa.

**Wyniki:** Łysienie androgenowe i łysienie plackowate to główne przyczyny odpowiedzialne za wypadanie włosów. Łysienie androgenowe wynika z zwiększonej wrażliwości mieszków włosowych skóry głowy na dihydrotestosteron, zaś w łysienie plackowate zaangażowane są reakcje autoimmunologiczne [4]. Na rynku dostępne są różne syntetyczne leki na wypadanie włosów. Wśród nich występuje minoksydyl, finasteryd oraz spironolakton stosowane w leczeniu łysienia androgenowego, a także minoksydyl, antralina (dithranol), kortykosteroidy i tretynoina stosowane w terapii łysienia plackowatego. Mechanizmy, dzięki którym leki pobudzają wzrost włosów są częściowo zrozumiałe i bardzo złożone. Przykładem jest minoksydyl, który wpływa na proliferację i różnicowanie keratynocytów pęcherzykowych, co w konsekwencji wydłuża fazę anagenu. Minoksydyl wznosi ekspresję VEGF i jego receptorów w brodawce skórnej, stymulując angiogenezę w fazie anagenu włosów. Minoksydyl jest silnym aktywatorem syntezy endonadtlenku prostaglandyn-1, który stymuluje wzrost

włosów dodatkowo minoksydyl indukuje wzrost włosa poprzez aktywację szlaku Wnt / $\beta$ -kateniny. Zwiększa syntezę DNA komórki brodawki skórnej, macierzy opuszkowej oraz zewnętrznej pochewki korzenia, co skutkuje wydłużeniem fazy anagenu i przemianą włosa do włosa końcowego [5].

**Tabela 2.** Składniki aktywne na wypadanie włosów

Nazwa substancji aktywnej	Charakterystyka substancji
Ketokonazol	Lek przeciwgrzybiczy, substancja pomocna przy wypadaniu włosów na skutek bytowania na skórze drożdżaków.
Minoxidil	Pochodna dihydrałazyny będąca lekiem o działaniu hipotensyjnym oraz stymulującym mieszki włosowe.
Biotyna	Witamina, jej niedobór powoduje zaburzenia w metabolizmie tłuszczów, których następstwem mogą być zmiany skórne i utrata włosów.
Niacyna	Witamina, odpowiada m.in. za transport substancji odżywczych do cebulek włosowych.
Procyjanidyna B2	Procyjanidyny, poprawiają krążenie krwi w obrębie mieszka włosowego oraz regulują florę bakteryjną.
Metylsulfonolometan	Organiczna postać siarki, źródło siarki.
Peptyd miedzi	Hamuje działanie enzymu 5- $\alpha$ -reduktazy oraz zwiększają aktywność mieszków włosowych.
Arginina	Aminokwas niezbędny do wytwarzania tlenu azotu, budulec żywej części włosa, występuje w brodawce włosa.
Flutamid, Finasteryd	Bardzo silne leki antyandrogenowe.
Spirolakton	Lek obniżający stężenie testosteronu.
Bimatoprost	Organiczny związek chemiczny, syntetyczny prostamid, który w działaniu przypomina naturalne prostaglandyny – stymuluje aktywny wzrost włosa.
Biotyl-tripeptide	Peptyd o działaniu wzmacniającym wzrost włosa.
Kofeina	Substancja aktywna poprawiająca ukrwienie mieszka włosowego.

**Wnioski:** Kondycja i cykl włosów zależy od wielu czynników, a podczas podaży zewnętrznej substancji aktywnych stymulujących aktywny wzrost włosa można wpływać na zróżnicowane szlaki komórkowe i mechanizmy aktywności. Szerokie spectrum mechanizmów wpływających na aktywne fazy cyklu włosowego daje duże możliwości tworzenia nowych syntetycznych leków przeciwko wypadaniu włosów oraz łysieniu.

#### **Literatura:**

1. L. Brzezińska-Wcisło, A. Lis, G. Kamińska, D. Wcisło-Dziadecka, Postępy Dermatologii i Alergologii XX; 2003/5.
2. W. Kostanecki, Choroby włosów. PZWL, Warszawa 1979.
3. M. Ratka, P. M. Płonka, Znaczenie wybranych odkryć biologii molekularnej w fizjologii i patologii włosa, Nowa Medycyna 3/2002.
4. V.M. Meidan, E. Touitou, Drugs, 61 (2001) 53.
5. A. Herman, A. P. Herman, Mechanism of action of herbs and their active constituents used in hair loss treatment, Fitoterapia (2016).

## BIOTESTY – NARZĘDZIE DO SZYBKIEGO BADANIA TOKSYCZNOŚCI PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

A. WASILEWSKA, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Ekotoksykologia jest nauką zajmującą się wpływem substancji pochodzenia antropogenicznego na organizmy żywe. Wraz z intensywnym wzrostem przyjmowanych leków konieczne jest opracowanie metod wpływu tego typu związków nie tylko na ludzi, ale również na środowisko. W badaniach wykorzystano dwa rodzaje biotestów: Phytotoxkit z wykorzystaniem pieprzycy siewnej i Microtox® oparty na bakteriiach *Vibrio fischeri*, a do badań wybrano leki grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, takich jak ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak i paracetamol oraz kofeinę, gdyż są to najczęściej spożywane farmaceutyki dostępne bez recepty. Wpływ badanych związków nie był jednakowy. Kofeina i naproksen wykazały najbardziej szkodliwe działanie na wzrost korzeni rzeżuchy. Natomiast kofeina nie jest szkodliwa dla bakterii *Vibrio fischeri*, wręcz na niskim poziomie stężeń stymuluje wzrost bioluminescencji. Ibuprofen, ketoprofen, naproksen i diklofenak przy wysokim stężeniu wykazywały dużą szkodliwość - hamowały bioluminescencję bakterii niemalże w 100%. Paracetamol należał do leków o średniej szkodliwości w stosunku do bakterii. Wzrost korzeni rzeżuchy stymulowały zaś paracetamol, ketoprofen i ibuprofen. Różnice pomiędzy wynikami biotestów wynikają z różnej budowy związków chemicznych, ich właściwości fizykochemicznych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że w celu określenia ekotoksyczności badanego związku konieczne jest przeprowadzenie kilku testów na organizmach na różnych poziomach troficznych.

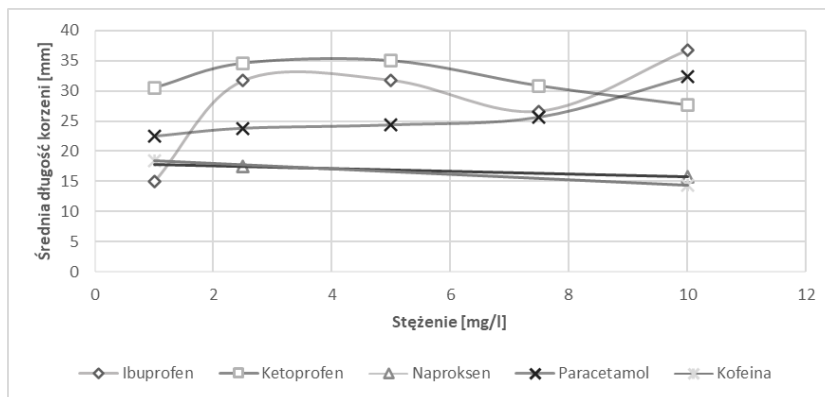
**Wprowadzenie:** Toksykometria zajmuje się badaniem i oceną działania toksycznego substancji chemicznych, by móc zapobiec ewentualnym zatruciom [1]. Wyróżnia się dwa typy testów toksyczności: *in vivo* oraz *in vitro*. Testy *in vivo* polegają na badaniu zwierząt. Metodę *in vitro* stosuje się w przypadku wyizolowanych komórek, preparatów tkankowych i narządów [2,3]. W ekotoksykologii wykorzystuje się biotesty, czyli testy toksyczności ostrej i chronicznej stosowane do wykrywania substancji toksycznych w środowisku [4]. Biotesty można podzielić ze względu na organizmy, które poddaje się badaniom. Fitotesty są to testy toksyczności wykorzystujące rośliny, takie jak glony, owies, pszenica, pieprzycy siewna [3]. Jednym z najpopularniejszych testów na roślinach jest Phytotoxkit. Należy do testów toksyczności ostrej, mierzącym zahamowanie wzrostu korzenia. Testy typu Phytotoxkit są szybkie w wykonaniu oraz umożliwiają bezpośredni pomiar długości korzeni za pomocą programu komputerowego. Test może być stosowany w przypadku badania tylko szybko kiełkujących roślin można traktować jako zaletę, ale również wadę [5]. Nie zawsze można prowadzić badania na jednym rodzaju roślin. Należy metoda prób i błędów wybrać najlepszą roślinę. Dodatkowo należy zwracać uwagę na wielkość nasion, aby nie były zbyt małe, czy zbyt duże [2]. Poza testami na roślinach, wykonuje się również testy na bakteriach. Jednym z najpopularniejszych jest Microtox® wykorzystujący bakterie *Vibrio fischeri* należące do bakterii morskich, które wykazują bioluminescencję [6]. Test

Microtox® należy do testów toksyczności ostrej. Jest to system szybkich pomiarów, (5-15 minut) wykrywania toksyczności w próbkach wodnych. Podczas testu w wyniku narażenia bakterii zaburzany jest ich metabolizm, a więc zmniejsza wytwarzane światło. Miarą toksyczności jest pomiar spadku luminescencji bakterii względem próby kontrolnej [7]. Testy Microtox® wykonywane są z dużą czułością, ponadto wykrywają dużą gamę związków chemicznych. Jednak ich szczególną wadą, która utrudnia prowadzenie pomiarów to hydrofobowość większości zanieczyszczeń chemicznych, a także konieczność modyfikacji pH próbki do zalecanego zakresu (6,5-8,5), co może zmienić właściwości toksyczne [8]. Celem badań było wykorzystanie biotestów do określenia toksyczności wybranych niesteroidowych leków przeciwwzapalnych.

**Część eksperymentalna:** Celem niniejszych badań jest określenie wpływu farmaceutyków na środowisko. Wykonano dwa typy biotestów: Phytotoxkit na pieprzycy siewnej oraz Microtox® wykorzystując bakterie morskie *Vibrio fischeri*. Do badań poddano leki: ibuprofen, ketoprofen, naproksen, paracetamol i diklofenak oraz kofeinę, każdy w pięciu stężeniach: 1,0 mg/l, 2,5 mg/l, 5,0 mg/l, 7,5 mg/l oraz 10,0 mg/l. Phytotoxkit opiera się na kilku etapach, pierwszy z nich to wyznaczenie pojemności wodnej gleby. W celu wykonania próby kontrolnej jedną część płytki wypełnia się glebą (110 g) i napełnia wodą destylowaną do osiągnięcia maksymalnej pojemności wodnej. Na papierowym filtrze umieszcza się 10 nasion w górnej części (według wgłębień zaznaczonych na płytce) w równych odstępach. Zamyka się płytkę i odstawia pionowo w ciemne miejsce. Próby testowe wykonuje się w analogiczny sposób, z tą różnicą, że zamiast wody destylowanej używa się roztworu odpowiedniego farmaceutyku. Płytki po czterech dniach zostały sfotografowane i przy pomocy odpowiedniego programu komputerowego zmierzone zostały średnie długości korzeni. Poza testem na pieprzycy siewnej, wykonano także test na bakteriach morskich *Vibrio fischeri*, Microtox®. Pomiary odczytuje się po 5 oraz 15 minutach od rozpoczęcia narażenia bakterii. Pomiary należy wykonywać w temperaturze termostatu wynoszącej 15°C oraz przy pH w zakresie 6.5-8.5. W takich warunkach *Vibrio fischeri* wykazują naturalną bioluminescencję [9]. Dodatkowo dla każdej serii badań należy wykonać test dla roztworu kontrolnego przy użyciu siedmiowodnego siarczanu cynku [6].

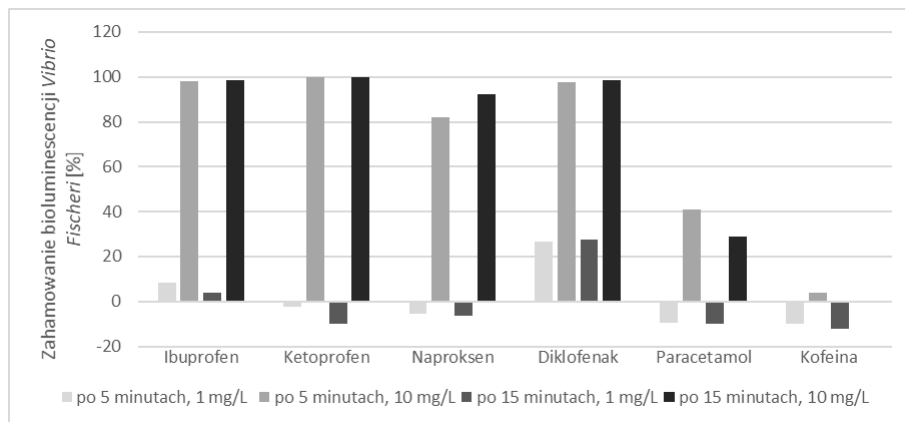
**Wyniki:** Po przeprowadzeniu testu Phytotoxkit zauważono, że tylko w przypadku próbek paracetamolu wykielkowało 100% nasion, ibuprofenu 98%, ketoprofenu 96%, a naproksenu i kofeiny po 85% nasion. Jeśli chodzi o długości korzeni, to wyniki przedstawia Rys. 1. W przypadku ibuprofenu istnieje duża tendencja wzrostowa między stężeniem 1 mg/L a 2.5 mg/L oraz 7.5 mg/L a 10 mg/L, co wskazywać może na pewne działanie stymulujące tego związku. Przy stężeniu 2.5 mg/L oraz 5 mg/L średnia długość korzeni utrzymuje się na tym samym poziomie, co świadczy o braku toksycznego wpływu ibuprofenu na rozwój rzeżuchy. Ketoprofen przy stężeniach do 5 mg/L spowodował wzrost długości korzeni, a przekroczenie stężenia 5 mg/L działa toksycznie na proces wzrostu korzenia pieprzycy. W przypadku paracetamolu, przy każdej dawce zastosowanej w badaniu następuje wzrost średniej długości korzeni rzeżuchy. Naproksen i kofeina

wykazały toksyczne działanie, hamując wzrost korzeni przy każdej dawce. W miarę wzrostu dawki, maleje średnia długość korzeni.



Rys. 1. Wykres zależności średniej długości korzenia od stężenia poszczególnych farmaceutyków.

Po przeprowadzeniu testu Microtox® zaobserwowano (Rys. 2), że wraz ze wzrostem stężenia farmaceutyku rośnie zahamowanie bioluminescencji bakterii.



Rys. 2. Wykres zahamowania bioluminescencji bakterii *Vibrio Fischeri* w zależności od stężenia farmaceutyków i czasu narażenia.

Ibuprofen, ketoprofen i naproksen zahamowały bioluminescencję diametralnie. Kofeina wykazywała najmniejsze działanie toksyczne w stosunku do *Vibrio fischeri*, a w większości przypadków nawet stymulowała bioluminescencję. Niewielkie stężenia (1 mg/L) badanych leków takich jak ketoprofen, naproksen, paracetamol i kofeina stymulowały procesy życiowe bakterii.

**Wnioski:** Spośród badanych farmaceutyków działanie stymulujące na wzrost pieprzycy siewnej wywierały paracetamol, ibuprofen i ketoprofen (do 5 mg/L). Działanie toksyczne farmaceutyków na badaną roślinę zanotowano w przypadku



naproksenu i kofeiny. Natomiast w przypadku toksyczności w stosunku do bakterii *Vibrio Fischeri* bioluminescencję stymulowała tylko kofeina. Paracetamol wykazuje średnio szkodliwy wpływ. Jednak przy stężeniu 10 mg/L ibuprofen, ketoprofen, naproksen i diklofenak wywierały bardzo duże (ponad 80%) zahamowanie bioluminescencji bakterii. Tak różnorodne wyniki badań wynikają z różnic w funkcjach życiowych pieprzycy siewnej oraz bakterii *Vibrio Fischeri*, środowiska ich życia. Kolejnym powodem jest zróżnicowana budowa chemiczna poszczególnych farmaceutyków i obecność w ich cząsteczkach grup funkcyjnych powodujących zmniejszenie lub zwiększenie toksyczności. Wskazuje to, że przy określaniu toksyczności danej substancji wykazującej działanie bioaktywne, konieczne jest wykorzystanie kilku testów bazujących na organizmach na różnych poziomach troficznych.

### Literatura:

1. W. Seńczuk, Toksykologia współczesna, wyd. PZWL, Warszawa, 2016.
2. M. Łebkowska, M. Załęska-Radziwiłł, B. Słomczyńska, Toksykologia środowiskowa Ćwiczenia laboratoryjne, wyd. Oficyna Wydawnictwo Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2004.
3. P. Graham, Chemia leków. Krótkie wykłady, wyd. PWN, Warszawa, 2004.
4. J. Kozak, M. Włodarczyk-Makuła, LAB Laboratoria, Aparatura, Badania, 6 (2016) 22.
5. T. Sekutowski, Zalety i wady mikrobiotestu Phytotoxkit, Streszczenie referatu z I Krajowych Warsztatów Ekotoksykologicznych, rozdział 4, Puławy, 2011.
6. A. Kuczyńska, L. Wolska, J. Namieśnik, Politechnika Gdańska, 32 (2007) 669.
7. [http://www.tigret.eu/images/stories/produkty/ToksSrodowiskowa/microtox500\\_pl.pdf](http://www.tigret.eu/images/stories/produkty/ToksSrodowiskowa/microtox500_pl.pdf), dostęp 6.03.2021.
8. M. B. Jakubus, N. Tatuśko, Inżynieria Ekologiczna Ecological Engineering, 42 (2015) 78.
9. M. Wierzbicka, O. Bemowska-Kalabun, B. Gworek Ecotoxicology, 24 (2015) 805.

## CHARAKTETYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH I CHEMICZNYCH WODY WYBRANYCH ZBIORNIKÓW ŚRÓDPOLNYCH PŁASKOWYŻU ŚWIDNICKIEGO I KOTLINY ZAMOJSKIEJ

M. TCHÓRZEWSKA<sup>1</sup>, W. PŁASKA<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Biologii Środowiskowej Studenckie Koło Naukowe Hydrobiologii i Ochrony Środowiska, <sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Biologii Środowiskowej, Katedra Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów, ul. Dobrzańskiego 37, 20-262 Lublin.

**Abstrakt:** Celem podjętych badań była charakterystyka właściwości fizycznych i chemicznych wody wybranych zbiorników śródpolnych Płaskowyżu Świdnickiego i Kotliny Zamojskiej. Badania przeprowadzono w 2018 r. w miesiącach: kwiecień, maj oraz lipiec. Zmierzono następujące parametry: przewodnictwo elektrolityczne, zawiesina ogólna, całkowita zawiesina rozproszona, odczyn pH, całkowity węgiel organiczny, chemiczne zapotrzebowanie na tlen, biologiczne zapotrzebowanie na tlen oraz surfaktanty. Wiele czynników wykazało sezonowe wahania, ale przede wszystkim wykazano widoczne różnice pomiędzy badanymi stanowiskami. Najgorszym stanem wody charakteryzował się zbiornik Podlipie 1 na Płaskowyżu Świdnickim, gdzie odnotowano wysokie wartości takich czynników jak: przewodnictwo elektrolityczne (902  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), BZT (122  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ), surfaktanty (49  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) oraz TOC (88  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ). W pozostałych zbiornikach, takich jak: Cyganka 2 czy Kajetanówka, wartości badanych wskaźników były niższe i wynosiły odpowiednio: przewodnictwo elektrolityczne (319  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), BZT (13  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ), surfaktanty (4  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) oraz TOC (11  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ). Zróżnicowanie badanych wskaźników wynika z różnego stopnia degradacji zbiorników, powodowanych w głównej mierze przez antropopresję.

**Wprowadzenie:** Wyróżniającym się elementem krajobrazu rolniczego Polski są drobne (0,2–1,0 ha), bezodpływowe zagłębienia, położone na użytkach rolnych, zwane powszechnie śródpolnymi oczkami wodnymi [Fatyga i in., 2007]. Literatura zagraniczna [Collinson i in., 1995; Wild i in., 1995; Wilbur, 1997] określa małe zbiorniki jako „stawy” (*ponds*). Według Pond Conservation Group [1993] małe zbiorniki to obiekty posiadające lustro wody przez minimum 4 miesiące w roku, o powierzchni nie przekraczającej 2 ha. Małe zbiorniki wodne spełniają ważną rolę w zachowaniu różnorodności biologicznej - wpływają na obieg materii przez unieruchomienie substancji biogennych [Cholewiński i Błaudciak, 1995]. Zbiorniki i ciekły jeszcze istniejące często zostają przekształcane w miejsca zrzutu śmieci – sprzyja to niszczeniu istotnych elementów struktury krajobrazu. Nadmierna eutrofizacja zaburza naturalną sukcesję w takich zbiornikach i zastępowana jest przez „sukcesję antropogeniczną”. Właściwości fizyczne i chemiczne wód małych zbiorników wodnych podlegają sezonowej zmienności oraz wyraźnym przekształceniom, na które największy wpływ mają czynniki antropogeniczne [Kagaloua i in, 2008]. Środowisko wodne jest stale narażane na presję ze strony intensywnego rolnictwa oraz przemysłu [Páll i in., 2013].

**Część eksperymentalna:** Badania właściwości fizycznych i chemicznych wody zostały przeprowadzone w miesiącach kwiecień, maj i lipiec 2018 r. Badaniami objęto osiem zbiorników śródpolnych zlokalizowanych na terenie Płaskowyżu Świdnickiego (Cyganka 2, Cyganka 3, Kajetanówka, Leopoldów, Podlipie 1, Stróża 2 i Zalesie) i Kotliny Zamojskiej (Białobrzegi 1). Obszary te położone są we wschodniej Polsce. Próbkę wody były pobierane z ośmiu wyznaczonych zbiorników do plastikowych pojemników o pojemności 0,5 litra każdy. Przy pomocy spektrofotometru Pastel UV oznaczono:

Całkowitą zawiesinę rozproszoną - TSS ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ); całkowity węgiel organiczny – TOC ( $\text{mg C}/\text{dm}^3$ ); surfaktanty, związki powierzchniowo czynne – SUR ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ); chemiczne zapotrzebowanie na tlen – ChZT ( $\text{mg O}_2/\text{dm}^3$ ); biologiczne zapotrzebowanie na tlen – BZT ( $\text{mg O}_2/\text{dm}^3$ ).

Sonda wieloparametrowa YSI służyła do określenia takich parametrów jak: przewodnictwo elektrolityczne ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); zawiesina ogólna - TDS ( $\text{g}/\text{dm}^3$ ); odczyn wody – pH ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ).

**Wyniki:** W badanych zbiornikach zauważono niewielkie wahania odczynu wody, średnia wartość tego parametru wynosiła 7,47. Największe różnice w wartościach pH zaobserwowano w zbiorniku Cyganka 2 oraz Cyganka 3: w obu przypadkach widać znaczny spadek z pH 8-8,3 w miesiącach kwiecień-maj do wartości pH 7,2 w lipcu 2018 r. Najniższym odczynem wody cechował się zbiornik Białobrzegi 1, którego pH utrzymywało się na poziomie 7-7,2. Tadajewski i Kubiak [1976] stwierdzili, że takie wartości pH są typowe dla danych akwenów wodnych i zależą od położenia geograficznego, warstwy topograficznej, w której zachodzą procesy asymilacji oraz od rodzaju gleby. Wyniki pomiarów przewodnictwa elektrolitycznego wahają się w ciągu 3 miesięcy: od wartości 317  $\mu\text{S}/\text{cm}$  do 921  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Najwyższą wartość odnotowano na stanowisku Podlipie 1 i wynosiła ona 921  $\mu\text{S}/\text{cm}$  w lipcu. Najniższą wartość zaobserwowano we wszystkich badanych miesiącach dla zbiornika Cyganka 2, odpowiednio 328  $\mu\text{S}/\text{cm}$  w kwietniu, 319  $\mu\text{S}/\text{cm}$  w maju i 317  $\mu\text{S}/\text{cm}$  w lipcu. Według Joniaka [2009] przewodnictwo elektrolityczne w zbiornikach śródpolnych często osiąga wartości powyżej 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Tak wysokie wartości wskazują na duże zanieczyszczenie wody bądź wpływ zlewni rolniczej [Niemirycz i in., 1993]. Najwyższe wartości zawiesiny ogólnej zaobserwowano na stanowisku Podlipie 1 – 0,6  $\text{g}/\text{dm}^3$  przez cały okres badań. Zbiornik Białobrzegi 1 również cechował się wysokimi wartościami badanego parametru - 0,5  $\text{g}/\text{dm}^3$  w kwietniu oraz maju. Najniższe stężenia zawiesiny ogólnej odnotowano w zbiorniku Cyganka 2, które wahały się od wartości 0,2  $\text{g}/\text{dm}^3$  do 0,3  $\text{g}/\text{dm}^3$ . Najwyższe wartości całkowitego węgla organicznego zanotowano na stanowisku Podlipie 1 i wynosiły one: 50  $\text{mg C}/\text{dm}^3$  w kwietniu, 88  $\text{mg C}/\text{dm}^3$  w maju oraz 70  $\text{mg C}/\text{dm}^3$  w lipcu 2018 r. W pozostałych zbiornikach odnotowano zbliżone do siebie średnie wartości badanego parametru: Cyganka 2 – 9  $\text{mg C}/\text{dm}^3$ , Cyganka 3 – 12  $\text{mg C}/\text{dm}^3$ , Kajetanówka – 11  $\text{mg C}/\text{dm}^3$ , Leopoldów - 13  $\text{mg C}/\text{dm}^3$ , Stróża 2 – 17  $\text{mg C}/\text{dm}^3$  i Zalesie – 12  $\text{mg C}/\text{dm}^3$ . Podczas badań stwierdzono duże wahania całkowitej zawiesiny rozproszonej. Najwyższe wartości zawiesiny odnotowano w lipcu na stanowiskach: Białobrzegi 1 – 132  $\text{mg}/\text{dm}^3$  oraz Stróża 2 – 103  $\text{mg}/\text{dm}^3$ . Tak wysokie stężenie zawiesiny może świadczyć o zanieczyszczeniu wody. Najniższe wartości TSS dla kwietnia odnotowano

w zbiorniku Leopoldów - 5 mg/dm<sup>3</sup>, Kajetanówka - 4 mg/dm<sup>3</sup> i Zalesie – 3 mg/dm<sup>3</sup>. W maju zbiorniki te również charakteryzowały się najniższymi wynikami badanego parametru. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen dla badanych stanowisk wynosiło średnio od 16 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> w zbiorniku Cyganka 2 do 186 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> w zbiorniku Podlipie 1. Według Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. do II i III klasy pod względem badanego parametru można zaliczyć zbiorniki Białobrzegi 1 (śr. 29 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), Cyganka 2 (śr. 16 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), Cyganka 3 (śr. 24 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), Kajetanówka (śr. 25 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) oraz Zalesie (śr. 29 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), natomiast do V klasy zalicza się zbiornik Podlipie 1 (Tab. 1.). Spośród badanych zbiorników najbardziej narażonymi na degradację były stanowiska Stróża 2 i Podlipie 1. Zbiornik Stróża 2 był stale zasypywany pozostałościami rolniczymi, co skutkowało jego szybkim zanikaniem.

**Tabela 1.** Właściwości fizyczne i chemiczne wody na badanych stanowiskach

Zbiornik/Miesiąc /Parametr		Przew. elektrol. (μS/cm)	TOC (mgC /dm <sup>3</sup> )	SUR (mg /dm <sup>3</sup> )	ChZT (mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> )	BZT (mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> )	TSS (mg C /dm <sup>3</sup> )	TDS (g/dm <sup>3</sup> )	pH
Białobrzegi 1	IV	612	11	6	19	11	21	0,5	7,1
	V	648	11	7	26	15	35	0,5	7
	VI I	784	17	10	41	23	132	0,5	7,2
Cyganka 2	IV	328	7	4	11	10	18	0,3	8,2
	V	319	9	5	13	13	21	0,3	8
	VI I	317	10	6	25	14	27	0,2	7,2
Cyganka 3	IV	527	9	5	13	12	27	0,4	8,3
	V	621	10	7	19	15	38	0,4	8,2
	VI I	778	17	12	39	23	85	0,5	7,2
Kajetanówka	IV	512	10	4	18	14	4	0,4	7,1
	V	537	11	4	30	16	3	0,4	7,4
	VI I	511	12	7	28	16	34	0,3	7,6
Leopoldów	IV	510	10	8	27	15	5	0,4	7,3
	V	582	12	32	32	17	3	0,4	7,5
	VI	641	16	10	36	21	47	0,4	7,4
Podlipie 1	IV	871	50	30	116	92	39	0,6	7,2
	V	902	88	49	211	122	100	0,6	7,4
	VI	921	70	32	230	139	82	0,6	7,6
Stróża 2	IV	378	13	8	31	18	29	0,4	7,1
	V	520	15	10	39	19	59	0,5	7,2
	VI	688	27	18	48	29	103	0,4	7,3
Zalesie	IV	630	8	8	19	12	3	0,4	7,2
	V	714	11	28	28	15	3	0,5	7,7
	VI	587	17	11	40	23	57	0,4	8

**Wnioski:** Działania rolnicze, a w szczególności intensywne wykorzystanie nawozów, herbicydów i pestycydów, wypas zwierząt oraz zasypywanie śmieciami i odpadami poźniwnymi wpływają negatywnie na jakość wody małych zbiorników wodnych. Zbiornik Podlipie 1 charakteryzował się najgorszą jakością wody pod względem badanych parametrów, a w szczególności: całkowitego węgla

organicznego, surfaktantów, chemicznego zapotrzebowania na tlen, biologicznego zapotrzebowania na tlen, przewodnictwa elektrolitycznego oraz zawiesiny ogólnej. Największe sezonowe wahania parametru zaobserwowano w lipcu w zbiornikach: Białobrzegi 1, Cyganka 3, Kajetanówka, Leopoldów, Stróża 2 oraz Zalesie dla całkowitej zawiesiny rozproszonej wywołane przez sploty powierzchniowe i zakwity fitoplanktonu. W celu ochrony i poprawy jakości wód zbiorników śródpolnych zaleca się wprowadzenie stref buforowych, nieusuwanie roślinności szuwarowej oraz bezwzględny zakaz gromadzenia resztek poźniwnych w misie zbiorników.

### **Literatura:**

1. A. Cholewiński, R. Białciak, *Wszechświat*, 96/5 (1995) 124.
2. N. H. Collinson, J. Biggs, A. Corfield, M. J. Hodson, D. Walker, M. Whitfield, P.J. Williams, *Biol. Conserv.*, 74/2 (1995) 125.
3. J. Fatyga, A. Górecki, M. Helis, *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 7/2a (2007) 107.
4. T. Joniak, Charakterystyka hydrochemiczna wód i zarys chemizmu osadów dennych drobnych zbiorników wodnych krajobrazu rolniczego i leśnego. W: N. Kuczyńska-Kippen, S. Celewicz-Gołdyn, T. Joniak, B. Messyasz, B. Nagengast, K. Stefaniak, *Funkcjonowanie zbiorników planktonu w zróżnicowanych siedliskowo drobnych zbiornikach wodnych Wielkopolski*, BIONAMI Wydawnictwo-Drukarnia, Poznań 2009.
5. I. Kagalou, E. Papastergiadoub, I. Leonardosa, *J. Environ. Manag.*, 87 (2008) 497.
6. E. Niemirycz, R. Taylor, Z. Makowski, *Zagrożenie substancjami biogennymi wód powierzchniowych*, Biblioteka Monitoringu Środowiska, 1993.
7. E. Páll, M. Niculae, T. Kiss, C. D. Şandru, M. Spřnu, *J Med Microbiol*, 62 (2013) 1635.
8. Pond Conservation Group. *A future for Britain's ponds. An agenda for action*. Pond Conservation Group (1993).
9. A. Tadjewski, J. Kubiak, *Stud. i Mat. Oceanol.*, 15 (1976) 91.
10. H. M. Wilbur, *Ecology*, 78/8 (1997) 2279.
11. A. Wild, J. Lee-Kaden, H. Gimmler, W. Simonis, *Limnologia*, 25/3 (1995) 229.

## DEMODEKOZA- PRAWDZIWE OBLICZE NUŻEŃCÓW

M. KOŁODZIEJCZYK<sup>1</sup>, A. BOGUCKA-KOCKA<sup>1</sup>, M. PAWLICKA<sup>2</sup>, P. GŁAZ<sup>3</sup>, <sup>1</sup>UM Lublin, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Biologii z Genetyką, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, <sup>2</sup>UM Lublin, Wydział Lekarsko-Dentystyczny, Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin, <sup>3</sup>UM Lublin, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Roztocza *Demodex* są egzopasożytami skóry ssaków, występującymi głównie w jednostkach włosowo-łojowych lub w regionach owłosionych. Niekiedy znajdowane są u zdrowych ludzi i zwierząt bez powodowania jakichkolwiek objawów klinicznych. Wywołują objawy chorobotwórcze, gdy pojawiają się w dużym zagęszczeniu w sprzyjających warunkach, prowadzi to do pojawienia się nużycy. Niemniej jednak ich rola jako głównego czynnika wywołującego choroby u ludzi jest dziś przedmiotem licznych badań. Aktualna literatura sugeruje podobne odpowiedzi immunologiczne i mechanizmy unikania odporności w nużycy u ludzi. Okazało się, że odporność komórkowa odgrywa kluczową rolę w ochronie przed nużycą, a roztocza *Demodex* wpływają zarówno na wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź immunologiczną, aby uniknąć ataku immunologicznego [1].

**Wprowadzenie:** *Demodex folliculorum* i *Demodex brevis* to pasożyty zewnętrzne człowieka. Są one częścią jednostek włosowo-łojowych skóry twarzy, mieszków włosowych i gruczołów Meiboma, które znajdziemy na powiekach. *D. folliculorum* znajduje się zwykle w powierzchniowych strukturach pęcherzyków i gruczołów, podczas gdy *D. brevis* jest zakotwiczona głębiej w gruczołach [2]. Niemniej jednak ich dokładna rola w normalnych stanach skóry jest nadal niepewna. Przypuszcza się, że mogą mieć asymbiotyczny związek z ludźmi jako komensale, odżywiając się ludzkim łojem bez szkody dla gospodarza. Jednak gdy ich populacja przekracza punkt krytyczny stają się chorobotwórcze, schorzenie, które wywołują powszechnie określane jest jako nużycyca- demodekoza [3].

**Wyniki:** Nużycyca twarzy jest powiązana zarówno z oczywistymi stanami skórnymi, takimi jak trądzik różowaty grudkowo-krostkowy i ziarniniakowy, jak i z niedostatecznymi i mniej zauważalnymi objawami, takimi jak łupież kolczystokomórkowy i zapalenie mieszków włosowych [4–6]. Objawy nużycy na twarzy są różnorodne i niespecyficzne: swędzenie skóry, rumień, biaława łuska, niektóre grudki i krosty pęcherzykowe. Aby określić ilościowo objawy nużycy w skórze, opisano różne techniki, takie jak bezpośrednie badanie mikroskopowe i standaryzowana biopsja powierzchni skóry [SSSB]. Bezpośrednie badanie mikroskopowe pozwala na lepszą wizualizację głębszych warstw skóry i wyższą wykrywalność *D. brevis* niż SSSB, która zbiera tylko zewnętrzną warstwę naskórka i zawartość mieszka włosowego. Niemniej jednak SSSB pozostaje najbardziej rozpowszechnioną techniką, ponieważ jest mało inwazyjna, dobrze tolerowana i skuteczna w warunkach klinicznych [7]. Nużycyca powiek może przybierać różne formy i nasilenie, w zależności od tego, czy głównym czynnikiem sprawczym jest

*D. brevis*, czy *D. folliculorum*. Zwiększona liczba *D. brevis* występuje na ogół w gruczołach Meiboma u osób z dysfunkcją tych gruczołów i gradówką [8,9]. Natomiast *D. folliculorum* występuje w większości przypadków zapalenia powiek przednich i u osób z dysfunkcją gruczołów Meiboma [10-12]. Choć osoby dotknięte nużycą mogą być bezobjawowe, większość z nich doświadcza niespecyficznych objawów, takich jak świąd, zaczerwienienie powiek, łzawienie oczu i uczucie suchego oka [10, 13] Najczęstsze objawy zgłaszane przez pacjentów to świąd, zaczerwienienie powiek i łzawienie oczu [14]. Zdarzają się sytuacje, iż nietypowe zmiany skórne spowodowane bytowaniem *Demodex spp.* pojawiają się wokół ust czy na dłoniach [15]. Roztocza *Demodex* wnikają do komórek skóry (zwłaszcza keratynocytów wyścielających mieszki włosowo-łojowe) i połykają ich zawartość. Roztocza żywią się łożem i białkami komórkowymi otrzymywanymi przez proteazę zawierającą enzymy ślinowe roztoczy [15,16]. Demodekoza może objawiać się obecnością stałych lub nawracających zmian. Noy i wsp. opisali pacjenta z nawracającą swędzącą wysypką na twarzy [17]. W momencie gdy miejscowe leczenie chorego steroidami, inhibitorami kalcyneuryny, ogólnoustrojowymi antybiotykami czy lekami przeciwhistaminowymi nie przynosiło rezultatów, przeprowadzono badanie, w wyniku czego wykryto wiele gatunków *Demodex spp.* Zmiany ustąpiły w ciągu kilku tygodni przy wprowadzeniu miejscowego leczenia iwermektyną, nie wystąpiły nawroty [18].

**Wnioski:** Nadal nie wyjaśniono, czy nużycza jest przyczyną chorób skóry. Jednak na podstawie wyników badania przeprowadzonego przez Karabay oraz Çerman można stwierdzić, że trądzik różowaty, trądzik pospolity i łojotokowe zapalenie skóry są istotnie związane z inwazją nużeńcem. Reaktywacja układu odpornościowego, stan zapalny i zmiany pęcherzykowe wywołane przez roztocze *Demodex* mogą przyczynić się do rozwoju choroby. SSSB, łatwo dostępne i praktyczne narzędzie, może posłużyć do określenia obecności zarażenia nużeńcem. Szczególnie w przypadkach opornych na terapię należy wziąć pod uwagę towarzyszącą inwazję nużeńcem [19]. Przypuszcza się, że roztocza *Demodex* są częścią normalnej fauny i saprofitycznych pasożytów skóry ssaków, obecnie dyskutuje się o ich związku z wieloma chorobami oczu i skóry. Uważa się, że roztocza albo działają bezpośrednio prowadząc do wystąpienia objawów / chorób, albo działają jako wektor dla czynnika odpowiedzialnego za wystąpienie choroby[1].

### Literatura:

1. U. Gazi, A. Taylan-Ozkan, K.Y. Mumcuoglu, *Parasite Immunol.*, 12 (2019) 12673.
2. S.G. Nicholls, C.L. Oakley, A. Tan, B.J. Vote, *Int. Ophthalmol.*, 37/1 (2017) 303.
3. N. Lacey, S. Ni Raghallaigh, F.C. Powell, *Dermatology*, 222/2 (2011) 128.
4. M. el-Shazly, B.M. Ghaneum, T.A. Morsy, H.E. Aaty, *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 31/3 (2001) 867.
5. F.M. Forton, V. De Maertelaer, *Acta Derm Venereol.*, 97 (2017) 242.
6. Y. Karıncaoglu, N. Bayram, O. Aycan, M. Esrefoglu, *J. Dermatol.*, 31/8 (2004) 618.
7. S. Aumond, E. Bitton, *Cont. Lens. Anterior Eye.*, 43/2 (2020) 115.
8. Y.Y. Gao, M.A. Di Pascuale, A. Elizondo, S.C. Tseng, *Cornea*, 26/2 (2007) 136.
9. W. Tarkowski, M. Owczynska, A. Blaszczyk-Tyszka, D. Młocicki, *Acta Parasitol.*, 60/4 (2015) 777.
10. J.K. Bhandari, K. Reddy, *Middle East Afr J Ophthalmol.*, 21/4 (2014) 317.
11. D. Lopez-Ponce, F. Zuazo, C. Cartes, D. Salinas-Toro, C. Perez-Valenzuela, F. Valenzuela, *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 1 (2017) 33.
12. D. Chen, R. Li, X.W. Liu, Y. Li, Z. Fu, Y. Gao, Y. Ma, Y. Yang, *PLoS One.*, 53 (2015) 193.
13. M. Sedzikowska, M. Oseka, B. Grytner-Ziecina, *Acta Parasitol.*, 61/4 (2016) 808.

14. M. Wesolowska, W. Baran, J. Szepietowski, L. Hirschberg, S. Jankowski, *Wiad Parazytol.*, 51 (2005) 253.
15. E.M. Moran, R. Foley, F.C. Powell, *Clin Dermatol.*, 35 (2017) 195.
16. P.A. Rather, I. Hassan, *Indian J Dermatol.*, 59 (2014) 60.
17. M.L. Noy, S. Hughes, C.B. Bunker, *Clin Exp Dermatol.*, 41 (2016) 958.
18. J. Hong, B. Koo, J. Koo, *Dermatol Ther.*, 21 (2008) 54.
19. E. Aktas Karabay, C.A. Aksu, *An Bras Dermatol.*, 95 (2020) 187.



## **ROLA WITAMINY D3 W PROCESIE GOJENIA RAN POOPERACYJNYCH U KOBIET PO MASTEKTOMII**

**M. PAWLICKA<sup>1</sup>, A. FILIP<sup>1</sup>, M. KOŁODZIEJCZYK<sup>2</sup>, P. GŁAZ<sup>3</sup>,** <sup>1</sup>UM Lublin, Wydział Lekarski, Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin, <sup>2</sup>UM Lublin, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Biologii z Genetyką, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, <sup>3</sup>UM Lublin, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Rak piersi to nowotwór złośliwy, wywodzący się z tkanki nabłonkowej. Obecnie stanowi jeden z największych problemów epidemiologicznych w Polsce i na świecie. Podstawową metodą terapii jest leczenie chirurgiczne, które niesie za sobą powikłania w postaci trudno gojących się ran oraz blizn, mogących utrudniać mobilność chorym. Istnieje wiele czynników wpływających na przebieg procesu gojenia rany, jednym z nich są niedobory składników odżywczych. W poniższym artykule dokonano przeglądu literatury dotyczącej wpływu witaminy D3 na procesy gojenia ran oraz na karcynogenezę raka piersi.

**Wprowadzenie:** Rak piersi to najczęściej występujący nowotwór złośliwy u kobiet w Polsce. Jest drugą po raku płuca przyczyną zgonów wywołanych nowotworami. Zabiegiem ratującym zdrowie i życie jest mastektomia. Najczęściej stosuje się radykalną amputację piersi, zwaną mastektomią metodą Pateya. Zabieg polega na całkowitym odjęciu gruczołu wraz z powięzią pokrywającą mięsień piersiowy większy i mniejszy oraz węzłami chłonnymi. Część chorych kwalifikuje się do leczenia oszczędzającego pierś [1]. Niestety, bez względu na zastosowaną metodę, zabieg niesie za sobą przykre konsekwencje w postaci obrzęków limfatycznych i blizn pooperacyjnych. Negatywnie na prawidłowy przebieg procesu gojenia wpływa dodatkowo leczenie uzupełniające (radioterapia i chemioterapia), stosowane w celu wyeliminowania pozostałych komórek nowotworowych. Dlatego tak ważne jest jak najszybsze podjęcie terapii blizny, która przede wszystkim może utrudniać mobilność i być bolesna, ale także stanowi defekt estetyczny. Na prawidłowy proces gojenia rany i formowanie blizny ma wpływ wiele czynników, m.in. wiek i status immunologiczny, stan zdrowia, mobilność, stan psychiczny, stosowane leki, ale także poziom składników odżywczych [2]. Jednym z nich może być poziom witaminy D3. Niedobór tego związku jest zjawiskiem powszechnie występującym (pandemicznym), co wiąże się z niewystarczającą ekspozycją na światło słoneczne [3]. W artykule omówiono aktualne poglądy dotyczące roli witaminy D3 w procesie gojenia ran pooperacyjnych u kobiet po mastektomii.

**Część eksperymentalna:** Gojenie się ran jest procesem wieloetapowym, w którym bierze udział wiele typów komórek. Początkowe etapy gojenia obejmują hemostazę oraz odpowiedź zapalną. W trakcie hemostazy dochodzi do powstania skrzepu, którego składnikami są płytki krwi osadzone na fibrynowej siateczce. Powstały skrzep pełni funkcję tymczasowego rusztowania, które umożliwia migrację komórek i jednocześnie stanowi źródło mediatorów procesu gojenia. Ponadto jego powstanie zapobiega nadmiernej utracie krwi oraz chroni ranę przed infekcją. Dochodzi także

do obkurczenia naczyń otaczających ranę i agregacji płytek krwi, które aktywują serotoninę, fibrynogen, TGF $\alpha$  i TGF $\beta$ , FGF oraz PDGF. W procesie tym biorą także udział jony wapnia i witamina K. Płytki krwi uwalniają następnie czynniki immunomodulujące, nasilające reakcję zapalną oraz aktywują keratynocyty i makrofagi, które z kolei pobudzają fibroblasty do proliferacji. Faza zapalna trwa około 4-5 dni (w przypadku ran niezainfekowanych), po czym dochodzi do właściwej fazy gojenia, czyli proliferacji [4]. Podczas niej fibroblasty produkują kolagen, który tworzy tkankę łączną włóknistą. W procesie tym bierze udział wiele czynników wzrostu i cytokin, m.in. IL-1, IL-6, GM-CSF, KGF, FGF, HGF. Ziarnina jest tworzona przez luźno ułożone włókna kolagenowe, kwas hialuronowy oraz fibronektyny, których wytwarzanie jest uzależnione m.in. od obecności TGF $\alpha$  i TGF $\beta$ . Zachodzą również procesy angiogenezy, umożliwiające napływ komórek macierzystych, substancji odżywczych i czynników wzrostu. W fazie epitelializacji dochodzi do migracji komórek podstawnych i nabłonkowych z mieszków włosowych oraz gruczołów potowych. W momencie kiedy komórki zetkną się z komórkami sąsiadującymi, rozpoczyna się faza przebudowy blizny, która może trwać 6-12 miesięcy [5]. Witamina D3 (kalcytriol) ma strukturę zbliżoną do hormonów steroidowych i wykazuje działanie hormonopodobne. Działa ona na komórki docelowe poprzez receptory jądrowe VDR, które znajdują się nie tylko w komórkach kostnych, ale także w większości komórek ludzkiego organizmu, m.in. keratynocytach. Receptory VDR znajdują się również w komórkach nowotworowych. Obecność receptora VDR na tak wielu rodzajach komórek warunkuje plejotropowe działanie kalcytriolu. Witamina D3 kontroluje transkrypcję ponad 200 genów [6]. Działanie witaminy D3 na organizm ludzki jest bardzo szerokie. Jej właściwy poziom jest niezbędny do prawidłowego przebiegu procesu gojenia się ran. Wiele badań sugeruje, że powstawanie ran zwiększa zapotrzebowanie na kalcytriol [6, 7]. Dzieje się tak ze względu na wiele istotnych ról, jakie składnik ten odgrywa w procesie regeneracji. Witamina D3 kontroluje geny, które promują tworzenie katelicydyny, peptydu antybakteryjnego, który wykorzystywany jest przez układ odpornościowy do zwalczania infekcji ran. W przypadku niedoboru tego związku, funkcja immunologiczna może zostać osłabiona, co zwiększa podatność na zakażenia drobnoustrojami [7]. Na potencjalny wpływ witaminy D3 na procesy gojenia ran wskazuje również szereg badań klinicznych [8, 9, 10, 11, 12]. Jedno z nich sugeruje istnienie wyraźnej równowagi pomiędzy poziomem witaminy D3 i czynnika TGF $\beta$ 1 [8]. Wysoki poziom witaminy D3 w połączeniu z niskim poziomem TGF $\beta$ 1 poprawia gojenie się ran, podczas gdy wysoki poziom witaminy D3 w połączeniu z wysokim poziomem TGF $\beta$ 1 zmniejsza włóknienie blizny. Sugeruje to, że kalcytriol moduluje efekty gojenia ran przez TGF $\beta$ 1 w różny sposób, w zależności od stężenia TGF $\beta$ 1. W związku z tym suplementacja witaminą D3 może być skuteczną terapią poprawiającą gojenie się ran, a także zmniejszającą włóknienie powstającej blizny [8]. W innym badaniu przeanalizowano wpływ suplementacji witaminą D3 na gojenie owrzodzeń u 60 pacjentów ze stopą cukrzycową. Połowa pacjentów otrzymywała co 2 tygodnie dawkę 50 000 IU kalcytriolu przez okres 12 tygodni, a druga połowa otrzymywała placebo. Rany znacznie lepiej goiły się u pierwszej grupy pacjentów [9]. W innym badaniu klinicznym wykazano korelację pomiędzy poziomem witaminy D3, a skutecznością terapii blizn hipertoficznych. W grupie badanych znalazło się 50

pacjentów z poziomem witaminy D3 poniżej 25 ng/mL, których podzielono na 3 grupy. W pierwszej grupie znaleźli się pacjenci stanowiący grupę kontrolną (brak leczenia), w drugiej pacjenci, którym podawano witaminę D3, a w trzeciej pacjenci, którym podawano witaminę D3 oraz chirurgicznie wycięto bliznę. Najlepsze efekty terapii zaobserwowano w trzeciej grupie [10]. Przeanalizowano także wpływ poziomu kalcytriolu w surowicy na procesy gojenia u pacjentów z oparzeniami. Badanie pokazało, że pacjenci z wyższym poziomem witaminy D3 mieli lepsze rokowanie, lepsze gojenie się ran, mniej powikłań i mniej blizn [11, 12]. W ostatnich latach witamina D3 stała się obiektem zainteresowań wielu naukowców. Badania dotyczą m.in. wpływu witaminy D3 na rozwój nowotworów, przede wszystkim raka piersi, jajnika, prostaty oraz skóry. Badania epidemiologiczne wskazują na obniżone ryzyko raka piersi u osób regularnie przyjmujących witaminę D3 [13, 14, 15]. Zostały one poparte przez liczne badania laboratoryjne, które pokazały, że 1,25(OH)D zwiększa różnicowanie komórek raka piersi a także hamuje enzym aromatazę, z wykorzystaniem licznych mechanizmów, w tym blokowania enzymu COX-2 [16]. Ekspresja aromatazy jest nieodzowna, żeby mogła zajść synteza estrogenu i prawdopodobnie odgrywa także rolę w działaniu ochronnym witaminy D3 w ER(+) rakach piersi. Witamina D3 w liniach komórkowych raka piersi indukuje apoptozę i hamuje czynniki stymulujące proliferację. Hamuje także angiogenezę poprzez blokowanie VEGF [17] oraz wpływając supresyjnie na COX-2 [16]. Witamina D3 może również wpływać na przebieg choroby u kobiet z rakiem piersi poprzez zwiększanie syntezy e-kadheryn [17]. Toksyczność kalcytriolu zdarza się dosyć rzadko, jednak podczas dobowania dawki, warto pamiętać, że nadmiar witaminy D3 może także zaszkodzić. Pierwszymi mierzalnymi niepożądanymi działaniami nadmiaru kalcytriolu mogą być hiperkalciuria i hiperkalcemia [18]. W związku z tym, w trakcie suplementacji wysokich dawek należy kontrolować kalcemię, kalciurię, fosfatemię i aktywności fosfatazy alkalicznej [19].

**Wyniki:** Wraz z postępem nauki zwiększa się liczba chorób, których rozwój i przebieg może być uwarunkowany niedoborem witaminy D3. Procesy gojenia ran i powstawania blizn są ściśle skorelowane z jej poziomem w surowicy. Wiele badań populacyjnych i laboratoryjnych pokazuje również, że jej deficyt może zwiększać ryzyko powstawania nowotworów, a odpowiedni poziom może być pozytywnym czynnikiem prognostycznym w przebiegu ich leczenia.

**Wnioski:** Bilans korzyści i zagrożeń stosowania witaminy D3 w odpowiednio dostosowanych dawkach w oparciu o dostępne badania kliniczne uprawnia do powszechnego zalecania suplementacji kalcytriolu kobietom w trakcie i po leczeniu raka piersi, zwłaszcza metodami chirurgicznymi. Odpowiednia podaż w diecie oraz suplementacja witaminą D3 jest bezpieczną, tanią i prostą metodą zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka piersi. Dalszych badań wymagają mechanizmy odpowiadające za wpływ witaminy D3 na przyspieszanie gojenia ran.

#### **Literatura:**

1. B. Jabłońska, J. Brańka, P. Lampe, Postępy Nauk Medycznych, 1 (2011) 29.
2. P.H. Lin, M. Sermersheim, H. Li, P.H.U. Lee, S.M. Steinberg, J. Ma. Nutrients, 10 (2017) 16.
3. F. Holick, C. Binkley, A. Bischoff-Ferrari i in... J Clin Endocrinol Metab. 97 (2012) 1153.

4. A. Kołodziejczak, Kosmetologia, PZWL, Warszawa 2020.
5. E. Rojczyk, M. Klimek, K. Wilemska-Kucharzewska, M. Kucharzewski, Leczenie Ran, 13 (2016) 1.
6. Z. Zdrojewicz, E. Chruszczewska, M. Miner, Med Rodz, 2(18) (2015) 61.
7. N. Collins. Advances in Skin & Wound Care, 24(11) (2011) 498.
8. J. Ding, P. Kwan, Z.Ma i in. 1, Burns, 42(6) (2016) 1277.
9. K. Smith, S. Hewlings, Journal of Wound Care, 29 (2020) 7.
10. B. Ince, I. Uyar, M. Dadaci, Dermatol Sur. 45(2) (2019) 274.
11. K. Al-Tarrach, C. Jenkinson, M. Hewison, N. Moiemien, J. Lord, Endocrine Abstracts, 2017
12. Y. Soo Cho, C. Hoon Seo, S.Y. Joo, Journal of Burn Care & Research, 40(3) (2019) 274.
13. J. Lappe, D. Cullen, G. Haynatzki i in., J Bone Miner Res., 23 (2008) 741.
14. M. Bolland, A. Grey, G. Gamble i in., Am J Clin Nutr, 94 (2011) 1144.
15. A. Krishnan, D. Feldman, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 51 (2011) 311.
16. G. Pearson, T. Hunter, J Cell Biol, 179 (2007) 1555.
17. N. Lopes, J. Carvalho, C. Durães i in., Anticancer Res, 32 (2012) 249.
18. P. Pludowski, E. Karczmarewicz, M. Bayer i in., Endokrynol Pol. 64(4) (2013) 319.
19. P. Kmieć, K. Sworzczak, Forum Medycyny Rodzinnej, 11(1) (2017) 38.

## TERAPEUTYCZNA ROLA KURKUMINY

A. ARCHAŁA<sup>1</sup>, O. KOSZŁA<sup>2</sup>, M. MACIĄG<sup>1</sup>, P. STĘPNICKI<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Biofarmacji, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, <sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Zakres działania kurkuminy zaobserwowano zarówno na poziomie molekularnym jak i całego organizmu. Istnieją dowody na to, że może być stosowana zarówno jako środek zapobiegawczy, jak i leczniczy w przebiegu wielu chorób, takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, choroby układu krążenia, choroby autoimmunologiczne, astma oraz wiele innych.

**Wprowadzenie:** Kurkumina jest związkiem roślinnym pozyskiwanym z kłączy ostryżu długiego (*Curcuma longa* L.). W badaniach *in vitro* nad wpływem kurkuminy na proces nowotworzenia zaobserwowano indukcję śmierci komórkowej oraz spadek proliferacji komórek nowotworowych. W badaniach *in vivo* zauważono zahamowanie angiogenezy oraz zmniejszenie liczby przerzutów nowotworu. Kurkumina wykazuje cytotoksyczny charakter dla wielu linii komórek nowotworowych pochodzących z różnych tkanek. Działanie kurkuminy zależy od typu komórki, stężenia kurkuminy (IC<sub>50</sub>: 2-40 µg/ml) i czasu traktowania związkiem. Głównym mechanizmem, za pomocą którego kurkumina indukuje cytotoksyczność jest indukcja apoptozy. Udowodniono, że kurkumina zmniejsza ekspresję antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 i zwiększa ekspresję białek p53, Bax, a także prokaspazy 3, 8, i 9. Kurkumina zapobiega wejściu czynnika jądrowego KB (NF-κB) do jądra poprzez zmniejszenie ekspresji białek regulacyjnych cyklu komórkowego i czynników przeżycia, takich jak Bcl-2 i surwiwiny. Kurkumina hamuje przerzuty komórek nowotworowych w różnych modelach zwierzęcych i zwiększa żywotność zwierząt posiadających guzy [1]. Glejak (*ang. Glioblastoma* - GBM) jest bardzo agresywnym guzem mózgu charakteryzującym się zwiększoną proliferacją i odpornością na chemioterapię i radioterapię. Ostatnio coraz więcej dowodów sugeruje, że komórki inicjujące glejaka (*ang. glioma-initiating cells* - GIC) są odpowiedzialne za powstawanie i nawrót GBM. Czynniki decydujące o zróżnicowanym rozwoju GIC pozostają jednak słabo zdefiniowane. Kurkumina, związek o niskiej toksyczności w normalnych komórkach, indukuje różnicowanie się patologicznie zmienionych GIC w prawidłowe *in vivo* i *in vitro* poprzez indukowanie autofagii. Co więcej, kurkumina hamuje również tworzenie się guzów po wszczepieniu wewnątrzczaszkowo GIC myszom. Wyniki sugerują, że autofagia odgrywa zasadniczą rolę w regulacji samoodnowy i różnicowania GIC i może być obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu glejaków [2]. Kurkumina wykazuje działanie antynowotworowe także poprzez wpływ na białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego. Między innymi zwiększa poziom inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDK), hamując cykl komórkowy i namnażanie komórek, zmniejsza poziom cykliny D1 i cykliny E, które także promują cykl komórkowy. Ma wpływ na białka zaangażowane w proces apoptozy. Zmniejsza poziom białka Bcl-2, kinazy Akt oraz kinazy mTOR. Zwiększa poziom białek zaangażowanych w śmierć

komórki – Bax, Bad i Bim oraz białka p53, zwanego „strażnikiem ludzkiego genomu” [3]. Powoduje spadek poziomu enzymu COX-2, metaloproteinaz – MMP 9 i MMP10 i zmniejsza poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Białka te mają istotne znaczenie w kontekście promowania nowotworzenia podczas niekontrolowanego wzrostu ich aktywności [4]. Kurkumina chroni neurony zapobiegając ekscytotoksyczności glutaminianu, prowadzącej do śmierci komórek nerwowych, poprzez zwiększenie poziomu neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego – BDNF. Niweluje uszkodzenia mózgu, towarzyszące chorobie Alzheimera, zapobiegając agregacji amyloidu- $\beta$  i powstawaniu jego złogów w mózgu, przenika przez barierę krew-mózg (BBB), dociera do neuronów i chroni je przed toksycznym działaniem  $\beta$ -amyloidu i białka Tau [5]. Zwiększa przeżywalność komórek nerwowych, hamując proces apoptozy [6] i korzystnie wpływa na neurogenezę [7]. Zwiększa zdolności poznawcze oraz neurogenezę również w starzejących się mózgach. Powoduje zmiany w ekspresji genów związanych z przekazywaniem neuronalnym w hipokampie i korze mózgowej, co może znacznie przyczynić się do poprawy funkcji kognitywnych (zarówno poznawczych jak i pamięciowych) [8]. Kurkumina hamuje działanie monoaminooksydaz (MAO-A i MAO-B), katalizujących rozkład neuroprzekazników monoaminowych takich jak serotonina, noradrenalina oraz dopamina. Inhibitory te to jedne z najpopularniejszych leków stosowanych w leczeniu depresji, kurkumina zwiększa ich stężenie w mózgu [9]. Działanie kurkuminy na układ sercowo-naczyniowy wpływa na poziom cholesterolu i szkodliwe utlenianie lipidów. Obniża poziom frakcji LDL, a podwyższa poziom frakcji HDL oraz zmniejsza poziom trójglicerydów. Jej antyoksydacyjne i przeciwzapalne działanie zapobiega miażdżycy [10]. Zapobiega szkodliwym skutkom niedotlenienia - reperfuzji, co ma znaczenie w przypadku wylewów krwi [11]. Zapobiega agregacji płytek krwi i obniża poziom fibrynogenu [12]. Pomimo tego, że kurkumina wspiera śmierć komórek nowotworowych, to jednak na pozostałe komórki działa kardio-, nefro- i hepatoprotekcyjnie. Dzieje się tak ze względu na redukcję stresu oksydacyjnego i zmniejszenie odpowiedzi zapalnej w organizmie. Kurkumina indukuje przemieszczenie się komórek i przyspiesza ich prawidłowego namnażanie oraz zwiększa syntezę kolagenu [13]. Kurkumina zapobiega zaburzeniom trawienia związanym z wymiotami, wzdęciami i odbijaniem [14], wykazuje działanie przeciwrzodowe oraz pobudza wydzielanie mucyny, powlekającej ścianę żołądka [15]. Korzystnie wpływa na pracę wątroby, działając żółciopędnie i żółciotwórczo. Działa hepatoprotekcyjnie w przypadku uszkodzeń, spowodowanych działaniem różnych czynników hepatotoksycznych, np. alkoholu, paracetamolu i alfatoksyn [16]. Reguluje glikemię i gospodarkę węglowodanową poprzez hamowanie procesu glukoneogenezy, czyli powstawania glukozy z niebiałkowych źródeł. Zmniejsza tym samym poziom wolnokrążącej glukozy we krwi [17]. Aktywuje kinazę AMPK, której działanie jest korzystne w kontekście promowania autofagii. Białko to aktywuje się w wyniku braku składników odżywczych. AMPK bierze udział w wielu procesach metabolicznych organizmu, w tym w regulacji metabolizmu glukozy, białek i tłuszczów, oraz jest uważane za jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za homeostazę energetyczną ustroju [18]. Kurkumina aktywuje także receptor PPAR- $\gamma$ , który jest czynnikiem transkrypcyjnym warunkującym prawidłowy metabolizm glukozy i lipidów, wrażliwość tkanek na insulinę, przebieg

procesów zapalnych, odpowiedź immunologiczną oraz podziały i różnicowanie komórek. Ma też ważne znaczenie w kontekście dobrego funkcjonowania i biogenezy mitochondriów [19].

**Wnioski:** Obecnie prowadzone badania wykazują działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne oraz przeciwnowotworowe kurkuminy ze względu na to, że oddziałuje ona na wiele związków, w tym na białka, enzymy, cytokiny, czynniki transkrypcyjne i czynniki wzrostu. Pomimo korzystnego oddziaływania na zdrowie badania nad tym związkiem oraz zastosowanie go jako leku są utrudnione przez to, że kurkumina stanowi tylko 2-5% kurkumy i cechuje się słabą przyswajalnością po podaniu doustnym.

### **Literatura:**

1. G. Kuttan, K.B. Kumar, C. Guruvayoorappan, R. Kuttan, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595 (2007) 173.
2. W. Zhuang, L. Long, B. Zheng, B. Ji, N. Yang, Q. Liang, *Cancer Sci.*, 103 (2012) 684.
3. R. Wilken, M.S. Veena, M.B. Wang, E.S. Srivatsan, *Mol. Cancer.*, 7/10 (2011) 12.
4. Y. Takada, Y. Bhardwaj, A. Potdar, B.B. Aggarwal, Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*. 2004 Dec 9;23(57):9247-58.
5. S. Dong, Q. Zeng, E.S. Mitchell, *PLoS One.*, 7/2 (2011) 31.
6. S.Y. Park, D.S. Kim, *J. Nat. Prod.*, 65 (2002) 1227.
7. B.B. Aggarwal, K.B. Harikumar, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 41 (2009) 40.
8. S.K. Kulkarni, M.K. Bhutani, M. Bishnoi, *Psychopharmacology (Berl.)*, 201 (2008) 435.
9. G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, P.S. Srinivas, *Planta Med.*, 64 (1998) 353.
10. A.S. Strimpakos, R.A. Sharma, *Antioxid Re- dox Signal*, 10 (2008) 511.
11. S. Miriyala, M. Panchatcharam, P. Rengarajulu, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595 (2007) 359.
12. S. Rafatullah, M. Tariq, M.A. Al-Yahya, *J. Ethnopharmacol.*, 29 (1990) 25.
13. R.L. Thangapazham, A. Sharma, R.K. Maheshwari, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595 (2007) 343.
14. D.C. Kim, S.H. Kim, B.H. Choi, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (2005) 2220.
15. E.J. Park, C.H. Jeon, G. Ko, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52 (2000) 437.
16. L.Q. Su, Y.D. Wang, H.Y. Chi, *Saudi. J. Biol. Sci.*, 24/8 (2017) 1776.
17. T. Kim, J. Davis, A.J. Zhang, X. He, S.T. Mathews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388 (2009) 377.
18. A. Chen, J. Xu, *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 288/3 (2005) 47.
19. T. Kim, J. Davis, A.J. Zhang, X. He, S.T. Mathews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388 (2009) 377.

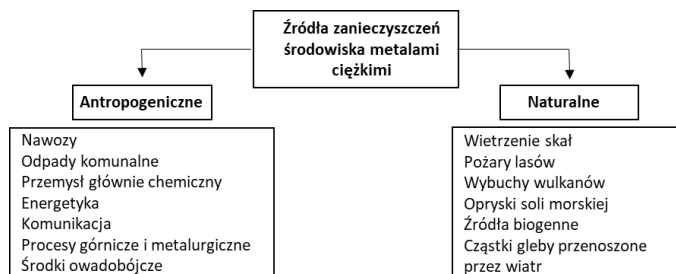
## METALE CIĘŻKIE W KOSMETYKACH KOLOROWYCH

A. WOŁOWICZ, A. ŚWISTOWSKA, UMCS, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 20-031 Lublin.

**Abstrakt:** Z biegiem czasu zapotrzebowanie na kosmetyki kolorowe znacząco wzrosło, co spowodowane jest głównie wzrostem świadomości konsumentów na temat poprawy wyglądu ciała. Globalny rynek kosmetyków kolorowych wykazuje średni wzrost o około 5% w skali roku. Dlatego też celem pracy było zwrócenie uwagi na metale ciężkie, które mogą być obecne w kosmetykach kolorowych ze szczególnym uwzględnieniem jonów ołowiu (Pb), rtęci (Hg), kadmu (Cd), arsenu (As) oraz niklu (Ni). Przedstawiono ich źródła, drogę przenikania do kosmetyków kolorowych oraz organizmu ludzkiego, a także objawy. Wskazano również maksymalną zawartość metali ciężkich w preparatach kosmetycznych, a także regulacje prawne obowiązujące w tym zakresie.

**Wprowadzenie:** Otaczający nas świat jest złożony głównie z pierwiastków chemicznych. Organizm ludzki również posiada je w swojej budowie, dzięki którym może prawidłowo funkcjonować. Wśród pierwiastków chemicznych wyróżniamy metale ciężkie, które są wszechobecne w środowisku z powodu rozwijającej się cywilizacji. Mogą występować w postaci wodorotlenków, tlenków, siarczków, siarczanów, fosforanów, krzemianów oraz związków organicznych. Badania naukowe wykazały, że metale ciężkie z łatwością ulegają gromadzeniu się w narządach ludzkich, a także wywołują wiele schorzeń powodując poważne choroby. Każdy z nas ma stały kontakt z toksycznymi pierwiastkami w codziennym życiu, dlatego tak istotna jest świadomość społeczeństwa dotycząca zakresu szkodliwości metali ciężkich, monitorowanie ich stężenia i migracji w środowisku oraz opracowywanie technologii ich usuwania.

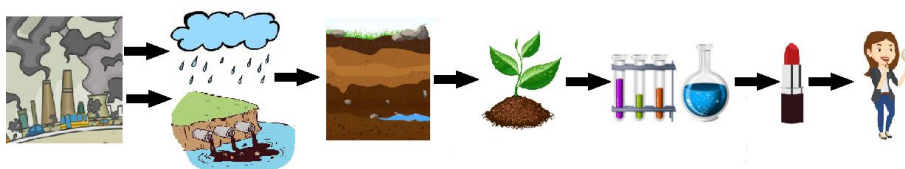
Metale ciężkie to pierwiastki o gęstości większej od  $4,5 \text{ g/cm}^3$ . Do najczęściej spotykanych metali ciężkich należą: arsen (As), bar (Ba), kadm (Cd), chrom (Cr), nikiel (Ni), ołów (Pb), rtęć (Hg), selen (Se) oraz srebro (Ag). Występują one naturalnie w środowisku np. w skałach, glebach, wodzie, organizmach zwierzętach oraz roślinach w śladowych ilościach [1]. Wzrost stężenia metali ciężkich w środowisku jest spowodowany zarówno przez procesy naturalne jak i działalność antropogeniczną człowieka (Rys. 1).



Rys. 1. Podział źródeł zanieczyszczeń środowiska metalami ciężkimi.



Nadmierna ilość metali ciężkich w organizmie oraz długotrwały z nimi kontakt w codziennej pracy stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Metale te mogą bowiem zaburzać procesy fizjologiczne i biochemiczne w organizmie człowieka, uszkadzać narządy oraz przyczyniać się do występowania chorób nowotworowych. Są one wykrywane w różnego rodzaju kosmetykach (kosmetykach kolorowych, produktach do pielęgnacji twarzy i ciała, kosmetykach do włosów, kosmetykach ziołowych itp.). Metale te pochodzą ze skażenia surowców i stosowania surowców niespełniających norm np. zanieczyszczonej wody, stosowania aparatury metalicznej, a także celowego ich wprowadzania np. jako filtry UV lub pigmenty, nieprzestrzegania przepisów przez drobnych producentów oraz braku ścisłych regulacji prawnych [2]. Na rysunku 2 przedstawiono drogę przenikania metali ciężkich do konsumentów kosmetyków kolorowych.



Rys. 2. Schemat dostawania się metali ciężkich do organizmu ludzkiego.

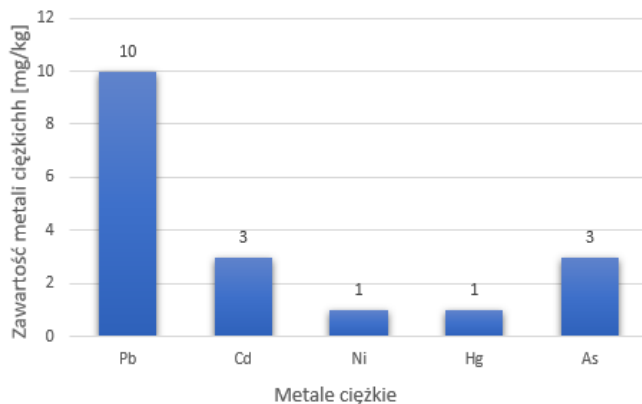
Związki metali ciężkich tj. ołów, kadm, nikiel, rtęć oraz arsen obecne są w kosmetykach kolorowych. W tabeli 1 opisano ich występowanie w kosmetykach kolorowych oraz negatywnie objawy wpływające na stan zdrowia ludzi [3,4].

Tabela 1. Najczęściej występujące metale ciężkie w kosmetykach kolorowych oraz ich negatywne objawy.

Metale ciężkie	Kosmetyki kolorowe	Objawy
Pb	szminka, podkład, kredka do oczu, eyelinery, tusz do rzęs, cienie do powiek	zatrucia przewlekłe i ostre, encefalopatia, uszkodzenie erytrocytów, anemia, nowotwory, demielinizacja-uszkodzenie układu nerwowego, bezpłodność, wzrost ciśnienia tętniczego
Cd	róż do policzków, tusz do rzęs, balsamy do ust, pudry	podrażnienia żołądka, biegunki, wymioty, kruchość kości, uszkodzenie nerek, wątroby i jelit, niedokrwistość
Ni	henna, cienie z talku, pudry nawilżające, pomadki	nowotwory, astma, reakcje alergiczne, choroby układu oddechowego i serca
Hg	szminka, balsam do ust, lakiery do paznokci, henna, cienie do powiek	bezsenna, upośledzenie koncentracji, uszkodzenie dróg oddechowych, utrata pamięci, bezsenna, drgawki, polineuropatia, uszkodzenie nerek
As	puder, róż do policzków, tusz do rzęs, błyszczki, cienie do powiek	nowotwory, zmiany skórne, podrażnienia, stany zapalne przewodu pokarmowego, uszkodzenie serca, łamliwość paznokci, niedokrwistość

Zaostrzenia praw w zakresie toksycznych substancji chemicznych w produktach kosmetycznych oraz zakaz stosowania metali ciężkich w składzie kosmetyków kolorowych nie zawsze jest respektowany. Mimo licznych kontroli i zarządzania produkcją według GMP (Good Manufacturing Practice) metale ciężkie wciąż są spotykane w preparatach kosmetycznych. W przypadku potwierdzenia obecności

zbyt dużej ilości metali ciężkich w kosmetykach zagrażającej życiu człowieka, produkt zostaje zgłoszony do europejskiego systemu Safety Gate [5]. Na rysunku 3 przedstawiono maksymalną dopuszczalną zawartość metali ciężkich w kosmetykach kolorowych [4], a w tabeli 2 przykładową ich zawartość w kosmetykach kolorowych [2].



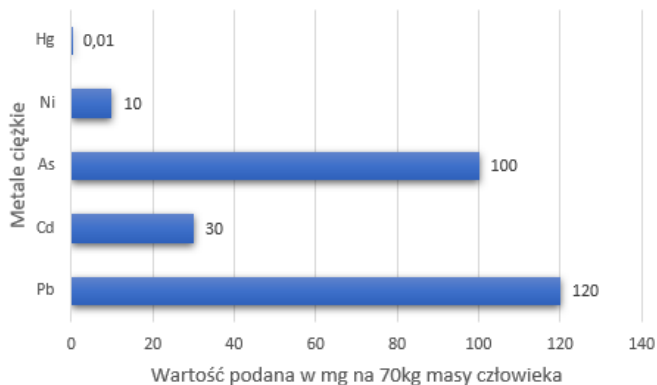
**Rys. 3.** Dopuszczalna zawartość metali ciężkich w kosmetykach kolorowych.

**Tabela 2.** Ilość pierwiastków toksycznych w kosmetykach kolorowych (mg/kg).

Kosmetyki kolorowe	Pb	Cd	As	Ni	Hg
Cienie do powiek	0-202,06	0-55,59	0-11,1	0,02-359,44	0-0,74
Kredki do oczu	0,31-213,6	0,3-3,05	-	0,69-21,5	-
Eyelinery	0-14	0-1,5	-	5,07-46,8	0-0,01
Pomadki	0-3,76	0-60,2	-	0-22,8	0-0,01
Podkłady	0-61,86	0,18-29,05	-	0,72-214,54	-
Róże do policzków	0,2-31,7	0,1-0,3	-	4,1-13,1	-
Lakiery do paznokci	0,2-6,03	0,01-1,68	-	1,89	0-0,19

Według ustawy z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach zakazuje się wprowadzania substancji niedozwolonych np. metali ciężkich do stosowania ich w wyrobach kosmetycznych [6]. Jednakże badania poświęcone składowi kosmetyków kolorowych wykazały obecność metali ciężkich, które występują w nich zarówno jako składniki lub zanieczyszczenia. Tabela 2 potwierdza przekroczony limit maksymalnej zawartości metali ciężkich np. w lakierach do paznokci, przekroczona jest ilość niklu o 0,89 mg/kg oraz w różach do policzków może występować aż 31,7 mg/kg ołowiu, co z pewnością nie jest tylko przyczyną zanieczyszczeń spowodowanych przez urządzenia metaliczne, stosowanie surowców do produkcji kosmetyków kolorowych, ale również celowe ich wykorzystywanie, aby np. przedłużyć termin ich przydatności. Stwierdzono także obecność ołowiu w pastach do zębów, którego stężenie przekraczało limity norm amerykańskich i unijnych czy obecność ołowiu i niklu w pomadkach i pudrach na poziomie ograniczonym wytycznymi europejskimi na rynku polskim [7]. Na rysunku 4 przedstawiono

zawartość toksycznych pierwiastków – rtęci, niklu, arsenu, kadmu oraz ołowiu, które znajdują się w organizmie przeciętnego człowieka, wynikające z braku przestrzegania praw w zakresie regulacji szkodliwych metali ciężkich przez producentów wyrobów kosmetycznych [8].



Rys. 4. Zawartość metali ciężkich w organizmie przeciętnego człowieka o masie 70 kg.

**Wnioski:** Na podstawie danych zawartych w literaturze wynika, iż społeczeństwo jest ciągle narażone na kontakt z toksycznymi pierwiastkami chemicznymi. Usunięcie metali ciężkich z produktów do pielęgnacji ciała po ich wyprodukowaniu nie jest możliwe, jednak staranny dobór surowca, mając na uwadze zawartość metali ciężkich, może znacząco wpłynąć i poprawić jakość kosmetyków kolorowych oraz ocalić piękno środowiska. Konsumenci powinni mieć większą świadomość składu kosmetyków kolorowych, powinni czytać etykiety i przestrzegać zasad bezpiecznego stosowania preparatów, żeby jak najbardziej ograniczyć przenikanie metali ciężkich do organizmu ludzkiego.

#### Literatura:

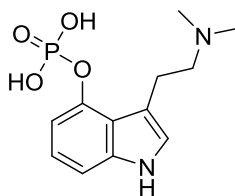
1. S. Martin, W. Griswold, Human Health Effects of Heavy Metals, (2009) 1.
2. S. Borowska, M.M. Brzóska, Journal of Applied Toxicology, 35 (2015) 551.
3. A. Kołodziejczyk, Substancje groźne, niebezpieczne i pożyteczne, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2019.
4. H. Ullah, S. Noreen, Fozia, A. Rehman, A. Waseem, S. Zubair, M. Adnan, I. Ahmad, Arabian Journal of Chemistry, Pakistan, 10 (2017) 10.
5. A. Moniczewski, M. Starek, A. Rutkowska, Toksykologiczne aspekty zanieczyszczeń metalicznych w kosmetykach, (2016) 81.
6. H. Gertig, Regulacje prawne w kosmetyce, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2007.
7. A.K. Mohiuddin, American J. Biomedical Sci. & Res., 4 (2019) 332.
8. P. Koziej, Świat Przemysłu Kosmetycznego, 2 (2014) 54.

## PSYCHODELIKI JAKO PRZYSZŁOŚĆ FARMAKOTERAPII W LECZENIU ZABURZEŃ PSYCHICZNYCH

A. GRUDZIŃSKA, A. PAWLAK, T. WRÓBEL, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownią Modelowania Komputerowego, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin.

**Abstrakt:** Psychodeliki są substancjami psychoaktywnymi, znanymi od wieków, głównie za sprawą ludów plemiennych, gdzie stosowane są w praktykach religijnych. Szczyt popularności psychodelików przypada na lata 60. XX w, kiedy to stosowane rekreacyjnie, stały się nieodłącznym elementem kultury hipisowskiej. Jednocześnie, w USA przeprowadzano nad nimi badania w kierunku właściwości farmakologicznych. Mimo, iż wyniki badań były bardzo obiecujące, zostały one zawieszono, w myśl walki z narkomanią. W latach 90. po złagodzeniu obustrzeń powrócono do badań, a substancje psychodeliczne przeżyły prawdziwy renesans w świecie nauki. Pojawiły się nowe doniesienia o potencjalnej skuteczności psychodelików w leczeniu zaburzeń depresyjnych i lękowych. Niniejsza praca stanowi przegląd najnowszych badań naukowych, dotyczących potencjału farmakologicznego psychodelików i ich wpływu na przyszłość farmakoterapii zaburzeń psychicznych.

**Wprowadzenie:** Do psychodelików należą m.in takie substancje jak LSD, psylocybina, meskalina. Badania nad nimi mogą mieć ogromny wpływ na przyszłość farmakoterapii zaburzeń psychicznych, ale również na rozwój neuronauki w badaniu funkcji mózgu i ludzkiej świadomości. Już w latach 50. Humphry Osmond, angielski psychiatra, próbował leczyć alkoholizm, za pomocą LSD, otrzymując zadowalające wyniki [1]. Obecnie, największe nadzieje skupiają się na psylocybinie – substancji psychodelicznej pochodzenia naturalnego o budowie tryptaminowej (Rys.1).



Rys.1. Wzór chemiczny psylocybiny.

Występuje ona w grzybach psylocybinowych m.in. w *Psilocybe cubensis* i *Psilocybe semilacetae*. W latach 60. została pierwszy raz wyizolowana i opisana przez Alberta Hoffmanna [2]. W 2016 roku zespół badawczy R. Carthart'a Harris'a przeprowadził pierwsze badania kliniczne z użyciem psylocybiny jako środka przeciwdepresyjnego. Badanie przyniosło pozytywne rezultaty [3]. Najnowsze badania pokazały, że psychodeliki mają działanie hamujące aktywność mózgu

w obszarach sieci układu spoczynkowego, której aktywność jest wyższa u osób dotkniętych zaburzeniami psychicznymi takimi jak depresja, schizofrenia, autyzm czy Alzheimer [4,5].

**Część eksperymentalna:** Praca stanowi przegląd najnowszych wyników badań, dotyczących wpływu psychodelików na strukturę mózgu oraz wynikających z tego farmakologicznych korzyści. W niniejszej pracy skupiono się w szczególności na doniesieniach naukowych, dotyczących psylocyliny, która jest obecnie najbardziej obiecującą substancją w leczeniu lekoopornej depresji, uzależnień a także stanów lękowych u pacjentów onkologicznych. Jako źródło publikacji naukowych wykorzystano ogólnodostępną bazę danych Pubmed. Autorzy skupili się głównie na analizie wyników badań nad psylocybiną, opublikowanych w ostatnich 5 latach.

**Wyniki:** Depresja jest narastającym problemem we współczesnym świecie. Obecnie ok 264 milionów ludzi cierpi na depresję, a 800 tys. ludzi umiera z powodu samobójstw. Każdego roku liczby te są coraz większe. Farmakologiczne leczenie chorób psychicznych skupione jest głównie na działaniu objawowym, często ma ograniczoną efektywność i wiąże się z licznymi działaniami niepożądanymi [6]. Rozwój badań nad psychodelikami daje szansę na nowatorskie podejście do leczenia zaburzeń. Skupia się ono na poszukiwaniu źródeł zmian neuronalnych, prowadzących do choroby i sposobach ich leczenia za pomocą substancji psychoaktywnych. Spożycie psychodelików wywołuje trudne do opisu doświadczenia, które mają ogromny wpływ na późniejszy stan psychiczny. To jest obszar, który wymaga jeszcze wielu lat badań, ale otwiera furtkę do zgłębienia funkcjonowania ludzkiego mózgu. Farmakologia psylocyliny i innych psychodelików nie jest jeszcze dobrze poznana. Wiemy, że psylocylina jest prolekiem dla psylocyny, która ma zdolność pokonania bariery krew-mózg i oddziałuje na receptory. Szczególnie silne powinowactwo ma do receptorów serotoninowych: 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 6-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>. Za właściwości psychoaktywne prawdopodobnie odpowiada działanie agonistyczne psylocyny na receptory 5-HT<sub>2A</sub>. Skutki spożycia psylocyliny są zależne od dawki. Przy większych dawkach obserwuje się efekty słuchowe, wizualne, halucynacje, zniekształcenia poznawcze i multisensoryczne. Okazuje się, że takie przeżycia mają potencjał wyciągania ludzi z uzależnień, depresji i innych zaburzeń psychicznych [7]. Co więcej, nie odnotowano właściwości toksycznych psychodelików dla ludzkiego organizmu. Charakteryzują się również niskim potencjałem uzależniającym (Rys. 2.) [5]. W 2016 roku ukazały się obiecujące wyniki badań nad psylocybiną prowadzonych przez zespół R. Carthart'a Harris'a. Zbadano wówczas właściwości przeciwdepresyjne psylocyliny. W badaniu wzięło udział 12 ochotników, dotkniętych lekooporną depresją. Po otrzymaniu dawki 25 mg, stwierdzono znaczną poprawę stanu zdrowia i utrzymanie się efektu przeciwdepresyjnego od 3 tygodni do nawet 6 miesięcy po otrzymanej dawce [3]. W 2019 roku agencja FDA (Food and Drug Administration) zatwierdziła psylocybinę jako terapię przełomową dla MDD (Major Depressive Disorder),

w odpowiedzi na medyczne zapotrzebowanie i korzystniejszy potencjał farmakologiczny w stosunku do obecnie stosowanej farmakoterapii [8]. W 2020 roku ukazały się wyniki badań pod autorstwem Alana K. Davis'a. Było to randomizowane badanie kliniczne potwierdzające pozytywne efekty psylocybiny, w terapii lekoopornej depresji. Wzięło w nim udział 24 ochotników ze zdiagnozowaną ciężką depresją. Badanie wykazało, że terapia psylocybiną wywołuje szybkie i trwałe efekty przeciwdepresyjne [9]. Obecnie, w Stanach Zjednoczonych, w instytucie Usona, trwają badania kliniczne 2 fazy, w których bierze 80 uczestników.



Rys. 2. Wykres przedstawiający szkodliwość używek i narkotyków według badań David'a Nutt'a [10].

**Wnioski:** Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają potencjał leczniczy psylocybiny. Można się spodziewać, że w przyszłości substancja ta otworzy furtkę do intensywniejszych badań nad psychodelikami, co może być prawdziwym przełomem w farmakoterapii zaburzeń psychicznych. Co więcej, substancje psychodeliczne mogą również posłużyć jako narzędzie do poznania ludzkiego umysłu. Już w latach 50. XX w. podkreślał to Stanislaw Grof – amerykański psycholog i pionier w badaniach na psychodelikami. Obecny rozwój badań nad psychodelikami przyczynia się do odejścia od kontrowersyjnego postrzegania substancji psychoaktywnych, na rzecz wydobycia z nich pozytywnych korzyści naukowych. Wiele mechanizmów zachodzących w ludzkim mózgu jest jeszcze niezbadanych i niezrozumiałych. Psychodeliki, ze względu na swoje specyficzne działanie, mają szansę rzucić nowe światło w kierunku rozwoju neuropsychologii i farmakologii zaburzeń psychicznych.

**Literatura:**

1. J.H. Tanne, H. Osmond, 328 (2004) 713.
2. A. Hofmann; LSD. Moje trudne dziecko (2016).
3. R.L. Carhart-Harris, M. Bolstridge, J. Rucker, C.M.J. Day, D. Erritzoe, M. Kaelen, M. Bloomfield, J.A. Rickard, B. Forbes, A. Feilding, *Lancet Psychiatry*, 3 (2016) 619.
4. D. Nutt, *Clin Neurosci.*, 21 (2019) 139.
5. R.B. Kargbo, *ACS Med. Chem. Lett.*, 11 (2020) 399.
6. S.P. Chand, H. Arif, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), (2020).
7. H.A. Geiger, M.G. Wurst, R.N. Daniels, *ACS Chem. Neurosci.*, 9 (2018) 2438.
8. M. Brooks, medscape.com (2019).
9. A.K. Davis, F.S. Barrett, D.G. May, M.P. Cosimano, N.D. Sepeda, M.W. Johnson, P.H. Finan, R.R. Griffiths, *JAMA Psychiatry* (2020).
10. D.J. Nutt, L.A. King, L.D. Phillips, *Lancet*, 376 (2010) 1558.

## **NEUROLEPTYKI ATYPOWE W LECZENIU SCHIZOFRENII – PRZEGLĄD LITERATURY**

**A. PAWLAK<sup>1</sup>, A. GRUDZIŃSKA<sup>1</sup>, A.A. KACZOR<sup>1,2</sup>**, <sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownią Modelowania Komputerowego, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin <sup>2</sup>Szkoła Farmacji, Uniwersytet Wschodniej Finlandii Yliopistonranta 1, P.O. Box 1627, FI-70211 Kuopio, Finlandia.

**Abstrakt:** Schizofrenia to jedno z najpoważniejszych i wyniszczających zaburzeń psychicznych, stanowiących duże obciążenie społeczno-ekonomiczne wśród pacjentów, ich opiekunów i całego społeczeństwa. Pacjenci, u których choroba pojawiła się we wczesnym okresie życia, zazwyczaj borykają się z cięższymi objawami negatywnymi, impulsywnością, zaburzeniami poznawczymi, słabym funkcjonowaniem społecznym oraz częstymi hospitalizacjami. Chorobie tej towarzyszą: zwiększona śmiertelność, współistniejące choroby fizyczne oraz wyraźne objawy psychiatryczne. Podstawą postępowania farmakologicznego w terapii tej choroby jest stosowanie leków przeciwpsychotycznych. Szczególną uwagę w kontekście leczenia schizofrenii przykuwają leki atypowe, które zaleca się stosować jako leki pierwszego rzutu ze względu na wysoką skuteczność, a także mniejszą ilość działań niepożądanych w porównaniu z przeciwpsychotycznymi lekami pierwszej generacji. Niniejsza praca stanowi przegląd doniesień dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa stosowania neuroleptyków atypowych w terapii schizofrenii.

**Wprowadzenie:** Schizofrenia to przewlekła i niezwykle ciężka choroba psychiczna dotykająca blisko 1% populacji na świecie. Symptomy choroby pojawiają się zazwyczaj u ludzi osiągających wczesną dorosłość oraz w okresie dojrzewania. Zdaniem wielu badaczy, objawy choroby są wynikiem zaburzeń neurotransmisji w układzie dopaminergicznym, serotonergicznym, glutaminergicznym oraz adrenergicznym [1,2]. Objawy choroby dzieli się na trzy grupy. Do jednej z nich należą objawy pozytywne w skład których wchodzi: urojenia, zdezorganizowane myśli, mowa i zachowanie oraz omamy. Kolejną grupę stanowią objawy negatywne do których należą: alergia, apatia, spłaszczenie afektywne i wycofanie społeczne. Na trzecią grupę objawów składają się deficyty poznawcze, wśród których wyróżnia się problemy z uwagą i pamięcią, a także słabe funkcjonowanie wykonawcze [3]. Do leczenia schizofrenii stosuje się leki przeciwpsychotyczne, wśród których wyróżnia się leki typowe (pierwszej generacji) i leki atypowe (drugiej i trzeciej generacji). Wśród leków należących do drugiej generacji wymienia się między innymi: klozapinę, olanzapinę, kwetiapinę, risperidon, zyprazydon, paliperidon, asenapinę, lurasidon i amisulpiryd [4]. Ich mechanizm działania opiera się na antagonistycznym wpływie na receptory serotoninowe 5-HT<sub>2</sub> i w mniejszym stopniu na receptory D<sub>2</sub> [5]. Natomiast za leki trzeciej generacji uznaje się aripiprazol, breksipiprazol i kwetiapinę. Są one stroniczowymi lub częściowymi agonistami receptorów D<sub>2</sub>. Leki przeciwpsychotyczne podawane są doustnie lub domięśniowo. W przypadku podania domięśniowego są to formy o przedłużonym działaniu, które poprawiają przestrzeganie przez pacjentów zaleceń lekarskich [4].

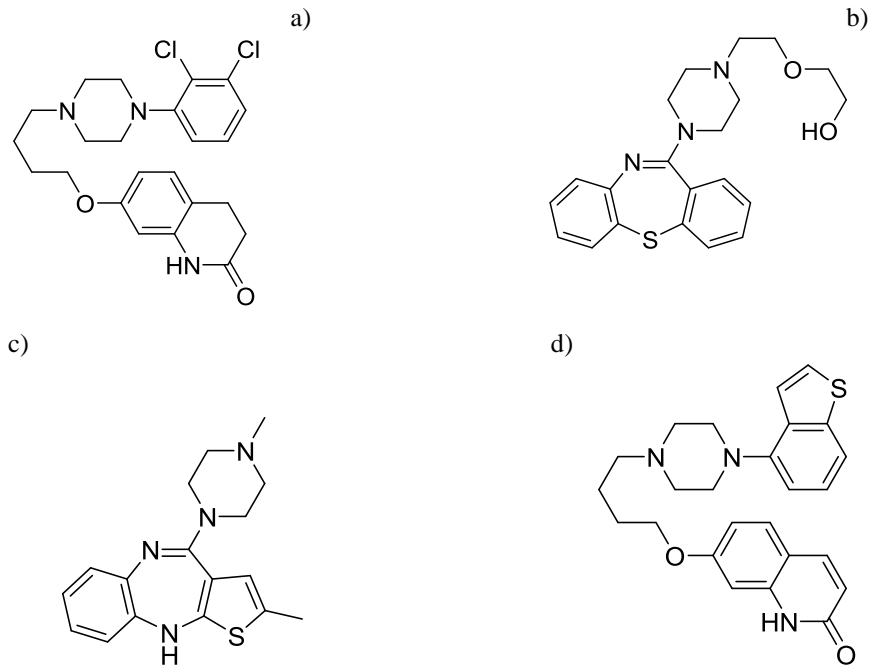


Leki atypowe są dobrym przykładem terapii wielocelowych, a stosowanie pojedynczego leku zmniejsza ryzyko interakcji i nieprawidłowego dawkowania. Oprócz korzystnego wpływu na objawy pozytywne choroby, wywierają wpływ także na leczenie objawów negatywnych, zaburzeń poznawczych, a także wiążą się z poprawą wyników funkcjonalnych [2]. W przeciwieństwie do leków typowych, neuroleptyki atypowe wykazują wyższy profil bezpieczeństwa w kontekście późnych dyskinez oraz objawów pozapiramidowych [3]. Neuroleptyki atypowe wykazują zróżnicowane profile tolerancji, obejmujące między innymi: zaburzenia lipidowe, podwyższenie poziomu prolaktyny, przyrost masy ciała, sedację lub zaburzenia stężenia glukozy. Przy wyborze leku dla konkretnego pacjenta, zaleca się dokładne rozważenie profilu tolerancji. Z zebranych informacji wynika, że w przypadku młodzieży występuje zwiększona podatność na problemy metaboliczne. Wiąże się z tym długotrwałe ryzyko hiperlipidemii oraz cukrzycy. Dlatego w tej populacji zalecane jest monitorowanie metabolizmu oraz masy ciała w trakcie stosowania neuroleptyków [6].

**Część eksperymentalna:** Praca opiera się na przeglądzie aktualnych informacji naukowych, podsumowuje stan wiedzy w kontekście skuteczności i bezpieczeństwa stosowania atypowych leków przeciwpsychotycznych w leczeniu schizofrenii. Do odnalezienia literatury odnoszącej się do tematu pracy, wykorzystano opracowanie naukowe oraz materiały z ogólnodostępnej bazy danych PubMed, używając do wyszukiwania następujących słów kluczowych: „schizophrenia”, „atypical”, „neuroleptics”. Autorzy skupili się na analizie opublikowanych od 2012 roku informacji na temat neuroleptyków drugiej i trzeciej generacji używanych w terapii schizofrenii.

**Wyniki:** Przeanalizowano badania naukowe dotyczące skuteczności i bezpieczeństwa stosowania neuroleptyków atypowych w schizofrenii (Rys.1.). Frampton J.E. w przeglądzie prac dotyczących domięśniowego podania aripiprazolu lauroxililu w schizofrenii zauważył między innymi, że terapia zapewniła osiągnięcie znacznego złagodzenia objawów dolegliwości. Ponadto wśród pacjentów zaobserwowano poprawę skali zespołu pozytywnego i negatywnego (PANSS, Positive and Negative Syndrome Scale). U kilku osób odnotowano pojawienie się skutków ubocznych, tj. akatyzyja, bezsenność, niepokój, ból głowy, reakcja w miejscu wstrzyknięcia oraz wzrost masy ciała. Na ogół lek był dobrze tolerowany, a większość działań niepożądanych związanych z zastosowaną terapią miała charakter łagodny lub umiarkowany [7]. Badacze z Anglii w przeglądzie prac dotyczących doustnie podawanego brekspiprazolu zaobserwowali, że skala pozytywnego i negatywnego zespołu uległa poprawie po zastosowanej terapii. Wskaźnik ciężkości choroby oraz ogólna poprawa wrażeń klinicznych również dowiodły skuteczności brekspiprazolu. Terapia wiązała się z wystąpieniem umiarkowanych skutków ubocznych, tj. wzrost masy ciała, nudności, akatyzyja, suchość w ustach i senność [8]. W innym przeglądzie prac zauważono, że doustne podawanie lurazydonu, aripiprazolu, olanzapiny, kwetiapiny, zyprazydonu, asenapiny, risperydonu, paliperydonu o przedłużonym uwalnianiu i klozapiny w porównaniu z placebo wykazało poprawę wyniku PANSS (z wyjątkiem zyprazydonu) oraz wskaźnika ciężkości choroby (oprócz kwetiapiny). Nie

odnotowano znaczących różnic wśród atypowych leków w kontekście pojawiania się akatyzji lub objawów pozapiramidowych. Lurazydon wykazał mniejsze ryzyko przerwania terapii i niższy odsetek pacjentów, u których odnotowano przyrost masy ciała w porównaniu z innymi lekami zastosowanymi w badaniu [6]. Polscy badacze dokonali przeglądu artykułów naukowych dotyczących domięśniowego stosowania palmitynianu paliperidonu w leczeniu schizofrenii. Na podstawie przeanalizowanych badań klinicznych wyciągnęli wnioski dotyczące skuteczności i bezpieczeństwa stosowania wyżej wymienionego farmaceutyku. Zauważono tendencję do wydłużenia okresu poprawy oraz zmniejszenia nasilenia objawów choroby. Ponadto paliperidon wykazał dobrą tolerancję wśród pacjentów i brak szczególnych różnic w częstotliwości i nasileniu skutków ubocznych w porównaniu z placebo [9]. W oryginalnym badaniu przeprowadzonym przez Fernandes T.P. i in. udowodniono, że neuroleptyki atypowe mają wpływ na widzenie oraz procesy poznawcze, a w przypadku pacjentów stosujących terapię tymi lekami wykazano lepsze wyniki w porównaniu z osobami leczonymi za pomocą neuroleptyków typowych [10]. Badacze z USA na podstawie analizy prac badawczych zaobserwowali, że podawany doustnie lurazydon jest skutecznym lekiem w terapii schizofrenii. Ponadto nie powoduje działania przeciwmuskarynowego, antyhistaminowego H<sub>1</sub>, ani nie wykazał znaczącego antagonizmu receptorów 5-HT<sub>2c</sub>. Jako skutki uboczne tego leku związane z dawką wymienia się: akatyzję, wzrost stężenia prolaktyny, uspokojenie polekowe i senność. Należy je zniwelować poprzez dostosowanie odpowiedniej dawki leku [11].



Rys. 1. Przykładowe neuroleptyki atypowe – a) aripiprazol, b) kwetiapina, c) olanzapina, d) breksipirazol

**Wnioski:** Na podstawie wyników badań okazuje się, że istnieje wysoka skuteczność i bezpieczeństwo stosowania neuroleptyków atypowych w leczeniu schizofrenii. Ocena skuteczności była podobna we wszystkich omówionych pracach, natomiast bezpieczeństwo stosowania poszczególnych leków atypowych różniło się między sobą. W zawiązku z tym istnieje zapotrzebowanie na odkrywanie coraz nowszych neuroleptyków atypowych, mogących zapewnić jeszcze większą kontrolę objawów choroby i wyższy poziom tolerancji. Wszystkie zebrane informacje w tej pracy potwierdzają, że terapia przeprowadzona przy pomocy wyżej wymienionych leków, ma szansę doprowadzić do uzyskania lepszych wyników badań i tym samym podniesienia jakości życia u pacjentów cierpiących na schizofrenię.

**Literatura:**

1. M. Kondej, P. Stępnicki, A.A. Kaczor, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018) 3105.
2. A.A. Kaczor, K.M. Targowska-Duda, A.G. Silva, M. Kondej, G. Biała, M. Castro, *Biomolecules*, 10 (2020) 349.
3. J.E. Frampton, *Drugs*, 79 (2019) 189.
4. E.J. Park, S. Amatya, M.S. Kim, J.H. Park, E. Seol, H. Lee, Y.-H. Shin, D.H. Na, *Archives of Pharmacal Research*, 36 (2013) 651.
5. J. Jawień, P. Wolkow, R. Olszanecki, *Farmakologia*, PWZL, Warszawa, 2012.
6. C. Arango, D. Ng-Mak, E. Finn, A. Byrne, A. Loebel, *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*, 29 (2020) 1195.
7. J.E. Frampton, *Drugs*, 77 (2017) 2049.
8. A. Antoun Reyad, E. Girgis, R. Mishriky, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 35 (2020) 119.
9. M. Jarema, P. Bienkowski, J. Heitzman, T. Parnowski, J. Rybakowski, *Psychiatr. Pol.* 51(2017), 7-21.
10. T.P. Fernandes, A. Shaqiri, A. Brand, R.L. Nogueira, M.H. Herzog, M. Roinishvili, N.A. Santos, E. Chkonia, *Psychiatry Res.*, 275 (2019) 31.
11. W.M. Greenberg, L. Citrome, *Clin. Pharmacokinet.*, 56 (2017) 493.



ISBN 978-83-227-9503-3