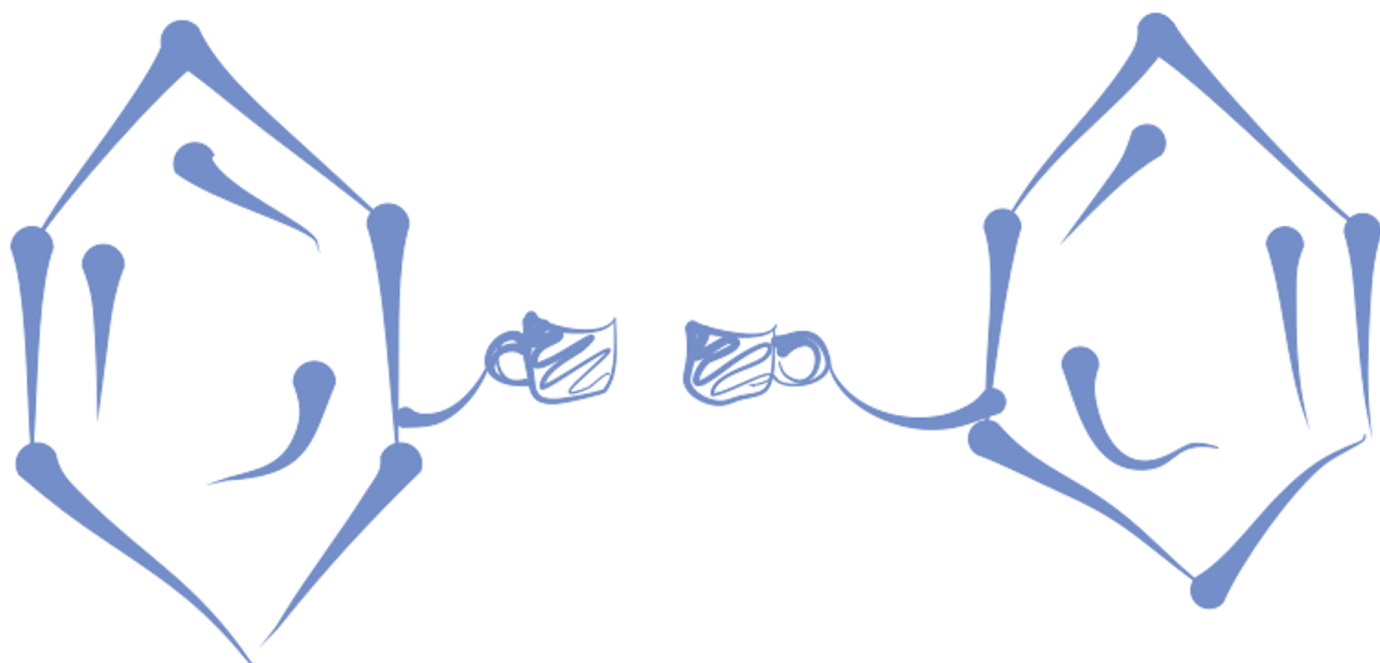




SEKCJA STUDENCKA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO



„KWADRANS DLA CHEMII” MONOGRAFIA

ZJAZD WIOSENNY
SEKCJI STUDENCKIEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

13-17.04.2016 r.
BIAŁOWIESKI PARK NARODOWY



OFICyna
EDUKACYJNA
KRZYSZTOF PAZDRO



**OFICyna
EDUKACYJNA**

KRZYSZTOF PAZDRO



www.pazdro.com.pl

„KWADRANS DLA CHEMII”

**MONOGRAFIA
ZJAZDU WIOSENNEGO
SEKCJI STUDENCKIEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

Białowieża, 13-17 kwietnia 2016

Recenzenci:

Prof. dr hab. Adam Bald (Uniwersytet Łódzki)
Prof. dr hab. Adam Lesner (Uniwersytet Gdański)
Prof. dr hab. Jacek Ulański (Politechnika Łódzka)
Prof. dr hab. inż. Adam Voelkel (Politechnika Poznańska)
Prof. dr hab. inż. Zygfryd Witkiewicz (Wojskowa Akademia Techniczna)
Dr hab. Łukasz Albrecht (Politechnika Łódzka)
Dr hab. inż. Jacek Grams (Politechnika Łódzka)
Dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk, prof. UG (Uniwersytet Gdański)
Dr hab. Piotr Polanowski (Politechnika Łódzka)
Dr hab. Robert Zakrzewski (Uniwersytet Łódzki)

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

© Copyright by Sekcja Studencka PTChem

ISBN 978-83-7594-144-9

Wydawca:

Oficyna Edukacyjna * Krzysztof Pazdro Sp. z o.o.

**Redakcja naukowa i skład:**

Tomasz Kostrzewa
mgr Piotr Stasiewicz

**Niniejsze artykuły zostały opublikowane na podstawie materiałów
nadesłanych przez uczestników Zjazdu Wiosennego SSPTChem 2016.
SSPTChem nie ponosi odpowiedzialności za ich treść.**

Komitety Organizacyjne

inż. Hanna Makowska
inż. Pola Cybulska
mgr inż. Paulina Filipczak
Gabriela Handzlik
mgr Marek Kłobucki
Tomasz Kostrzewa
Aleksander Promiński
mgr Justyna Stachniuk
mgr Piotr Stasiewicz

mgr inż. Anna Stefaniuk-Grams
dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

Doradca Sekcji Studenckiej PTChem
Opiekun Sekcji Studenckiej PTChem

Spis treści

Wstęp	5
Usztywnione konformacyjnie peptydy Tat jako modulatory aktywności proteasomu <i>Maciej Cieślak, Przemysław Karpowicz, Małgorzata Giżyńska, Elżbieta Jankowska</i>	7
Woltamperometryczne badanie leków przeciwretrowirusowych <i>Natalia Festinger, Sylwia Smarzewska, Witold Ciesielski</i>	16
Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon <i>Marcin Purchała, Justyna Jonik, Henryk Grajek</i>	27
Development of method for the determination of chlorophenols using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection <i>Marcin Purchała, Justyna Jonik, Henryk Grajek</i>	37
Konstrukcja i zasada działania wybranych organicznych ogniw fotowoltaicznych <i>Anna Stefaniuk-Grams, Jarosław Jung</i>	47
Zastosowanie grupy piwaloilowej w syntezie związków organicznych i bioorganicznych <i>Piotr Surynt, Karolina Bartosik, Grażyna Leszczyńska</i>	57
Indeks autorów	76

Wstęp

Jest nam niezmiernie miło, że do Państwa rąk trafiła pierwsza edycja monografii Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego wydana po Zjeździe Wiosennym SSPTChem, który odbył się dniach 13-17 kwietnia 2016 roku w Białowieży.

W Zjeździe wzięło udział 97 uczestników, z licznych ośrodków akademickich w Polsce, którzy wygłosili 38 komunikatów ustnych oraz przedstawili 55 posterów. Podczas Zjazdu odbyły się wykłady plenarne, na których uczestnicy konferencji mieli szansę wysłuchać ciekawych prelekcji wybitnych polskich uczonych. W trakcie konferencji odbyła się również wycieczka po Rezerwacie Ścisłym Białowieskiego Parku Krajobrazowego.

Po raz pierwszy uczestnicy zjazdu mieli możliwość opublikowania artykułów w monografii pokonferencyjnej. W niniejszej pozycji możemy znaleźć prace napisane na podstawie badań własnych, jak i typowe prace przeglądowe. Mamy nadzieję, że kolejny zjazd SSPTChem przyniesie wydanie kolejnej edycji monografii Sekcji Studenckiej PTChem.

Pragniemy podziękować Oficynie Edukacyjnej * Krzysztof Pazdro Sp. z o.o. za wydanie niniejszej pozycji. Liczymy na dalszą owocną współpracę z Państwa wydawnictwem.

Przyjemnej lektury życzy
Komitety Organizacyjny Zjazdu Wiosennego
Sekcji Studenckiej PTChem 2016

Usztywnione konformacyjnie peptydy Tat jako modulatory aktywności proteasomu

Conformationally constrained Tat peptides as modulators of the proteasome activity

**Maciej Cieślak¹, Przemysław Karpowicz¹,
Małgorzata Giżyńska¹, Elżbieta Jankowska¹**

¹Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Biomedycznej,
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
mac.cieslak@yahoo.com

Streszczenie

Proteasom odpowiada głównie za zachowanie homeostazy wewnątrzkomórkowej, regulując przebieg szeregu komórkowych procesów biochemicznych oraz usuwając z komórki uszkodzone białka. Jest on także zaangażowany w regulację cyklu komórkowego, transkrypcję i replikację DNA, a także w procesy powiązane z apoptozą. W komórce eukariotycznej znajduje się około 30 tys. cząsteczek proteasomu, które są obecne w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym. Odpowiadają one za degradację około 90% białek komórkowych.

Nieprawidłowe funkcjonowanie szlaku ubiquityno-proteasomalnego (UPS) przyczynia się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, nowotworów, a także chorób układu sercowo-naczyniowego, stąd też proteasom może być wykorzystany jako jeden z punktów docelowych w opracowaniu terapii powiązanych z tymi chorobami. Stworzenie innowacyjnego leku będącego czynnikiem naprawczym funkcji UPS jest wyzwaniem XXI wieku. W świetle najnowszych badań wiele nadziei wiązać można z małocząsteczkowymi, allosterycznymi modulatorami aktywności proteasomu. Jednym z nielicznych opisanych dotąd allosterycznych inhibitorów jest białko HIV-1 Tat, którego zaledwie 12-aminokwasowy fragment (zwany Tat2) także hamuje aktywność ludzkiego proteasomu 20S. Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy było sprawdzenie, czy modyfikacje wprowadzone do sekwencji bazowych Tat (cyklizacja, zastąpienie aminokwasów z szeregu L resztami D-aminokwasów, wprowadzenie znacznika fluorescencyjnego 5-FITC), wpłyną na zdolność peptydów do inhibicji aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu.

Abstract

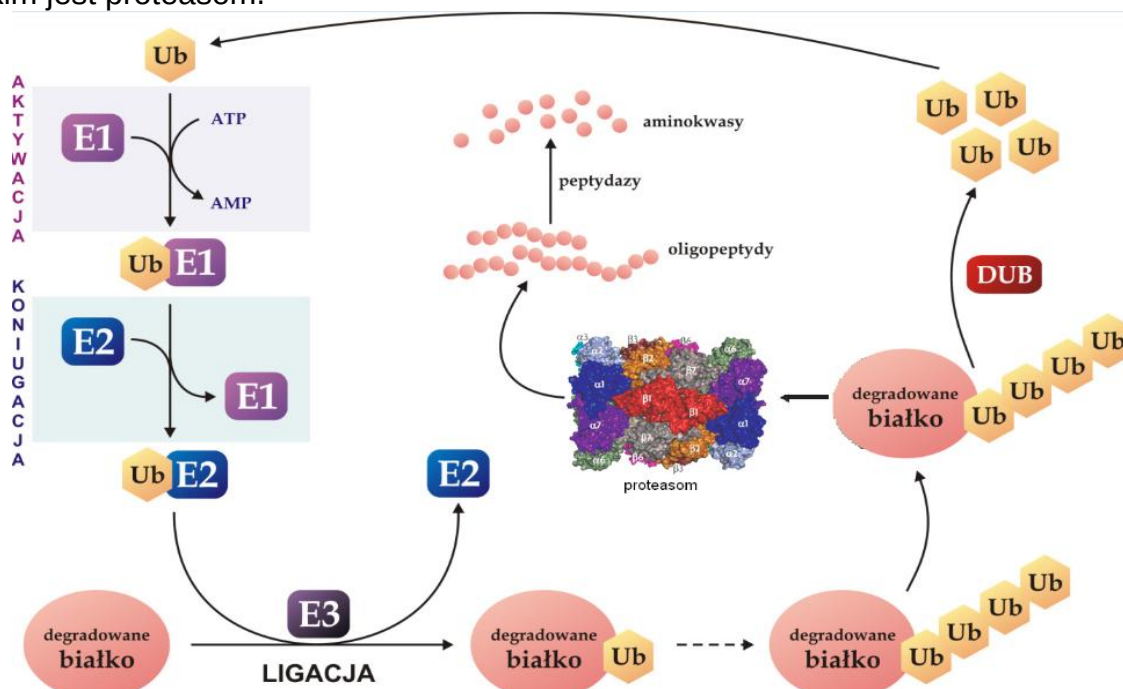
Proteasome is responsible mainly for the maintenance of homeostasis of intracellular processes and the removal of damaged proteins. Proteasome is also involved in a number of biochemical processes, such as cell cycle progression, transcription and replication of DNA, and apoptosis. In the eucaryotic cell, there are about 30,000 proteasome molecules that are present in the cytoplasm and nucleus. These proteasomes are responsible for degradation of more than 90% of cellular proteins.

Malfunction of the ubiquitin-proteasome pathway (UPS) contributes to the development of neurodegenerative diseases, cancer, and cardiovascular disease, thus the proteasome can be one of the targets in the therapies associated with these diseases. Development of an innovative drug, which will be involved in the repair process of the UPS system is a challenge of the XXI century. In the light of the latest research a lot of hope can be associated with small-molecule allosteric modulators of the proteasome activity. One of the few described so far allosteric inhibitors of the proteasome is HIV-1 Tat protein. Its 12-amino acid fragment (Tat2) has been also recognized as able to inhibit the activity of the human 20S proteasome. The aim of the research described in this paper was to determine whether modifications of the sequence of the Tat-based peptides (cyclization, substitution of L-amino acid residues

with their D enantiomers, incorporation of 5-FITC fluorescence label), will affect their ability to inhibit the proteasome chymotrypsin-like activity.

1. Wstęp

Degradacja białek jest niezbędnym elementem homeostazy wewnątrzkomórkowej i prawidłowego funkcjonowania komórki. Początkowo sądzono, iż za degradację enzymatyczną białek odpowiadają jedynie proteazy zawarte w lizosomach i endosomach, obecnie wiadomo już jednak, iż istnieje drugi szlak - ubikwityna-proteasom (UPS). UPS jest głównym szlakiem proteolitycznym nielizosomalnej degradacji białek komórkowych (rys. 1). Cząsteczki ubikwityny znakują białka przeznaczone do degradacji (tzw. „pocałunek śmierci”), które następnie są rozpoznawane i degradowane przez multienzymatyczny kompleks jakim jest proteasom.



Rys. 1 Mechanizm działania szlaku ubikwityno-proteasomalnego (UPS)¹.

W komórce eukariotycznej znajduje się około 30 tys. cząsteczek proteasomu, które są obecne w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym. Odpowiadają one za degradację około 90% białek komórkowych², a w związku z tym wpływają na przebieg wielu istotnych procesów, takich jak cykl komórkowy, transkrypcja i replikacja DNA czy apoptoza³. Dysfunkcja proteasomu może powodować poważne zaburzenia w komórkach, pobudzając zachodzenie procesów patologicznych prowadzących do rozwoju różnorodnych chorób, w tym chorób nowotworowych i neurodegeneracyjnych (Tab. 1).

¹ M. Maliński, M. Cichocki, Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów, *Post Hig Med Dosw*, **2013**, 67, 90-106.

² Bury M., Niemierko A. Proteasomalna degradacja białek komórkowych, *Post Biol Kom*, **2005**, 32, 435– 448.

³ G. Tan, T.A. Waldmann, Proteasome Inhibitor PS-341, a Potential Therapeutic Agent for Adult T-Cell Leukemia, *Cancer Res*, **2002**, 62, 1083.

Tab. 1 Choroby związane z UPS⁴.

Choroby	Defekty/objawy	Aktywność proteasomu
<u>Nowotwory</u> Nowotwór jelita grubego Szpiczak mnogi Rak nerki Rak szyjki macicy	Mutacja regulatora β -katenin, substratu UPS Zahamowanie apoptozy, indukcja proliferacji Zahamowanie apoptozy, indukcja proliferacji Przyspieszona degradacja p53 przez UPS	Aktywność $\uparrow$ Aktywność $\uparrow$, ekspresja $\downarrow$ Aktywność $\uparrow$, ekspresja $\downarrow$ Ekspresja $\downarrow$
<u>Choroby neurodegeneracyjne</u> Choroba Alzheimera Choroba Parkinsona Płásawica Huntingtona Stwardnienie zanikowe boczne Choroby prionowe	Złogi β -amyloidu/białka tau, utrata neuronów Ciała Lewy'ego, utrata neuronów Inkluzje poliglutaminy, utrata/dysfunkcja neuronów Agregacja SOD1 Mutacja białka prionowego	Aktywność $\downarrow$ Aktywność $\downarrow$ Aktywność $\downarrow$ Aktywność $\downarrow$ Aktywność $\downarrow$
<u>Infekcje wirusowe</u> Wirus zapalenia wątroby typu B	Hepatitis	Aktywność $\downarrow$
<u>Choroby autoimmunologiczne</u> Zespół Sjorgena	Zniszczenie tkanek	Ekspresja $\downarrow$
<u>Inne choroby</u> Mukowiscydoza Choroba Wilsona	Mutacja w CFTR, DF508 Mutacja w białku Wilsona	Aktywność $\uparrow$ Degradacja $\uparrow$

Proteasom poprzez degradację białek przyczynia się m.in. do kontroli liczebności i aktywności onkogenów i supresorów nowotworowych, ale także czynników transkrypcyjnych, czy też cząsteczek sygnałowych⁵. Ponieważ komórki nowotworowe mają znacznie wyższy poziom aktywności proteasomu, zahamowanie jego aktywności skutkuje szybszą apoptozą komórek nowotworowych niż zdrowych⁶. Ta większa wrażliwość powoduje, iż proteasom jest obiecującym i wykorzystywanym już celem w leczeniu chorób nowotworowych⁷. Wykazano, iż inhibicja układu UPS blokuje progresję cyklu komórkowego⁸, prowadzi do zahamowania wzrostu komórek

⁴ Paul S., Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches, *BioEssays*, **2008**, 30, 1172-1184.

⁵ Coux O., et al., Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem*, **1996**, 65, 801-847.

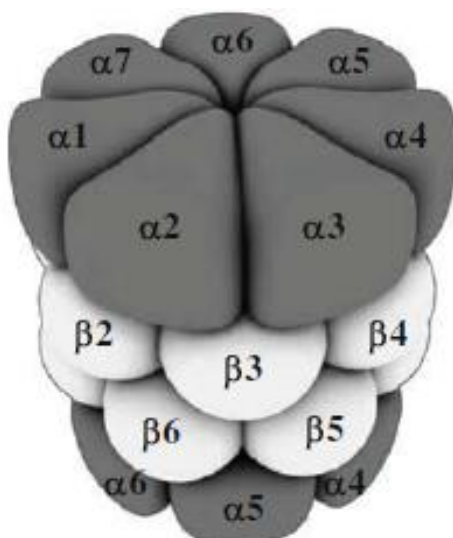
⁶ Shimbara N., et al., Regulation of gene expression of proteasomes (multi-protease complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells, *J Biol Chem*, **1992**, 267, 18100-18109.

⁷ Adams, J., et al., Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res*, **1999**, 59, 2615-2622.

⁸ Shah S.A., et al., 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer, *J Cell Biochem*, **2001**, 82, 110-122.

oraz indukuje apoptozę, a tym samym umożliwia zatrzymanie rozwoju nowotworów takich jak: szpiczak mnogi⁹, leukemia¹⁰, rak trzustki¹¹ czy rak płuc¹².

Większość chorób neurodegeneracyjnych jest związana z agregacją białek, na przykład tworzenie neurofibrilarnych splotów ma związek z rozwojem choroby Alzheimera, a ciał Lewy'ego - choroby Parkinsona. Agregaty białek mają różne pochodzenie i skład, jednak ich cechą wspólną jest obecność ubikwityny oraz podjednostek proteasomu. Cechą wspólną chorób neurodegeneracyjnych jest wystąpienie niezdolności do degradacji ubikwitynowanych protein, co prowadzi do uszkodzenia i śmierci neuronów¹³.



Rys. 2 Struktura proteasomu 20S ¹⁴.

Proteasom 20S jest wieloenzymatycznym kompleksem białkowym zbudowanym z 28 podjednostek, o łącznej masie 720 kDa (rys. 2). Enzym w swej budowie przypomina wąską tubę, utworzoną z czterech pierścieni - dwóch pierścieni alfa oraz dwóch beta, zgodnie ze schematem $\alpha\beta\beta\alpha$ ¹⁵. Każdy pierścień składa się z siedmiu podjednostek, które są strukturalnie do siebie podobne. Zewnętrzne pierścienie α nie wykazują aktywności proteolitycznej. N-końce podjednostek α tworzą natomiast bramę regulującą dostęp do ukrytych wewnątrz kanału katalitycznego miejsc aktywnych. Zewnętrzne związanie tzw. allosterycznego modulatora powoduje otwarcie pierścienia α , a także, co ważne, powstanie impulsu allosterycznego przenoszonego aż do centrów katalitycznych. Dzięki otwarciu bramy substraty mogą wnikać do komory katalitycznej, gdzie są degradowane.

⁹ Martinelli G., et al., Molecular therapy for multiple myeloma, *Haematologica*, **2001**, 86, 908–917.

¹⁰ Almond J.B., et al., Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex, *Leukemia*, **2001**, 15, 1388–1397.

¹¹ Bold R.J., et al., Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasom, *J. Surg Res*, **2001**, 100, 11–17.

¹² Oyaizu H., et al., Proteasome inhibitor 1 enhances paclitaxel-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line, *Oncol Rep*, **2001**, 8, 825–829.

¹³ Q. Huang, M. E. Figueiredo-Pereira, Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications, *Apoptosis*, **2010**, 15, 1292–1311.

¹⁴ T. Jung, B. Catalgol, T. Grune, The proteasomal system, *Mol Aspects Med*, **2009**, 30, 191–296.

¹⁵ X. Tan, P. A. Osmulski, M. Gaczynska, Allosteric Regulators of the Proteasome: Potential Drugs and a Novel Approach for Drug Design, *Curr Med Chem*, **2006**, 13, 155-165.

Proteasom posiada trzy różne aktywności proteolityczne, związane z miejscami aktywnymi zlokalizowanymi na *N*-końcach podjednostek β :

- $\beta 1$ - wykazuje aktywność kaspazopodobną (PGPH, ang. post-glutamyl peptide hydrolyzing), hydrolizuje wiązania peptydowe po resztach zawierających kwasowy łańcuch boczny,
- $\beta 2$ - posiada aktywność trypsynopodobną (T-L, ang. trypsin-like), hydrolizuje wiązania peptydowe po resztach zawierających zasadowy łańcuch boczny,
- $\beta 5$ - wykazuje aktywność chymotrypsynopodobną (ChT-L, ang. chymotrypsin-like), hydrolizuje wiązania peptydowe po resztach zawierających rozbudowany, hydrofobowy łańcuch boczny¹⁵.

Białko HIV-1 Tat (transaktywator ekspresji genów wirusa HIV) jest złożonym z osiemdziesięciu sześciu reszt aminokwasowych¹⁵ inhibitorem proteasomu. Białko Tat reguluje aktywność genów zaangażowanych w proces angiogenezy. Badania z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego i dynamiki molekularnej umożliwiły zidentyfikowanie w strukturze białka dwóch głównych domen: rdzenia hydrofobowego oraz domeny bogatej w reszty glutaminy. Pozostałe dwa regiony są bardziej elastyczne i tworzą domeny zasadową oraz bogatą w reszty cysteiny. Domena zasadowa odpowiadająca za wiązanie RNA zawiera motyw bogaty w reszty argininy, ma tendencję do formowania struktury helikalnej i, co najważniejsze, jest zaangażowana w interakcję z proteasomem 20S¹⁶. HIV-1 Tat jest allosterycznym inhibitorem proteasomu, tzn. nie blokuje bezpośrednio miejsc katalitycznych. Wiąże się raczej poza komorą katalityczną, indukując przesłanie sygnału konformacyjnego w stronę miejsc aktywnych, przez co wpływa na efektywność/specyficzność realizowanej przez nie proteolizy.

Peptydy Tat to małe, niekompetycyjne, najprawdopodobniej allosteryczne modulatory aktywności proteasomu. Ich sekwencja wywodzi się z zasadowej domeny białka HIV-1 Tat. Zarówno peptyd Tat1 jak i Tat2 (Rys. 3), wpływają na aktywność proteasomu, oba silnie inhibują aktywność kaspazopodobną oraz chymotrypsynopodobną proteasomu 20S, a w żaden sposób nie wpływają natomiast na aktywność trypsynopodobną¹⁶.

Tat1 GRKKRRQRRPS

Tat2 GRKKRRQRRQDPI

Rys. 3 Sekwencja peptydu Tat1 oraz Tat2.

Peptydy Tat są silnie dodatnio naładowanymi molekułami i prawdopodobnie oddziałują z resztami kwasowymi obecnymi na powierzchni podjednostek α proteasomu¹⁶. Dla peptydu Tat2 został przeprowadzony skan alaninowy pozwalający ustalić, które aminokwasy są kluczowe podczas interakcji z proteasomem. Wykazano, iż podstawienie Asp10 oraz dwóch lub więcej reszt Arg/Lys zakłóca oddziaływanie jonowe stabilizujące strukturę peptydu i/lub uniemożliwia modulację aktywności proteasomu¹⁷. Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy było

¹⁶ E. Jankowska, M. Gaczynska, P. Osmulski, E. Sikorska, R. Rostankowski, S. Madabhushi, M. Tokmina-Lukaszewska, F. Kasprzykowski, Potential Allosteric Modulators of the Proteasome Activity, *Biopolymers*, **2010**, 93, 485-495.

¹⁷ J. Witkowska, et al., Dissecting a role of a charge and conformation of Tat2 peptide in allosteric regulation of 20S proteasome, *J Pept Sci*, **2014**, 20, 649–656.

sprawdzenie, czy modyfikacje wprowadzone do sekwencji bazowych Tat (cyklizacja, zastąpienie aminokwasów z szeregu L resztami D-aminokwasów, wprowadzenie reszty 5-FITC), wpłyną na zdolność peptydów do inhibicji aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu.

2. Materiały i metody

Synteza: Syntezę peptydów przeprowadzono z wykorzystaniem metody Merrifielda na stałym nośniku polimerowym (TentaGel R RAM lub żywica 2-chlorotrytylowa), używając reaktora mikrofalowego RM800 (Plazmotronika). Grupy α -aminowe aminokwasów były chronione osłoną 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc), zaś łańcuchy boczne – ortogonalnymi ugrupowaniami powszechnie stosowanymi w chemii peptydów. Do tworzenia wiązania peptydowego stosowano heksafluorofosforan 3-tlenku 1-[bis(dimetyloamino)metyleno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pirydyniowego (HATU). Osłonę Fmoc usuwano za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF. Peptydy odszczepiano od nośnika roztworem kwasu trifluorooctowego (TFA) z dodatkiem triizopropylsilanu i wody. Po odsączeniu od ziaren nośnika i odparowaniu TFA, peptydy wytrącano schłodzonym eterem, odwirowywano, po czym poddawano liofilizacji. Peptydy oczyszczano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) w układzie gradientowym rozpuszczalników woda-acetonitril z dodatkiem TFA. Czyste frakcje liofilizowano. Peptydy scharakteryzowano za pomocą HPLC ProStar 240 (Varian) z kolumną Phenomenex Luna C8 przy długości fali $\lambda = 223$ nm, w gradiencie 0-25% B w 20 minut (peptyd c304MC) oraz 0-35% B w 20 minut (pozostałe peptydy) oraz metodą spektrometrii mas na spektrometrze MALDI TOF Biflex III (Bruker), używając matrycy CCA (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy).

Badania biologiczne: Wpływ peptydów na katalityczną aktywność proteasomu 20S został zbadany przy użyciu proteasomu aktywowanego za pomocą 0,01% SDS. Do zbadania aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu został użyty substrat fluorogeniczny sukcyńlo-LeuLeuValTyr-4-metylokumaryno-7-amid (SucLLVY-AMC, Enzo Life Science) rozpuszczony w DMSO. Badane peptydy zostały rozpuszczone w DMSO do wyjściowego stężenia 10 mM. Wszystkie analizy zostały wykonane na 96-studzienkowej płytce, w końcowej objętości 100 μ l, w buforze 50 mM TRIS/HCl o pH 8. Próby kontrolne były wykonywane bez peptydu, zamiast którego dodawano równoważną ilość DMSO. Pomiar przeprowadzono na spektrofлуorymetrze Tecan Infinite M200Pro w temperaturze 37°C, stosując wzbudzenie przy długości fali 380 nm, a odczyt emisji fluorescencji przy 460 nm. Odczyt przyrostu fluorescencji, związanego z uwolnioną w wyniku proteolizy grupą AMC, był wykonywany co 2 minuty, przez 60 minut. Aktywność ChT-L proteasomu została obliczona jako ilość nanomoli uwolnionej grupy AMC na miligram proteasomu h20S na sekundę. Względna aktywność ChT-L proteasomu była obliczona w stosunku do jego aktywności katalitycznej zmierzonej bez dodatku peptydu. Wartości IC₅₀ zostały wyznaczone za pomocą dopasowania punktów pomiarowych do krzywej eksponencjalnej, z wykorzystaniem programu SigmaPlot 11.0 (Rys. 5).

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie zasadowej domeny białka HIV-1-Tat, będącego naturalnym allosterycznym inhibitorem proteasomu, zaprojektowane zostały peptydy – potencjalne modulatory aktywności proteasomu, mogące docelowo znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Przy projektowaniu sekwencji bazowych wykorzystano rozpoznane jako inhibitory ludzkiego proteasomu peptydy

Tat2¹⁷ oraz Tat5_DKTO (wyniki nieopublikowane). Nowe analogi peptydów Tat zostały zmodyfikowane (Tab. 2) w celu sprawdzenia wpływu cyklizacji oraz zastąpienia reszt aminokwasowych z szeregu L resztami D-aminokwasów na zdolność peptydów do inhibicji aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu. Przetestowano także czy wprowadzenie reszty 5-FITC, umożliwiającej badania oddziaływania analogów Tat z proteasomem za pomocą metod fluorescencyjnych, nie obniża ich zdolności inhibicyjnej.

Wykorzystanie reaktora mikrofalowego pozwoliło na skrócenie czasu syntezy oraz przyczyniło się do uzyskania peptydów z dużą wydajnością.

Tab 2. Sekwencje peptydów zaplanowanych do syntezy.

Peptyd	Sekwencja
c301MC	Rc(KKRRQRRQD)PI
c302MC	RKc(KRRQRRQD)PI
303MC	RKKRRQRRQDPI
c304MC	GRKKRRc(CRRRPC)
305MC	kkkqkkk-D-Tic-Oic-kkkqkkk
f306MC	5-FITC-β-Ala- kkkqkkk-D-Tic-Oic- kkkqkkk

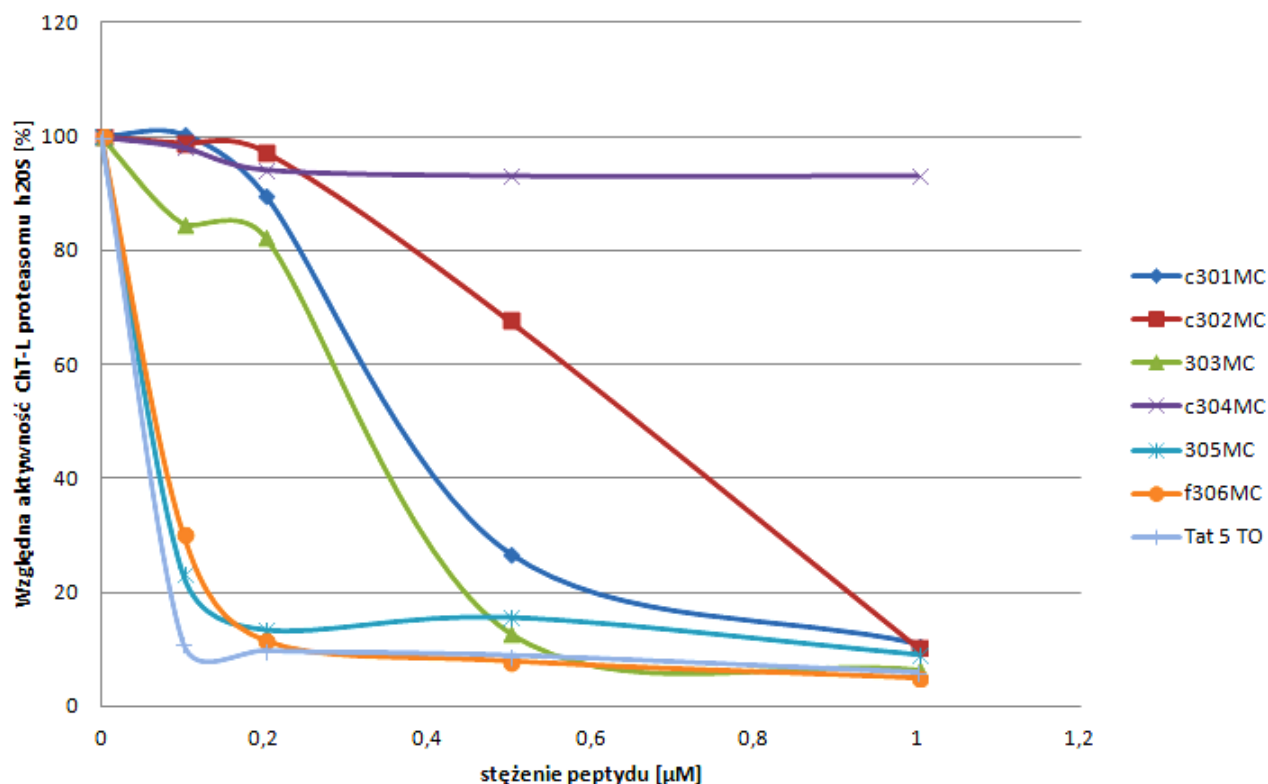
Charakterystyka otrzymanych peptydów została wykonana z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (Tabela 3).

Tab. 3 Charakterystyka oczyszczonych peptydów.

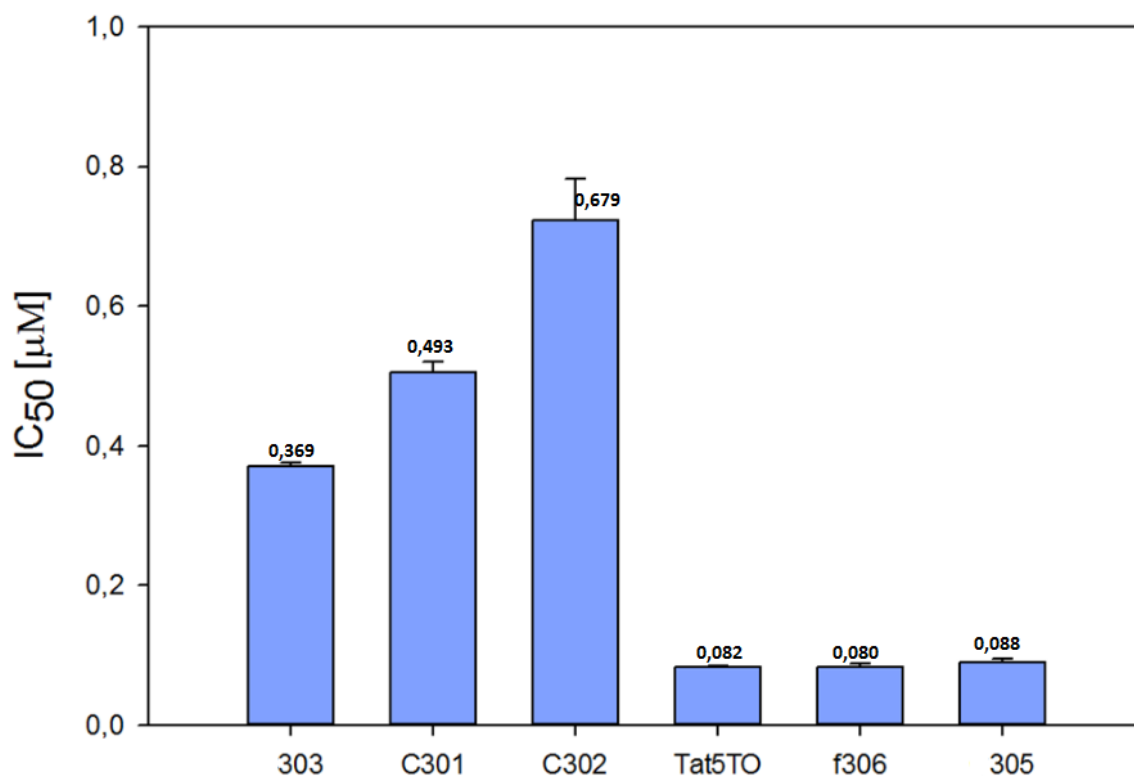
Peptyd	Sekwencja	Masa molowa [g/mol]	Jon molekularny [m/z]	Czas retencji [min]
c301MC	R-cyklo(KKRRQRRQD)PI	1618,9	1620,0	15,45
c302MC	RK-cyklo(KRRQRRQD)PI	1618,9	1619,8	15,71
303MC	RKKRQRRQDPI	1636,9	1637,8	16,09
c304MC	GRKKRR-cyklo(CRRRPC)	1572,8	1573,8	9,91
305MC	KKKQKKK-D-Tic-Oic- KKKQKKK	2122,0	2123,0	15,40
f306MC	5-FITC-β-Ala- KKKQKKK -D- Tic-Oic- KKKQKKK	2581,0	2582,0	12,01

Badania przeprowadzone na proteasomie aktywowanym przy użyciu 0,01% SDS wykazały, iż niektóre z zaprojektowanych związków skutecznie hamują aktywność chymotrypsynopodobną (Rys. 4). Jedynie peptyd c304MC, posiadający w swojej strukturze mostki disulfidowe, nie wykazał zdolności do inhibicji proteasomu 20S. Najlepszymi inhibitorami okazały się analogi peptydu Tat5, których wartości IC₅₀ zawierają się w zakresie 0,080-0,088 μM (Rys. 5). Peptyd f306MC, który na C-końcu posiada przyłączony znacznik fluorescencyjny 5-FITC wykazuje bardzo dobre właściwości inhibitorowe, co jest dowodem na możliwość wykorzystania tego znacznika w badaniach oddziaływania analogów Tat z proteasomem z użyciem

metod fluorescencyjnych. Peptydy c301MC oraz c302MC, których konformacja usztywniona została poprzez cyklizację typu łańcuch boczny - łańcuch boczny (między resztami Lys2/Lys3 i Asp10) inhibują proteasom gorzej aniżeli analog liniowy 303MC. Analog c301MC inhibuje nieco lepiej niż c302MC, prawdopodobnie ze względu na większą odległość pomiędzy resztami tworzącymi układ cykliczny.



Rys. 4 Wykres zależności względnej aktywności ChT-L proteasomu h20S, aktywowanego przy użyciu 0,01% SDS, od stężenia testowanych peptydów. W celach porównawczych dodano także krzywą uzyskaną dla silnego inhibitora h20S – peptydu Tat5TO.



Rys. 5 Inhibicja aktywności ChT-L proteasomu h20S przez zaprojektowane peptydy.

Podsumowując, wykonane prace eksperymentalne należy zatem stwierdzić iż:

- wszystkie peptydy, poza analogiem c304MC mają zdolność do inhibicji aktywności chymotrypsynopodobnej ludzkiego proteasomu 20S,
- najlepszymi inhibitorami są analogi peptydu Tat5,
- wprowadzenie reszt D-aminokwasowych oraz znacznika 5-FITC nie ma negatywnego wpływu na zdolność inhibicyjną peptydu,
- usztywniona konformacja poprawia odporność na degradację enzymatyczną, jednak cyklopeptydy (c301MC, c302MC) nie inhibują silniej niż analog liniowy.

Podziękowania: Badania finansowane z grantu NCN 2014/15/B/NZ7/01014

Woltamperometryczne badanie leków przeciwretrowirusowych

Voltammetric study of antiretroviral drugs

Natalia Festinger¹, Sylwia Smarzewska¹, Witold Ciesielski¹

¹Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
ul. Tamka 12, 91-403 Łódź
n.festinger@wp.pl

Streszczenie

Celem badań było porównanie możliwości analitycznych dwóch elektrod roboczych: elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra (Hg(Ag)FE) oraz elektrody z węgla szklistego modyfikowanej tlenkiem grafenu (GO/GC). Porównania dokonano na podstawie oznaczania tenofowiru – substancji aktywnej zawartej w preparatach farmaceutycznych zwalczających wirus HIV. Na pierwszej z elektrod tj. (Hg(Ag)FE) badano proces redukcji, na drugiej tj. GO/GC – proces utlenienia.

Najlepiej ukształtowane sygnały tenofowiru otrzymano w buforze cytrynianowo – fosforanowym o pH 2.5 (na elektrodzie Hg(Ag)FE) oraz w buforze Brittona – Robinsona o pH 2.0 (na elektrodzie GO/GC).

W toku badania zależności natężenia prądu pikowego TFV od jego stężenia otrzymano liniowy zakres odpowiedzi w przedziale $5.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ – $7.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ na elektrodzie amalgamatowej i $7.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ – $3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ na elektrodzie GO/GC. Wyliczono również wartości granicy wykrywalności i oznaczalności, które wyniosły odpowiednio $1.35 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ i $4.48 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dla Hg(Ag)FE oraz $9.98 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ i $3.32 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dla GO/GC.

Na podstawie prowadzonych eksperymentów zostały określone warunki oznaczania tenofowiru w preparatach farmaceutycznych Viread i Tenofovir disoproxil Teva oraz w moczu z dodatkiem analitu. Do oznaczania TFV w preparatach farmaceutycznych z bardzo dobrym odzyskiem (97.5 – 104.4%) wykorzystać można elektrodę amalgamatową, natomiast do moczu z dodatkiem analitu – elektrodę GO/GC (odzysk w zakresie 95.5 – 103.0%).

Opracowana metoda oznaczania TFV jest pierwszą elektrochemiczną metodą oznaczania tego związku.

Abstract

The goal of this work was to develop sensitive and innovative electroanalytical method for tenofovir (TFV) determination in pharmaceutical formulations and spiked urine samples. Analytical parameters obtained on two working electrodes: cyclic renewable mercury film silver based electrode (Hg(Ag)FE) and graphene oxide modified glassy carbon electrode (GO/GC) were compared. Both of the developed electroanalytical methods offer rapid and simple detection of tenofovir. The best results were obtained in supporting electrolyte based on citrate-phosphate buffer (pH 2.5) for Hg(Ag)FE and in Britton-Robinson buffer (pH 2.0) for GO/GC.

Obtained linear response ranges for Hg(Ag)FE and GO/GC were $5.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ – $7.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $7.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ – $3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The detection and quantification limits for Hg(Ag)FE were found as $1.35 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4.48 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and for GO/GC $9.98 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.32 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively.

Determination of TFV in pharmaceutical formulations (Viread and Tenofovir disoproxil Teva) was possible only on Hg(Ag)FE (with recovery in range 97.5 – 104.4%) while spiked urine samples analysis only on GO/GC (with recovery in range 95.5 – 103.0%).

Developed method is the first electrochemical method for TFV determination.

1. Wstęp

Leki przeciwretrowirusowe są lekami stosowanymi do leczenia zakażeń wirusem HIV (ludzkim wirusem niedoboru odporności), a także do leczenia pełnoobjawowej choroby AIDS¹. Wirus HIV jest wirusem atakującym limfocyty T-pomocnicze, co powoduje upośledzenie odporności². Nabyty zespół niedoboru odporności (AIDS) jest powodowany przez zakażenie wirusem HIV, jednakże nie jest chorobą w pełnym tego słowa znaczeniu, a zespołem objawów i chorób występujących u pacjentów z upośledzoną odpornością. Pierwszy opis AIDS pojawił się 10 grudnia 1981 roku w czasopiśmie New England Journal of Medicine³.

Zarówno w Polsce jak i na całym świecie systematycznie wzrasta ilość wykrywanych zakażeń wirusem HIV. Według Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (CDC) w 2012 roku w Stanach Zjednoczonych ponad milion osób w wieku powyżej 13 lat zakażone było wirusem HIV, z czego około 50 tysięcy stanowiły zakażenia nowe. Natomiast według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2013 roku liczba ludzi żyjących z HIV i/lub AIDS wynosiła 35 milionów⁴. W Polsce codziennie średnio 2 osoby dowiadują się o tym, że są zakażone wirusem HIV⁵. Wirus HIV przenosi się wyłącznie trzema drogami: przez kontakt krwi z zakażoną krwią, drogą płciową i podczas porodu lub ciąży.

Aktualnie, leki jakie stosowane są przeciwko wirusowi HIV można podzielić na 6 grup⁶:

- Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy – NRTIs (Nucleoside reverse transcriptase inhibitors),
- Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy – NNRTIs (non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitors),
- Inhibitory proteazy – PIs (Protease inhibitors),
- Inhibitory fuzji – FIs,
- Inhibitory integrazy – InIs,
- Inhibitory koreceptora – CCR-5.

¹ J.K. Podlewski, A. Chwaliborska-Podlewska, *Leki współczesnej terapii*; Split Trading Sp. z o.o., Warszawa, **2005**, 607-608.

² S. Kalinowska, B. Trzeźniowska-Drukała, J. Samochowiec, *Psychiatria Polska*, **2013**, 3, 453-463.

³ D. Rogowska-Szadkowska, *ABC wiedzy o HIV/AIDS*; wyd. Departament Wychowania i Promocji Obronności – Ministerstwo Obrony Narodowej, **2010**, 7-18.

⁴ W.K. Kabbaral, W.H. Ramadan, *Journal of Infection and Public Health*, **2015**, 8, 409-417.

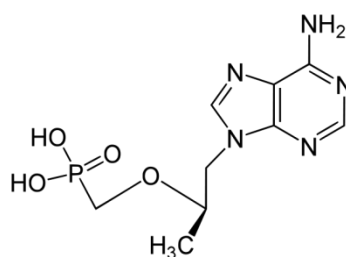
⁵ D. Rogowska-Szadkowska, *ABC wiedzy o HIV/AIDS*; wyd. Departament Wychowania i Promocji Obronności – Ministerstwo Obrony Narodowej, **2010**, 7-18.

⁶ A. Hoban, R. Podlasin, G. Cholewińska, A. Wiercińska-Drapało, B. Knysz, M. Inglot, A. Szymczak, M. Bociąga-Jasik, E. Jabłonowska, *Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. Zalecenia PTN AIDS*; wyd. Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa-Wrocław, **2015**, 50-51.

Tabela 1. Przykłady leków antyretrowirusowych zarejestrowanych w Polsce.

NRTIs	NNRTIs	PIs	FIs	InIs	CCR-5
Abakawir	Efawirenz	Atazanawir	Enfuwirtyd	Raltegrawir	Marawirok
Tenofowir	Etrawiryna	Darunawir		Elviregrawir	
Emtrycytabina	Rilpiwiryna	Fosamprenawir		Dolutegrawir	
Zydowudyna	Newirapina	Indynawir			
Lamiwudyna		Lopinawir			
		Nelfinawir			
		Rytonawir			

Jednym z przedstawicieli grupy NRTIs jest tenofowir⁷. Tenofowir (TFV, Schemat 1) – kwas ([(2R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl]oksy)metylofosfonowy – jest lekiem stosowanym w leczeniu zakażeń zarówno wirusem HIV jak i HBV (wirus zapalenia wątroby typu B). Ze względu na niedostateczne wchłanianie stosowany jest w postaci fumaranu dizoproksylu tenofowiru czyli proleku, z zestyfikowaną grupą fosforanową. Prolek przekształcany jest w tenofowir przez hydrolizę diestru przy pomocy esteraz surowicy i tkanek, następnie fosforylowany jest przez enzymy komórkowe, co prowadzi do powstania difosforanu tenofowiru – aktywnej formy leku⁸. Tenofowir jest analogiem 5-monofosforanu adenozyne, a w postaci difosforanu hamuje działanie odwrotnej transkryptazy HIV, działając na zasadzie fałszywego podstawnika i blokując wydłużanie wirusowej nici DNA, a tym samym hamując replikację wirusa⁹.



Schemat 1. Wzór strukturalny tenofowiru.

Kilka organizacji na świecie podjęło się określenia najkorzystniejszych dla pacjenta schematów postępowania w przypadku zakażeń wirusem HIV. Schemat terapii antyretrowirusowej – cART (combined antiretroviral therapy) jest połączeniem kilku synergistycznie działających leków antyretrowirusowych¹⁰, do którego włączane

⁷ Rajani Kumar Valluru, Phani Bhushana Reddy B, Kalyan Sumanth S, Praveen Kumar V, Naveen Babu Kilaru, *Journal of Chromatography B*, **2013**, 931, 117-126.

⁸ M. El Barkil, M-C. Gagnieu, J. Guillon, *Journal of Chromatography B*, **2007**, 854, 192-197.

⁹ T. King, L. Bushman, J. Kiser, P.L. Anderson, M. Ray, T. Delahunty, C.V.Fletcher, *Journal of Chromatography B*, **2006**, 854, 147-156.

¹⁰ Z. Marchewka, B. Szymańska, J. Płonka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **2012**, 66, 603-608.

są coraz nowsze leki w celu poprawienia skuteczności leczenia i zmniejszenia działań niepożądanych.

Zastosowanie odpowiedniego schematu terapii może zapewnić zakażonym wirusem HIV długoletnie życie, a nawet uniknięcie rozwoju AIDS. W przeciągu 15 lat, śmiertelność u pacjentów zakażonych wirusem HIV zmniejszyła się o przynajmniej 50%, co doprowadziło do uznania AIDS za chorobę przewlekłą¹¹. Ilość zgonów spadła gwałtownie po wprowadzeniu w 1990 roku Wysoce Aktywnej Terapii Antyretrowirusowej (HAART), która miała za zadanie nie tylko zmniejszyć ilość przypadków śmiertelnych, ale również poprawić jakość życia zakażonych i zmniejszyć zapadalność na zakażenia oportunistyczne i nowotwory¹². Ponieważ całkowite wyeliminowanie wirusa nie jest obecnie możliwe leczenie sprowadza się do przywrócenia i zachowania procesów immunologicznych poprzez zmniejszenie miana wirusa i zapobieganie innym zakażeniom¹³.

Niestety leczenie antyretrowirusowe obarczone jest wieloma działaniami niepożądanymi, które stają się wiodącą przyczyną przerwania leczenia przez pacjentów. Tenofovir jako jedyny lek z grupy NRTIs przyczynia się do powstania białkomoczu oraz obniżenia klirensu kreatyniny i gęstości mineralnej kości¹⁴. Większość wytycznych dotyczących leczenia zakażenia wirusem HIV zaleca monitorowanie poziomu leku w organizmie. Badania wskazują na dużą zmienność osobniczą stężeń tenofoviru pomimo podawania tej samej dawki, co może być spowodowane interakcjami lekowymi, różną jakością czy też szybkością metabolizmu¹⁵. Zbyt niski poziom stężeń tenofoviru w osoczu nie ma działania przeciwwirusowego i dodatkowo może powodować oporność wirusa, natomiast zbyt wysokie poziomy leku w osoczu niebezpiecznie zwiększają toksyczność tenofoviru¹⁶. Z ww. powodów określanie stężenia leków przeciwretrowirusowych w organizmach osób je przyjmujących jest niezwykle istotne.

Celem niniejszych badań było oznaczenie tenofoviru będącego jednym z leków przeciwretrowirusowych zarówno w preparatach farmaceutycznych jak i w moczu z dodatkiem analitu, a także porównanie dwóch elektrod roboczych: elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra i elektrody z węgla szklanego modyfikowanej tlenkiem grafenu na podstawie oznaczania tego leku. Badania prowadzono techniką woltamperometrii fali prostokątnej (SWV) i woltamperometrii cyklicznej (CV).

Elektroda srebrna z odnawialnym filmem amalgamatu srebra jest elektrodą szeroko stosowaną w elektrochemii ze względu na szeroki zakres potencjałów roboczych. Wykazuje ona stabilność działania i zachowuje zalety elektrody rtęciowej przy zmniejszonym zużyciu szkodliwej rtęci¹⁷. Niezbędną czynnością podczas pracy z elektrodą Hg(Ag)FE jest odświeżanie filmu amalgamatu srebra przed każdym

¹¹ Rajani Kumar Valluru, Phani Bhushana Reddy B, Kalyan Sumanth S, Praveen Kumar V, Naveen Babu Kilaru, *Journal of Chromatography B*, **2013**, 931, 117-126.

¹² L.F. Pinto Neto, B.R. Bassetti, I.H. Fraga, C.R. Oliveira Santos, P.D. Ximenes, A.E. Miranda, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **2016**, 20, 14-18.

¹³ W.K. Kabbaral, W.H. Ramadan, *Journal of Infection and Public Health*, **2015**, 8, 409-417.

¹⁴ B. Szetela, J. Gąsiorowski, R. Krygier, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **2008**, 62, 28-35.

¹⁵ Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiabie, H. Millart, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2013**, 86, 100-111.

¹⁶ R.S. Jansen, H. Rosing, W. Kromdijk, R. ter Heine, J.H.M. Schellens, J.B. Beijnen, *Journal of Chromatography B*, **2010**, 878, 621-627.

¹⁷ R. Piech, B. Baś, *Electroanalysis*, **2007**, 19, 2342-2350.

pomiarem. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie bardzo dobrej czułości, odtwarzalności i powtarzalności sygnałów analitycznych.

Alternatywą dla elektrody amalgamatywnej jest elektroda z węgla szklanego (GC). Elektroda GC działa w bardzo szerokim zakresie potencjałów. Węgiel szklany zbudowany jest z płaskich fragmentów grafenowych (sp^2) oraz występujących w płaszczyźnie poprzecznej wiązań, co sprawia, że GC posiada skomplikowaną strukturę splecionych mikrofibril. Doskonałe właściwości węgla szklanego (wysoka trwałość i obojętność chemiczna, szeroki zakres potencjałów, odporność na zanieczyszczenia, niski koszt) sprawiają, iż materiał ten jest jednym z najczęściej stosowanych w produkcji elektrod roboczych. Modyfikacje elektrody mają za zadanie polepszyć właściwości katalityczne, zwiększyć powierzchnię elektroaktywną oraz wydajność reakcji elektrodowych, a także zwiększyć selektywność pomiarów¹⁸.

2. Aparatura i odczynniki

W badaniach elektrochemicznych stosowano μ Autolab Typ III/GPES (Eco Chemie) ze statywem M164 (mtm-anko, Kraków) w układzie trójelektrodowym z elektrodą srebrną z odnawialnym filmem amalgamatu srebra (Hg(Ag)FE) lub elektrodą z węgla szklanego modyfikowaną tlenkiem grafenu (GO/GC) jako elektrodą roboczą, z elektrodą chlorosrebrną Ag/AgCl ($3 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ KCl) jako elektrodą odniesienia i drucikiem platynowym jako elektrodą pomocniczą. Odczynniki zakupiono w Sigma Aldrich.

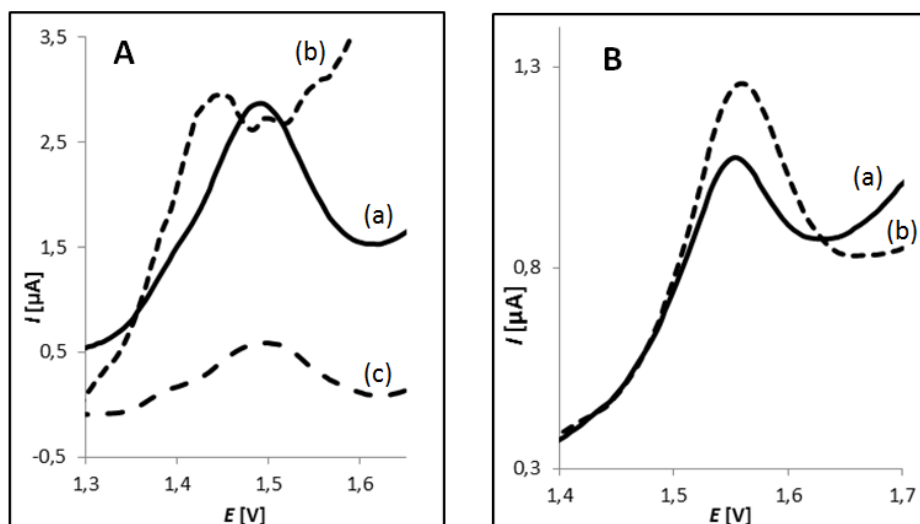
3. Dyskusja wyników

3.1 Przygotowanie elektrody z węgla szklanego modyfikowanej tlenkiem grafenu

Poszukiwania odpowiedniej modyfikacji elektrody GC wykazującej najlepsze właściwości analityczne do oznaczania TFV rozpoczęto od sprawdzenia różnych modyfikacji opartych zarówno na zawiesinach jednoskładnikowych (tlenek grafenu, zredukowany tlenek grafenu, grafen), jak i na ich mieszaninach sporządzonych z zastosowaniem różnych rozpuszczalników organicznych i nieorganicznych. Modyfikacje te nakraplano na powierzchnię elektrody roboczej i pozostawiano do odparowania rozpuszczalnika.

Jak można zauważyć na Schemacie 2A zastosowanie zredukowanego tlenku grafenu (RGO) czy grafenu wpłynęło negatywnie na kształt i wysokość rejestrowanego sygnału tenofowiru. Modyfikacją elektrody z węgla szklanego, która wykazała lepsze możliwości analityczne oznaczania tenofowiru była zawiesina tlenku grafenu zdyspergowana w wodzie destylowanej o stężeniu $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ наносzona na powierzchnię elektrody roboczej w objętości $1 \text{ } \mu\text{L}$ (Schemat 2B).

¹⁸ J.-J. Ren, N. Sun, M. Cui, W.-P. Ji, *Chinese Chemical Letters*, **2015**, 26, 1421-1425.



Schemat 2. (A) Zestawienie woltamperogramów tenofowiru o stężeniu $C_{TFV} = 5.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dla elektrody niemodyfikowanej (a) oraz elektrody modyfikowanej RGO (b) i grafenem (c); (B) Zestawienie woltamperogramów tenofowiru o stężeniu $C_{TFV} = 5.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ na elektrodzie niemodyfikowanej (a) i modyfikowanej tlenkiem grafenu (GO/GC) (b).

3.2 Badanie powierzchni elektroaktywnej elektrod GC i GO/GC

W celu porównania elektrody węglowej niemodyfikowanej i modyfikowanej tlenkiem grafenu zbadano powierzchnie elektroaktywne elektrod poprzez wykonanie badania techniką woltamperometrii cyklicznej przy użyciu heksacyjanożelazianu (II) potasu jako układu redoks. Wyliczono powierzchnię elektroaktywną obydwu elektrod korzystając z równania Randlesa-Sevcika:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A C^* D^{1/2} \nu^{1/2}$$

gdzie:

n – liczba elektronów biorących udział w reakcji

A – powierzchnia elektroaktywna

C^* – stężenie substancji elektroaktywnej

D – współczynnik dyfuzji analitu

ν – szybkość skanowania

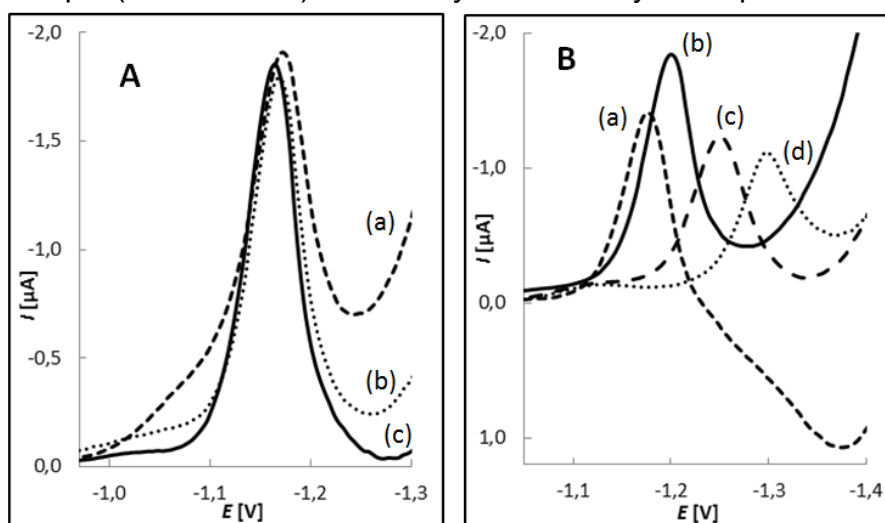
Okazało się, że modyfikacja elektrody roboczej tlenkiem grafenu spowodowała zwiększenie powierzchni elektroaktywnej o ponad 50% w stosunku do elektrody niemodyfikowanej (Tabela 2).

Tabela 2. Porównanie powierzchni elektroaktywnej elektrody GC i GO/GC.

Powierzchnia robocza elektrody [mm^2]	
Elektroda niemodyfikowana GC	1.66
Elektroda modyfikowana GO/GC	2.46

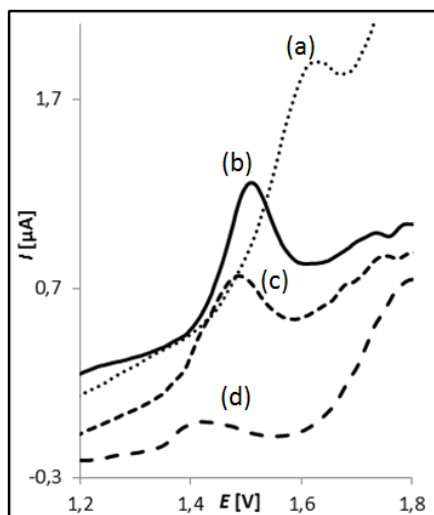
3.3 Wybór elektrolitu podstawowego i optymalizacja parametrów techniki woltamperometrii fali prostokątnej (SWV)

Elektrochemiczne oznaczanie TFV techniką SWV na elektrodzie Hg(Ag)FE rozpoczęto od doboru optymalnego elektrolitu podstawowego. W tym celu analizowano wpływ rodzaju buforu na rejestrowane sygnały TFV wykonując badanie w buforze Brittona – Robinsona, buforze cytrynianowym i cytrynianowo – fosforanowym. Najodpowiedniejszym elektrolitem podstawowym okazał się bufor cytrynianowo – fosforanowy ze względu na kształt i wysokość prądu piku (Schemat 3A). Porównano sygnały TFV otrzymane w buforze cytrynianowo – fosforanowym dla różnych wartości pH (Schemat 3B). Do dalszych badań wybrano pH = 2.5.



Schemat 3. (A) Zestawienie woltamperogramów TFV ($C_{TFV} = 7.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) z użyciem elektrody Hg(Ag)FE dla trzech badanych buforów o pH = 2.5, (a): bufor Brittona – Robinsona, (b): bufor cytrynianowy, (c): bufor cytrynianowo – fosforanowy; (B) Zestawienie woltamperogramów TFV ($C_{TFV} = 7.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na elektrodzie Hg(Ag)FE dla buforu cytrynianowo – fosforanowego o różnych wartościach pH: (a) pH = 2.0, (b) pH = 2.5, (c) pH = 3.0, (d) pH = 3.5;

Do badań nad wyborem elektrolitu podstawowego na elektrodzie GO/GC wykorzystano 3 bufor: bufor Brittona – Robinsona, bufor cytrynianowo – fosforanowy i bufor chlorkowy. Sygnały uzyskano tylko w buforze Brittona – Robinsona co mogło być spowodowane efektem solwatacyjnym. Kierując się kształtem i wysokością sygnału jako elektrolit podstawowy wybrano bufor Brittona – Robinsona o pH 2.0 (Schemat 4).



Schemat 4. Zestawienie woltamperogramów TFV ($C_{TFV} = 5.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na elektrodzie GO/GC dla buforu Brittona – Robinsona o różnych wartościach pH: (a) pH = 1.6, (b) pH = 2.0, (c) pH = 2.5, (d) pH = 3.0.

Kolejny etap badań polegał na doborze parametrów techniki SWV dla obydwu elektrod roboczych. Parametrami tymi były: amplituda, krok potencjału i częstotliwość. Optymalne wartości parametrów przedstawiono w tabeli 3.

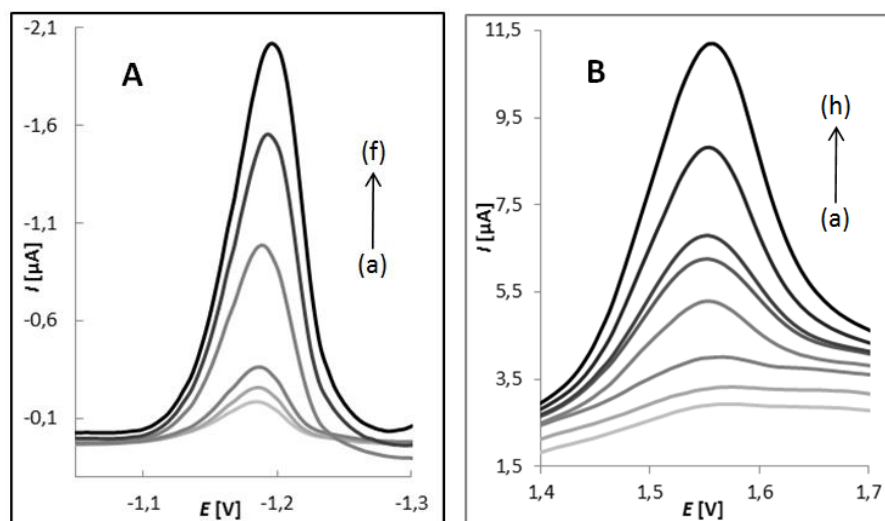
Tabela 3. Zestawienie optymalnych wartości parametrów techniki SWV.

Parametr	Hg(Ag)FE	GO/GC
	Wartość optymalna	
Amplituda [mV]	30	30
Krok potencjału [mV]	4	7
Częstotliwość [Hz]	25	30

3.4 Krzywa kalibracyjna i oznaczanie TFV w próbkach naturalnych

Badania oznaczania tenofowiru prowadzono techniką SWV przy zoptymalizowanych wcześniej warunkach eksperymentu. Na elektrodzie amalgamatowej natężenie prądu pikowego TFV zależało liniowo od jego stężenia w zakresie od $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ do $7.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Schemat 5A). Zależność tą opisuje równanie: $I_p [\mu\text{A}] = 0.285 [\mu\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot C_{TFV} + 0.0926 [\mu\text{A}]$, $R^2 = 0.9999$. Obliczone wartości granicy wykrywalności i granicy oznaczalności wynoszą odpowiednio: $1.35 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oraz $4.48 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Na elektrodzie z węgla szklanego modyfikowanej tlenkiem grafenu liniową zależność natężenia prądu pikowego TNF od jego stężenia otrzymano w zakresie stężeń od $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ do $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Schemat 5 B). Zależność tą opisuje równanie: $I_p [\mu\text{A}] = 0.247 [\mu\text{A} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot C_{TFV} + 0.0809 [\mu\text{A}]$, $R^2 = 0.9993$. Obliczone wartości granicy wykrywalności i granicy oznaczalności wynoszą odpowiednio: $9.96 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oraz $3.32 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Elektroda GO/GC

wykazała zarówno rozszerzenie liniowej odpowiedzi układu pomiarowego jak i obniżenie wartości LOD i LOQ.



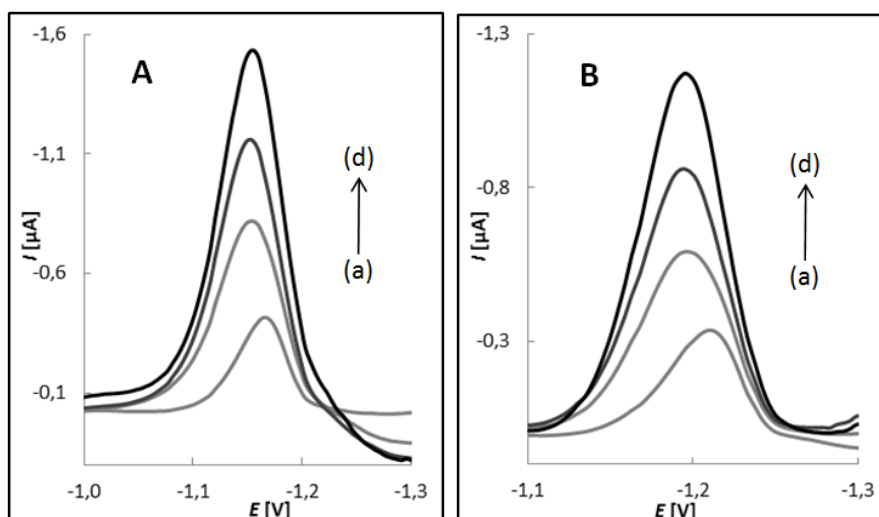
Schemat 5. Zestawienie woltamperogramów tenofowiru po odjęciu ślepej próby (A) na elektrodzie Hg(Ag)FE dla stężeń: (a): $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (b): $0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (c): $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (d): $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (e): $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (f): $7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B) na elektrodzie GO/GC dla stężeń: (a): $0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (b): $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (c): $3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (d): $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (e): $7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (f): $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (g): $20.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (h): $30.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczania tenofowiru w preparatach farmaceutycznych dostępnych na polskim rynku: Viread (Gilead) i Tenofovir disoproxil Teva (Teva Pharmaceuticals). Oznaczanie wykonano metodą dodatku wzorca. W przypadku obu elektrod zaobserwowano sygnały pochodzące od tenofowiru. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki oznaczania zawartości tenofowiru w preparatach farmaceutycznych Viread i Tenofovir disoproxil Teva.

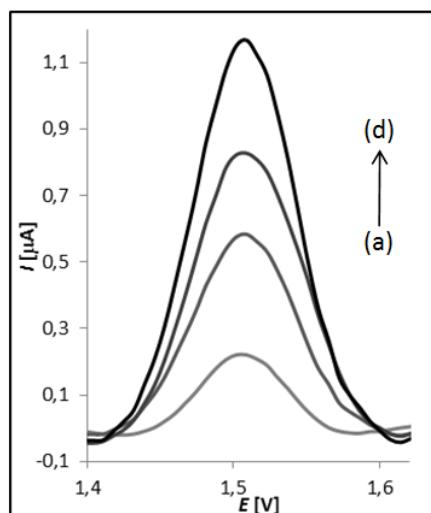
Preparat farmaceutyczny	Zawartość deklarowana [mg]	Zawartość obliczona [mg]	CV [%]	Odzysk [%]
Elektroda Hg(Ag)FE				
Viread	245.0	238.8 ± 14.1	6.8	97.5
Tenofovir disoproxil Teva	245.0	255.8 ± 14.3	6.4	104.4

Na podstawie otrzymanych wyników wnioskować można, iż metoda oparta na procesie redukcji przy użyciu elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra daje bardzo dobre wyniki oznaczania tenofowiru w preparatach farmaceutycznych (Schemat 6). Różne wartości odzysków dla dwóch preparatów farmaceutycznych (na Hg(Ag)FE) spowodowane były różnym składem pomocniczym tabletek. Oznaczanie TFV w lekach na elektrodzie GO/GC nie dało satysfakcjonujących wyników, co mogło być spowodowane obecnością interferentów w preparatach farmaceutycznych.



Schemat 6. Woltamperogramy uzyskane podczas analizy preparatów farmaceutycznych metodą dodatku wzorca po odjęciu ślepej próby na Hg(Ag)FE: (A) Viread, (B) Tenofovir disoproxil Teva; (a): próbka badana, (b) – (d): kolejne dodatki wzorca.

Kolejnym etapem badań było oznaczanie tenofowiru w próbkach moczu z dodatkiem analitu. Do nierozcieńczonych próbek moczu dodano analit uzyskując stężenia w zakresie $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ do $100.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, co jest zgodne z zawartością leku w moczu pacjentów leczonych tenofowirem¹⁹. Otrzymane wyniki na elektrodzie GO/GC przedstawiono w tabeli 5 i na Schemacie 7. Nie otrzymano satysfakcjonujących wyników podczas badania na elektrodzie amalgamatowej co było spowodowane zbyt dużym wpływem matrycy biologicznej zawierającej interferenty zakłócające sygnał TFW podczas procesu redukcji.



Schemat 7. Zestawienie woltamperogramów TFW uzyskanych na elektrodzie GO/GC podczas badania próbki moczu III z dodatkiem analitu metodą dodatku wzorca po odjęciu ślepej próby, (a): próbka moczu z dodatkiem analitu, (b) – (d): kolejne dodatki wzorca.

¹⁹ M. Simiele, C. Carcieri, A. De Nicolò, A. Ariaudo, M. Sciendra, A. Calcagno, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 114, 8-11.

Tabela 5. Wyniki oznaczania zawartości tenofowiru w próbkach moczu z dodatkiem analitu na elektrodzie z węgla szklistego modyfikowanej tlenkiem grafenu.

Próbka moczu	Stężenie dodane [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	Stężenie znalezione [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	CV [%]	Odzysk [%]
I	10.00	10.30 ± 0.86	9.5	103.0
II	50.00	47.73 ± 4.05	9.7	95.5
III	100.00	87.47 ± 7.56	8.9	97.5

4. Wnioski

Celem pracy było oznaczanie tenofowiru, w preparatach farmaceutycznych i próbkach moczu z dodatkiem analitu, z zastosowaniem dwóch elektrod roboczych: Hg(Ag)FE i GO/GC. Opracowana metodyka jest pierwszą elektrochemiczną, a zarazem jedną z najprostszych, najszybszych i najtańszych metod oznaczania tego związku. Na elektrodzie Hg(Ag)FE badano proces redukcji, a na drugiej elektrodzie GO/GC proces utlenienia tenofowiru. Można stwierdzić, że do oznaczania TFV w lekach odpowiednia jest metoda oparta na redukcji TFV na elektrodzie amalgamatowej. Natomiast, do oznaczania TFV w moczu z dodatkiem analitu nadaje się wyłącznie metoda oparta na procesie utlenienia tenofowiru na elektrodzie GO/GC. Interferująca w redukcji tenofowiru matryca biologiczna, całkowicie wyklucza zastosowanie elektrody amalgamatowej do analizy próbek moczu z dodatkiem analitu. Zależność natężenia prądu piku TFV od jego stężenia na elektrodzie węglowej modyfikowanej tlenkiem grafenu charakteryzuje się szerszym zakresem liniowym oraz niższymi wartościami granicy wykrywalności i oznaczalności w porównaniu z elektrodą amalgamatową. Elektroda srebrna z odnawialnym filmem amalgamatu srebra jest za to prostsza w przygotowaniu, a jednocześnie uznawana za mniej przyjazną środowisku, pomimo wykorzystania znikomych ilości rtęci (około 1 μL na 1000 pomiarów). Jednakże nie jest możliwe jednoznaczne określenie, która z badanych elektrod jest lepsza ponieważ na elektrodzie srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra możliwe jest oznaczanie TFV w preparatach farmaceutycznych, a na elektrodzie z węgla szklistego modyfikowanej tlenkiem grafenu – tenofowir w próbkach moczu z dodatkiem analitu.

Finansowanie badań: Dotacja celowa (B1611100001291.02) dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2016 r.

Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon

Adsorpcja kwasów 2,4-dichlorofenoksyoctowego i 4-chloro-2-metylofenoksyoctowego na granulowanym węglu aktywnym Filtrasorb 400

Marcin Purchała¹, Justyna Jonik¹, Henryk Grajek¹

¹ Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
Wydział Nowych Technologii i Chemii, Instytut Chemii,
ul. Kaliskiego 2, 01-476 Warszawa
marcin.purchala@wat.edu.pl

Abstract

The modern agriculture relies heavily on the use of fertilizers and chemicals for crop protection. However, the use of pesticides entails negative consequences, since even small amounts are harmful to humans, i.e. exhibit inter alia carcinogenic properties. Therefore their removal from drinking water is a very important and needed task. Among the methods for removing pesticides from water, adsorption on active carbon is the most widespread and effective manner. Filtrasorb 400 activated carbon is commercially used to remove the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) from water. The obtained results were described by the equations of adsorption connected with the Langmuir and Freundlich adsorption models. The effect of the initial amount of adsorbent on the adsorption efficacy and adsorption kinetics and equilibrium was tested. The results are described in the relevant theoretical models of adsorption. It has been found that the kinetics of adsorption of 2,4-D and MCPA was well described by the equation of the pseudo-second order model.

Streszczenie

Współczesne rolnictwo opiera się w dużej mierze na stosowaniu nawozów sztucznych i środków chemicznych do ochrony roślin uprawnych. Jednak zastosowanie pestycydów niesie za sobą negatywne skutki, ponieważ nawet w niewielkich ilościach są one szkodliwe dla człowieka, wykazują m.in. właściwości rakotwórcze, zatem ich usuwanie z wody pitnej jest zadaniem bardzo istotnym i pożądanym. Spośród sposobów usuwania pestycydów z wody, adsorpcja na węglu aktywnym, jest najbardziej rozpowszechniona i skuteczna.

W pracy zostały zbadane właściwości adsorpcyjne komercyjnie dostępnego, granulowanego węgla aktywnego Filtrasorb 400 do usuwania kwasów 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i 4-chloro-2-metylofenoksyoctowego (MCPA) z wody. Zbadano wpływ ilości początkowej adsorbentu na skuteczność adsorpcji oraz kinetykę adsorpcji. Uzyskane wyniki zostały opisane równaniami adsorpcji odpowiadającymi modelom adsorpcji Langmuira i Freundlicha. Stwierdzono, że kinetyka adsorpcji kwasu 2,4-D i MCPA była dobrze opisywana przez równanie modelu pseudo drugiego rzędu.

1. Introduction

The population growth and related demand for food cause that people have to look for more effective ways of the food production. The result of that is an increase of demand for plant protection products, which after use accumulate in the environment. Because of that, environmental legislation and monitoring of pollution are very strict and have an impact on the agricultural industry. Therefore the researchers are inspired to develop methods of analysis and disposal of plant protection products from environment.

Pesticides (from the Latin: *pestis* – plague, swine; *caedo* – kill) belong to a group of plant protection products. In general, the pesticide is defined as a mixture of chemical compounds, which are biologically active, antimicrobial and disinfectant. They are also defined as agents that are used for the selective removing of pests, which hindering the production, processing, storage, transport, sales of food¹.

The most common plant protection products are 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA). They are the first organic herbicides, which have a selective action. They have the ability to form complexes with heavy metals such as copper, cobalt, mercury, lead and cadmium, which is causing additional environmental hazard^{2, 3}.

It is commonly known, that activated carbon is the most widely used adsorbent for removing organic compounds from gas and liquid phases. Adsorption on activated carbon is also recommended by the US Environmental Protection Agency as the convenient technology for the removal of non-biodegradable toxic substances from drinking water and wastewater. This is due to the high mechanical stability, low specificity, rapid adsorption kinetics and relatively high sorption capacity of activated carbons. The method of sorption on activated carbon permits the selective removal of substances of low concentrations. Life-threatening organic pollutants, such as pesticides, aliphatic and aromatic hydrocarbons, detergents, heavy metals, phenols and its derivatives, carcinogens and others⁴.

There are a lot of research results for the adsorption of 2,4-D and MCPA on various types of activated carbons such as Filtrasorb 400 (F-400)⁵, the carbonaceous adsorbents⁶, GAC⁷, CAC F-200⁸, activated carbons prepared on the basis of palm leaves⁹, activated carbon fibers¹⁰, activated carbon Sorbo Norit and Ceca AC

¹ K.Y. Foo, B.H. Hameed, *J. Hazard. Mater.*, **2010**, 175, 1-11

² I. Mrzyk, *Ocena toksykologiczna kwasu 2,4-dichlorofnoksyoctowego i 4-chloro-2-metylofenoksyoctowego*, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marciniaka – rozprawa doktorska, Poznań, **2011**

³ K. Sitarek, *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, **2004**, 1, 65-89

⁴ Report EPA-540/2-91/024, Granular Activated Carbon Treatment, US Environmental Protection Agency, US Government Printing Office, Washington DC, **1991**

⁵ T.Y. Kim, S.S. Park, S.J. Kim, S.Y. Cho, *Adsorption*, **2008**, 14, 611-619

⁶ V.K. Gupta, I.A. Suhas, V.K. Saini, *J. Colloid Interface Sci.*, **2006**, 299, 556-563

⁷ J.M. Salman, B.H. Hameed, *Desalination*, **2010**, 256, 129-135

⁸ J.M. Salman, A.L. Ahmad, B.H. Hameed, Proceedings of 2nd USM Penang International Postgraduate Convention (ICYC 2008), Malaysia, **2008**

⁹ J.M. Salman, B.H. Hameed, V.O. Njokua, *Chem. Eng. J.*, **2011**, 174, 33-40

¹⁰ J. Wang, H. Feng, H. Yu, *J. Hazard. Mater.*, **2007**, 144, 200-207

40¹¹ and activated carbon NP-5¹¹. The vast number of publications concerns the study of 2,4-D⁵⁻¹⁰, which is most likely due to its much lower price in comparison with MCPA^{5, 11, 12}.

In this paper the methods of disposal of pesticides and techniques of their adsorption on activated carbon are briefly presented. The literature studies concerning the challenges and prospects for the pesticides applications are presented in order to familiarize with the subject of adsorptive disposal of pesticides.

2. Experimental sections

2.1 Reagents and apparatus

98% 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and >99% 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) manufactured by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) were used. We also used acetonitrile (Acros Organics, New Jersey, USA) and acetic acid (Chempur Piekary Silesia, Poland) with a purity of 99.5% and granular activated carbon Filtrasorb 400 (F400) Chemviron (Feluy, Belgium) with a surface area of about 997 m²/g¹³. Prior the use, the activated carbon was dried at a temperature of 130°C and stored in a desiccator.

To determine the adsorption isotherms we used liquid chromatograph SHIMADZU LC-MS 2010 equipped with a UV-VIS detector diode array. The analyzed compounds were separated on the Luna C18 (150 x 4.6 mm, 3 µm) chromatographic column from Phenomenex (Kyoto, Japan). We also used the CP-505 pH meter with combined glass electrode (Elmetron, Zabrze, Poland) and laboratory shaker WL-972 (JW Electronic, Poland). We used the following conditions: isocratic elution method with mobile phase 70% ACN/30% buffer H₂O/CH₃COOH, pH = 3, the flow rate of the mobile phase equal to 0.7 cm³/min, analytical wavelength λ_{2,4-D} = 283 nm and λ_{MCPA} = 278 nm to obtain satisfactory results of separation of the analyzed mixture.

3. Results and discussion

3.1 The adsorption of 2,4-D and MCPA on activated carbon - equilibrium adsorption of mixtures of pesticides 2,4-D and MCPA

The first stage of the study was to investigate the effectiveness of the adsorption process of mixtures of pesticides 2,4-D and MCPA on the activated carbon. We prepared the following mixtures of adsorbates: 0% of 2,4-D and 100% of MCPA, 25% of 2,4-D and 75% of MCPA, 50% of 2,4-D and 50% of MCPA, 75% of 2,4-D and 25% of MCPA, 100% of 2,4-D and 0% of MCPA, respectively with total concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol/dm³ in Erlenmeyer flasks. These solutions, additionally containing 30 mg of activated carbon, were shaken for 6 hours and

¹¹ R. Ocampo-Pérez, M. Mahmoud, A. Daiem, J. Rivera-Utrilla, J.D. Méndez-Díaz, M. Sánchez-Polo, *J. Colloid Interface Sci.*, **2012**, 385, 174-182

¹² K. Ignatowicz-Owsieniuk, I. Skoczko, *Pol. J. Environ. Stud.*, **2002**, 4, 339-344

¹³ S. Biniak, A. Deryło-Marczewska, A. Świątkowski, G. Trykowski, Analysis of the influence of adsorbate and adsorbent properties on adsorption of aromatics from aqueous solutions on the modified activated carbons, The International Conference on Carbon 16-21.07.2006, Aberdeen, 3P134, p. 320

Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon

analyzed using chromatograph. Using the concentrations, the initial and the steady-state, amounts of pesticides adsorbed onto the activated carbon surface were determined.

$$q_e = (C_0 - C_e) \cdot V / m \quad (1)$$

q_e – adsorption capacity [mmol/g], C_0 – initial concentration [mmol/dm³], C_e – steady-state concentration [mmol/dm³], V – volume of the solution [cm³], m – weight of used activated carbon [g].

The adsorption isotherms of analyzed pesticides as a function $y = f(C_e)$ are presented in Figures 1 and 2.

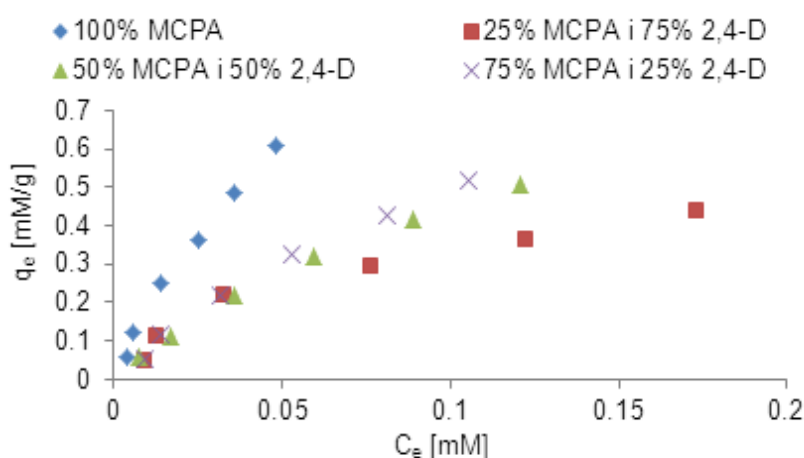


Figure 1. The adsorption isotherms of the pure MCPA and the binary mixtures containing, respectively, 25% of MCPA and 75% of 2,4-D, 50% of MCPA and 50% of 2,4-D, 75% of MCPA and 25% of 2,4-D on activated carbon F400.

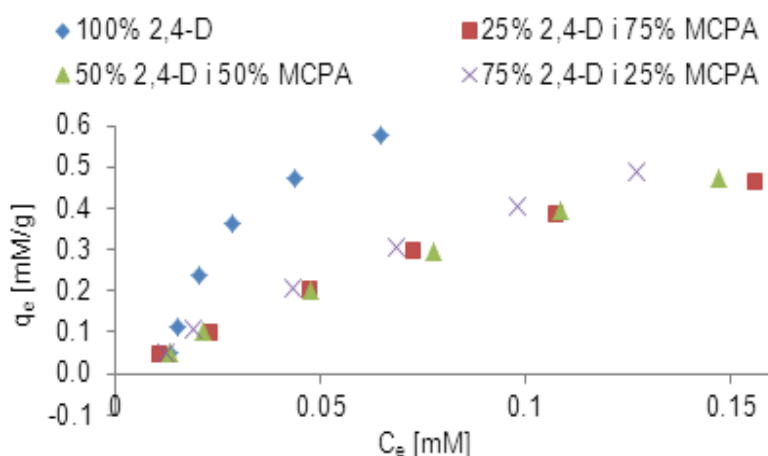


Figure 2. The adsorption isotherms of the pure 2,4-D and the binary mixtures containing, respectively, 25% of 2,4-D and 75% of MCPA, 50% of 2,4-D and 50% of MCPA, 75% of 2,4-D and 25% of MCPA on activated carbon F400.

We used the equations of the Langmuir and Freundlich model for the mathematical description of the obtained isotherms. The Langmuir adsorption model assumes that the adsorbed substance can form monolayer surface of molecules interacting with the adsorption centers. In linear Langmuir isotherm equation (Equation 2) b is a constant of the equation and q_m is the maximum adsorption capacity [mmol/g].

The Freundlich adsorption model is used for the description of the adsorption at energetically heterogeneous and microporous adsorbents. In linear Freundlich isotherm equation (Equation 3) K_F is a constant of the equation and $1/n$ is the exponent of the equation.

$$1/q_e = 1/b \cdot q_m \cdot 1/C_e + 1/q_m \quad (2)$$

$$\ln q_e = \ln K_F + 1/n \cdot \ln C_e \quad (3)$$

The parameters of the Langmuir and the Freundlich isotherms were determined on the base of the Equations 2 and 3. The Langmuir and the Freundlich isotherms for the tested mixtures are shown in Figures 3-6.

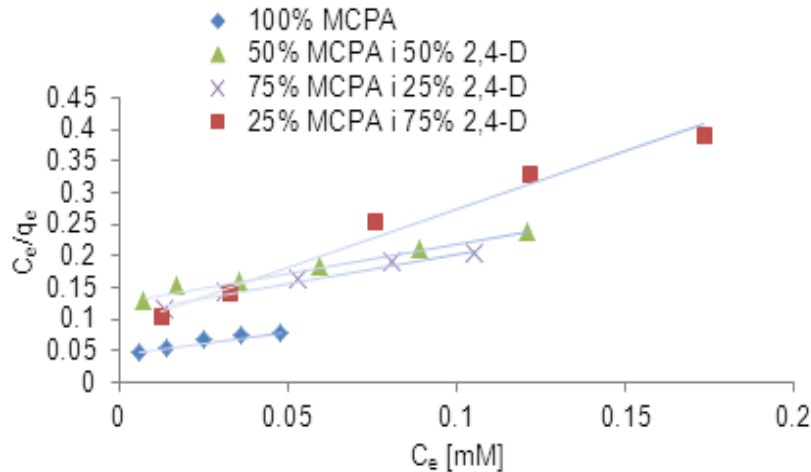
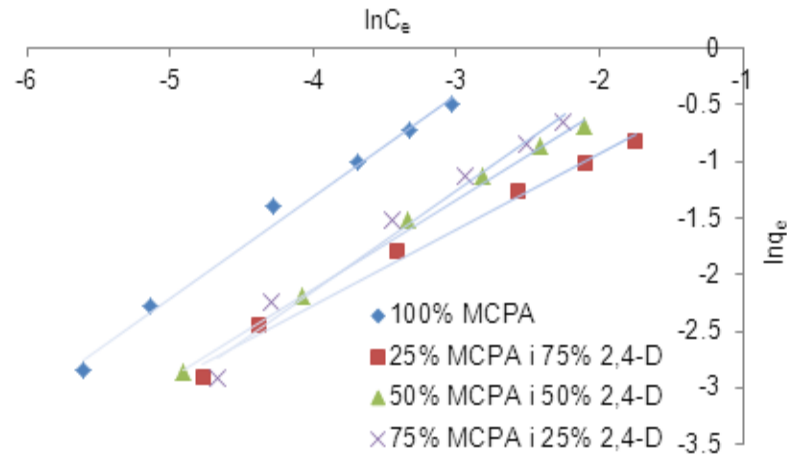


Figure 3. The Langmuir adsorption isotherms of pure MCPA and binary mixtures containing, respectively, 25% of MCPA and 75% of 2,4-D, 50% of MCPA and 50% of 2,4-D, 75% of MCPA and 25% of 2,4-D on activated carbon F400.



Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon

Figure 4. The Freundlich adsorption isotherms of pure MCPA and binary mixtures containing, respectively, 25% of MCPA and 75% of 2,4-D, 50% of MCPA and 50% of 2,4-D, 75% of MCPA and 25% of 2,4-D on activated carbon F400.

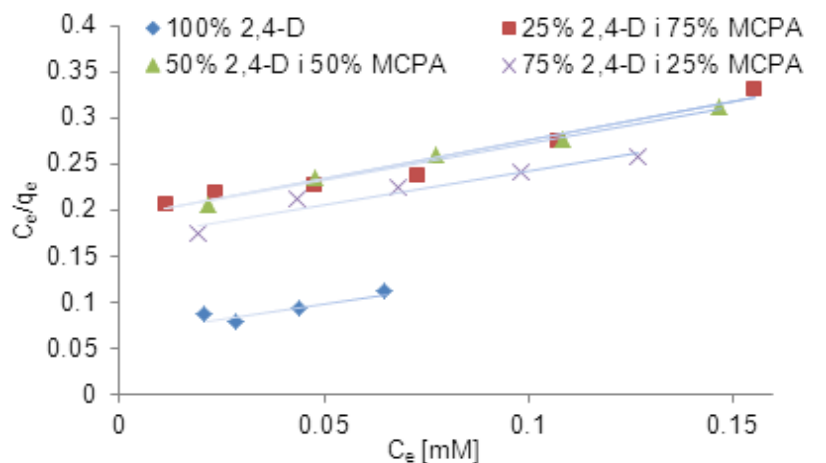


Figure 5. The Langmuir adsorption isotherms of pure 2,4-D and binary mixtures containing, respectively, 25% of 2,4-D and 75% of MCPA, 50% of 2,4-D and 50% of MCPA, 75% of 2,4-D and 25% of MCPA on activated carbon F400.

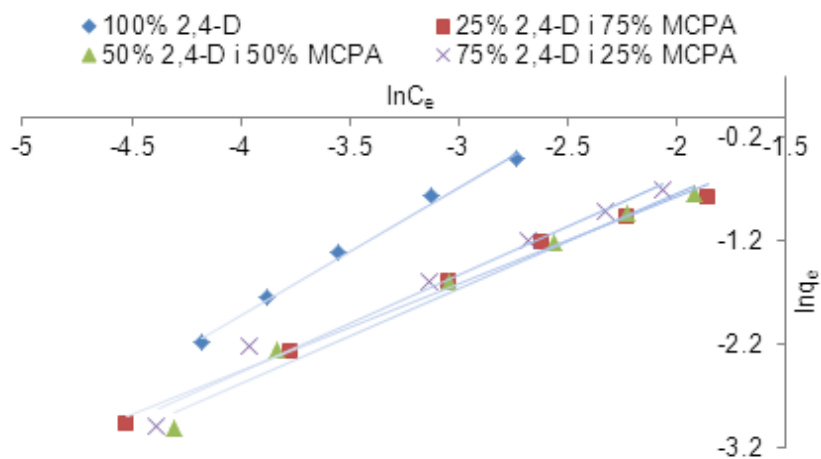


Figure 6. The Freundlich adsorption isotherms of pure 2,4-D and binary mixtures containing, respectively, 25% of 2,4-D and 75% of MCPA, 50% of 2,4-D and 50% of MCPA, 75% of 2,4-D and 25% of MCPA on activated carbon F400.

The results of the aforementioned calculations are collated in Table 1.

Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon

Table 1. The parameters of the Langmuir and the Freundlich isotherms, which characterizing the adsorption of mixtures of pesticides 2,4-D and MCPA on activated carbon.

	Langmuir		Freundlich	
	2,4-D	MCPA	2,4-D	MCPA
100% 2,4-D 0% MCPA	$q_m = 15.152$ $b = 0.099$ $R^2 = 0.822$	-	$K_F = 3.456$ $n = 0.641$ $R^2 = 0.994$	-
75% 2,4-D 25% MCPA	$q_m = 5.882$ $b = 0.233$ $R^2 = 0.940$	$q_m = 10.753$ $b = 0.051$ $R^2 = 0.978$	$K_F = 2.537$ $n = 0.781$ $R^2 = 0.977$	$K_F = 1.952$ $n = 2.342$ $R^2 = 0.990$
50% 2,4-D 50% MCPA	$q_m = 5.263$ $b = 0.237$ $R^2 = 0.987$	$q_m = 7.752$ $b = 0.140$ $R^2 = 0.985$	$K_F = 2.499$ $n = 0.906$ $R^2 = 0.980$	$K_F = 2.203$ $n = 0.953$ $R^2 = 0.996$
25% 2,4-D 75% MCPA	$q_m = 5.181$ $b = 0.231$ $R^2 = 0.958$	$q_m = 9.091$ $b = 0.119$ $R^2 = 0.977$	$K_F = 2.326$ $n = 1.080$ $R^2 = 0.991$	$K_F = 2.435$ $n = 0.698$ $R^2 = 0.977$
0% 2,4-D 100% MCPA	-	$q_m = 22.222$ $b = 0.059$ $R^2 = 0.949$	-	$K_F = 2.452$ $n = 0.437$ $R^2 = 0.990$

Based on the aforesaid calculations, it was found that the adsorption of pesticides on activated carbon is better described by the Freundlich isotherm equation. The knowledge of the value of the constant K_F of Freundlich equation allows to determine the sorption capacity of the activated carbon at the steady-state concentration. On the basis of the value of the exponent of equation $1/n$ it is possible to estimate the energy of adsorption of the analyte from the aqueous phase to the activated carbon surface. Analyzing the set of parameters collated in Table 1, the coefficient K_F for solution 100% of 2,4-D are greater than the solution 100% of MCPA and are respectively 3.456 and 2.452 $[((\text{mmol/g}) \cdot (\text{dm}^3/\text{mmol}))^{1/n}]$. This demonstrates the greater adsorption of the pesticide 2,4-D on the F-400 activated carbon in comparison to the MCPA.

3.2 The kinetics of the adsorption of pesticides 2,4-D and MCPA on activated carbon

The kinetics of the adsorption was tested at an initial concentration (0.25 mmol/dm^3) of solutions of 2,4-D and MCPA on 30 mg of activated carbon. The chromatographic analysis was performed after 0h, 0.5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h of the process. In Figure 7 the amount of adsorbed pesticides, calculated by dividing the analyte concentration at the moment (C_T) to the initial concentration (C_0) as a function of adsorption time, was depicted.

From the plot C_T/C_0 versus time the adsorption equilibrium set after approximately 6 hours. At this time, it was adsorbed ca. 80% of 2,4-D and ca. 83% of MCPA (see Figure 7).

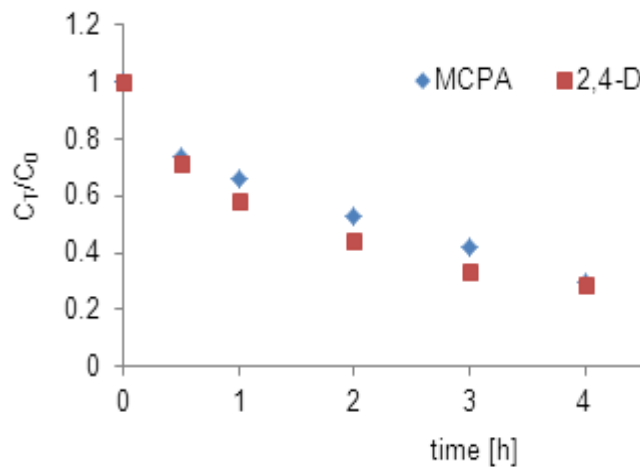


Figure 7. Variations in the ratio C_T/C_0 as a function of time.

The relationship between the amount of adsorbed pesticides and the time of adsorption were the basis for mathematical analysis of the adsorption kinetics. For this purpose, we used the kinetic equations of pseudo-first and -second order, which allowed to determine the constants of rate of the process. The model pseudo-first order is given by Equation 4, where q_e is the amount of pesticide adsorbed in steady-state conditions [mmol/g], q_t is the amount of pesticide adsorbed at time [mmol/g], k_1 is a constant of rate of the adsorption [1/h] and t is the time of adsorption [h]. The pseudo-second order model is described by the Equation 5, where k_2 is the constant of the rate of the adsorption [g/mmol*h].

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - k_1/2,303 \cdot t \quad (4)$$

$$t/q_t = 1/k_2 \cdot q_e^2 + 1/q_e \cdot t \quad (5)$$

We used graphs of $\log(q_e - q_t) = f(t)$ and $t/q_t = f(t)$ in order to determine the rate constants, k_1 and k_2 , they are shown in Figures 8 and 9, respectively.

Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids on Filtrasorb 400 granular activated carbon

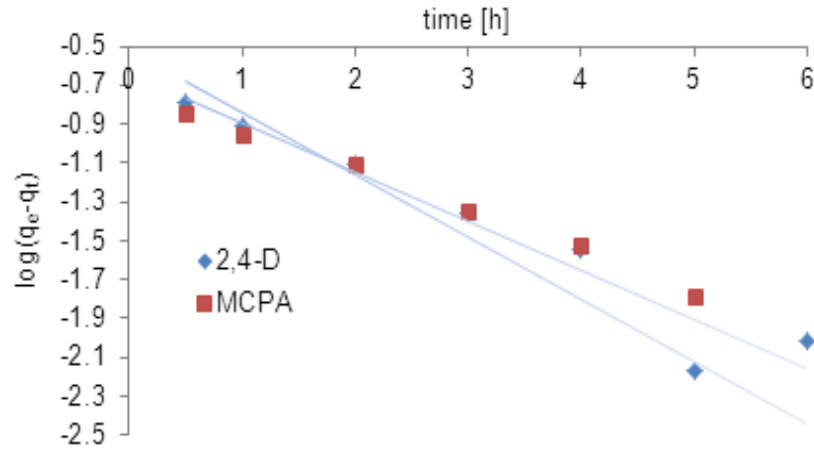


Figure 8. The plots for pseudo-first order kinetics in the dependency $\log(q_e - q_t) = f(t)$ describing the adsorption of 2,4-D and MCPA on activated carbon F400.

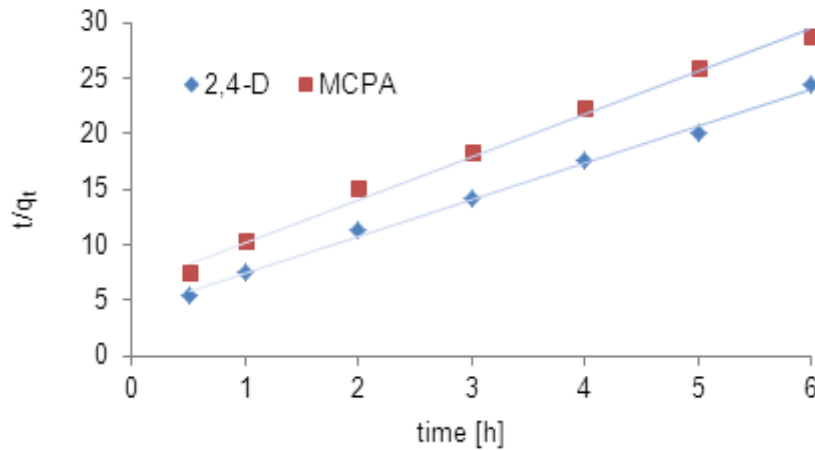


Figure 9. The plots for pseudo-second order kinetics in the dependency $\log(q_e - q_t) = f(t)$ describing the adsorption of 2,4-D and MCPA on activated carbon F400.

Using the coefficients a and b determined by the least squares method for the function $\log(q_e - q_t) = f(t)$ we calculated rate constant k_1 of the process, and for the relation $t/q_t = f(t)$ we calculated rate constant k_2 of the process. The calculated kinetic parameters and obtained the values of squares linear correlation coefficients for the analyzed pesticides are presented in Table 2.

Table 2. The kinetic parameters describing the kinetics of adsorption of 2,4-D and MCPA on activated carbon.

Kinetics model	Coefficient	2,4-D	MCPA
pseudo-first order	k_1	0.587	0.702
	R_1^2	0.952	0.859
pseudo-second order	k_2	3.661	3.499
	R_2^2	0.996	0.992

It was observed that the kinetics of the adsorption of pesticides 2,4-D and MCPA on activated carbon was pseudo-second order. This fact was confirmed by the high values of the linear correlation coefficients ($R_2 > 0.992$) obtained in the calculations. The largest value of the adsorption rate constant was obtained for the pesticide 2,4-D (3.661g/mmol*h, compared to 3.499 for MCPA).

4. Conclusions

Based on an analysis of the literature data concerning the adsorption of organochlorine pesticides and studies on the kinetics of the adsorption and steady-state adsorption of 2,4-D and MCPA it can be concluded that activated carbon F-400 is a very good adsorbent for the removal of organochlorine herbicides 2,4-D and MCPA from water. It is also observed that adsorption increased with the increase of the initial amount of adsorbent and the steady-state adsorption was achieved after about 6 hours for the two adsorbates used. The kinetics of the adsorption proceeded in accordance with the model pseudo-second order. The kinetic rates for MCPA are higher in comparison with the 2,4-D, and they are equal to 3.661 and 3.499 [g/mmol*h], respectively. At the steady-state conditions 2,4-D is better adsorbed than MCPA. The adsorption of pesticides on activated carbon can be better described by the Freundlich equation, regarding the higher values of correlation coefficients R_2 .

Development of method for the determination of chlorophenols using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection

Opracowanie metody oznaczania chlorofenoli techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w nadfiolecie

Marcin Purchała¹, Justyna Jonik¹, Henryk Grajek¹

¹ Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
Wydział Nowych Technologii i Chemii, Instytut Chemii,
ul. Kaliskiego 2, 01-476 Warszawa
marcin.purchala@wat.edu.pl

Abstract

Chlorophenols have a significant influence on environment. They leak into the groundwater with wastewater from chemical industry. The toxicity of chlorophenols depends on the pH, availability of oxygen, temperature, presence of other inorganic and organic substances as well as the molecular structure of these compounds, i.e. the number of chlorine atoms and their position in the molecule. In this work we made an attempt to develop an analytical method allowing simultaneous detection and determination of mono- and dichlorophenols by means of high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. The implementation of the objective was carried out in three stages: the first stage of the study was the choice of wavelength, then the selection of the optimum chromatographic conditions (the concentration of organic solvent in the mobile phase, pH), and at the end the calibration and the validation of method.

Streszczenie

Chlorofenole stanowią duże zagrożenie dla środowiska naturalnego. Przedostają się one do wód gruntowych wraz ze ściekami z przemysłu chemicznego. Stopień toksyczności chlorofenoli zależy od pH środowiska, dostępności tlenu, temperatury, obecności innych substancji interferujących (organicznych i nieorganicznych), jak również od budowy cząsteczek tych związków – liczby atomów chloru i ich pozycji w cząsteczce. Opracowano metodę analityczną pozwalającą na równoczesne wykrywanie i oznaczanie mono- i dichlorofenoli techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w nadfiolecie. Oznaczenia prowadzono w trzech etapach: pierwszym etapem był wybór optymalnej analitycznej długości fali, następnie dobór optymalnych warunków chromatograficznych (stężenie rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, pH) i kalibracja oraz walidacja metody.

1. Introduction

Chlorophenols are the derivatives of phenol, in its structure one or more atoms of hydrogen are replaced by chlorine. There are five groups of derivatives of phenols, which means monochlorophenols, dichlorophenols, trichlorophenols, tetrachlorophenols and pentachlorophenol. Usually chlorophenols occur in the environment as a result of radical reactions¹.

As it is commonly known chlorophenols belong to a group of compounds, which have a negative impact on the environment. They occur during water disinfection and in the technological processes, in which phenol's compounds and chlorine are used². They penetrate the atmosphere during the combustion of the waste, the water with the waste water industry and the soil while using pesticides³. US Environmental Protection Agency and the European Union qualified chlorophenols for a priority list of environmental pollutants. Due to their high toxicity and increasing release into the environment it is necessary to control them^{4,5}. The process of occurrence of chlorophenols has to be controlled by using of instrumental methods of analysis with detection and determination trace amounts of these compounds^{6, 7, 8, 9, 10}.

The aim of the study is to analyze chlorophenols by employing high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and the development of an accurate and precise analytical method.

2. Experimental sections

2.1 Reagents and apparatus

During the analysis, we used 99.5% phenol, >99% 2-chlorophenol (2-CP), 98% 3-chlorophenol (CP-3), 99% 4-chlorophenol (4-CP), 98% 2,3-dichlorophenol (2,3-CP), 99% 2,4-dichlorophenol (2,4-CP), 98% 2,5-dichlorophenol (2,5-CP), 99% 2,6-dichlorophenol (2,6-CP) manufactured by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

For the HPLC assay we used acetonitrile (ACN) (Acros Organics, New Jersey, USA) and acetic acid (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) with a purity of 99.5%.

For the qualitative and quantitative analysis of chlorophenols we used liquid chromatograph SHIMADZU LC-MS equipped with a 2010 UV-VIS diode array detector (DAD). Analyzed compounds were separated on the Luna C18 (150 x 4.6

¹ R. Jae-Young, *Chemosphere*, **2008**, 71, 1100-1109

² E.M. Fiss, K.L. Rule, P.J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 2387-2394

³ P. Larson, K. Lemkemeier, *Water Res.*, **1989**, 23, 1081-1085

⁴ M. Czaplicka, *Sci. Total Environ.*, **2004**, 322, 21-39

⁵ S. Larsen, H.V. Hendriksen, B.K. Ahring, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1991**, 57, 2085-2090

⁶ B.J. Alloway, D.C. Ayers, *Chemiczne podstawy zanieczyszczania środowiska*; PWN, Warszawa, **1999**

⁷ U. Dmitruk, E. Zbieć, J. Dojlido, *Ochr. Środ.*, **2006**, 3, 25-27

⁸ E. Szczepaniec-Cięciak, P. Kościelniak, *Chemia Środowiska*; Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, **1999**

⁹ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th. ed. APHA, AWWA, WEF, Washington, **1998**

¹⁰ A. Dąbrowska, J. Nawrocki, *Monografie PZITS, Seria: Wodociągi i Kanalizacja* nr 9, Warszawa, **2002**

mm, 3 μm) chromatographic column from Phenomenex (Kyoto, Japan). We also used the CP-505 pH meter with combined glass electrode (Elmetron, Zabrze, Poland) and a spectrophotometer.

2.2 The choice of the analytical wavelength

In order to determine the analytical wavelength λ of the test compounds we introduced 20 ml of the original analyte with concentration of 10 mmol/dm³ into glass flasks with a volume of 5 cm³ and it was supplemented with distilled water. Thus prepared, each compound was transferred to the cuvette and assayed spectrophotometrically with water as a reference solution. The analytical wavelength of each analyte was, respectively, $\lambda_{\text{phenol}} = 269 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-2}} = 273 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-3}} = 274 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-4}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-2,3}} = 276 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-2,4}} = 284 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{CP-2,5}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{2,6-CP}} = 280 \text{ nm}$. It was possible to carry out an analysis at several wavelengths simultaneously by using the diode array detector¹¹.

2.3 Selection of the optimal chromatographic conditions

In order to choose the optimal chromatographic conditions, we conducted the study, whose aim was to determine the effect of pH and concentration of the mobile phase on the retention factor k' and resolution R_s . For this purpose, we prepared a mixture of aqueous phenol and chlorophenols at a concentration of 0.2 mmol/dm³, which was analyzed by chromatograph using different concentrations of ACN in a mobile phase at different pH values¹².

3. Results and discussion

3.1 Influence of the content of ACN in mobile phase

In a first step, we analyzed the effect of different concentrations of ACN in the mobile phase in the range of 30 to 50%. We observed the height and the resolution of the peaks and their retention times. Test compounds were carried out using an isocratic elution method, mobile phase's flow rate equal to 1 cm³/min and a column's temperature $T_K = 40^\circ\text{C}$. The second component of the mobile phase (except ACN), was a buffer of water/acetic acid at pH = 3.

The values of resolution of peaks show a decreasing trend when the concentration of ACN increased in the mobile phase, which shows that the peaks are poorly separated to each other.

¹¹ W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*; PWN, Warszawa, **1999**

¹² Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, **2011**

Development of method for the determination of chlorophenols using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection

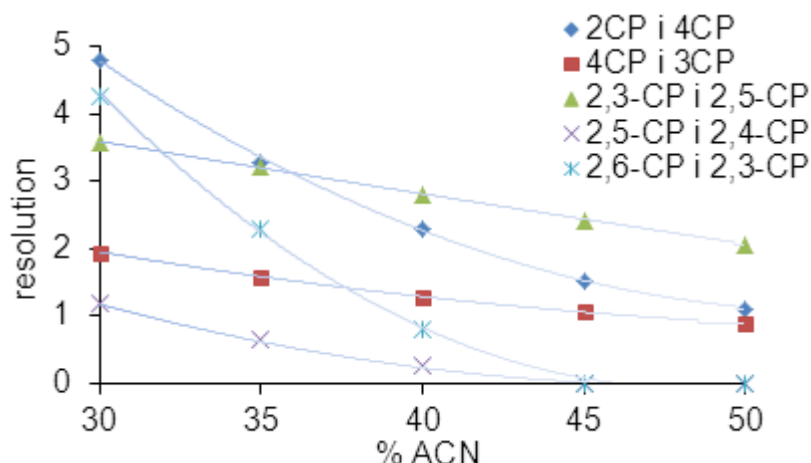


Figure 1. Variation of the resolution values as a function of the concentration of ACN for chlorophenols.

The highest values of resolution of chlorophenols were achieved at 30% of ACN (see Figure 1). The resolution of the peaks for 2,5-CP and 2,4-CP was less than 1.5.

With the increase of the initial concentration of ACN in the mobile phase, the retention factor of analyzed phenol and monochlorophenols has tended to decrease (see Figure 2). A similar situation occurs in the case of dichlorophenols (see Figure 3). At a concentration 30% of ACN in the mobile phase 2,4-CP achieves the highest retention.

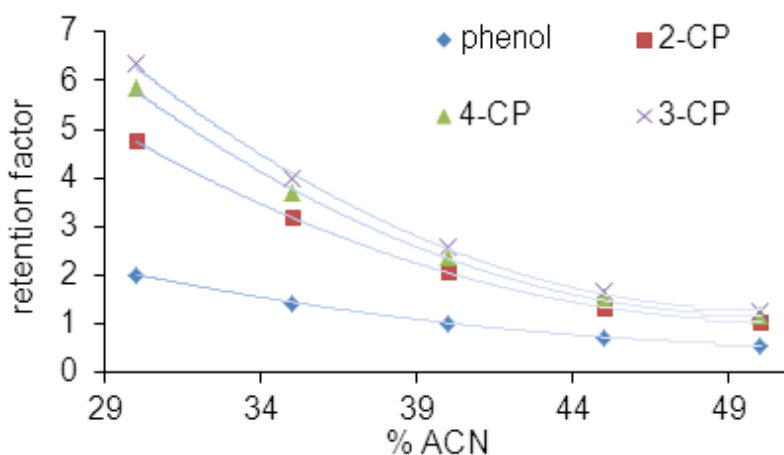


Figure 2. Variation of the retention factor as a function of concentration of ACN for phenol and monochlorophenols.

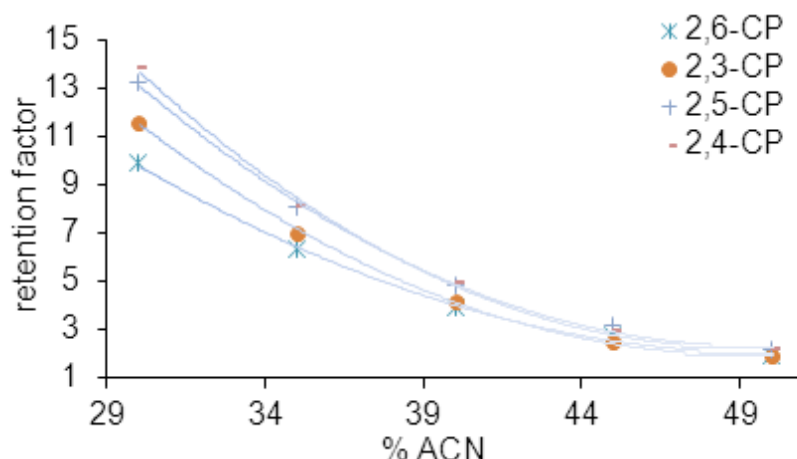


Figure 3. Variation of the retention factor as a function of concentration of ACN for dichlorophenols.

Analysing the Figures 1-3, the most preferred, for further investigation, was the initial concentration of ACN equal to 30%.

3.2 Influence of pH of mobile phase

The pH of the mobile phase is a very important parameter for the chromatographic process. A 30% solution of ACN and a buffer solutions of $2.2 < \text{pH} < 3.5$ at temperature of 40°C and a flow-rate equal to $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ were employed.

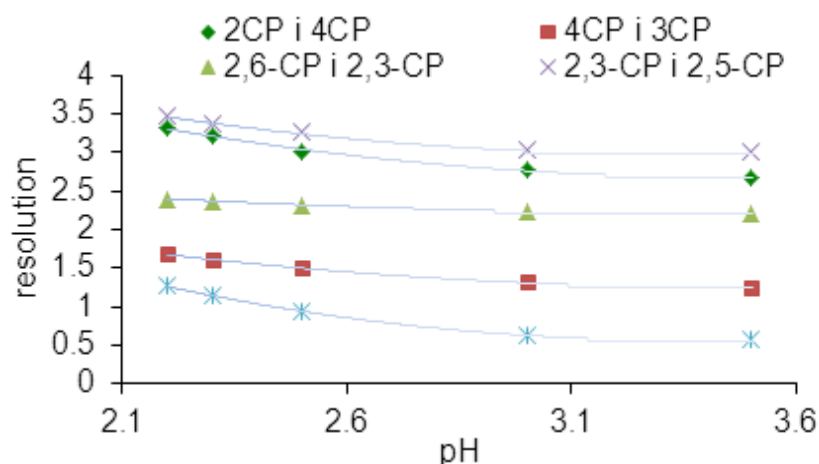


Figure 4. Variation of the resolution as a function of pH for dichlorophenols.

With increasing the pH values to 3 the resolution of monochlorophenols showed a decreasing tendency, whereas at the $\text{pH} = 3.5$ the increase is very mild. Further increasing of the pH values do not introduce significant changes to the resolution. At $\text{pH} = 2.2$, we can see that the value of R_s increased to 1.27. At these conditions the base line was reached between the peaks. For $2.2 < \text{pH} < 3.5$ there was no observed changes in the separation of 2,3-CP and 2,6-CP; resolution's value was in the range 2.0-2.5 (see Figure 5).

The retention coefficient values of phenol and chlorophenols decrease with increasing the pH values (see Figure 6).

Peaks with low retention are generally poorly separated, but with the high retention they are blurry and they have a bad resolution. The optimal values of retention coefficients are in the range of 1 to 10. On the basis of analysis of the above graphs it can be concluded that the best resolutions obtained in the case of the mobile phase's pH equal to 2.2.

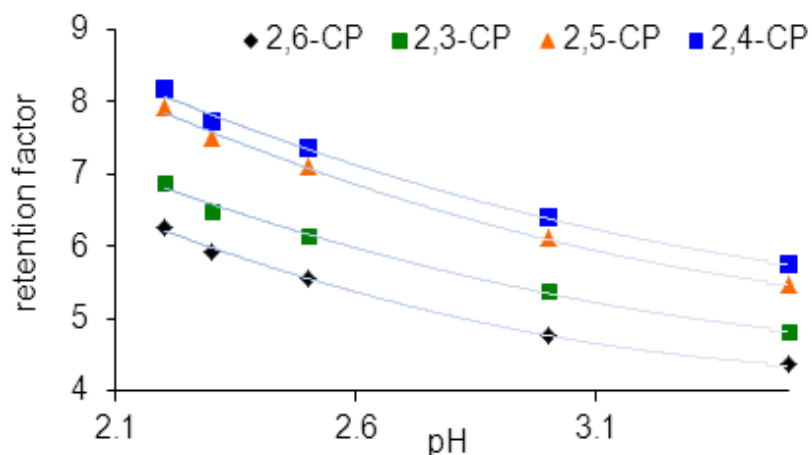


Figure 5. Variations of the retention factors as a function pH for dichlorophenols.

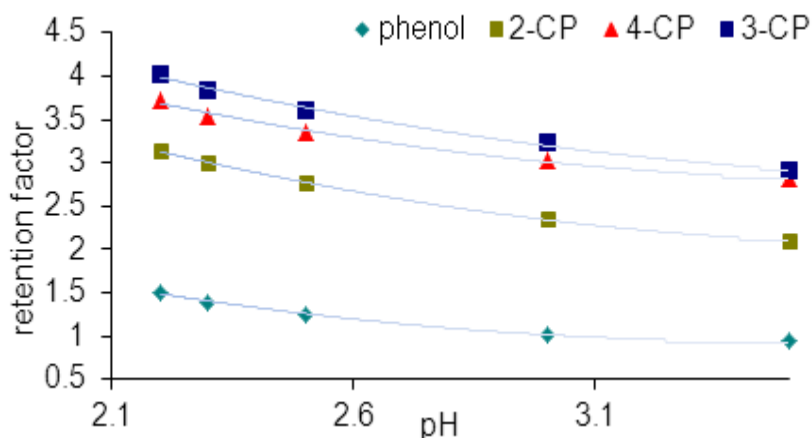


Figure 6. Variation of the retention factor as a function of pH for phenol and monochlorophenols.

We used the following chromatographic conditions: isocratic elution method with mobile phase 30% ACN/70% buffer $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$, the pH value of mobile phase was equal to 2.2, $\lambda = 269\text{--}284\text{ nm}$, $T_K = 40^\circ\text{C}$ and $F = 1\text{ cm}^3/\text{min}$ during the studies. We obtained narrow, symmetrical peaks and good resolution using the above chromatographic conditions. The chromatographic conditions enabled the best separation of the mixtures components analyzed.

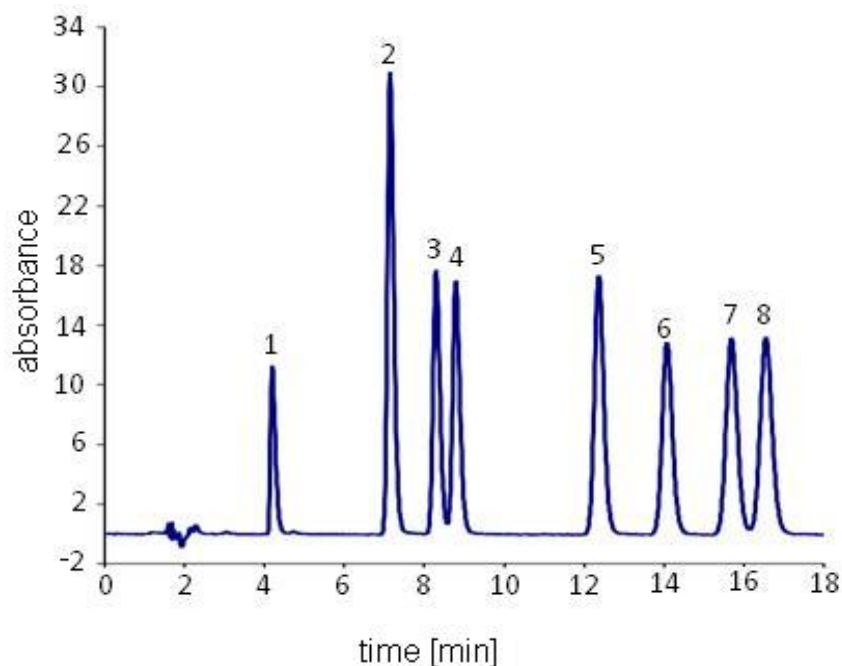


Figure 7. The chromatogram of the mixture of analyzed chlorophenols; peaks: 1: phenol, 2: 2-CP, 3: 4-CP, 4: 3-CP, 5: 2,6-CP, 6: 2,3-CP, 7: 2,5-CP, 8: 2,4-CP.

3.3 The calibration and the validation of our method

The calibration plot was used for the description of the accuracy of the method employed. The accuracy of the analytical method was statistically rated using the recovery. The precision of the method was characterized by the standard deviation, the relative standard deviation (RSD) and the confidence interval¹³. In order to check the linearity of the detector we made calibration plots for phenol and chlorophenols. For this purpose, to the glass flasks with a capacity of 5 cm³ we introduced appropriate volumes of standard solutions of analytes to give a final concentration on the straight: 0.005; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 and 1 mmol/dm³. The flask was brought up to volume with methanol and then the flask's content was analyzed by chromatograph. Three repetitions for each concentration value were done. The results of the calibration and validation are presented in Tables 1 and 2, prepared on the basis of calibration plots.

To determine the values of the limits of detection (LOD) and the limits of quantitation (LOQ) we prepared mixture of eight analytes at a concentration of 0.1 mmol/cm³, which was then successively diluted and analyzed chromatographically. Finally, the detection limit for monochlorophenols was equal to 0.001 mmol/cm³, while for phenol and dichlorophenols it was equal to 0.002 mmol/cm³. The limit of quantification for all analyzed compounds was equal to 0.005 mmol/cm³¹².

¹³ R. Gąsior, *Wiadomości Zootechniczne*, **2001**, R. XLV, 3, 55-60

Development of method for the determination of chlorophenols using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection

Table 1. The results of the calibration and the validation for 1: phenol, $R^2=0.998$; 2: 2-CP, $R^2=0.998$; 3: 3-CP, $R^2=0.999$; 4: 4-CP, $R^2=0.999$.

1

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	9,52	107,01
0,05	0.050 ± 0.001	0	99,88
0,1	0.099 ± 0.007	7,98	99,37
0,25	0.233 ± 0.002	0,93	93,15
0,5	0.521 ± 0.009	1,8	104,26
0,75	0.757 ± 0.035	4,62	100,93
1	0.988 ± 0.075	7,51	98,81

2

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.003	7,69	102,39
0,05	0.046 ± 0.001	8,31	92,83
0,1	0.098 ± 0.009	9,55	98,46
0,25	0.245 ± 0.011	4,72	98,02
0,5	0.508 ± 0.013	2,7	101,6
0,75	0.727 ± 0.025	3,41	96,95
1	1.009 ± 0.023	2,34	100,92

3

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	7,53	98,71
0,05	0.052 ± 0.003	5,24	104,29
0,1	0.103 ± 0.009	8,84	103
0,25	0.251 ± 0.013	5,08	100,42
0,5	0.520 ± 0.015	2,8	104,03
0,75	0.744 ± 0.027	3,67	99,22
1	1.002 ± 0.006	0,64	100,23

4

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	7,7	101,5
0,05	0.047 ± 0.001	2,05	93,38
0,1	0.095 ± 0.009	9,03	95,41
0,25	0.248 ± 0.012	5,01	99,34
0,5	0.489 ± 0.003	0,59	97,85
0,75	0.734 ± 0.041	5,6	97,89
1	1.008 ± 0.011	1,04	100,76

Development of method for the determination of chlorophenols using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection

Table 2. The results of the calibration and the validation for 5: 2,3-CP, $R^2=0.995$; 6: 2,4-CP, $R^2=0.999$; 7: 2,5-CP, $R^2=0.999$; 8: 2,6-CP, $R^2=0.998$.

5

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	9,52	102,58
0,05	0.048 ± 0.001	2,89	95,74
0,1	0.097 ± 0.007	7,14	96,72
0,25	0.236 ± 0.017	7,01	94,57
0,5	0.541 ± 0.029	5,36	108,25
0,75	0.780 ± 0.028	3,54	103,95
1	0.969 ± 0.022	2,28	96,91

6

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.0004	8,88	105,2
0,05	0.052 ± 0.001	4,42	103,58
0,1	0.098 ± 0.008	8,18	97,91
0,25	0.248 ± 0.008	3,22	99,37
0,5	0.494 ± 0.016	3,24	98,72
0,75	0.740 ± 0.032	4,33	98,61
1	1.007 ± 0.001	0,11	100,74

7

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	8,88	105,85
0,05	0.050 ± 0.005	9,12	100,96
0,1	0.098 ± 0.009	9,43	97,7
0,25	0.229 ± 0.020	8,56	91,52
0,5	0.515 ± 0.020	3,8	103,08
0,75	0.743 ± 0.012	1,55	99,01
1	0.997 ± 0.090	9,01	99,66

8

Introduced [mmol/dm ³]	Found [mmol/dm ³]	RSD [%]	Recovered [%]
0,005	0.005 ± 0.001	6,45	104,36
0,05	0.049 ± 0.003	5,81	98,3
0,1	0.093 ± 0.008	8,2	92,92
0,25	0.238 ± 0.008	3,2	95,34
0,5	0.455 ± 0.017	3,77	91,03
0,75	0.722 ± 0.024	3,29	96,33
1	1.019 ± 0.006	0,56	101,94

4. Conclusions

Based on the obtained results it can be concluded that the analytical wavelength corresponding to the absorption maximum of the analyzed compounds varied in the ultraviolet range.

The best separation results are obtained using a mobile phase's pH equal to 2.2 and the initial concentration of ACN equal to 30%. The use of an isocratic elution method with 30% ACN/70% buffer H₂O/CH₃COOH, pH = 2.2, F = 1 cm³/min and the column Luna C18 (150 x 4.6 mm, 3 mm) thermostated at 40°C permits the simultaneous determination of phenol, monochlorophenols and dichlorophenols.

Developed and validated HPLC method with UV detection is suitable for the detection and determination of chlorophenols and has a high sensitivity. The LOD values of the phenol and its derivatives varied in the range from 0.001 mmol/cm³ to 0.005 mmol/cm³. The limit of quantification for all analyzed compounds was equal to 0.005 mmol/cm³. The method is also characterized by good accuracy and precision.

Konstrukcja i zasada działania wybranych organicznych ogniw fotowoltaicznych

Construction and principles of operation of selected organic solar cells

Anna Stefaniuk-Grams, Jarosław Jung

Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, Katedra Fizyki Molekularnej
Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

Streszczenie

W pracy opisano zasadę działania, metody wytwarzania oraz właściwości elektryczno-optyczne wybranych organicznych ogniw fotowoltaicznych. Spośród różnych rodzajów organicznych ogniw fotowoltaicznych do opisu wybrano następujące urządzenia: organiczne ogniwa z heterozłączeniem objętościowym (bez oraz z wprowadzonymi nanocząstkami czułym na światło z zakresu podczerwieni), organiczne ogniwa Grätzel'a, ogniwa fotowoltaiczne na bazie perowskitu organiczno-nieorganicznego oraz tandemowe organiczne ogniwa fotowoltaiczne. Zamieszczono również informacje o wpływie czynników zewnętrznych na sprawność konwersji mocy organicznych ogniw fotowoltaicznych.

Abstract

This paper describes the principles of operation, preparation methods and electro-optical properties of selected organic solar cells. Among the various types of organic photovoltaics following devices were chosen: organic solar cells with bulk heterojunction (without and with infrared light-responsive nanoparticles), Grätzel solar cells, organic-inorganic perovskite solar cells and organic tandem solar cells). The information about external factors impact on the performance of organic devices was also provided.

1. Wstęp

Szybki rozwój cywilizacji oraz zwiększające się zapotrzebowanie na energię przyczynia się do wyczerpywania tradycyjnych źródeł energii. Dlatego coraz większym zainteresowaniem cieszą się badania związane z opracowaniem alternatywnych metod pozyskiwania energii z wykorzystaniem zasobów odnawialnych. Jedną z takich metod jest przetwarzanie światła słonecznego absorbowanego przez półprzewodniki na prąd elektryczny. W tym celu wykorzystywane są ogniwa słoneczne¹. Dotychczas prym wiodły urządzenia wykonane z materiałów nieorganicznych, jednak ostatnio coraz bardziej popularne stają się organiczne ogniwa fotowoltaiczne². Cechują się one nieco gorszymi właściwościami elektrycznymi oraz optycznymi w porównaniu do urządzeń bazujących na półprzewodnikach nieorganicznych. Jednakże ich zalety, do których

¹ M. Wacławek, R. Rodziejcz, *Ogniwa słoneczne – wpływ środowiska naturalnego na ich pracę*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, **2011**, 17-20.

² G. Jastrzębska, *Ogniwa słoneczne – Budowa, technologia i zastosowanie*, Wydawnictwo Komunikacji i Łączności, Warszawa, **2013**, 133-137.

przede wszystkim należy zaliczyć niskie koszty produkcji (stosunkowo niska cena substratów organicznych, stosowanie niskotemperaturowych metod wytwarzania), dobre właściwości mechaniczne (duża elastyczność) oraz możliwość projektowania urządzeń wielkopowierzchniowych powodują, że znajdują coraz większą grupę zwolenników. Dlatego w dalszej części pracy postanowiono przedstawić charakterystykę właśnie tej grupy urządzeń.

2. Parametry charakteryzujące organiczne ogniwo fotowoltaiczne

Podstawowe parametry charakteryzujące działanie organicznych ogniw fotowoltaicznych, wyznaczane na podstawie charakterystyki prądowo – napięciowej oświetlonego ogniwa (Rys. 1.) to:

- prąd zwarcia (I_{sc}),
- napięcie obwodu otwartego (V_{oc}),
- współczynnik wypełnienia (FF):

$$FF = \frac{P_{max}}{I_{sc} V_{oc}} \cdot 100 [\%] = \frac{I_{max} V_{max}}{I_{sc} V_{oc}} \cdot 100 [\%],$$

gdzie:

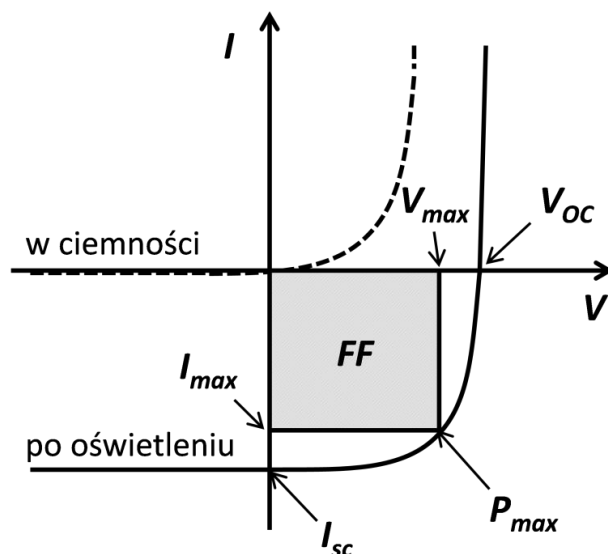
$$P_{max} = V_{max} I_{max},$$

stanowi największą moc elektryczną wydzielaną w ogniwie, której odpowiadają wartości maksymalnego prądu I_{max} i maksymalnego napięcia V_{max} ,

- sprawność zamiany mocy promieniowania świetlnego na moc elektryczną (PCE):

$$PCE = \frac{P_{max}}{P_{in}} \cdot 100 [\%],$$

P_{in} – moc światła padającego na ogniwo.



Rys. 1. Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniwa słonecznego w ciemności (linia przerywana) i po oświetleniu (linia ciągła).

Badania wykazały, że parametry te zależą m.in. od następujących właściwości organicznych ogniw fotowoltaicznych:

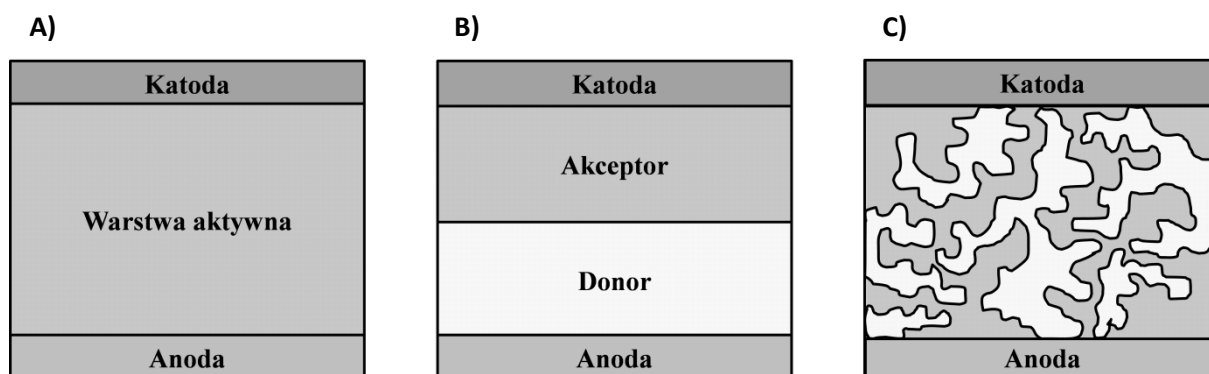
- absorpcji światła w zakresie widma światła słonecznego,
- długości drogi dyfuzji ekscytonów (związana para elektron-dziura),
- wydajności fotogeneracji nośników ładunku,
- transportu nośników ładunku,
- dopasowania poziomów energetycznych półprzewodników organicznych: HOMO (najwyższy obsadzony orbital molekularny - w j. ang. Highest Occupied Molecular Orbital) oraz LUMO (najniższy nieobsadzony orbital molekularny - w j. ang. Lowest Unoccupied Molecular Orbital) do pracy wyjścia elektronu (energii potrzebnej do wybicia z metalu jednego elektronu) z elektrody.

3. Konstrukcja organicznych ogniw fotowoltaicznych

Organiczne ogniwa fotowoltaiczne złożone są z warstwy aktywnej (zawierającej materiał półprzewodnikowy składający się np. z mieszaniny półprzewodnika polimerowego i pochodnej fullerenu), która znajduje się pomiędzy dwiema elektrodami charakteryzującymi się różną pracą wyjścia elektronu. Anodę stanowi materiał posiadający wyższy potencjał jonizacji (np. tlenek molibdenu (VI), tlenek cynku domieszkowany glinem, borem lub galem, grafen, nanorurki węglowe lub ITO - czyli mieszanina tlenku indu i tlenku cyny w stosunku wagowym 9 do 1)^{3,4}. Natomiast katoda zbudowana jest z metalu charakteryzującego się niższą pracą wyjścia elektronu (magnez, wapń lub glin).

Półprzewodniki organiczne stanowiące warstwę aktywną mogą tworzyć trzy rodzaje złączy:

- homozłącze, w którym materiał transportuje tylko jeden rodzaj nośników ładunku (Rys. 2A),
- heterozłącze warstwowe, które złożone jest z połączonych ze sobą warstw półprzewodników typu *p* i *n* (Rys. 2B),
- heterozłącze objętościowe, w którym materiały transportujące nośniki ładunku (dziury i elektrony) są ze sobą wymieszane (Rys. 2C).



Rys. 2. Schemat homozłącza (A), heterozłącza warstwowego (B) i objętościowego (C).

4. Organiczne ogniwo fotowoltaiczne z heterozłączem objętościowym

³ R. Steim, F.R. Kogler, C.J. Brabec, *Journal of Materials Chemistry*, **2010**, 20(13), 2499-512.

⁴ X. Sun, Y. Shi, H. Ji, X. Li, S. Cai, C. Zheng, *Journal of Alloys and Compounds*, **2012**, 545, 5-11.

Ogniwa słoneczne z heterozłączeniem objętościowym stanowią jedną z najbardziej popularnych grup organicznych ogniw fotowoltaicznych. Najczęściej wybieranym materiałem do wytworzenia anody jest tlenek indowo-cynowy (ITO). Okazuje się, że właściwości cienkich warstw wytworzonych z ITO są zależne od warunków procesu ich nanoszenia (np. temperatura, ciśnienie) oraz grubości filmu^{5,6}. Podstawowe parametry warstw ITO przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Podstawowe parametry warstw złożonych z tlenku indowo-cynowego (ITO).

Rodzaj parametru	Wartość
Rezystywność	od $7,6 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$ do $5,7 \cdot 10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$
Praca wyjścia elektronu	4,65 eV
Przerwa energetyczna	2,90 – 3,91 eV

Prezentowane właściwości ITO powodują, że zarówno w zakresie światła widzialnego jak i bliskiej podczerwieni materiał ten odznacza się wysoką transmisją światła (zaobserwowano, że przy długości fali równej 550 nm jego przezroczystość może przekraczać nawet 90%). Ponadto, cienkie warstwy wytworzone przy użyciu ITO pozwalają na uzyskanie wysokiej wydajności wstrzykiwania dziur do materiałów organicznych. Warstwy ITO mogą być nanoszone przy użyciu różnych metod, do których można zaliczyć: chemiczne osadzanie z fazy gazowej, osadzanie metodą litografii lub osadzanie przy użyciu krótkich impulsów laserowych. W przypadku zastosowania dwóch pierwszych metod powierzchnia naniesionych warstw tlenku indowo-cynowego może być niejednorodna i chropowata. Zmniejszenie chropowatości tlenku indowo-cynowego można uzyskać poprzez pokrycie go cienką warstwą przewodnika polimerowego, którego poziom energetyczny HOMO jest tak dobrany, aby dziury mogły swobodnie przepływać z warstwy aktywnej do anody.

Jednym ze stosowanych do tego celu układów jest mieszanina zawierająca poli(3,4-etylenodioksytyofen) (PEDOT) oraz poli(siarczan styrenu) (PSS). Niedomieszkowany PEDOT wykazuje wysokie przewodnictwo elektryczne rzędu 1000 S/cm oraz odznacza się wysoką przezroczystością wynoszącą nawet 90% (w przypadku warstwy o grubości około 20 nm)^{7,8}. W celu zwiększenia rozpuszczalności PEDOT, a także ustabilizowania dyspersji wodnego roztworu do układu dodaje się PSS⁹.

Najbardziej popularne organiczne materiały półprzewodnikowe stosowane do budowy warstw aktywnych ogniw fotowoltaicznych, to: poli(3-heksylotiofen-2,5-diyl) (P3HT) oraz fuleren C₆₀ modyfikowany estrem kwasu masłowego (PCBM). Pierwszy z wymienionych związków to jedna z szeroko opisywanych w literaturze

⁵ S.H. Mohamed, F.M. El-Hossary, G.A. Gamal, M.M. Kahlid, *Acta Physica Polonica A*, **2009**, 115(3), 704-708.

⁶ S.Q. HussainQ, W.K. Oh, S. Kim, et al., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2014**, 14(12), 9237-41.

⁷ R.H. Karlsson, A. Herland, M. Hamedi, et al., *Chemistry of Materials*, **2009**, 21(9), 1815-21.

⁸ J. Liang, Y. Ma, F. Wang, W. Yang, *Chemistry of Materials*, **2010**, 22(14), 4254-62.

⁹ D.M. DeLongcham, B.D. Vogt, C.M. Brook, et al., *Langmuir*, **2005**, 21(24), 11480-3.

substancji transportujących dziury¹⁰. Charakteryzuje się on dobrą rozpuszczalnością w licznych rozpuszczalnikach organicznych, do których można między innymi zaliczyć chloroform, 1,2-dichlorobenzen, czy ksylen. Właściwość ta sprzyja nanoszeniu P3HT z roztworu na podłoże (po odparowaniu rozpuszczalnika powstaje cienka warstwa).

Poli(3-heksylofien-2,5-diyl) wykazuje absorpcję promieniowania świetlnego w zakresie widzialnym. Można wyróżnić trzy maksima absorpcji przy długości fali równej 520 nm, 550 nm oraz 600 nm. Dwa pierwsze odpowiadają przejściom π - π^* pomiędzy łańcuchami polimeru, a ostatnie przejściom π - π^* wewnątrz łańcuchów polimeru¹¹.

PCBM należy do grupy materiałów, które transportują elektrony¹². Analiza jego właściwości wykazała, że może się on rozpuszczać np. w chlorobenzenie lub toluenie, a także mieszać się z polimerami z układem wiązań sprzężonych. Fuleren C₆₀ modyfikowany estrem kwasu masłowego absorbuje promieniowanie w zakresie ultrafioletu oraz światła widzialnego (jednakże najwyższą absorpcję obserwuje się przy długości fali poniżej 400 nm).

Przygotowanie mieszaniny składającej się z obu omawianych substancji (P3HT i PCBM) pozwala na uzyskanie układu zdolnego do pochłaniania światła widzialnego w szerokim zakresie, co jest bardzo istotne w przypadku konstruowania ogniw słonecznych.

Zastosowanie warstwy półprzewodnika składającej się z mieszaniny P3HT i PCBM umożliwia wytworzenie warstw zawierających heterozłącze objętościowe (Rys. 2C) o bardzo rozbudowanej powierzchni złącza *p-n* i krótkiej drodze dyfuzji ekscytonów. Dzięki temu wydajności energetyczne organicznych ogniw słonecznych z warstwami mieszanin P3HT/PCBM (Rys. 2B) są znacznie wyższe niż w ogniwach wykonanych z tych samych materiałów, ale z heterozłączem warstwowym (Rys. 2A). Dodatkowo obecność obydwu omawianych substancji umożliwia transport nośników obdarzonych zarówno dodatnim, jak i ujemnym ładunkiem (dziur w P3HT i elektronów w PCBM). Badania przeprowadzone przez Cook'a¹³ i Liu¹⁴ wykazały, że zastosowanie układu zawierającego mieszaninę P3HT i PCBM w stosunku wagowym 1:1 pozwoliło na uzyskanie wysokiej sprawności konwersji mocy światła na moc elektryczną *PCE* (w porównaniu z innymi rodzajami organicznych ogniw słonecznych), która może przyjąć wartość nawet 5%. Dane literaturowe wykazują, że ogniwo słoneczne skonstruowane przy użyciu powyższych substancji

¹⁰ X. Crispin, F. Jakobsson, A. Crispin, P. Grim, P. Andersson, A. Volodin, et al., *Chemistry of Materials*, **2006**, 18(18), 4354-60.

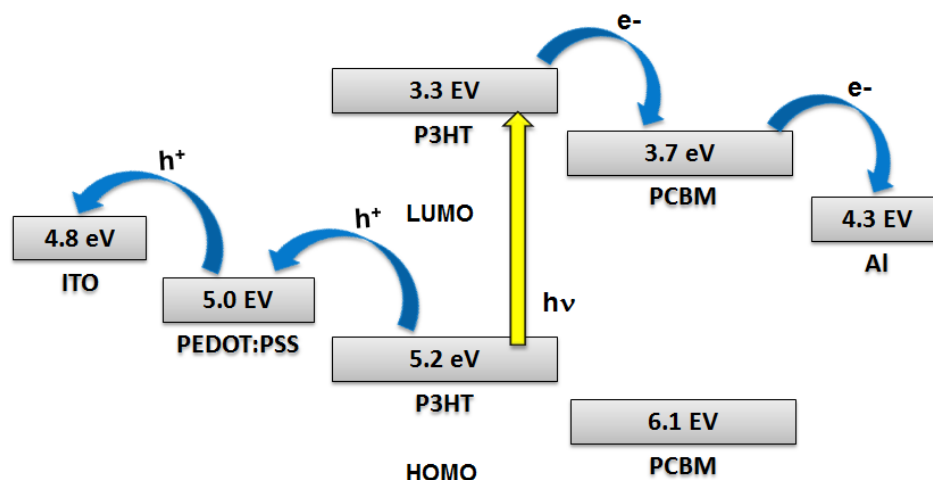
¹¹ Ge W. *An overview on P3HT:PCBM, the most efficient organic solar cell material so far*, Physics Department, University of Tennessee, USA, **2009**.

¹² A. Huczko, M. Bystrzejewski, *Fulery 20 lat później w domu*, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, **2007**.

¹³ S. Cook, H. Ohkita, Y. Kim, J.J. Benson-Smith, D.D. Bradley, J.R. Durrant, *Chemical Physics Letters*, **2007**, 445(4), 276-80.

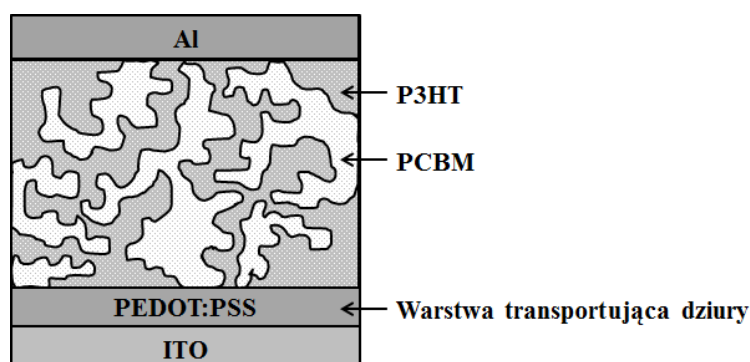
¹⁴ Y. Liu, M.A. Summers, S.R. Scully, M.D. McGehee, *Journal of Applied Physics*, **2006**, 99(9), 093521-093521-4.

charakteryzują się bardzo dobrze dopasowanymi wzajemnie poziomami energetycznymi HOMO i LUMO¹⁵ (Rys. 3.)¹⁶:



Rys. 3. Poziomy energetyczne HOMO i LUMO P3HT, PCBM, ITO, PEDOT PSS i Al.

Mechanizm powstawania efektu fotowoltaicznego w takim ogniwie jest związany z absorpcją fotonów przez P3HT, które wcześniej przeszły przez cienkie warstwy złożone z ITO i PEDOT:PSS. W następnej kolejności w warstwie aktywnej, która zawiera P3HT następuje generacja ekscytonów, które ulegają dysocjacji na pary elektron-dziura. Dzieje się to na granicy faz pomiędzy P3HT i PCBM. Elektrony są przechwytywane przez PCBM i transportowane w kierunku katody. Natomiast dziury są przenoszone przez P3HT do anody. Powoduje to wytworzenie różnicy potencjału pomiędzy elektrodami V_{oc} . Dzięki odpowiedniemu dopasowaniu poziomów energetycznych HOMO w P3HT do pracy wyjścia układu ITO+PEDOT:PSS dziury docierają do anody. Podobnie, odpowiednie dopasowanie poziomu LUMO w PCBM do pracy wyjścia katody zapewnia efektywne wstrzykiwanie elektronów katody (Rys. 3.). Po zwarciu elektrod następuje przepływ prądu I_{sc} w obwodzie zewnętrznym.



Rys. 4. Schemat organicznego ogniw fotowoltaicznego wykonanego z mieszaniny matrycy polimerowej (P3HT) oraz domieszki niskcząsteczkowej (PCBM).

¹⁵ O. Ourida, B.M. Said, *Optics Express*, **2013**, 21(26), 32358-70.

¹⁶ J. Wootthikanokkhan, P. Khunsriya, N. Seeponkai, U. Asawapirom, A. Keawprajak, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **2015**, 64(8), 392–399.

W tabeli 2 przedstawiono dane literaturowe dotyczące parametrów elektrycznych organicznych ogniw słonecznych wytworzonych przy użyciu mieszaniny P3HT oraz PCBM (stosunek wagowy 1:1)¹⁷.

Tabela 2. Dane literaturowe dotyczące parametrów elektrycznych przykładowego organicznego ogniwa słonecznego wytworzonego przy użyciu mieszaniny P3HT oraz PCBM¹⁶.

Rodzaj parametru	Wartość
Napięcie obwodu otwartego (V_{OC})	0,616 V
Prąd zwarcia (I_{SC})	9,17 mA/cm ²
Współczynnik wypełnienia (FF)	61,9 %
Sprawność zamiany mocy promieniowania świetlnego na moc elektryczną (PCE)	3,57 %

5. Organiczne ogniwo fotowoltaiczne z heterozłączeniem objętościowym z wprowadzonymi nanocząstkami

Wymagania stawiane elektronice organicznej powodują konieczność stosowania ogniw fotowoltaicznych, które wykazują czułość w zakresie bliskiej podczerwieni. Okazuje się jednak, że materiały organiczne stosowane w standardowych urządzeniach charakteryzują się stosunkowo słabą absorpcją promieniowania w tym zakresie długości fal. Dlatego rozpoczęto badania nad opracowaniem nowych struktur organicznych ogniw słonecznych. Do tego celu stosuje się metody umożliwiające zwiększenie prawdopodobieństwa pochłaniania padających kwantów poprzez wytwarzane urządzenia. Może to być osiągnięte poprzez użycie np. warstw organicznych, które zawierają nanocząstki metali (absorbujące promieniowanie w zakresie długości fali powyżej 700 nm). Wytwarzanie takich warstw wiąże się jednak z możliwością aglomeracji wprowadzanych domieszek w większe struktury. Może to powodować zmianę parametrów urządzeń związaną ze zmniejszeniem absorpcji światła oraz wydajności fotogeneracji nośników ładunku. Dzięki odpowiedniej modyfikacji powierzchni nanocząstek (np. poprzez dołączanie do nanocząstek ligandów posiadających odpowiednią długość i budowę chemiczną) można temu zapobiec.

Dane literaturowe wykazują, że nanocząstki metali mogą być wprowadzane do ogniw fotowoltaicznych przy użyciu różnych metod¹⁸, np.:

- bezpośrednie wprowadzenie do warstwy fotoaktywnej,
- wprowadzenie do warstwy transportującej dziury,
- umieszczenie nanocząstek na styku warstwy transportującej dziury i warstwy fotoaktywnej,
- umieszczenie nanocząstek na styku warstwy tlenku indowo-cynowego (ITO) oraz warstwy transportującej dziury.

¹⁷ D. Chi, S. Qu, Z. Wang, J. Wang, *Journal of Materials Chemistry C*, **2014**, 2(22), 4383-4387.

¹⁸ E. Stratakis, E. Kymakis, *Materials Today*, **2013**, 16(4), 133-146.

Do najczęściej wykorzystywanych metod nanoszenia nanocząstek można zaliczyć fizyczne naparowywanie próżniowe, syntezę chemiczną oraz metodę ablacji¹⁹. Zastosowanie ostatniej z nich umożliwia na uniknięcie problemów związanych z obecnością cząsteczek surfaktantów, które przyczyniają się do wygaszania ekscytonów oraz wpływają na tworzenie się warstwy pasywującej, która powstaje podczas syntezy chemicznej. Wartość współczynnika konwersji mocy dla ogniwa słonecznego z mieszaniną nanocząstek złota i srebra wprowadzoną do warstwy PEDOT wynosi 8,67%²⁰.

6. Organiczne ogniwo fotowoltaiczne Grätzel'a

Ogniwa tego typu nazywane są również barwnikowymi ogniwami słonecznymi. Są to fotoelektrochemiczne ogniwa fotowoltaiczne, w których elektrolity ciekłe lub inne substancje o przewodnictwie jonowym stanowią medium służące do transportu nośników ładunku²¹.

Organiczne ogniwo fotowoltaiczne Grätzel'a składa się z przezroczystej elektrody przewodzącej stanowiącej anodę (np. porowaty nanokrystaliczny tlenek tytanu (IV)) naniesionej na szklane podłoże, cząsteczek barwnika, które są przymocowane do powierzchni tlenku tytanu, elektrolitu z rozpuszczoną w nim parą redokсовą (jodek-trijodek) oraz przeciwelektrody (katoda).

W tak zbudowanych ogniwach promieniowanie świetlne absorbowane jest przez cząsteczki barwnika (najczęściej mogą nim być związki kompleksowe rutenu, ftalocyjaniany lub porfiryne), które w wyniku tego ulegają wzbudzeniu. Wygenerowane światłem elektrony są wstrzykiwane do warstwy zawierającej tlenek tytanu (IV) skąd przepływają do odpowiedniej elektrody. Najwyższa sprawność zamiany mocy promieniowania świetlnego na moc elektryczną, którą udało się uzyskać dla tego typu ogniw to ponad 12%²².

7. Ogniwo fotowoltaiczne na bazie perowskitu organiczno-nieorganicznego

Coraz większą popularność zdobywają również ogniwa fotowoltaiczne oparte na związkach organiczno-nieorganicznych posiadających strukturę perowskitu – ABX_3 , gdzie: A – to kation nieorganiczny (np. Pb^{2+}), B – duży kation organiczny (np. metyloamoniowy – $CH_3NH_3^+$) i X – mniejszy anion nieorganiczny (np. I^-)²³.

W tym przypadku kation nieorganiczny odpowiedzialny jest za absorpcję światła. Obecność kationu organicznego pozwala na rozpuszczenie materiału w rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego perowskity organiczno-nieorganiczne, oprócz metody naparowywania fizycznego w próżni, mogą być również nanoszone

¹⁹ G.D. Spyropoulos, M.M. Stylianakis, E. Stratakis, E. Kymakis, *Applied Physics Letters*, **2012**, 100(21), 213904.

²⁰ L. Lu, et al., *Nano Letters*, **2013**, 13(1), 59–64.

²¹ B. O'regan, M. Grätzel, *Nature*, **1991**, 353, 737–740.

²² A. Yella, H.W. Lee, H.N. Tsao, et al., *Science*, **2011**, 4, 334(6056), 629–634.

²³ M.A. Loi, J.C. Hummelen, *Nature Materials*, **2013**, 12, 1087–1089

przy użyciu „metod mokrych”, co pozwala na znaczne obniżenie kosztów produkcji całych urządzeń²⁴.

Jako dodatkową zaletę zastosowania perowskitów można rozpatrywać możliwość wymiany nieorganicznego anionu na inny jon z grupy chlorowców, co pozwala na dokonywanie zmian szerokości przerwy energetycznej tych materiałów w zakresie 1,5 – 2,2 eV. Przekłada się to na zwiększenie zakresu absorpcji warstwy od światła widzialnego do podczerwieni.

Urządzenia zawierające perowskity posiadają bardzo wysoką sprawność zamiany mocy promieniowania świetlnego na moc elektryczną, wynoszącą nawet 19%, co jest wartością porównywalną z tymi osiąganymi przez ogniwa nieorganiczne^{25,26}. Niestety największym problemem związanym z zastosowaniem ogniw fotowoltaicznych na bazie perowskitów jest toksyczność zawartego w nich ołowiu. Obecnie podejmuje się badania polegające na próbach zastąpienia ołowiu innymi metalami, np. cyną.

8. Tandemowe organiczne ogniwo fotowoltaiczne

Tego rodzaju ogniwo to szeregowe połączenie dwóch organicznych ogniw fotowoltaicznych²⁷. Absorpcja promieniowania świetlnego zachodzi w obu ogniwach jednocześnie. Na styku warstwy donora (półprzewodnik typu *n*) oraz akceptora (półprzewodnik typu *p*) dochodzi do dysocjacji pary nośników ładunku – dziura-elektron, która powstała w procesie fotogeneracji. Następnie nośniki ładunku przemieszczają się w kierunku odpowiedniej elektrody. W przypadku takich ogniw anoda jest zazwyczaj zbudowana z tlenku indowo-cynowego, a katoda ze srebra.

Do zalet tandemowych organicznych ogniw fotowoltaicznych należy zaliczyć możliwość wykorzystania cienkich warstw fotoaktywnych. Umożliwia to zwiększenie płynącego w urządzeniu fotoprądu, co wiąże się z podwyższoną absorpcją światła. Z uwagi na szeregowe połączenie dwóch organicznych ogniw fotowoltaicznych obserwuje się możliwość nawet dwukrotnego zwiększenia napięcia obwodu otwartego w porównaniu do pojedynczych urządzeń²⁸, a także możliwe jest uzyskanie sprawności konwersji mocy powyżej 10%²⁹.

9. Wpływ czynników zewnętrznych na działanie organicznych ogniw fotowoltaicznych

W przypadku komercyjnego wykorzystania ogniw fotowoltaicznych niezwykle istotne jest zachowanie ich długiego czasu działania. Podczas eksploatacji ogniwa mogą być narażone na kontakt z szeregiem czynników powodujących ich degradację. Można wyróżnić kilka procesów prowadzących do degradacji organicznych ogniw słonecznych:

²⁴ M.M. Lee, J. Teuscher, T. Miyasaka et al., Efficient hybrid solar cells based on meso-superstructured organometal halide perovskites. *Science*. 2012 Nov 2; 338(6107):643-7.

²⁵ M.A. Green, A. Ho-Baillie, H.J. Snaith, *Nature Photonics*, **2014**, 8(7), 506-514.

²⁶ F. Di Giacomo, S. Razza, et al., *Journal of Power Sources*, **2014**, 251, 152-156.

²⁷ T. Ameri, N. Lia, C.J. Brabec, *Energy & Environmental Science*, **2013**, 6, 2390-2413.

²⁸ B.P. Rand, P. Peumans, S.R. Forrest, *Journal of Applied Physics*, **2004**, 96(12), 7519-7526.

²⁹ J. You, L. Dou, K. Yoshimura, et al., *Nature Communications*, **2013**, 4, 1446-1455.

- degradacja chemiczna, która zachodzi w wyniku działania tlenu i wody mogących brać udział w reakcjach zachodzących na styku warstwy aktywnej i elektrod,
- degradacja fizyczna związana z migracją atomów tworzących elektrody do wnętrza warstwy aktywnej ogniwa,
- degradacja mechaniczna związana z mechanicznym uszkodzeniem poszczególnych komponentów ogniwa³⁰.

Najważniejszym efektem degradacji organicznych ogniw fotowoltaicznych jest obniżenie wydajności konwersji energii promieniowania świetlnego na energię elektryczną. Dlatego podczas wytwarzania tego typu urządzeń istotne jest zastosowanie dodatkowej warstwy barierowej, która chroni przed wpływem czynników atmosferycznych. Materiały, które mogą być wykorzystane jako warstwy ochronne powinny między innymi wykazywać niską przenikalność dla wody i tlenu (odpowiednio poniżej 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dzień}$ oraz 10^{-5} $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{dzień}$). Biorąc pod uwagę możliwość uszkodzenia ogniw fotowoltaicznych w warunkach atmosferycznych ich wytwarzanie odbywa się zazwyczaj kontrolowanych warunkach laboratoryjnych z użyciem gazów obojętnych (np. azotu).

10. Podsumowanie

Przedstawione informacje wskazują na wysoki potencjał organicznych ogniw fotowoltaicznych. Dotychczasowe badania umożliwiły opracowanie zróżnicowanych konstrukcji urządzeń zawierających materiały organiczne, które charakteryzują się coraz większą sprawnością. Zalety organicznych ogniw fotowoltaicznych związane z ich dużą giętkością oraz możliwością wytwarzania materiałów wielkopowierzchniowych powodują, że mogą one znaleźć zastosowanie w produkcji urządzeń, do których użycie tradycyjnych materiałów nieorganicznych byłoby utrudnione.

Artykuł został napisany w oparciu o informacje pozyskane w trakcie przygotowania i realizacji projektu „Diamantowy Grant” nr 022342 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

³⁰ M. Jørgensen, K. Norrman, F.C. Krebs, *Solar Energy Mater Solar Cells*, **2008**, 92(7), 686-714.

Zastosowanie grupy piwaloilowej w syntezie związków organicznych i bioorganicznych

Application of pivaloyl group in organic and bioorganic synthesis

Piotr Surynt^{1,2}, Karolina Bartosik², Grażyna Leszczyńska²

¹Politechnika Łódzka, Koło Naukowe Studentów Wydziału Chemicznego PŁ „Trotyl”
Stefana Żeromskiego 116, 90-924, Łódź

²Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii Organicznej
Stefana Żeromskiego 116, 90-924, Łódź
piotrsurynt@gmail.com

Streszczenie

Grupa piwaloilowa (tBuC(O)-) jest znaną grupą ochronną typu acylowego, stosowaną w syntezie organicznej głównie do osłony funkcji hydroksylowych alkoholi, fenoli, cukrów oraz nukleozydów. Reakcja piwaloilowania alkoholi może przebiegać z wysoką chemo-selektywnością, regioselektywnością a nawet stereoselektywnością. Utworzone w wyniku piwaloilowania estry PivOR cechuje stabilność w umiarkowanych warunkach zasadowych i kwasowych jak również odporność na działanie kwasu żołądkowego i enzymów trawien-nych co umożliwia ich zastosowanie w syntezie leków/proleków.

W otrzymywaniu związków o znaczeniu biologicznym grupa piwaloilowa znalazła zastosowanie w syntezie znakowanych DNA/ RNA - do zabezpieczenia grup hydroksylowych znaczników fluorescencyjnych oraz w syntezie N3-Piv urydyny i tymidyny jako związków pośrednich do otrzymania 2'-O-metylowych pochodnych. W ostatnim czasie odkryto nowe zastosowanie grupy piwaloilowej w chemii nukleozydów, umożliwiające syntezę różnorodnie podstawionych 5-metylourydyn i 2-tiourydyn (xm^5U i xm^5s^2U) w reakcji alilowej substytucji nukleofilowej 5-piwaloiloksymetylo(2-tio)urydyny (Pivom⁵U/ Pivom^{5s2}U) z odczynnikami o cha-rakterze nukleofili.

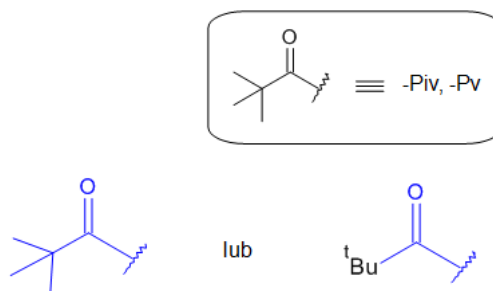
Abstract

Pivaloyl group (tBuC(O)-) is a well known in organic synthesis protecting group and is being used for protection of hydroxyl functions in alcohols, phenols, sugars, nucleosides. Pivaloylation can be carried out with high chemoselectivity, regioselectivity and/or even stereo-selectivity. Created in this way PivOR esters are characterized by stability in moderate alkaline and acidic conditions as well as by resistance to gastric acid and digestive-enzymes which allows their application in drugs/prodrugs synthesis.

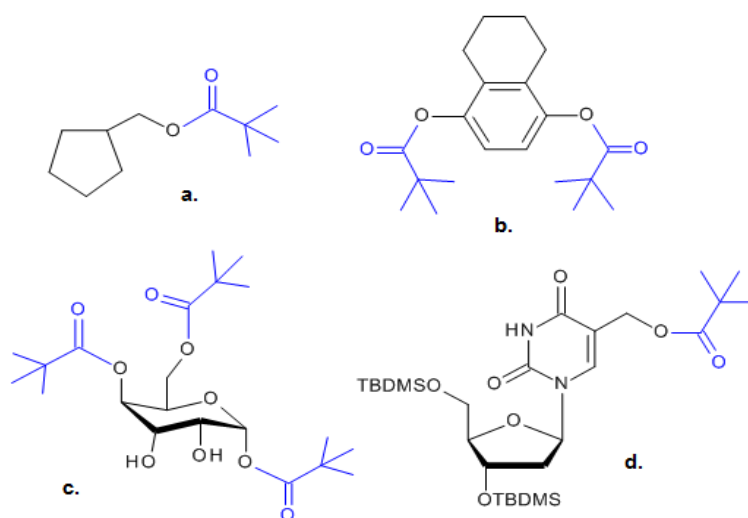
In preparing compounds of biological importance pivaloyl group has been used in the synthesis of labeled DNA/ RNA - to protect hydroxyl groups in fluorescent markers and for the N3-Piv thymidine and uridine syntheses as intermediates to receive 2'-O-methyl derivatives. Recently, a novel application of the pivaloyl group in the nucleosides chemistry has been found, allowing the synthesis of variously substituted 5-methyluridines and 2-thiouridines (xm^5U and xm^5s^2U) via allylic nucleophilic substitution of 5-pivaloyloxymethyl(2-thio)uridines (Pivom⁵U / Pivom^{5s2}U) with reagents of a nucleophile.

1. Charakterystyka grupy piwaloilowej

Grupa piwaloilowa, inaczej trimetyloacetylowa (w skrócie –Piv, -Pv, Rys.1) jest znaną w syntezie organicznej grupą i wykorzystywana jest głównie jako grupa ochronna funkcji hydroksylowych alkoholi alifatycznych¹, fenoli², cukrów³ oraz nukleozydów⁴ (Rys. 2). Podstawową korzyścią syntetyczną grupy Piv jest wysoce chemoselektywny i/lub regioselektywny przebieg reakcji piwaloilowania. W rezultacie, można ją wykorzystać w syntezie związków zawierających w strukturze kilka grup hydroksylowych różniących się rzędowością, zawadą przestrzenną czy położeniem (np. ekwatorialne vs aksjalne).



Rysunek 1. Struktura grupy piwaloilowej i różne formy jej zapisu.



Rysunek 2. Przykłady związków organicznych zawierających grupę piwaloilową jako osłonę funkcji hydroksylowej: a.) alkoholu alifatycznego, b.) polifenolu, c.) cukru oraz d.) nukleozydu.

¹ a) Ch. Bhujanga Rao, B. Chinnababu, Y. Venkateswarlu, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 8856; b) P. Jütten., H. D. Scharf, *J. Carbohydr. Chem.*, **1990**, 9, 675; c) Z. Yang, E. Wong, T. Y.-T. Shum, C. M. Che, Y. Hui, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 669; d) E. Vedejs, O. Daugulis, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5702; e) T. W. Greene, P. G. Wuts P, *Protective Groups In Organic Synthesis, Fourth Ed.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2007**.

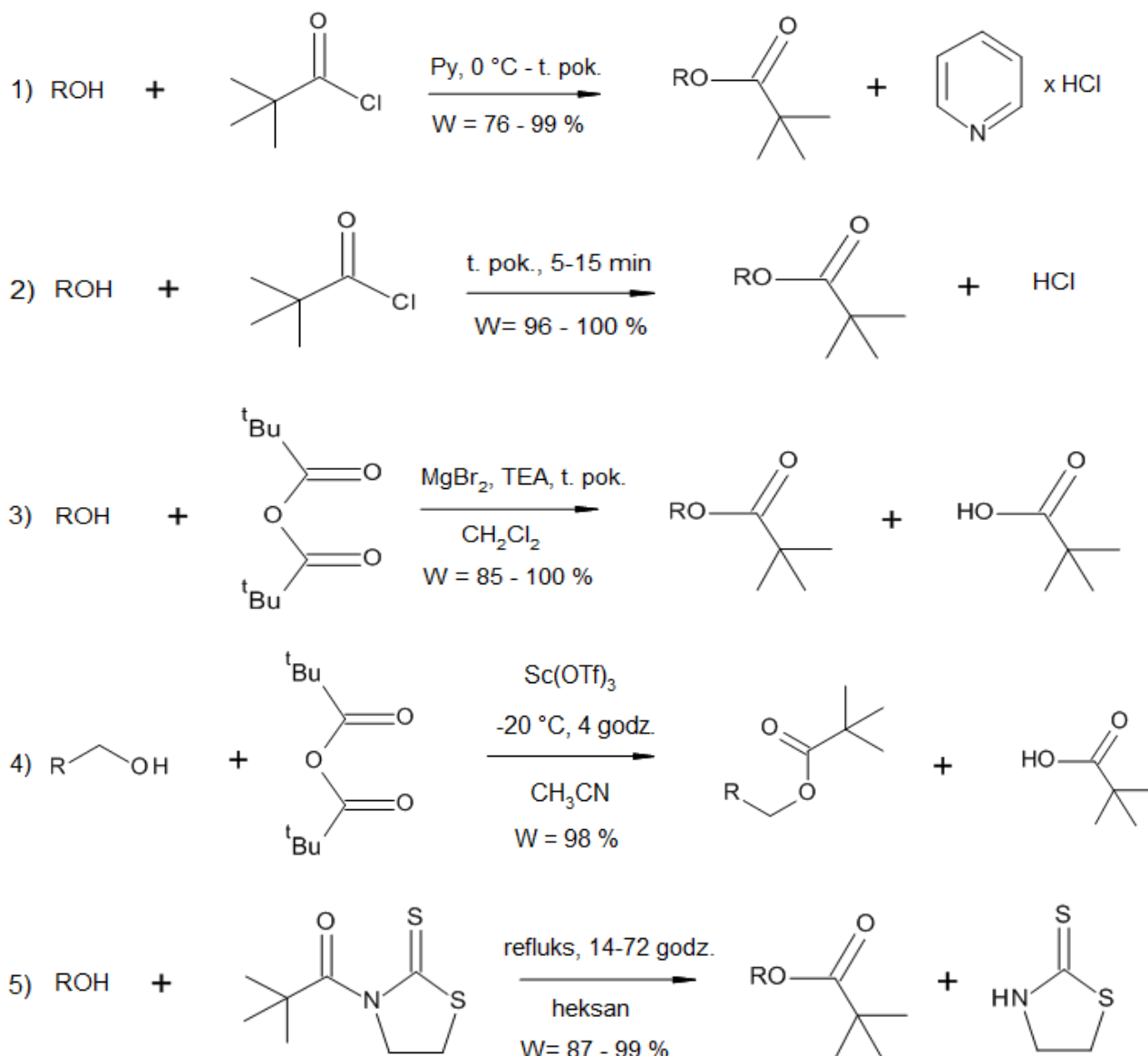
² a) T. W. Greene, P. G. Wuts P, *Protective Groups In Organic Synthesis, Fourth Ed.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2007**; b) A. M. Fernandez, J. Plaquevent, L. Duhamel, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4007.

³ a) Z. Yang, E. Wong, T. Y.-T. Shum, C. M. Che, Y. Hui, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 669; b) L. Jiang, T.-H. Chan, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 6035.

⁴ a) M. Sobkowski, *Czech. Chem. Commun.*, **2010**, 75, 1, 33; b) X. F. Zhu, H. J. Williams, A. I. Scott, *Synth. Commun.*, **2003**, 33, 1233; c) K. Bartosik, G. Leszczyńska, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, 56, 6593.

2. Wprowadzanie grupy piwaloilowej

W celu zabezpieczenia funkcji hydroksylowych alkoholi za pomocą grupy piwaloilowej wykorzystuje się procedury typowe dla syntezy estrów. Jednym z takich podejść syntetycznych jest zastosowanie chlorku piwaloilu jako czynnika acylującego (Schemat 1, przykład 1-2). Reakcję z jego udziałem prowadzi się najczęściej w bezwodnej pirydynie, w niskiej temperaturze, w ciągu kilku lub kilkunastu godzin⁵. W preparatyce estrów PivOR stosuje się również mieszaniny pirydyny z innymi rozpuszczalnikami np. z chlorkiem metylenu - CH₂Cl₂/Py (3:1,v/v), które w połączeniu z niską temp. reakcji (> -5°C) sprzyjają m.in. regioselektywnemu acylowaniu cukrów⁵.



Schemat 1. Metody wprowadzania grupy piwaloilowej z zastosowaniem: 1), 2) PivCl, 3), 4) bezwodnika piwaloilowego, 5) cyklicznego amidu, 3-piwaloilo-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyny.

⁵ a) P. Jütten, D. Scharf, *J. Carbohydr. Chem.*, **1990**, 9, 675; b) K. C. Nicolaou., S. Webber, *Synthesis*, **1986**, 453.

W przypadku związków niskocząsteczkowych reakcję piwaloilowania można przeprowadzić z chlorkiem piwaloilu, w warunkach pozbawionych rozpuszczalnika⁶. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej, w czasie 5-15 minut, uzyskując praktycznie całkowite przereagowanie alkoholu (Schemat 1, przykład 2)⁶. Badając zakres stosowalności tej metody, przetestowano reakcje piwaloilowania z alkoholami alifatycznymi (1° i 2°), aromatycznymi, alkoholami typu benzyłowego, alilowego oraz 1,2- i 1,4-diolami. Spośród alkoholi aromatycznych przetestowano fenole i naftole, przy czym fenole nie ulegały omawianej reakcji, z kolei w przypadku naftoli niezbędne było wydłużenie czasu trwania reakcji do 12 godzin. Uzyskane wydajności reakcji piwaloilowania naftoli były wysokie: 94-97%. Przedstawione podejście preparatywne jest względnie nietoksyczne i przyjazne dla środowiska, a nade wszystko jest niedrogie i nie wymaga dalszego oczyszczania otrzymanych związków, gdyż eliminuje całkowicie reakcje uboczne. Dla potwierdzenia skuteczności stosowania PivCl w warunkach pozbawionych rozpuszczalnika, reakcję piwaloilowania przeprowadzono w kilku wariantach preparatywnych, stosując następujące rozpuszczalniki: woda, DCM, CH₃CN (Tabela 1). Żaden z przetestowanych rozpuszczalników nie pozwolił na otrzymanie produktów piwaloilowania z wydajnością porównywalną do reakcji wykonanych w wariancie pozbawionym rozpuszczalnika, nawet przy wydłużeniu czasu trwania reakcji (Tabela 1).

Tabela 1. Porównanie wydajności reakcji piwaloilowania z użyciem różnych rozpuszczalników oraz bez rozpuszczalnika.

Użyty rozpuszczalnik	Czas reakcji [min]	Wydajność reakcji [%]
Woda	120	0
CH ₂ Cl ₂	30	89
CH ₃ CN	30	72
brak	5	100

Rzadziej do reakcji piwaloilowania stosowany jest bezwodnik piwaloilowy (Piv₂O)⁷ ze względu na jego mniejszą reaktywność w porównaniu z PivCl. Aby uzyskać zadowalające wydajności reakcji piwaloilowania za pomocą Piv₂O najczęściej poddaje się go aktywacji na jeden z dwóch sposobów⁷: i/ 5 ekw. Piv₂O, 0.05 ekw. triflatu skandu, CH₃CN jako rozpuszczalnik (temp. -20 °C, 4 godz.); ii/ podwójna aktywacja bezwodnika z zastosowaniem trzeciorzędowej aminy oraz 2 ekw. bromku magnezu (temp. pokojowa, 25 godz.), (Schemat 1, przykład 3 oraz 4). W obu reakcjach uzyskano wydajności bliskie 100%.⁸

⁶ Ch. Bhujanga Rao, B. Chinnababu, Y. Venkateswarlu, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 8856.

⁷ E. Vedejs, O. Daugulis, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5702.

⁸ Y. Kita, H. Maeda, K. Omori, T. Okuno, Y. Tamura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 33, 2999.

Alternatywnie, reakcję piwaloilowania można przeprowadzić z użyciem amidu 3-piwaloilo-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyny (Schemat 1, Przykład 5). W ogólnej procedurze syntetycznej mieszaninę alkoholu i amidu w bezwodnym toluenie miesza się w wysokiej temperaturze 60-80 °C lub w refluksie przez 18-90 godz. Wydajności piwaloilowania mieszczą się w zakresie 87-99%. Ze względu na nietypową budowę 3-piwaloilotiazolidyny, znalazła ona szerokie zastosowanie w stereoselektywnych reakcjach piwaloilowania.

3. Metody usuwania grupy piwaloilowej

Usuwanie grupy piwaloilowej z funkcji hydroksylowych alkoholi prowadzi się najczęściej w warunkach zasadowych. Do tego celu wykorzystuje się między innymi wodne lub alkoholowe roztwory silnych zasad: MeNH_2 ⁹, alkoholanów¹⁰ oraz wodorotlenków¹¹. Reakcje z ich udziałem zachodzą w temperaturze pokojowej, w czasie 3-12 godz, z wydajnościami rzędu 60-95% (Tabela 2). Grupę piwaloilową można usunąć również w warunkach zasadowych stosując DIBALH w mieszaninie DCM/toluen (1:1, v/v)¹². Zastosowanie tlenku glinu oraz mikrofal również prowadzi do efektywnej deprotekcji Piv, w bardzo krótkim czasie, z wysoką wydajnością¹³.

Usuwanie grupy piwaloilowej w warunkach kwasowych jest stosowane bardzo rzadko. Efektywna hydroliza estru wymaga prowadzenia reakcji w drastycznych warunkach (3 M dioksan nasycony HCl, przez 18 godzin w refluksie)¹⁴.

Oprócz chemicznych metod usuwania grupy piwaloilowej, możliwa jest również hydroliza enzymatyczna estru piwaloilowego. Dla przykładu, wysoka aktywność hydrolaz grzyba z gatunku *Curvularia Lunata* umożliwiła jednoczesne usunięcie ponad dwudziestu grup piwaloilowych obecnych w strukturze steroidu¹⁵.

⁹ B. Griffin, M. Jarman, C. Reese, *Tetrahedron*, **1968**, 24, 639.

¹⁰ a) K. C. Nicolaou, T. J. Caulfield, H. Kataoka, N. A. Stylianides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 3693;

b) P. G. Gassman, W. Schenk, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 918.

¹¹ K. K. Ogilvie, D. J. Iwacha, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 14, 317; b) C. A. A. Van Boeckel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 3561.

¹² E. M. Carreira, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 8106.

¹³ S. V. Ley, D. M. Mynett, *Synlett*, **1993**, 793.

¹⁴ A. M. Fernandez, J. C. Plaquevent, L. Duhamel, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4007.

¹⁵ H. Kosmol, F. Hill, U. Kerb, K. Kieslich, *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 11, 641.

Tabela 2. Przegląd chemicznych i enzymatycznych metod deprotekcji grupy piwaloilowej.

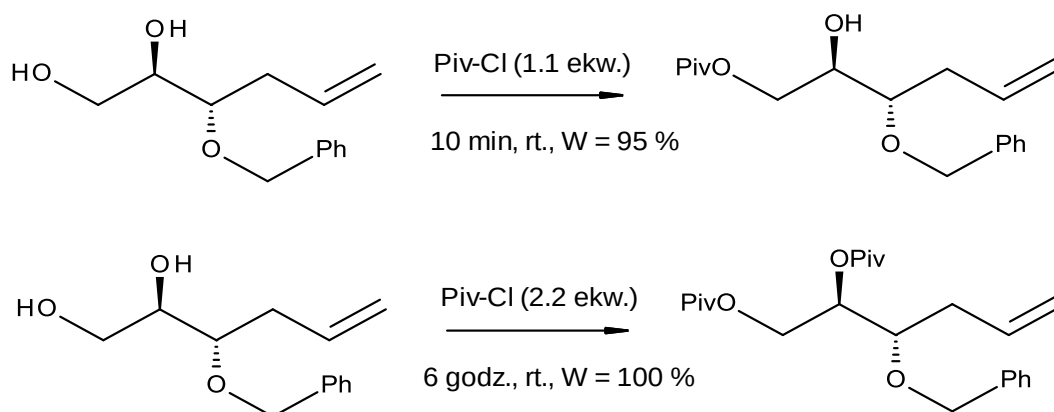
Warunki deprotekcji i wydajności reakcji :	Wydajność [%]
40% aq. MeNH ₂ , 3-12 godz., rt. ¹⁶	84-96
0.5 M MeONa/ MeOH, 3 godz., rt.	90
tBuOK / H ₂ O (8:2, v/v), 3 godz., rt.	94
0.5 M NaOH(KOH)/ EtOH / H ₂ O, 12 godz., rt.	58
Bu ₄ N ⁺ OH ⁻ , 4 godz., rt.	82
3 M HCl/dioksan, 18 godz., refluks	80
Al ₂ O ₃ , mikrofale, 12 min	93
DIBALH, CH ₂ Cl ₂ /toluen, 30 min, -78 °C	95
<i>Curvularia Lunata</i> , 6 godz.	64

4. Chemoselektywność reakcji piwaloilowania

Podstawową zaletą reakcji piwaloilowania jest jej wysoka chemoselektywność związana z preferencją acylowania alkoholi pierwszorzędowych. Wspomniana selektywność wynika z obecności rozbudowanej przestrzennie grupy *tert*-butylowej w strukturze piwaloilu, jednakże dla uzyskania wysokiej chemoselektywności piwaloilowania alkoholi pierwszorzędowych względem drugorzędowych niezbędna jest kontrola nadmiaru odczynnika piwaloilującego.

Bhujanga i wsp.⁶ wykorzystali 1.1 ekwiwalenta PivCl w warunkach pozbawionych rozpuszczalnika i katalizatora do chemoselektywnej reakcji piwaloilowania alkoholi pierwszorzędowych, uzyskując całkowite przereagowanie w czasie 10 min (Schemat 2). Niezwykle istotna w chemoselektywnym przebiegu reakcji jest kontrola nadmiaru użytego chlorku piwaloilu oraz czasu trwania reakcji – użycie w tej samej reakcji dwukrotnej ilości chlorku (2.2 ekwiwalenta) i wydłużenie czasu reakcji do 6 godz. dało wyłącznie produkt bis-piwaloilowania.

¹⁶ rt. – z ang. *room temperature*, odnosi się do temperatury pokojowej



Schemat 2. Przebieg reakcji piwaloilowania z udziałem 1° i/lub 2° rzędowej grupy hydroksylowej alkoholu, w zależności od użytego nadmiaru Piv-Cl.

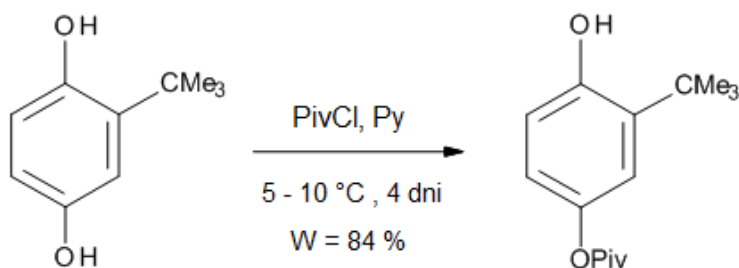
Celem weryfikacji selektywności piwaloilowania alkoholi 1° względem 2° za pomocą różnych odczynników acylujących. 1,4- oraz 1,5-diole (Tabela 3) poddano reakcji z PivCl (**1**), 3-piwaloiło-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyną (**2**), Piv₂O (**3**) (w ilości po 1.1 ekwiwalenta na grupę hydroksylową)¹⁷. Reakcje prowadzono w bezwodnym toluenie, zarówno w temperaturze pokojowej jak i podwyższonej 65-80 °C. Metodą GLC wyznaczono stosunek produktów piwaloilowania 1° grupy OH względem 2°-OH (1°-OPiv : 2°-OPiv, Tabela 3). Najlepszą chemoselektywność piwaloilowania alkoholu 1° otrzymano dla 3-piwaloiło-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyny (44:1), prowadząc reakcję w temperaturze 80 °C.

Tabela 3. Porównanie chemoselektywności piwaloilowania pierwszorzędowych grup hydroksylowych alkoholu względem drugorzędowych w zależności od zastosowanego odczynnika acylującego.

Struktura diolu	Odczynnik acylujący	Warunki reakcji	Stosunek produktów 1°-OPiv : 2°-OPiv
	1	r.t., 10 godz.	3 : 1
	2	65 °C, 65 godz.	27 : 1
	3	65 °C, 15 godz.	8 : 1
	1	r.t., 10 godz.	7 : 1
	2	65 °C, 65 godz.	20 : 1
	1	r.t., 10 godz.	4 : 1
	2	80 °C, 40 godz.	44 : 1
	1	r.t., 10 godz.	7 : 1
	2	65 °C, 65 godz.	20 : 1

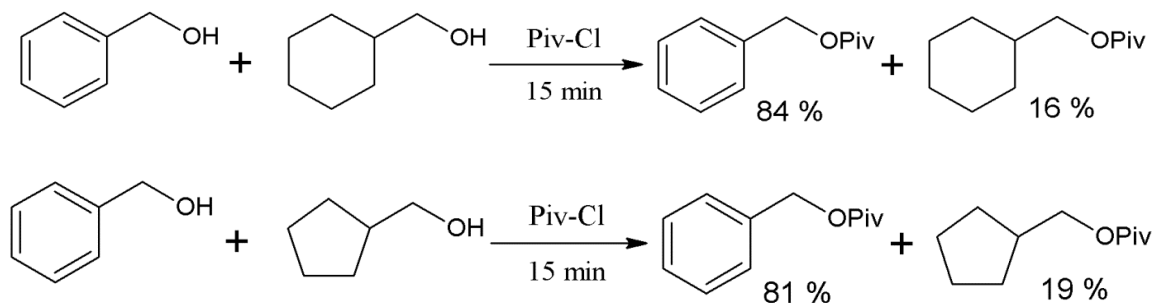
¹⁷ S. Yamada, T. Sugaki, K. Matsuzaki, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5932-5938.

Znane są w literaturze przykłady zastosowania reakcji piwaloilowania do osłony mniej zawadzonych grup hydroksylowych alkoholi alifatycznych¹⁸ i aromatycznych¹⁹ (Schemat 3). Reakcje takie prowadzi się z niewielkim nadmiarem chlorku piwaloilu w pirydynie, w stosunkowo niskich temperaturach.



Schemat 3. Przykład reakcji pochodnej fenolu z preferencyjnym przebiegiem piwaloilowania mniej zawadzonej grupy hydroksylowych.

Niezwykle korzystna preparatywnie jest możliwość wykorzystania grupy -Piv do chemoselektywnego piwaloilowania alkoholu benzyłowego w obecności pierwszorzędowego alkoholu alifatycznego. Podziałanie 1 ekwiwalentem PivCl na równomolową mieszaninę alkoholu benzyłowego oraz hydroksymetylocykloheksanu lub alternatywnie hydroksymetylocyklopentanu (Schemat 5) już po 15 min. dało blisko 5-krotnie więcej produktu piwaloilowania alkoholu benzyłowego w stosunku do alkoholu alifatycznego⁶.



Schemat 5. Chemoselektywne piwaloilowanie alkoholu benzyłowego w obecności alkoholu alifatycznego.

5. Regioselektywność wprowadzania grupy piwaloilowej

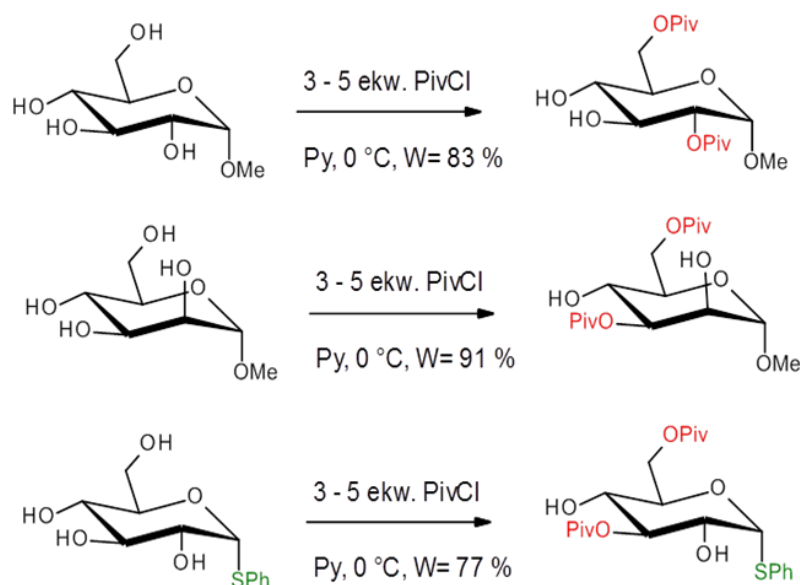
Literatura poświęcona chemii cukrów dostarcza wielu przykładów regio-selektywnego przebiegu reakcji piwaloilowania. W rozważanych reakcjach tylko jedna spośród trzech drugorzędowych grup hydroksylowych pierścienia cukrowego ulega zabezpieczeniu grupą Piv²⁰. Ze względów przestrzennych jest to najczęściej grupa

¹⁸ P. F. Schuda, M. R. Heimann, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 4267, 24.

¹⁹ L. K. T. Lam, K. Farhat, *Org. Prep. Proced. Int.*, **1978**, 10, 79.

²⁰ L. Jiang, T.-H. Chan, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 6035-6038.

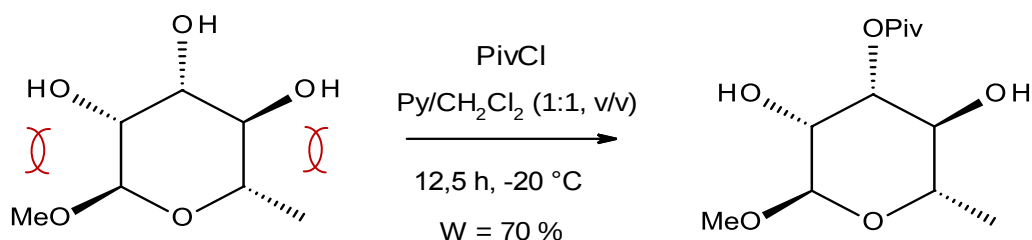
hydroksylowa w położeniu ekwatorialnym sąsiadującym z aksjalnym hydroksylem lub alkoksylem (Schemat 6). Selektywnemu piwaloilowaniu poddano zarówno cukry proste jak i dwucukry, wykorzystując 3-5 ekw. PivCl w pirydynie, w niskiej temperaturze 0 °C (Schemat 6). W każdym z rozważanych przypadków, selektywne piwaloilowanie węglowodanów prowadziło do zabezpieczenia pierwszorzędowych grup hydroksylowych w kombinacji z grupami C3-OH, rzadziej C2-OH. Otrzymane mono- i dipodstawione produkty zostały wykorzystane jako cząsteczki prekursorowe do syntez bardziej skomplikowanych polisacharydów²¹.



Schemat 6. Przykłady regioselektywnych reakcji piwaloilowania cukrów prostych.

Obserwowana wyższa reaktywność grup hydroksylowych w położeniu ekwatorialnym sąsiadującym z aksjalną grupą hydroksylową lub alkoksylową została wytłumaczona kierunkiem ataku czynnika acylującego, który zbliża się do grupy hydroksylowej z boku nie zaś z dołu czy z góry.

Regioselektywność piwaloilowania zależy od struktury substratu ale również od warunków prowadzenia syntezy. Spośród trzech drugorzędowych grup hydroksylowych substratu, tylko jedna – najmniej zawadzona przestrzennie ulega reakcji piwaloilowania (Schemat 7)²¹. Reakcję prowadzono za pomocą PivCl, w niskiej temp. -20 °C, w mieszaninie rozpuszczalników Py/DCM (1:1, v/v).

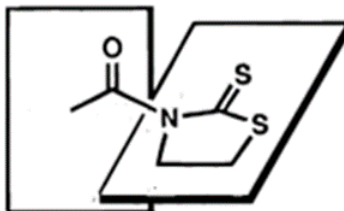


Schemat 7. Regioselektywne piwaloilowanie najmniej zawadzonej przestrzennie grupy hydroksylowej.

²¹ J. R. Merritt, E. Naiseng, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4443.

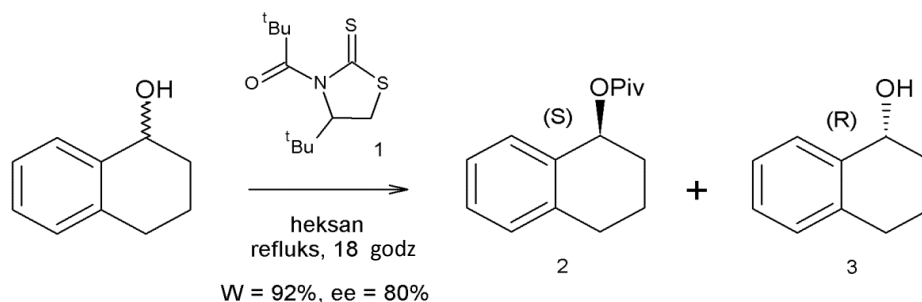
6. Stereoselektywność reakcji piwaloilowania

Yamada i Katsumata²² wykazali stereoselektywny charakter reakcji piwaloilowania alkoholi z użyciem 3-piwaloilo-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyny, posiadającej chiralność osiową wzdłuż wiązania C(O)-N (Rys. 3). Zastosowanie amidu w reakcji piwaloilowania racemicznej mieszaniny alkoholi umożliwia kinetyczny rozdział enancjomerów na skutek jego względnie szybkiej reakcji tylko z jednym z nich.



Rysunek 3. Struktura 3-piwaloilo-2-tiokarbonylo-1,3-tiazolidyny.

Wykorzystując dodatkowo zawadzoną 3-piwaloilotiazolidynę (**1**) (Schemat 8) przeprowadzono rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej drugorzędowego, cyklicznego alkoholu²⁵. Do reakcji użyto 5 ekw. racemicznego alkoholu oraz 1 ekw. amidu (**1**). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia heksanu przez 18 godz., uzyskując zabezpieczony piwaloilem enancjomer S (**2**) z wydajnością 92% (wydajność przeliczona względem użytego amidu) oraz nieprzereagowany enancjomer R (**3**). Wyznaczono nadmiar enancjomeryczny równy 80 %.



Schemat 8. Enancjoselektywna reakcja piwaloilowania racemicznego alkoholu z użyciem (S)-*N*-*tert*-butylokarbonylo-(4-*tert*-butylo-2-tiokarbonylo)-1,3-tiazolidyny.

Co ciekawe, dodatek odczynnika metaloorganicznego MeMgBr jako zasady lub MgBr₂ jako kwasu Lewisa w omawianej reakcji spowodował odwrócenie stereoselektywności (reakcji piwaloilowania uległ enancjomer R)²³. Prawdopodobnie dzieje się tak z powodu powstania odmiennej konformacji stanu przejściowego amidu wynikającej z możliwości tworzenia chelatu z jonem magnezu.

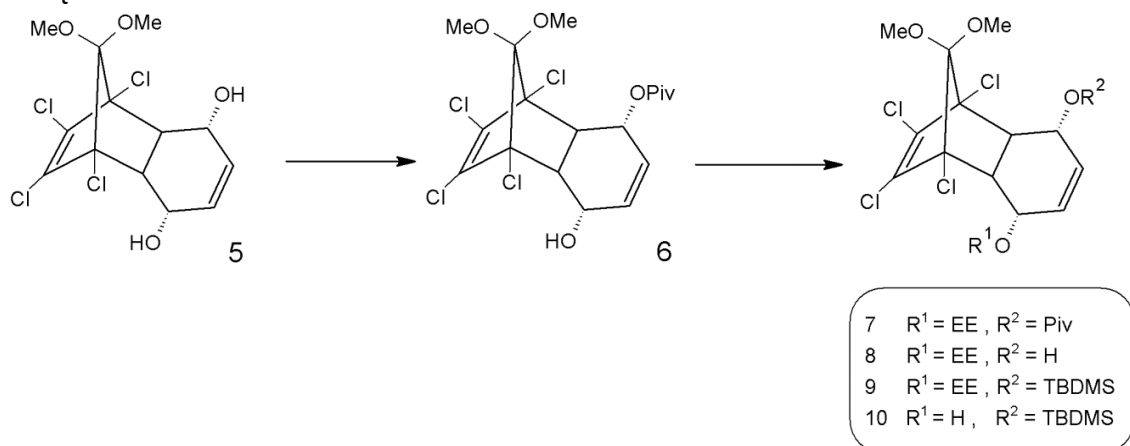
(S)-*N*-*tert*-butylokarbonylo-(4-*tert*-butylo-2-tiokarbonylo)-1,3-tiazolidynę zastosowano w syntezie noduscyminy, antybiotyku przeciwko bakteriom tlenowym i bez-tlenowym²⁴. W pierwszym kroku przeprowadzono piwaloilowanie jednej z grup

²² S. Yamada, H. Katsumata, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 9365-9373.

²³ Y. Nagao, M. Yagi, T. Ikeda, E. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 201.

²⁴ E. Gossinger, M. Graupe, C. Kratky, K. Zimmermann, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 3083.

hydroksylowych *mezo*-diolu **5** (Schemat 9). Otrzymany monoester (**6**) posłużył do wprowadzenia acetalowej osłony EE na drugą funkcję hydroksylową alkoholu. Grupa piwaloilowa została w kolejnym kroku usunięta, by na jej miejsce wprowadzić osłonę siliłową TBDMS.

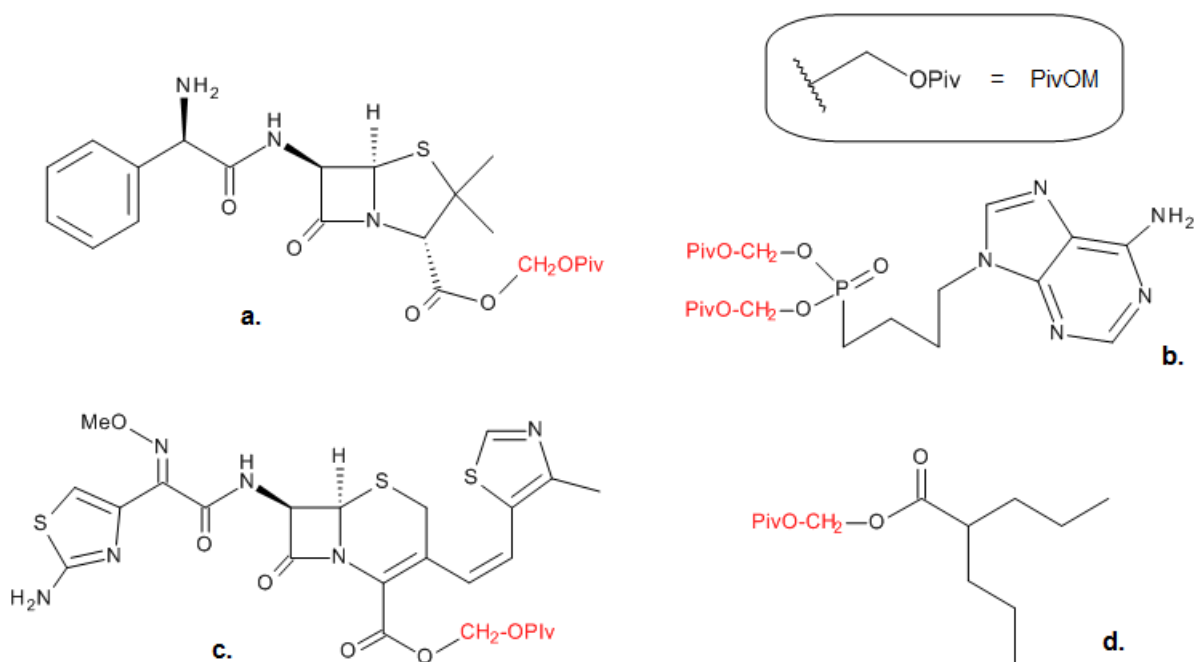


Schemat 9. Zastosowanie (S)-*N*-*tert*-butylokarbonylo-(4-*tert*-butylo-2-tiokarbonylo)-1,3-tiazolidyny w syntezie noduscyminy.

7. Zastosowanie grupy piwaloilowej w projektowaniu leków

Estry typu PivOR cechuje odporność na działanie kwasu żołądkowego oraz enzymów trawiennych obecnych w żołądku oraz jelicie cienkim. Dzięki tej właściwości grupa piwaloilowa znalazła szerokie zastosowanie w projektowaniu leków²⁵, umożliwiając skuteczną osłonę grup(y) hydroksylowych(ej) substancji aktywnej. W rezultacie takiego rozwiązania substancja aktywna jest stabilna w przewodzie pokarmowym (częściowa eliminacja efektu pierwszego przejścia) jak również posiada zwiększoną zdolność przechodzenia przez barierę lipidową komórek umożliwiającą jej efektywniejsze wchłanianie. W przemyśle farmaceutycznym komercyjnie dostępnych jest wiele leków zawierających jako substancje czynne związki z grupą piwaloiloksymetylową (PivOM), między innymi dipiwoksyl adefowiru, piwampicylina, piwoksyl amdinocyliny, piwoksyl cefditorenu należący do III generacji cefalosporyn oraz piwoksyl kwasu walproinowego będący lekiem przeciwdrgawkowym stosowanym w przypadkach epilepsji. Ich struktury zostały przedstawione na rys. 4.

²⁵ L. P. Graham, *An Introduction to Medicinal Chemistry, Fourth Ed.*, Oxford University Press, Inc., 2009, 421-444.



Rysunek 4. Struktury proleków z grupą PivOM: a.) piwampicylina, b.) dipiwoksyl adefowiru, c.) piwoksyl cefditorenu oraz d.) walproinian piwoksylu.

W pokazanych strukturach proleków, grupa POM zabezpiecza polarne funkcje kwasowe, nadając cząsteczce charakter lipofilowy. Dzięki wzrostowi liofilowości proleki są lepiej wchłaniane z przewodu pokarmowego do krwi niż związek macierzysty. To z kolei zwiększa biodostępność leku dzięki czemu można podawać niewielkie dawki tego leku doustnie uzyskując duży efekt terapeutyczny. Przykładowo zabezpieczenie grupą PivOM funkcji hydroksylowych adefowiru - kwasu fosfonowego będącego substancją czynną w lekach stosowanych przy wirusowych zapaleniach wątroby typu B (*Preveon* oraz *Hepsera*) powoduje jego lepsze wchłanianie do terapeutycznego celu leku – komórek wątroby. Jego prolek – dipiwoksyl adefowir zawiera dwie jednostki piwaloiloksymetylowe. Prekursor adefowiru ulega przekształceniu przez enzymy komórek gospodarza do difosforanu adefowiru, który blokuje odwrotną transkryptazę wirusa hepatotropowego (niszczącego komórki wątroby), a po wbudowaniu się do DNA wirusa powoduje zakończenie łańcucha. W roku 2003 lek wszedł szczęśliwie na rynek krajów europejskich.

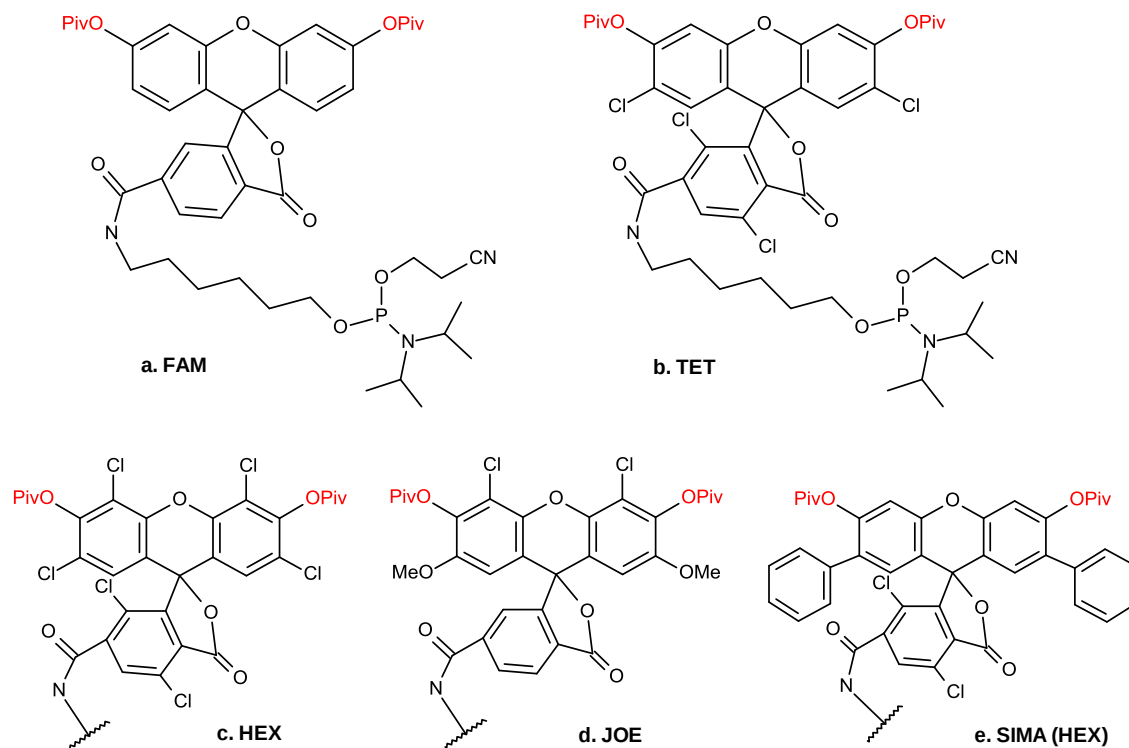
8. Zastosowanie grupy piwaloilowej w syntezie fluorescencyjnie znakowanych oligonukleotydów

Obok układów biotyna-awidyna, fluorescencyjne znakowanie oligonukleotydów stanowi najważniejszą metodę znakowania DNA i RNA, która obecnie z powodzeniem zastępuje znakowanie radioizotopami²⁶.

Ze względu na konieczność chemicznego włączenia znaczników w sekwencję DNA/RNA, reaktywne grupy hydroksylowe obecne w ich strukturze muszą zostać

²⁶ E. S. Mansfield, J. M. Worley, S. E. McKenzie, S. Surrey, E. Rappaport, P. Fortina, *Molecular and Cellular Probes*, **1995**, 9, 3, 145-156.

zabezpieczone w sposób kompatybilny z syntezą i deprotekcją oligonukleotydów. Eliminuje to niepożądane powstawanie produktów ubocznych i utratę właściwości fluorescencyjnych. Najbardziej użyteczna do tego celu okazała się grupa piwaloilowa (Rysunek 5).

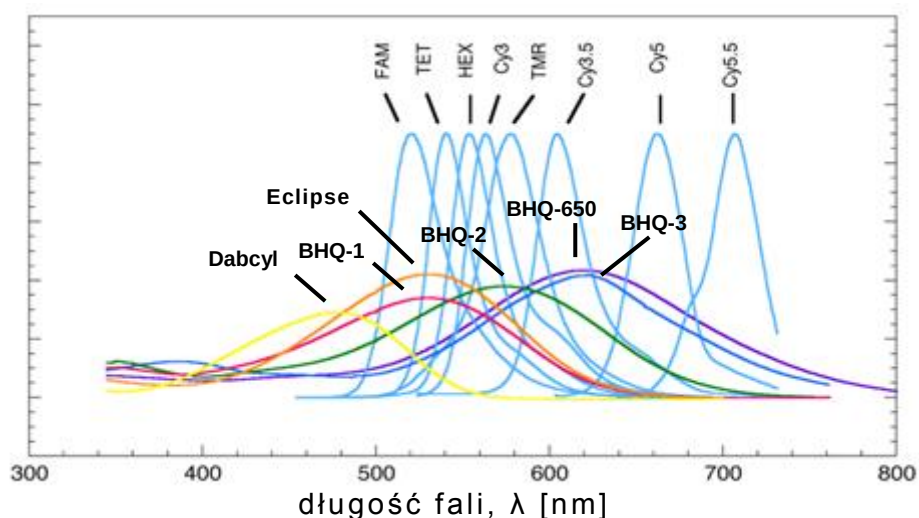


Rysunek 5. Struktury chemiczne komercyjnie dostępnych i stosowanych znaczników fluorescencyjnych.

Wśród powszechnie stosowanych fluorochromów wyróżnić należy fluoresceinę (FAM, zielona barwa po wzbudzeniu) i jej pochodne (TET, HEX, SIMA HEX, JOE), pochodne rodaminy (czerwona fluorescencja), aminowe acetylowane kumaryny (niebieska barwa) i inne. Najważniejsze zderzywizowane fluoresceiny oraz ich barwy po wzbudzeniu przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Przykłady znaczników fluorescencyjnych i ich barwy fluorescencji.

Nazwa fluorochromu	Długość fali przy maksimum emisji	Barwa fluorescencji
5'-Fluoresceina (6-FAM)	525 nm	Zielona
Tetrachlorofluoresceina (TET)	536 nm	Pomarańczowa
Heksachlorofluoresceina (HEX)	556 nm	Różowa
Dichlorodifenylofluoresceina (SIMA (HEX))	551 nm	Różowa
Dichlorodimetoksyfluoresceina (JOE)	548 nm	Różowo-pomarańczowa



Rysunek 6. Widma emisji sond znakowanych różnymi fluorochromami oraz wygaszaczami.

5'-Fluoresceina (FAM) może być dołączona do 5'-końca łańcucha oligonukleotydowego w postaci amidofosforanu o strukturze przedstawionej na rysunku 5, kończąc w ten sposób syntezę chemiczną oligomeru²⁶. Pozostałe zderywatyzowane fluoresceiny (HEX, JOE, TET) zostały zaprojektowane do zastosowania w wielokolorowej technice FISH umożliwiające określenie zaburzeń chromosomowych towarzyszących określonym chorobom człowieka. Dzięki wyznakowaniu różnych fragmentów DNA/RNA sondami z różnymi fluorochromami możliwe jest zlokalizowanie każdego z nich z osobna w badanym materiale genetycznym.

Grupa FAM włączona w sekwencję oligonukleotydu posiada dwie grupy Piv zabezpieczające funkcje C-3'- i C-6'-OH pierścieni aromatycznych. W tej formie cząsteczka nie posiada właściwości fluorescencyjnych, ponieważ te wynikają z połączenia dwóch charakterystycznych cech fluorochromów: sprzężonego układu wiązań podwójnych (π) w całej cząsteczce oraz wysokiej polarności wynikającej w przypadku fluorescein z obecności wolnych grup hydroksylowych. Zabezpieczona cząsteczka FAM jest więc grupą profluorescencyjną. Dopiero po odbezpieczeniu grup Piv FAM nabiera właściwości fluorescencyjnych. Zasadowolabilne grupy piwaloilowe usuwa się jednocześnie z odcięciem oligomeru od złoza i deprotekcją zasad nukleinowych stosując wodny roztwór NH_3 lub deprotekcję dwustopniową: 1) aq. NH_3 , 2) aq. MeNH_2 . Firma Glen Research zwróciła szczególną uwagę w swoich produktach na problem niestabilności znaczników w zasadowych warunkach deprotekcji oligomeru. Przykładowo, jeśli użyje się aq. MeNH_2 do deprotekcji grup zasadowo labilnych przed zastosowaniem wodnego NH_3 , to utworzą się w małej ilości niefluorescencyjne zanieczyszczenia. Wykazano²⁷, że dichlorodifenylofluoresceina (SIMA (HEX)) jest znacznie bardziej stabilnym znacznikiem niż HEX, chociaż wykazuje praktycznie identyczną absorpcję i emisję do jego widma (tabela 4). W przypadku zastosowania SIMA (HEX) grupy Piv można usunąć stosując aq. NH_3 / aq. MeNH_2 (tzw. AMA), w temperaturze pokojowej lub 65 °C.

²⁷ <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR25-13.html> (dostęp z dnia: 18.06.2016)

9. Zastosowanie grupy piwaloilowej do selektywnego zabezpieczania imidowego azotu N3 w urydynie i tymidynie

W 2013 roku Sobkowski²⁸ zastosował grupę -Piv do osłony azotu imidowego N3 w pierścieniu heterocyklicznym urydyny i tymidyny. Chociaż w większości przypadków synteza modyfikowanych nukleozydów nie wymaga wprowadzania osłony na azot N3 urydyny/tymidyny (mała reaktywność), to dla kilku reakcji (np. 2'-O-metylowania) zabezpieczenie to jest niezbędne. Opisywane w literaturze metody protekcji azotu N3 jak dotąd wykorzystywał do tego celu głównie grupę benzoilową²⁹, rzadziej arenosulfenylową³⁰ i Boc³¹. Przeprowadzone badania nad wykorzystaniem grupy Piv jako osłony azotu N3 ujawniły szereg zalet: *i/* wygodne i szybkie wprowadzanie Piv (poniżej jednej minuty w obecności zasady np. TEA); *ii/* możliwość selektywnego *N*-acylowania lub *O*-acylowanie w zależności od zastosowanego dodatku aminy; *iii/* stabilność N3-Piv w warunkach zasadowych i kwasowych przekłada się na możliwość selektywnego odbezpieczenia O-Piv w obecności N-Piv.

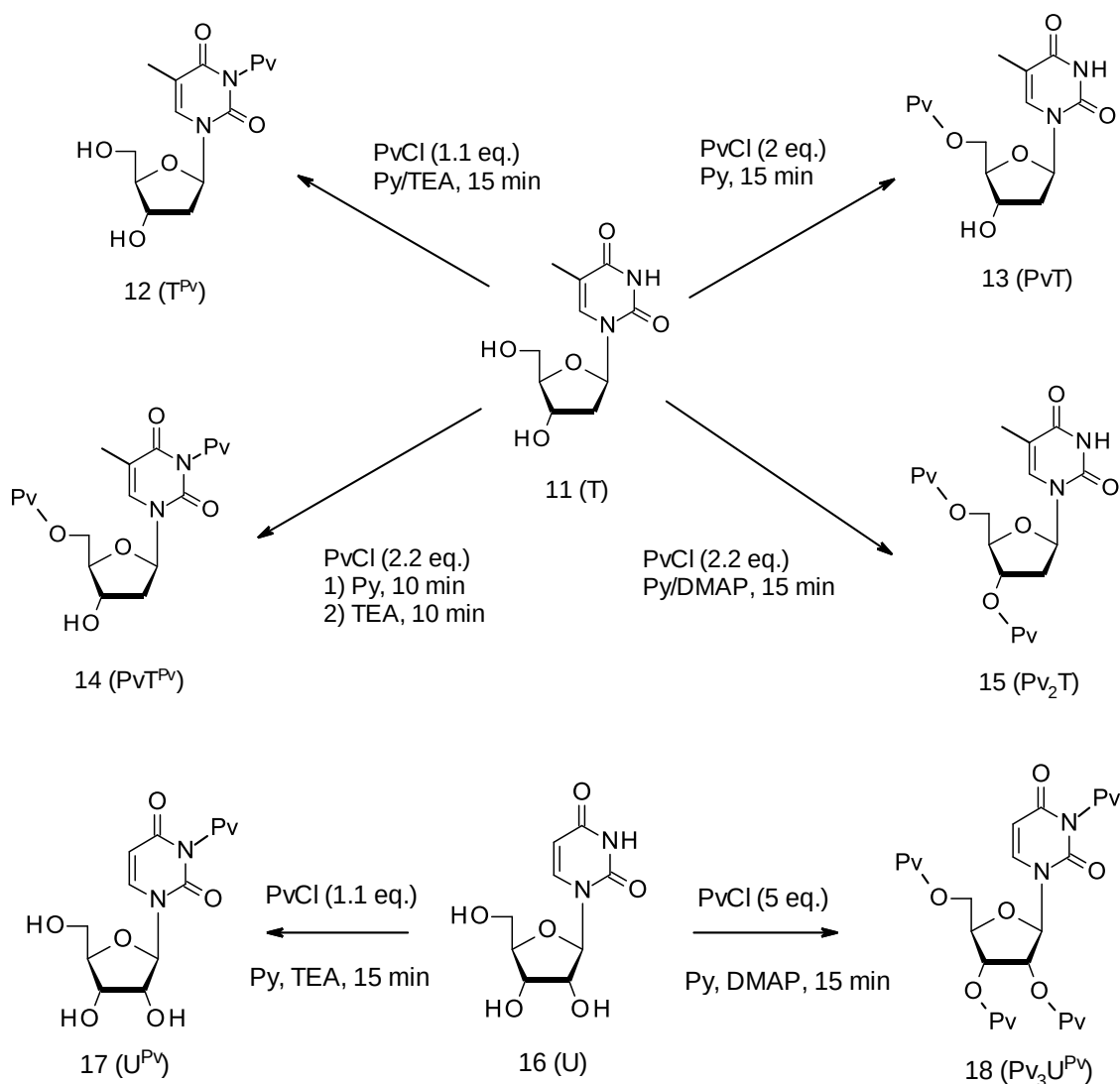
Reakcje piwaloilowania tymidyny (**11**) za pomocą PivCl przeprowadzono w czterech wariantach preparatywnych, otrzymując różnorodnie zabezpieczone pochodne: T^{Pv} (**12**), PvT (**13**), PvT^{Pv} (**14**) oraz Pv₂T (**15**) (Schemat 10)²⁷. Zastosowanie 1.1 ekwiwalenta PivCl w mieszaninie Py/TEA sprzyja selektywnej syntezie wyłącznie produktu N3-piwaloilowania, podczas gdy reakcja w pirydynie z 2 ekw. PivCl daje produkt 5'-O-Piv. Z kolei zastosowanie nadmiaru 2.2 ekw. PivCl prowadzi do utworzenia produktów bis-piwaloilowania **14** lub **15**. Ich struktura jest różna w zależności od rodzaju użytej w reakcji aminy trzeciorzędowej. W przypadku piwaloilowania urydyny (**16**) (Schemat 10) zastosowanie 1.1 ekw. PivCl w mieszaninie Py/TEA daje wyłącznie produkt N3-Piv (**17**) mimo obecności 1° grupy OH w reszcie cukrowej. Zwiększenie nadmiaru PivCl do 5 ekw. Doprowadziło do nieselektywnego piwaloilowania grup OH oraz do otrzymania Piv₃U^{Piv} (**18**) jako jedyne produktu.

²⁸ M. Sobkowski, *Czech. Chem. Commun.*, **2010**, 75, 1, 33-57.

²⁹ X. F. Zhu, H. J. Williams, A. I. Scott, *Synth. Commun.* **2003**, 33, 1233.

³⁰ C. J. Welch, H. Bazin, J. Heikkilä, J. Chattopadhyaya, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1985**, 39, 203.

³¹ T. Kamimura, T. Masegi, T. Hata, *Chem. Lett.* **1982**, 965.



Schemat 10. Metody selektywnego wprowadzania grupy Piv w tymidynie oraz urydynie.

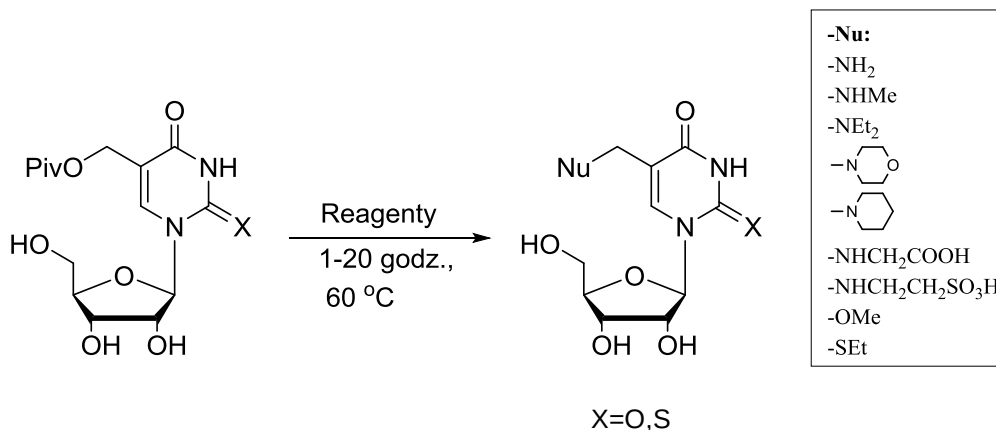
Usunięcie grupy N-Piv przeprowadza się w warunkach wodnych, w środowisku obojętnym - odmiennie od zasadowych warunków deprotekcji OPiv (aq. NH₃, MeNH₂, MeONa). Istnieje zatem możliwość selektywnej deprotekcji N3-Piv w obecności – OPiv. Hydroliza T^{Piv} (12) w wodzie w temp. pokojowej zachodzi całkowicie w ciągu 7 dni. Czas deprotekcji można skrócić do 10 min. stosując podwyższoną temperaturę 80 °C; efekt szybkiej deprotekcji T^{Piv} w wodzie przypisano autokatalitycznej reakcji hydrolizy pod wpływem wydzielającego się podczas reakcji kwasu piwaloowego.

10. Zastosowanie grupy piwaloiloksylowej jako grupy opuszczającej w syntezie różnorodnie podstawionych 5-metylourydyn i 5-metylo-2-tiourydyn (xm⁵U i xm⁵s²U)

W ostatnim czasie opisano³² możliwość wykorzystania grupy piwaloiloksylowej w położeniu pseudobenzylovym 5-hydroksymetylourydyny/ 2-tiourydyny jako dobrej grupy opuszczającej w reakcji 5-piwaloiloksymetylourydyny/ 2-tiourydyny z odczyn-

³² K. Bartosik, G. Leszczyńska, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, 56, 6593.

nikami o charakterze nukleofilowym tj. amoniak, aminy 1° i 2°, w tym aminy cykliczne (morfolina, piperidyna), sole tetrabutylamoniowe glicyny i tauryny, anion alkoksylowy oraz tiolanowy (Schemat 11). Reakcje prowadzono w zróżnicowanych warunkach preparatywnych (rozpuszczalniki organiczne/ woda, czas reakcji od 1 do 20 godz.) w podwyższonej temperaturze (50-60 °C).

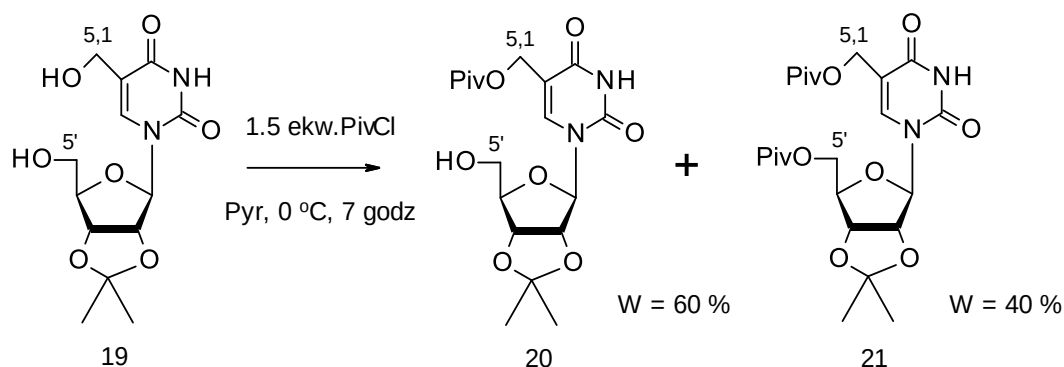


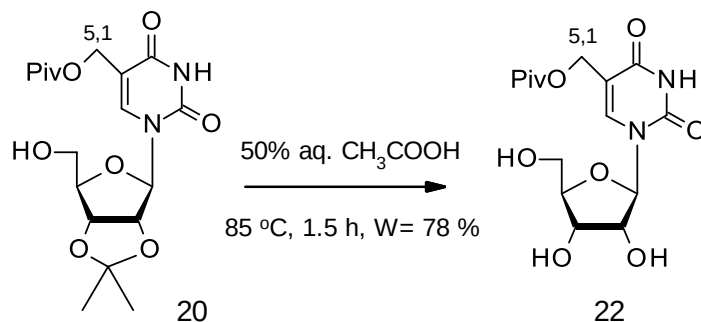
Reagenty: 8 M NH_3/EtOH ; 30% aq. NH_3 ; 8 M $\text{MeNH}_2/\text{EtOH}$; 8 M $\text{MeNH}_2/\text{EtOH}$; 40% aq. MeNH_2 ; $\text{Et}_2\text{NH}/\text{H}_2\text{O}$ 4/1 v/v; morfolina/ H_2O 4/1 v/v; piperidyna/ EtOH 1/1 v/v; piperidyna/ H_2O 4/1 v/v; 0.8 M $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{NBu}_4^+/\text{EtOH}$; 0.8 M $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3^-\text{NBu}_4^+/\text{EtOH}$; 0.1 M $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$; 0.5 M EtSNa/EtOH

Schemat 11. Reakcja substytucji nukleofilowej 5-piwaloiloksymetylourydyny.

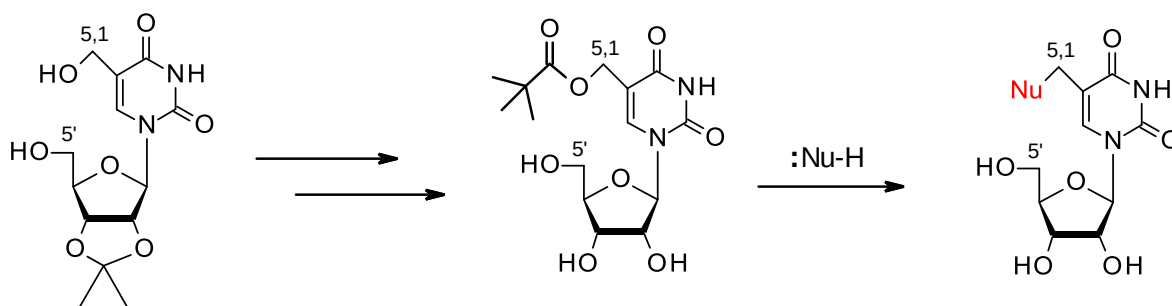
Opracowana metodyka umożliwiła otrzymanie 18 różnorodnie modyfikowanych 5-podstawionych urydyn/2-tiourydyn z wydajnościami 65-90%, spośród których sześć to jednostki natywne, występujące w sekwencjach cytozolowych i/lub mitochondrialnych tRNA.

Synteza substratu **20** niezbędnego dla wykonania powyższych przekształceń została przeprowadzona przez częściowo selektywne piwaloilowanie grupy hydroksylowej w położeniu pseudobenzylovym (pozycja C-5,1) 2',3'-O-izopropylideno-5-hydroksymetylo(-2-tio)urydyny (Schemat 12), stosując 1.5 ekwiwalenta PivCl w pirydynie, w niskiej temp. Otrzymane produkty mono- (**20**) i bis-piwaloilowania (**21**) zostały efektywnie rozdzielone metodą chromatografii kolumnowej. Następnie usunięto osłony izopropylidenowe w reakcji z 50 % CH_3COOH aq. (Schemat 12). Taki produkt poddano szeregowi reakcji z wyselekcjonowanymi odczynnikami nukleofilowymi zróżnicowanymi pod względem struktury i reaktywności (Schemat 13).





Schemat 12. Synteza 5-piwaloiloksymetylourydyny.



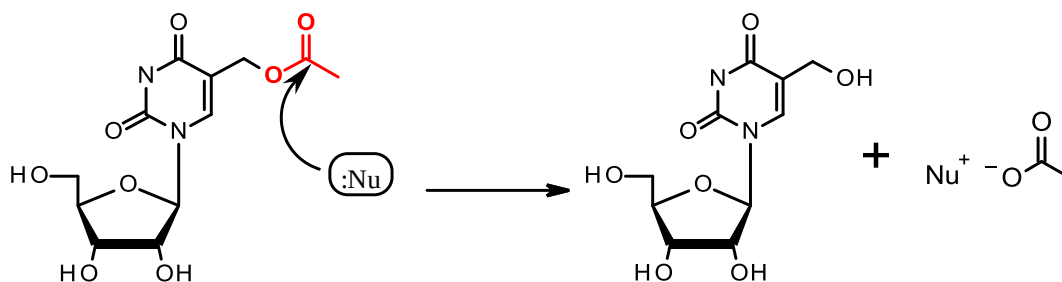
Schemat 13. Ogólny schemat syntezy 5-podstawionych urydyn *via* allilowe podstawienie nukleofilowe Pivom⁵U.

Korzyści płynące z zastosowania grupy Piv do syntezy 5-podstawionych urydyn i 2-tiourydyn to:

- stabilności 5-piwaloiloksymetylourydyny w warunkach zarówno syntezy jak i oczyszczania;
- możliwości prowadzenia reakcji S_N w zróżnicowanych warunkach preparacyjnych, w tym w środowisku wodnym;
- uniwersalności i wysokiej wydajności reakcji podstawienia nukleofilowego oraz braku niepożądanych produktów;

O znaczeniu syntetycznym grupy piwaloilowej jako osłony estrowej decyduje również jej większa stabilność w warunkach zarówno zasadowych jak i kwasowych w porównaniu z innymi osłonami estrowymi (-Ac, -izopropyliden). W literaturze znane są doniesienia o częściowym podstawieniu grupy 5,1-acetoksyłowej (OAc) amoniakiem czy metyloaminą jednakże głównym produktem tej reakcji jest hm⁵U (schemat 14)³³. Grupa acetylowa w przeciwieństwie do piwaloilowej wykazuje znacznie mniejszą trwałość, szczególnie w warunkach zasadowych, dlatego nie daje szans na powodzenie zastosowanej strategii.

³³ M. de Kort, P. de Visser, J. Kurzeck, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, W. Rüger, J. H. van Boom, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 2075.



Schemat 14. Hydroliza wiązania estrowego oraz usunięcie osłony Ac w reakcji z nukleofilem.

Obecnie podejrzewa się, że istnieje możliwość aplikacji opracowanych protokołów do syntezy modyfikowanych fragmentów RNA/ DNA w wyniku post-syntetycznej modyfikacji na poziomie łańcucha oligomeru. Zwiększenie dostępności syntetycznej otrzymanych na tej drodze oligomerów modyfikowanych $\text{xm}^5\text{U}/\text{xm}^5\text{s}^2\text{U}$ ma znaczenie dla poznania wpływu 5-podstawionych urydyn na aktywność biologiczną cząsteczek tRNA. Oligomer modyfikowany Pivom⁵U potencjalnie umożliwia przeprowadzenie post-syntetycznej transformacji $-\text{OPiv} \rightarrow -\text{Nu}$, nad czym aktualnie trwają dalsze prace.

11. Podsumowanie

Wybór odpowiedniej osłony dla danej grupy funkcyjnej wymaga rozważenia wielu aspektów dotyczących zarówno strategii jak i taktyki syntezy. Ocenie muszą zostać poddane odczynniki, warunki reakcji oraz schemat syntezy związku wielofunkcyjnego, w celu ustalenia kompatybilności zastosowanych grup ochronnych. Znaczenie ma nie tylko rodzaj wyselekcjonowanych grup ochronnych, ale również kolejność ich wprowadzania/usuwania.

Spośród szeregu grup acylowych stosowanych w syntezie organicznej do osłony funkcji hydroksylowych, grupa piwaloilowa spełnia szereg warunków decydujących o jej użyteczności. Między innymi cechuje się selektywnym, wydajnym i łatwym preparatywnie sposobem wprowadzenia, produkty piwaloilowania są stabilne w warunkach kwasowych i zasadowych jak również w procesach ich izolacji i oczyszczania. Jednocześnie grupa piwaloilowa daje się stosunkowo łatwo usunąć po syntezie docelowego produktu a jej deprotekcja w warunkach zasadowych stwarza możliwość zachowania ortogonalności z grupami o charakterze kwasowolabilnym czy fluorolabilnym. Nie bez znaczenia jest również niska cena i dostępność PivCl, który standardowo stosuje się do wprowadzenia grupy piwaloilowej oraz wodnych/ alkoholowych roztworów zasad niezbędnych do jej usunięcia.

Patrząc poprzez pryzmat doniesień literaturowych, zakres stosowania grupy piwaloilowej jest szeroki, jednak najczęściej dotyczy on preparatyki związków polihydroksylowych, tj. cukry, alkohole wielowodorotlenowe oraz nukleozydy.

INDEKS AUTORÓW

Bartosik Karolina	57
Ciesielski Witold	16
Cieślak Maciej	5
Festinger Natalia	16
Giżyńska Małgorzata	7
Grajek Henryk	27, 37
Jankowska Elżbieta	7
Jonik Justyna	27, 37
Jung Jarosław	47
Karpowicz Przemysław	7
Leszczyńska Grażyna	57
Purchała Marcin	27, 37
Smarzewska Sylwia	16
Stefaniuk-Grams Anna	47
Surynt Piotr	57



SEKCJA STUDENCKA

Polskiego Towarzystwa Chemicznego

ul. Freta 16
00-227 Warszawa

e-mail: ssptchem@ptchem.pl
<http://www.ssptchem.pl>
<https://pl-pl.facebook.com/sekcja.studencka/>

CHEMIA

cztery etapy do sukcesu
na maturze

etap 1.

ZBIÓR ZADAŃ



etap 2.

ZADANIA PRZEDMATURALNE



etap 3.

POWTÓRKA PRZED MATURĄ



etap 4.

PRÓBNE ARKUSZE



OFICyna
EDUKACYJNA

KRZYSZTOF PAZDRO

www.pazdro.com.pl