

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246032 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440650**

(22) Data zgłoszenia: **2022.03.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.09.18 BUP 38/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.11.18 WUP 47/2024**

(51) MKP:

C02F 1/28 (2023.01)

B01J 20/22 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA
KOŚCIUSZKI, Kraków, PL
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**PRZEMYSŁAW JODŁOWSKI, Kraków, PL
GRZEGORZ KUROWSKI, Kraków, PL
ANNA BOGUSZEWSKA-CZUBARA, Rudnik, PL
BARBARA BUDZYŃSKA, Lublin, PL
WITOLD PISKORZ, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Andrzej Stachowski, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym

PL 246032 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym z zastosowaniem sieci metaloorganicznej NU-1000.

Mefedron ([1-(4-metylofenylo)-2-metyloaminopropan-1-on; 4-metylometkatynon; 4-MMC) to syntetyczna pochodna katynonu, na międzynarodowym rynku znana także jako: Meph, MMCat, Meow, Friskrens, Crab czy Diabło XXX. W Polsce najbardziej rozpowszechniony jest pod nazwami: Mefka, Mef, Melcia, Miau Miau (J.B. Zawilska, J. Wojcieszak, Artykuł poglądowy Mefedron – „dopalacz” o działaniu psychostymulującym i sympatomimetycznym, *Neuropsychiatr. i Neuropsychol. Neuropsychol.* 5. 2010). Należy do grupy β ketonów, zawiera grupę karbonylową w pozycji β łańcucha fenyletyloaminy. Występuje jako sól w postaci chlorowodoru, tworząc białawy proszek rozpuszczalny w wodzie. Posiada dwa enancjomery: S-mefedron i R-mefedron, przy czym, ze względu na większe podobieństwo S-mefedronu do naturalnego katynonu, uważa się, że właśnie ta forma wywołuje silniejsze działanie [WHO, 2014, https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_12_review.pdf]. Obecnie na nielegalnym rynku mefedron wykorzystywany jest jako narkotyk klubowy, coraz częściej zastępując 3,4-Metylenodioksymetamfetaminę (MDMA, ecstasy). Wykorzystują go także osoby uzależnione od amfetaminy i jej pochodnych, ponieważ ze względu na podobieństwo działania stał się dla nich tańszą alternatywą dla nadużywanych związków, czyli tzw. Amphetamine Type Stimulants, ATS (R. Skowronek, Kokaina – o czym jeszcze powinien wiedzieć kardiolog?, *Kardiol. Pol.* 70 (2012) 987).

Jego działanie jest podobne do kokainy, amfetaminy czy MDMA. Mefedron stymuluje ośrodkowy układ nerwowy, działa empatogennie, halucynogennie i psychostymulująco, jednak nieco słabiej od amfetaminy. Na początku występuje silne pobudzenie, chęć interakcji społecznych, pobudzenie seksualne, poprawa nastoju i zwiększenie czujności. Związek wykazuje też działanie uzależniające.

Ze względu na podobieństwo w mechanizmie działania, objawy przedawkowania mefedronu przypominają objawy wywołane przez psychostymulanty pobudzające układ współczulny – sympatykomimetyki.

Pojawiają się psychozy paranoidalne, zespoły depresyjne, urojenia i manie prześladowcze. Odnotowano również przypadki śmiertelnego przedawkowania mefedronu.

Spośród wielu substancji psychoaktywnych, dopalacze oraz „club drugs” zdobywają coraz większą popularność wśród młodzieży. Ich dostępność, cena oraz luki prawne powodują, że są one coraz łatwiej dostępne, a co za tym idzie, są przyczyną ciężkich zatruć.

Słowo „dopalacze” jest szeroko pojętym terminem, potocznie określającym substancje psychoaktywne (NPS, new psychoactive substances) będące nowymi narkotykami lub związkami psychotropowymi w formie czystej lub w postaci produktu, które nie są kontrolowane przez Konwencję Narodów Zjednoczonych dotyczącą leków/związków psychoaktywnych, a które mogą wywołać szkody zdrowotne porównywalne do tych, które są skutkiem stosowania substancji wymienionych w przywołanych konwencjach (Oficjalna strona internetowa Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii – EMCDDA. <http://www.emcdda.europa.eu> 22.01.2017).

Obecne osiągnięcia medycyny i nanotechnologii pozwalają na efektywne odtrucie organizmu w przypadku ciężkich zatruć różnego rodzaju toksynami, jednakże usuwanie środków psychoaktywnych bazuje na metodach farmakologicznych i nefarmakologicznych, do których można zaliczyć zastosowanie powtarzanych dawek węgla aktywnego lub alkalizację i zakwaszenie krwi i moczu z jednoczesną forsowną diurezą (K. Jurowski, W. Piekoszewski, *Toksykologia*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2020).

Oprócz wielu zalet węgla aktywnego, takich jak łatwa dostępność, biogodność czy cena, posiada on jednak szereg ograniczeń, takich jak nieuporządkowana struktura, brak określonej wielkości porów oraz gwałtowna kinetyka adsorpcji ksenobiotyków. Ponadto, zbyt gwałtowna adsorpcja środków psychoaktywnych na węglu aktywnym może spowodować występowanie nasilonych objawów odstawiennych.

Spośród szeregu możliwych materiałów posiadających właściwości sorpcyjne ksenobiotyków, sieci metaloorganiczne poprzez swoje właściwości, takie jak wysoka biogodność, wysokie parametry sorpcyjne, duża powierzchnia właściwa czy ściśle zdefiniowane rozmiary porów, mogą stanowić alternatywę dla węgla aktywnego.

Sieci metaloorganiczne (MOF, *ang. metal organic frameworks*), znane również pod nazwą polimery koordynacyjne, stanowią grupę hybrydowych materiałów krystalicznych zbudowanych z jonów metali przejściowych połączonych ze sobą łącznikami organicznymi. W trakcie syntezy tych materiałów

powstaje porowata struktura, w której wielkość kanałów jest ściśle zdefiniowana poprzez dobór linkerów organicznych. Materiały te ze względu na budowę oraz specyficzne właściwości znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak medycyna, ochrona środowiska czy kataliza.

Ze zgłoszenia patentowego CN107913673A znana jest metoda syntezy sieci metaloorganicznej i sposób eliminacji z roztworu substancji aktywnych z grupy leków przeciwdrgawkowych, fenobarbitalu, fenytoiny sodowej, karbamazepiny i walproinianu sodu. Sieć metaloorganiczną MIL-53 (M) zbudowaną z jonów metali przejściowych (M=Cr, Al, Fe) oraz linkera organicznego – kwasu tereftalowego i jego analogów, w ilości 8 mg, uprzednio aktywowaną na wyparce obrotowej w 80°C, a następnie wygrzewaną w piecu próżniowym w 150°C przez 24 h, zastosowano do adsorpcji leków przeciwdrgawkowych z zanieczyszczonej wody o objętości 80 ml i stężeniu substancji aktywnej od ng/L do µg/L, do której następnie dodawano 1 ml nadtlenu wodoru. Tak otrzymaną zawiesinę poddawano działaniu lampy ksenonowej o mocy 3500 W, jednocześnie utrzymując pH na poziomie 3 lub 5. Adsorpcja zanieczyszczeń z jednoczesną fotodegradacją przy zastosowaniu promieniowania prowadzona była przez okres 4–6 godzin w zamkniętym reaktorze.

W zgłoszeniu patentowym CN108421531A ujawniono sposób syntezy sieci metaloorganicznej opartej o jony miedzi. W przedstawionym rozwiązaniu zmieszano 2,7 g azotanu miedzi z 0,9 g kwasu 2,5-bis(3',5'-dikarboklofenylo)-benzoesowego, a następnie przeniesiono do 180 ml roztworu N-N-dimetyloformamidu z wodą (1 : 1). Tak otrzymaną mieszaninę ogrzewano w zamkniętej butelce w temperaturze 90°C przez 10 h. Uzyskane w ten sposób kryształy przemywano trzykrotnie etanolem i następnie umieszczono w etanolu na 1–3 dni, zmieniając roztwór etanolu co 12 h. Tak przemyte kryształy suszono w 100°C przez 10 godzin. Otrzymaną wg wynalazku sieć metaloorganiczną zastosowano do adsorpcji diklofenaku z roztworu wodnego o stężeniach 500–1300 mg/L oraz chlorowodoru chlorpromazyny z wodnego roztworu o stężeniach 200–1000 mg/L. Adsorpcję prowadzono, przygotowując uprzednio zawiesinę 10 mg sieci metaloorganicznej w 50 ml wodnego roztworu substancji aktywnej o określonym stężeniu. Maksymalna zdolność sorpcyjna substancji aktywnej w przypadku adsorpcji diklofenaku z wodnego roztworu wynosiła 0,3 g diklofenaku/g sieci metaloorganicznej, podczas gdy w przypadku adsorpcji chlorpromazyny maksymalna zdolność adsorpcyjna wynosiła 0,5 g chlorpromazyny na 1 g sieci metaloorganicznej.

Sposób usuwania toksyn mocznicowych ze środowiska wodnego za pomocą sieci metaloorganicznej NU-1000 został opisany w międzynarodowym zgłoszeniu WO2020086496A1. Sieć metaloorganiczną, otrzymaną według procedury znanej z literatury, zastosowano do usuwania toksyn mocznicowych z wodnych roztworów siarczanu p-krezylu, kwasu hipurowego oraz siarczanu indoksyli. Według opisu zgłoszeniowego, efektywność sorpcyjną sieci metaloorganicznych określano poprzez ekspozycję 1,5 mg NU-1000 na 2,5 mL wodnego roztworu toksyny mocznicowej lub 0,2 M wodnego roztworu NaCl przez 24 h w temperaturach 297, 303 oraz 310 K. Opisany sposób usuwania toksyn mocznicowych charakteryzuje się wysoką efektywnością adsorpcji toksyn sięgającą 100%.

Ze zgłoszenia patentowego EP3474011A1 znany jest sposób usuwania związków psychoaktywnych z próbek biologicznych poprzez zastosowanie urządzenia przepływowego składającego się z co najmniej jednej kolumny zawierającej cząstki sorbentu takiego jak Al₂O₃ i/lub krzemionki oraz jednej lub kilku soli higroskopijnych. Urządzenie przedstawione w patencie pozwala na usunięcie z płynów biologicznych, takich jak mocz, związków psychoaktywnych jak morfina, amfetamina, kodeina, MDMA, mefedron, ketamina, kokaina, 7-amino flunitrazepam, PCP czy oxazepam.

Mefedron jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, może być toksyczny dla organizmów wodnych, a także przedostawać się do wody pitnej. Wcześniejsze badania wykazały, że podczas analizy próbek ścieków wykryto substancje psychoaktywne takie jak mefedron, α-pirolidynopentiofenonu czy pochodne piperazyny (T. Gao i wsp., Occurrence of New Psychoactive Substances in Wastewater of Major Chinese Cities. *Sci. Total Environ.* 2017, 575, 963–969.) W pracy (D. Aberg i wsp., The Environmental Release and Ecosystem Risks of Illicit Drugs during Glastonbury Festival, *Environ. Res.* 2022, 204 (PB), 112061) przedstawiono wyniki badań potwierdzające zwiększone stężenie takich związków jak kokaina, benzoiloeogonina czy ecstasy w wodzie z rzeki Redlake River USA), które znacząco wzrosło w związku z odbywającym się w tym miejscu corocznym festiwalem muzycznym.

Celem niniejszego wynalazku jest opracowanie sposobu obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym do poziomu bezpiecznego dla organizmów żywych, charakteryzujący się wysoką efektywnością i dającym się przewidzieć przebiegiem sorpcji.

Zgodnie z wynalazkiem, sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym, w którym to sposobie stosuje się sieć metaloorganiczną NU-1000, aktywowaną uprzednio przez wygrzewanie

w próżni w 120°C przez 12 h, którą wprowadza się do środowiska wodnego o temperaturze 25°C na 24 godziny, a następnie oddziela, charakteryzuje się tym, że na 1 mL wodnego roztworu mefedronu, stosuje się 5–25 mg NU-1000, który po wprowadzeniu do roztworu pozostawia się w nim ciągle mieszając, a następnie oddziela przez wirowanie z szybkością 4000 rpm przez 10 minut, przy czym proces ten powtarza się aż do uzyskania w środowisku wodnym dopuszczalnego biologicznie stężenia mefedronu, korzystnie mniejszego niż wartość LC50 wyznaczona w modelu Danio pręgowanego wynosząca 0,108 mg/mL (609,9 µM).

Dzięki zastosowaniu sposobu obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym według wynalazku, uzyskano przewidywalną prędkość sorpcji mefedronu i wysoką efektywność procesu.

Sposób według wynalazku został przedstawiony w korzystnych przykładach realizacji. Część wspólna dla wszystkich przykładów.

Do oznaczenia stężenia mefedronu w roztworach wyjściowych i w roztworach, co do których zastosowano sposób według wynalazku, posłużono się metodą analizy spektrofotometrycznej.

Wyznaczono krzywą wzorcową absorbancji dla wodnych roztworów mefedronu o znanym stężeniu. Przygotowano wodny roztwór mefedronu o stężeniu 0,45 mg/mL, na wadze analitycznej odważono 4,5 mg mefedronu, a następnie przeniesiono ilościowo do kolby i uzupełniono wodą do objętości 10 mL. Następny roztwór przygotowano pobierając 5 mL roztworu wyjściowego, które przeniesiono ilościowo do kolby i uzupełniono wodą do objętości 10 mL. Kolejne roztwory przygotowano powtarzając procedurę rozcieńczeń pobierając 5 ml roztworu poprzedzającego, przenoszono ilościowo do kolby i uzupełniano wodą do objętości 10 mL. Metodą kolejnych rozcieńczeń przygotowano roztwory o stężeniach 0,225, 0,113, 0,0563, 0,0281, 0,0141, 0,00703, 0,00352, 0,00176, 0,000879 mg/mL. Zmierzono trzykrotnie absorbancję otrzymanych roztworów za pomocą spektrometru UV-Vis AvaSpec-2048, AvaLight-DHc, Światłowodowy 600 µm w 260 nm. Z otrzymanych wyników przygotowano krzywą wzorcową, służącą do określania stężenia mefedronu w roztworze. (Fig. 1.)

W przykładach stosowania wynalazku użyto sieć metaloorganiczną NU-1000, otrzymaną zgodnie procedurą opisaną w literaturze.

Sieć metaloorganiczna NU-1000 (Northwest University) jest siecią złożoną z rdzeni oksocyrcynowych $[Zr_6(\mu_3-OH)_8(OH)_8]^{8+}$ oraz łączników tetrakarboksylianowych (TBAPy⁴⁻, anion kwasu 4,4',4'',4'''-(pireno-1,3,6,8-tetraylo)tetrabenzoowego). Syntezę oraz aktywację materiału wykonano wg opisu z prac J.E. Mondloch i wsp. „Vapor-phase metalation by atomic layer deposition in a metal-organic framework”, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013). Dokładna procedura przygotowania sieci metaloorganicznej NU-1000 przedstawiona została w pracy T. Wang i wsp. „Scalable synthesis and post-modification of a mesoporous metal-organic framework called NU-1000”, Nat. Protoc. 11 (2016).

Na podstawie analizy dyfraktometrycznej potwierdzono strukturę otrzymanych materiałów, przy użyciu dyfraktometru PANalytical X'Pert Pro. Otrzymany dyfraktogram przedstawiony na Fig. 2 odpowiada widmom charakterystycznym dla NU-1000 znanym z literatury.

Przykład 1

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym zgodnie z wynalazkiem zastosowano dla obniżenia stężenia 1000 µM roztworu mefedronu w wodzie. Przygotowano roztwór 1000 µM mefedronu, w tym celu odważono na wadze analitycznej 1,8 mg mefedronu, przeniesiono ilościowo do kolby o pojemności 10 mL i uzupełniono wodą do kreski. Do termostatowanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio aktywowaną, w próżni w 120°C przez 12 h, próbkę 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 mL, uprzednio przygotowanego, 1000 µM wodnego roztworu mefedronu.

Wyznaczono krzywą sorpcji mefedronu dla przykładu 1 (fig. 3). W tym celu wykonano kolejno pomiary absorbancji pasma charakterystycznego dla wodnego roztworu mefedronu w wartości 260 nm przed procesem adsorpcji (C₀) oraz po czasie t (C_t). Pomiar wykonano w 5 minucie, 10 minucie, 30 minucie, 1 godzinie, 2 godzinach i 24 godzinach sorpcji. Każdy pomiar powtarzano trzykrotnie. Następnie dla zmierzonych wartości absorbancji odczytano, z krzywej wzorcowej (fig. 1), aktualne stężenie mefedronu w wodzie. Ilość zaadsorbowanego mefedronu określono stosując wzór:

$$\% \text{zaadsorbowanego mefedronu} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \cdot 100\%$$

Po 24 h roztwór odwirowano, zlaną oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Stężenie mefedronu po 24 h wynosiło 0,10 mg/mL (564 µM)

Przykład 2

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym zgodnie z wynalazkiem zastosowano dla obniżenia stężenia 1500 μM roztworu mefedronu w wodzie. Przygotowano roztwór 1500 μM mefedronu, w tym celu odważono na wadze analitycznej 2,7 mg mefedronu, przeniesiono ilościowo do kolby o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski. Do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio aktywowaną, w próżni w 120°C przez 12 h próbkę, 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 mL, uprzednio przygotowanego, 1500 μM wodnego roztworu mefedronu. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Zmierzonego absorbancję otrzymanego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu w próbce. Stężenie mefedronu po 24 h wynosiło 0,15 mg/mL (846 μM), wartość ta odpowiada wartości odczytanej z krzywej sorpcji mefedronu (fig. 3).

Przykład 3

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym zgodnie z wynalazkiem zastosowano dla obniżenia stężenia 2000 μM roztworu mefedronu w wodzie. Przygotowano roztwór 2000 μM mefedronu, w tym celu odważono na wadze analitycznej 3,6 mg mefedronu, przeniesiono ilościowo do kolby o pojemności 10 mL i uzupełniono wodą do kreski. Do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio aktywowaną, w próżni w 120°C przez 12 h próbkę, 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 ml, uprzednio przygotowanego, 2000 μM wodnego roztworu mefedronu. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osady. Zmierzonego absorbancję otrzymanego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu w próbce. Stężenie mefedronu po 24 h wynosiło 0,20 mg/mL (1128 μM), wartość ta odpowiada wartości odczytanej z krzywej sorpcji mefedronu (fig. 3).

Przykład 4

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym zgodnie z wynalazkiem zastosowano dla obniżenia stężenia 2000 μM roztworu mefedronu w wodzie. Przygotowano roztwór 2000 μM mefedronu, w tym celu odważono na wadze analitycznej 3,6 mg mefedronu, przeniesiono ilościowo do kolby o pojemności 10 mL i uzupełniono wodą do kreski. Do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio aktywowaną, w próżni w 120°C przez 12 h próbkę, 50 mg NU-1000, a następnie zalano 2 mL, uprzednio przygotowanego, 2000 μM wodnego roztworu mefedronu. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Zmierzonego absorbancję otrzymanego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu w próbce. Stężenie mefedronu po 24 h wynosiło 0,05 mg/mL (282 μM).

Przykład 5

Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym zgodnie z wynalazkiem zastosowano, w trzech cyklach, dla obniżenia stężenia 1000 μM roztworu mefedronu w wodzie. Przygotowano-roztwór 1000 μM mefedronu, w tym celu odważono na wadze analitycznej 1,8 mg mefedronu, przeniesiono ilościowo do kolby o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski. W pierwszym cyklu, do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono, uprzednio aktywowaną w 120°C w próżni próbkę 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 ml, uprzednio przygotowanego, 1000 μM wodnego roztworu mefedronu. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Zmierzonego absorbancję otrzymanego pierwszego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu. W drugim cyklu, do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio aktywowaną w 120°C w próżni nową próbkę 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 ml roztworu z pierwszej sorpcji. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Zmierzonego absorbancję otrzymanego drugiego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu. W trzecim cyklu, do termostатовanego naczynia, w temperaturze 25°C, umieszczonego na mieszadle magnetycznym przeniesiono uprzednio, aktywowaną w 120°C w próżni próbkę 10 mg NU-1000, a następnie zalano 2 ml roztworu z drugiej sorpcji. Po 24 h roztwór odwirowano, zlano oczyszczony roztwór mefedronu z nad osadu. Zmierzonego absorbancję otrzymanego trzeciego roztworu i z krzywej wzorcowej (fig. 1), odczytano stężenie mefedronu.

Stężenie mefedronu, po pierwszym cyklu, po 24 h wynosiło 0,1 mg/mL (564 μM), po drugim cyklu, po 48 h 0,06 mg/mL (339 μM) oraz po trzecim cyklu, po 72 h wynosiło 0,009 mg/mL (51 μM).

Adsorpcję mefedronu dla trzech cykli przedstawiono na (Fig. 4).

Dla potwierdzenia adsorpcji mefedronu do sieci krystalicznej wykonano analizę składu dla mefedronu, sieci metaloorganicznej NU-1000 przed procesem sorpcji oraz dla sieci metaloorganicznej NU-1000 po procesie sorpcji z przykładu 1, za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego ^1H NMR.

W celu wykonania pomiaru ^1H NMR, próbki Mefedronu, NU-1000 przed procesem sorpcji, oraz NU-1000 po procesie sorpcji z przykładu 1, rozpuszczono w 700 μL 1M roztworu NaOD w D_2O i pozostawiono do inkubacji na 24 h. Po tym czasie roztwór przeniesiono do próbki szklanej do pomiaru ^1H NMR. Pomiar widm ^1H NMR wykonano na spektrometrze Bruker Avance III HD 400 MHz, zbierając widmo poprzez uśrednienie 8 skanów i czas relaksacji 15 sekund. Wyniki pomiarów ^1H NMR zestawiono na Fig. 5. Na widmie przedstawiono sygnały pochodzące od mefedronu (w wartościach ok. 7.2 oraz 7.4 ppm), NU-1000 oraz NU-1000 po procesie sorpcji z przykładu 1. Na powiększeniu wykazano, że w przypadku NU-1000 po procesie sorpcji, widoczne są sygnały pochodzące od mefedronu.

Badania *in vivo*

Zwierzęta i warunki

Badania były przeprowadzone na embrionach lub 5-dniowych (dpf, day post fertilization) larwach *Danio rerio* otrzymanych z hodowli prowadzonej przez Ośrodek Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Hodowla była prowadzona w odpowiednich warunkach: w temperaturze 28,5°C, przy zachowaniu cyklu dobowego. Pozyskana ikra dostarczana do badania była w grupach po 100 osobników, w szalce Petriego, w roztworze E3 inkubatorze w temperaturze 28,5°C. Szalki z ikrą były codziennie oczyszczane z wszelkich zanieczyszczeń.

Roztwór bytowy próby kontrolnej (E3) stanowi mieszaninę soli:

- Chlorku sodu (NaCl)
- Chlorku potasu (KCl)
- Chlorku wapnia (CaCl_2)
- Chlorku magnezu (MgCl_2)

Sole rozpuszczone są w wodzie demineralizowanej i otrzymany roztwór doprowadzony jest do pH równego 7,2 za pomocą wodorotlenku sodu (NaOH). Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem 5 dpf larw *Danio rerio* nie wymagają zgody Lokalnej Komisji Etycznej.

Ocena wpływu NU-1000 na toksyczność mefedronu badaną w teście ostrej toksyczności zarodków rybich (Fish Embryo Acute Toxicity, FET)

Badania toksyczności zostały przeprowadzone w oparciu o wytyczne OECD test nr 236 „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test”. Test ten ma na celu określenie ostrej toksyczności chemikaliów na stadiach embrionalnych ryb *Danio* pręgowanego (*Danio rerio*).

Świeżo zapłodnione jaja *Danio* pręgowanego poddaje się działaniu badanej substancji chemicznej przez okres 96 godzin. W badaniu zastosowano roztwór bytowy E3 oraz roztwory mefedronu o stężeniach od 50 do 1200 μM . Świeżo zapłodnione zarodki *Danio* pręgowanego umieszczano na płytce 24-dołkowej, po 5 sztuk na dołek, 2 dołki na grupę. Do każdego dołka dodano 1 ml roztworu mefedronu z MOF i bez MOF lub taką samą objętość roztworu bytowego E3 (każda grupa liczyła 10 osobników, $n=10$). Zarodki następnie utrzymywano w inkubatorze (28,5°C). Obserwacje przy użyciu mikroskopu prowadzono do 96 godziny po zapłodnieniu (hpf, hour post fertilization) co 24 godziny i rejestrowano cztery obserwacje szczytowe: (i) koagulacja zapłodnionych jaj, (ii) brak tworzenia somitów, (iii) brak oderwania się pączka ogonowego od woreczka żółtkowego oraz (iv) brak bicia serca. Pod koniec okresu narażenia określono toksyczność ostrą na podstawie pozytywnego wyniku w dowolnej z czterech zarejestrowanych obserwacji szczytowych i obliczono LC50 dla mefedronu, wynoszące 609,9 μM (przy wartości dopasowania $R^2 = 0,9903$), co pokazano na Fig. 6. LC50 jest statystycznie obliczonym stężeniem, powodującą śmierć 50% badanych osobników.

Następnie wykonano doświadczenia sprawdzające efektywność i bezpieczeństwo obniżania stężenia mefedronu. Porównywano próbę kontrolną z roztworami, w których obniżano stężenie mefedronu według przykładów 1, 2, 4 oraz 5. Świeżo zapłodnione larwy *Danio* pręgowanego umieszczano na płytce 24-dołkowej, po 5 larw na dołek, po 2 dołki na grupę. Następnie larwy zalewano roztworami wzorcowymi oraz przygotowanymi według przykładów 1, 2, 4, 5. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie sposobu obniżania stężenia mefedronu przy zastosowaniu NU-1000 wg wynalazku zwiększyło istotnie przeżywalność larw *Danio* pręgowanego. Dodatkowo przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie MOF istotnie zmniejsza występowanie malformacji rozwojowych (Fig. 7).

Neurotoksyczność

Wpływ mefedronu na neurotoksyczność obserwowano jako zaburzenia aktywności lokomotorycznej indukowanej mefedronem u larw-*Danio rerio* 5 dpf. W doświadczeniu wykorzystano płytki 96-dółkowe, do których przeniesiono 5 dpf larwy *Danio rerio*, jedną larwę do jednego dołka. Nadmiar płynu przeniesionego wraz z rybą usunięto i do każdego dołka dodano 200 μ L badanego roztworu. Przygotowaną płytkę inkubowano przez 30 min, a potem przeniesiono do aparatu Noldus, systemu wyposażonego w rejestrator monitorujący aktywność larw.

W badaniu potwierdzono, że mefedron zastosowany w stężeniu 200 μ M nasila aktywność lokomotoryczną larw *Danio rerio*, zaś sam NU-1000 nie wpływał na tą aktywność. Natomiast inkubacja larw w roztworze mefedronu z NU-1000 zmniejszyła przepłynięty dystans w porównaniu do roztworu samego mefedronu. Uzyskany wynik świadczy o hamowaniu efektu hiperaktywności, indukowanej przez mefedron przez MOF, czyli potwierdza skuteczność wynalazku.

Na Fig. 8 przedstawiono wpływ mefedronu 200 μ M, MOF i mefedronu@MOF na odległość przebytą przez 5 dpf larwy *Danio* pręgowanego (w cm) przy ciągłym oświetleniu. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, n = 20; ***p<0,001 vs próba kontrolna, ^^p<0,001 vs grupa traktowana mefedronem, test post-hoc Tukeya.

Kardiotoksyczność

Ocena działania kardiotoksycznego polegała na obserwacji rozwoju serca oraz jego pracy. Larwy *Danio* pręgowanego po 96-godzinnej inkubacji w roztworach z mefedronem oraz z mefedronem i MOF obserwowano pod mikroskopem. Wykonano zdjęcia serca oraz zmierzono ilość uderzeń serca na minutę. Zmiany morfologii serca prezentuje Fig. 9, natomiast wykres ilości częstości uderzeń serca prezentuje Fig. 10. Kardioprotekcyjne działanie MOF prezentuje Fig. 11.

W doświadczeniu wykorzystano płytki 24-dółkowe, do których przeniesiono 0 hpf larwy *Danio rerio*, 5 larw do jednego dołka, 2 dołki na grupę. Larwy były inkubowane w odpowiednich roztworach mefedronu roztworu mefedronu@MOF przez okres 96 h. Po tym czasie każdą larwę oglądano pod mikroskopem DiscoveryV8 (Zeiss Axio Vert, ZEISS, Germany) i wykonywano zdjęcia. Mierzono ilość uderzeń serca na minutę, czas odmierzano stoperem.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono toksyczny wpływ mefedronu na rozwój serca – występowanie malformacji rozwojowych (edema serca) oraz jego pracę, wyrażoną ilością uderzeń serca na minutę.

Przeprowadzone badania potwierdziły kardioprotekcyjne działanie MOF zarówno w zakresie powstawania wad rozwojowych serca, jak i normalizacji jego pracy.

Metodą DFT określono mechanizm sorpcji dla NU-1000

Proces sorpcji cząsteczek mefedronu w kanałach materiału typu MOF NU-1000 został zbadany za pomocą symulacji kwantowo-chemicznej na poziomie teorii funkcjonału gęstości elektronowej (DFT) w formalizmie periodycznych warunków brzegowych, użyto funkcjonału PBE z grupy funkcjonałów gradientowych (GGA) (Perdew, J.P., Burke, K., Ernzerhof, M., 1996. Phys. Rev. Lett. 77, 3865–3868) z uwzględnieniem empirycznej poprawki oddziaływań dyspersyjnych (typu Londona) w parametryzacji Grimme (Grimme, S., 2004. J. Comput. Chem. 25, 1463–1473) oraz z uwzględnieniem wpływu rozpuszczalnika wodnego w postaci polaryzowanego kontinuum DFTsol (Mathew, K., Kolluru, V.S.C., Mula, S., Steinmann, S.N., Hennig, R.G., 2019. J. Chem. Phys. 151, 234101, 1–8.) Zastosowany został pakiet VASP. Jako akcelerator zbieżności obliczeń struktury elektronowej zostało zastosowane rozmycie rozkładu Fermiego-Diraca w postaci funkcji Gaussa o szerokości połówkowej energii 0,05 eV. Analiza populacyjna ładunków oraz rzędów wiązań została wykonana w formalizmie DDEC6, zaś dodatkowo, przeprowadzona została analiza ładunków Badera (Bader, R.F.W., 1990. Atoms in Molecules – A Quantum Theory. Oxford University Press, Oxford.).

Wykorzystana w obliczeniach komórka elementarna NU-1000 charakteryzuje się następującymi parametrami:

Stechiometria: $C_{264}H_{180}Zr_{18}O_{96}$; długości wektorów bazowych: 39,970 Å; 40,000 Å; 16,580 Å; kąty między wektorami: 90,0°; 90,0°; 120,0°.

Zoptymalizowana komórka elementarna MOF-u NU-1000 została następnie obsadzona cząsteczką mefedronu w trzech położeniach w większym kanale oraz w jednej geometrii w kanale mniejszym.

Energetykę sorpcji podano w Tabeli 2. Przy obliczeniach energii sorpcji przyjęto konwencję, według której energia ujemna oznacza strukturę stabilną. Analiza populacyjna i rzędów wiązań (kolumny 3–5) Tabeli 1 wskazują na niewielki przyczynek kowalencyjny oddziaływania pomiędzy cząsteczką mefedronu

a siecią MOF w przypadku NU-1000 (od ok. 0,6 do 1,0). Wartość składowej kowalencyjnej jest skorelowana z energetyką stabilności dla obu sieci.

Energie adsorpcji, E_{ads} , (obliczone na poziomie teorii DFTsol) wskazujące na zjawisko oddziaływania orbitali π - π pomiędzy pierścieniami aromatycznymi w cząsteczce mefedronu i w łączniku struktury MOF NU-1000 (Tabela 1). Całkowity rząd wiązania, $BO(mef.-MOF)$, dotyczy oddziaływania między cząsteczką mefedronu i siecią MOF i został wyznaczony za pomocą analizy rzędów wiązań DDEC6. Zakumulowany ładunek na cząsteczce mefedronu, $q_{DDEC}(mef.)$ i $q_{Bader}(mef.)$, zostały obliczone za pomocą analizy ładunków, odpowiednio, DDEC6 i Badera (Tabela 1).

Tabela 1

1	2	3	4	5
Kanał	E_{ads} [eV]	$BO(mef.-MOF)$	$q_{DDEC}(mef.)$	$q_{Bader}(mef.)$
NU-1000				
Struktura 1 (większy kanał)	-0,775	1,033	0,084	0,046
Struktura 2 (większy kanał)	-0,345	0,677	-0,007	-0,012
Struktura 3 (większy kanał)	-0,431	0,643	0,021	-0,005
Struktura 4 (mniejszy kanał)	-0,921	0,885	-0,030	-0,028

Na Fig. 12–14 przedstawiono lokalizację cząsteczki mefedronu w kanałach sieci metaloorganicznych. Dla sieci metaloorganicznej zaproponowano adsorpcję cząsteczki mefedronu, odpowiednio, w małym i dużym kanale, stosując dwa rodzaje geometrii tj. wzdłużnie i w poprzek do linkera organicznego występującego w sieci metaloorganicznej.

W Tabeli 2 przedstawiono wyliczone wartości parametrów geometrycznych, stosowanych do charakterystyki procesu adsorpcji cząsteczek zawierających pierścienie aromatyczne do elementów struktury adsorbentu, również posiadających pierścienie aromatyczne. Wielkości te to, kolejno: odległość między środkiem pierścienia aromatycznego cząsteczki mefedronu do środka układu aromatycznego (pojedynczego pierścienia lub układu, pierścieni skondensowanych) linkera, odległość między środkiem pierścienia aromatycznego cząsteczki mefedronu a uśrednioną płaszczyzną układu aromatycznego linkera, odległość między środkiem układu aromatycznego linkera i pierścienia cząsteczki mefedronu, oraz kąty, zdefiniowane na Fig. 15. Wielkości te, oprócz samej charakterystyki geometrii adsorpcji, pozwalają również na ocenę efektywności nakładania orbitali cząsteczkowych π - π .

Tabela 2

Geometria wzajemnej orientacji orbitali cząsteczkowych π - π
w procesie oddziaływania cząsteczki mefedronu ze strukturą NU-1000.

NU-1000						
Parametry geometryczne	$d(c(M)-c(L)) / \text{Å}$	$d\perp(c(M)-P(L)) / \text{Å}$	$d\perp(c(L)-P(M)) / \text{Å}$	$\alpha / ^\circ$	$\beta / ^\circ$	$\gamma / ^\circ$
Struktura 1 (duży kanał)	3,437	4,167	4,119	18,54	23,12	21,51
Struktura 2 (duży kanał)	4,250	3,575	3,533	4,30	33,77	32,73

Struktura 3 (duży kanał)	3,738	3,579	3,463	5,91	20,77	14,86
Struktura 4 (mniejszy kanał)	3,437	3,350	3,330	1,44	14,38	12,93
<p>$c(x)$ – środek pierścienia "x" $P(x)$ – płaszczyzna dopasowana do pierścienia aromatycznego "x" M – pierścień cząsteczki mefedronu L – pierścień łącznika MOF-u</p>						

Odległości oraz kąty pomiędzy zaadsorbowaną cząsteczką mefedronu w strukturze sorbentu, podano w Tabeli 2 oraz na Fig. 15.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób obniżania stężenia mefedronu w środowisku wodnym, w którym to sposobie stosuje się sieć metaloorganiczną NU-1000, aktywowaną uprzednio przez wygrzewanie w próżni w 120°C przez 12 h, którą wprowadza się do środowiska wodnego o temperaturze 25°C na 24 godziny, a następnie oddziela, **znamienny tym**, że na 1 mL wodnego roztworu mefedronu, stosuje się 5–25 mg NU-1000, który po wprowadzeniu do roztworu pozostawia się w nim ciągle mieszając, a następnie oddziela przez wirowanie z szybkością 4000 rpm przez 10 minut, przy czym proces ten powtarza się, aż do uzyskania w środowisku wodnym dopuszczalnego biologicznie stężenia mefedronu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces powtarza się, aż do uzyskania stężenia mefedronu mniejszego niż 0,108 mg/mL (609,9 μ M).

Rysunki

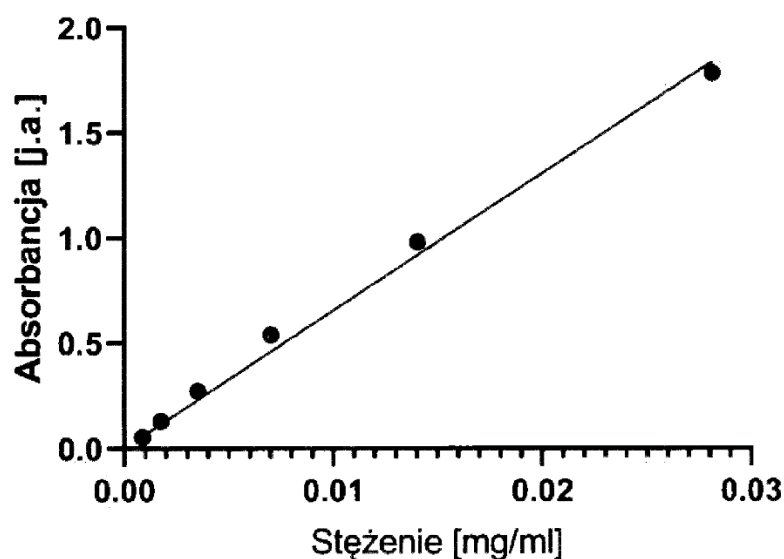


Fig. 1

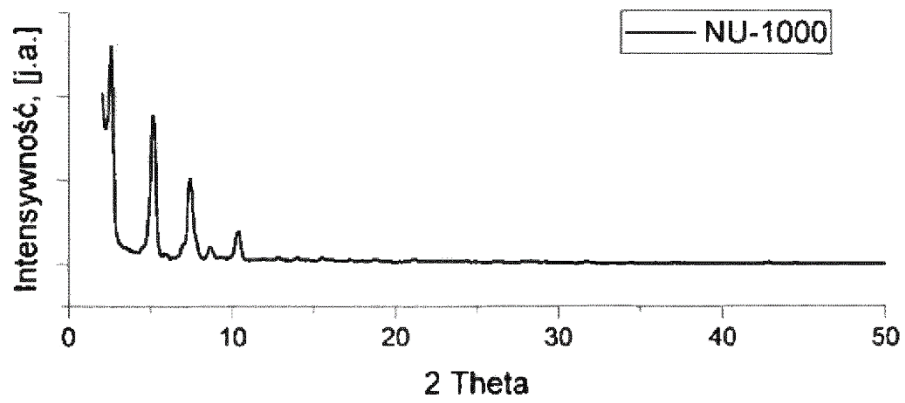


Fig. 2

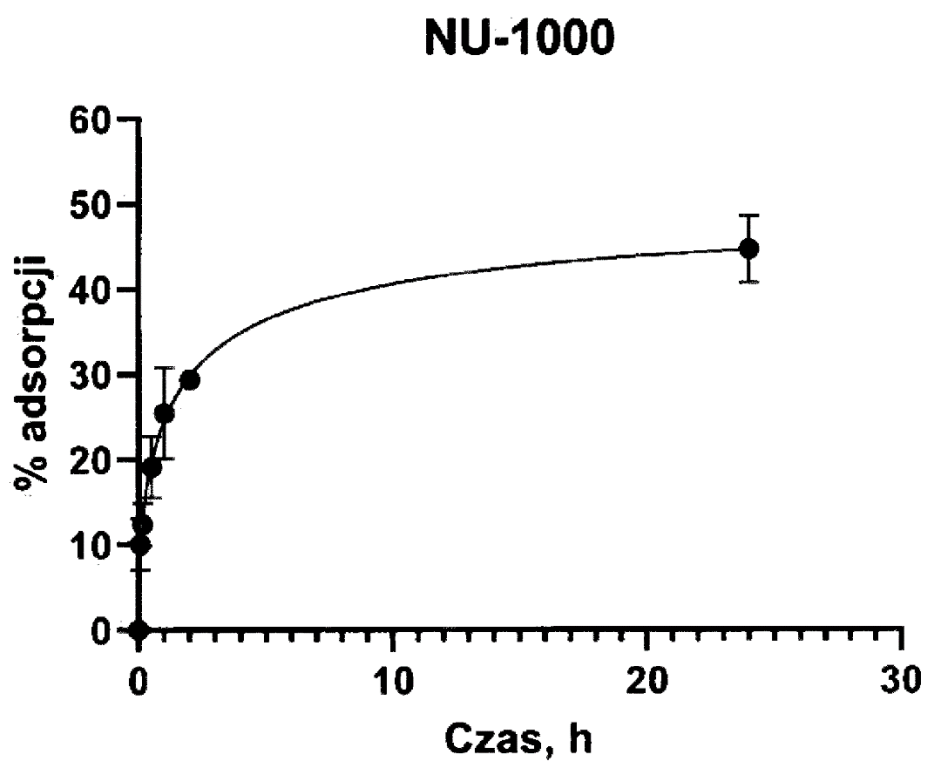


Fig. 3

NU-1000

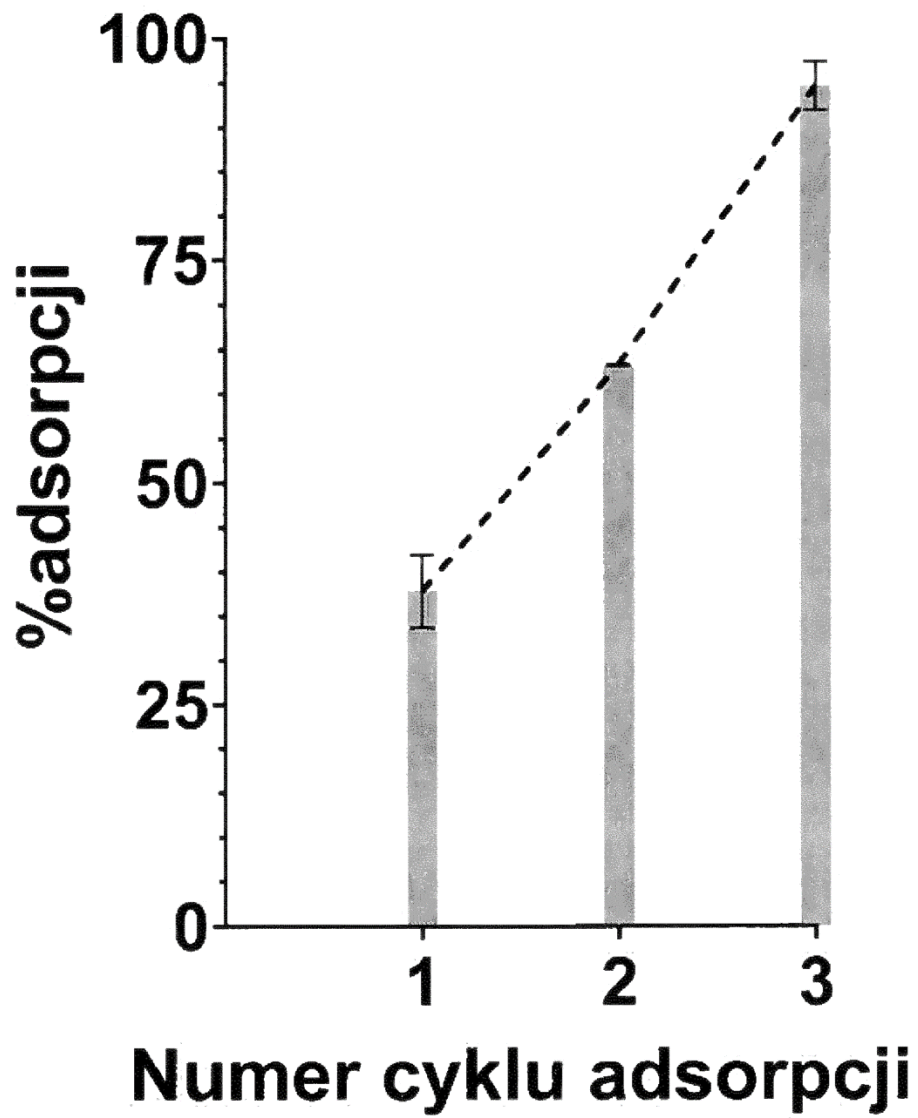


Fig. 4

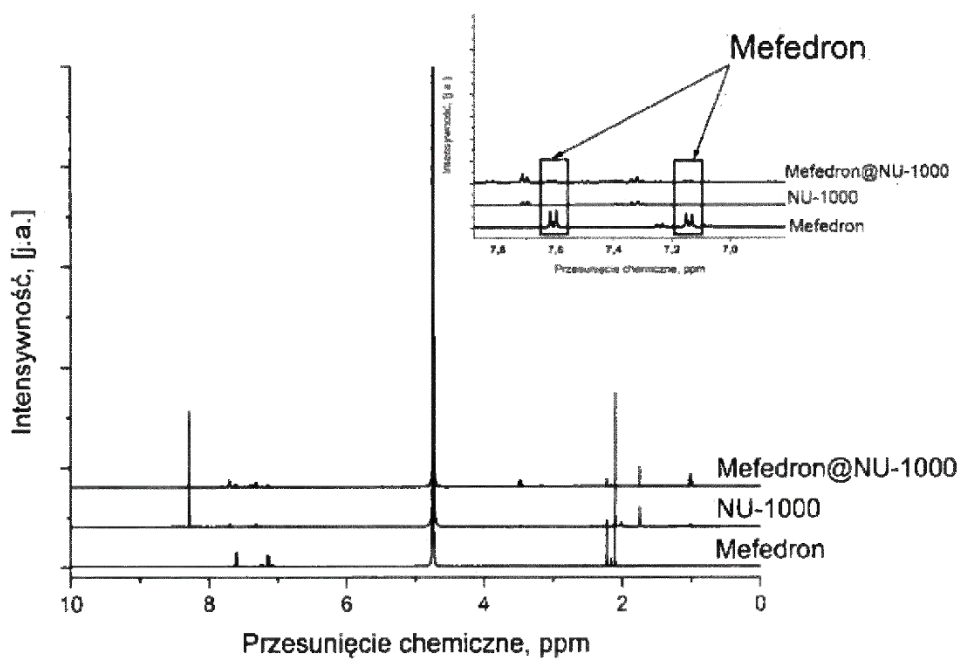


Fig. 5

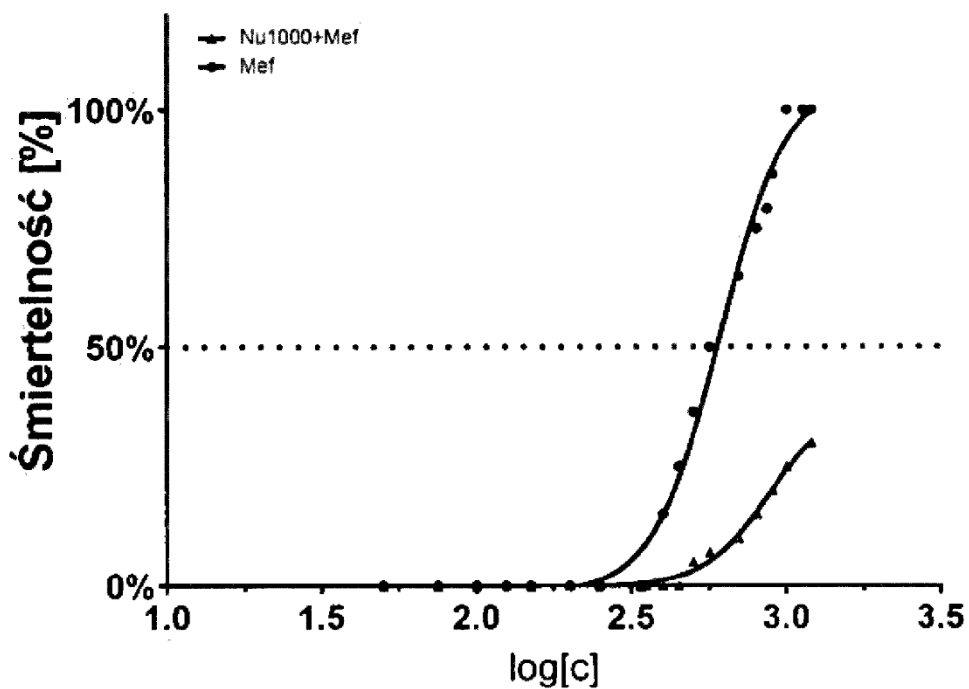


Fig. 6

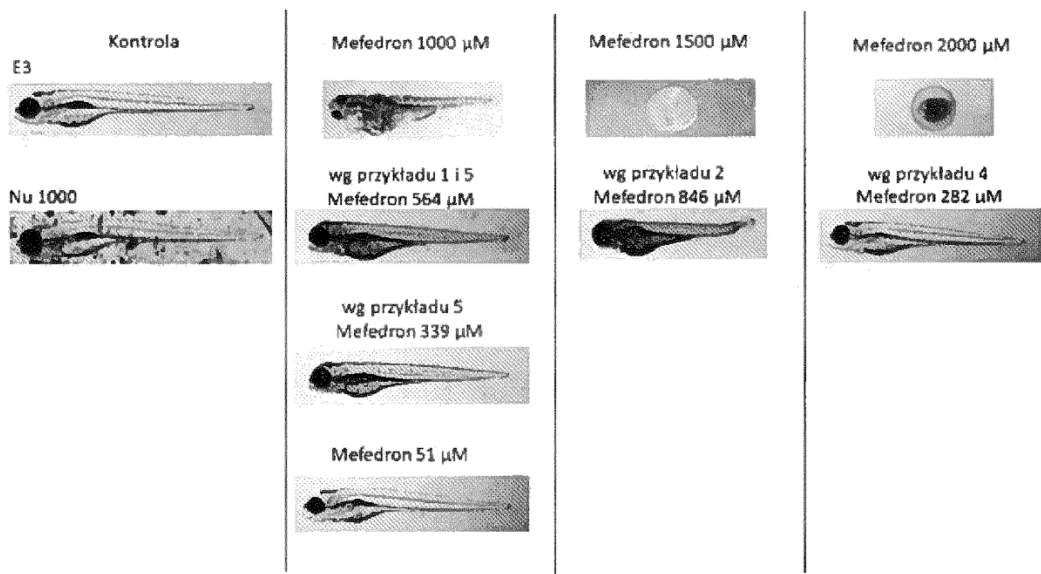


Fig. 7

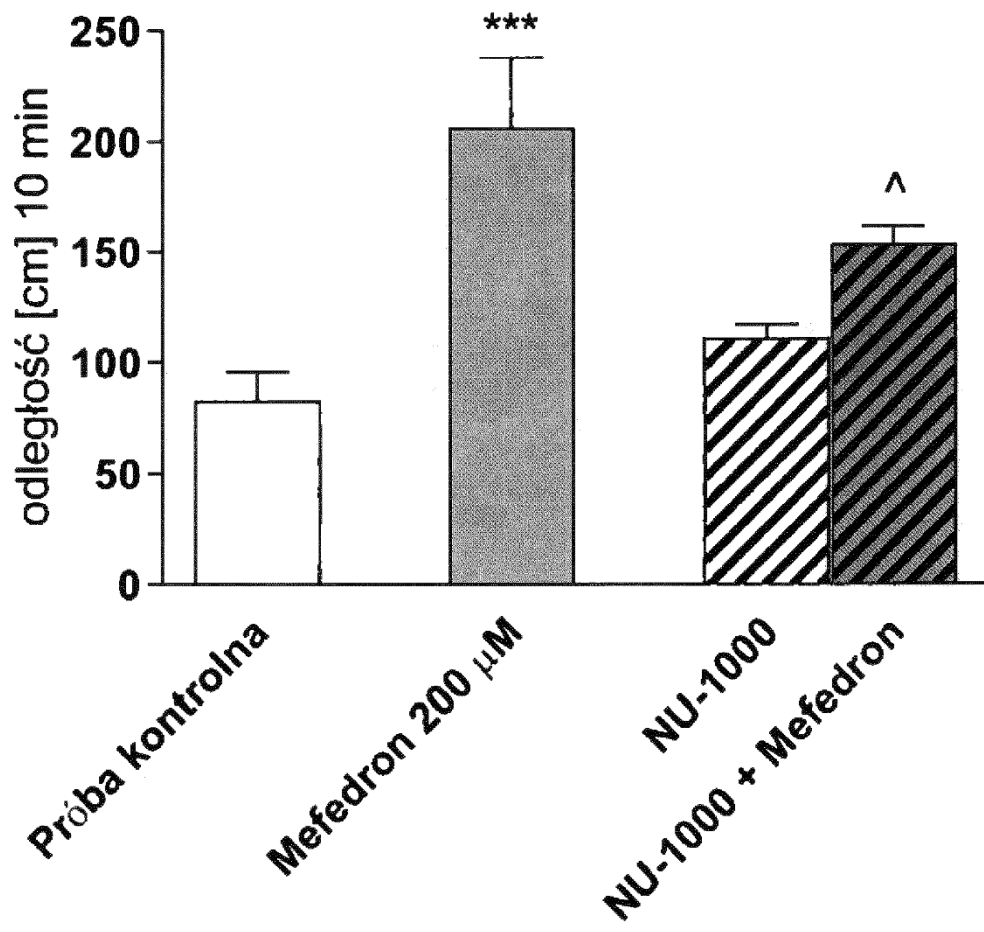


Fig. 8

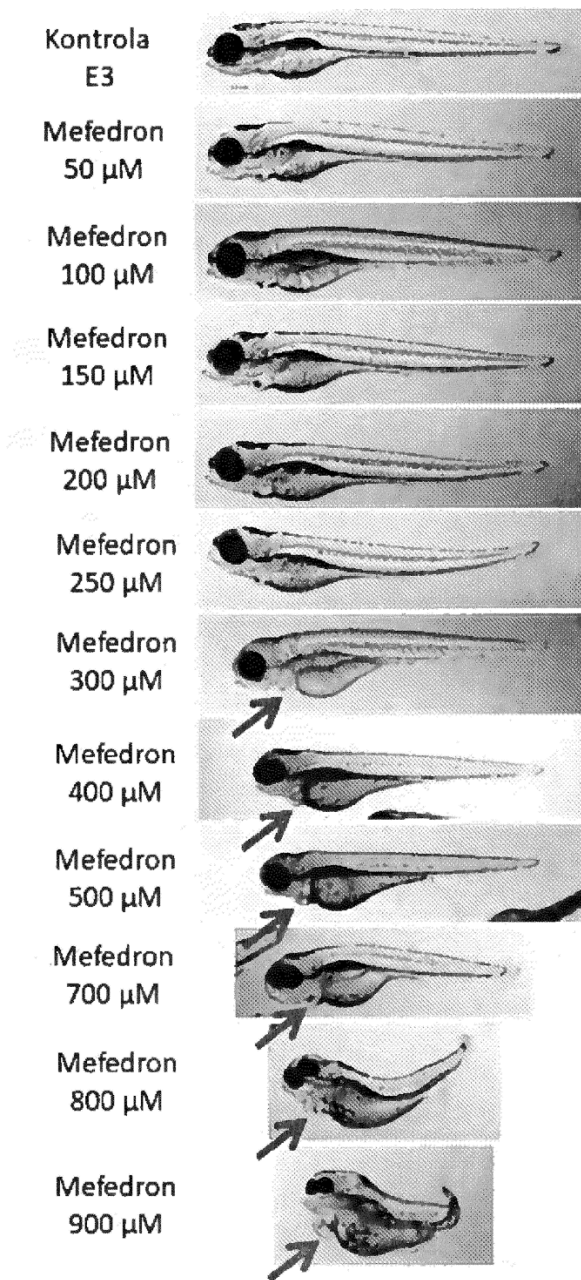


Fig. 9

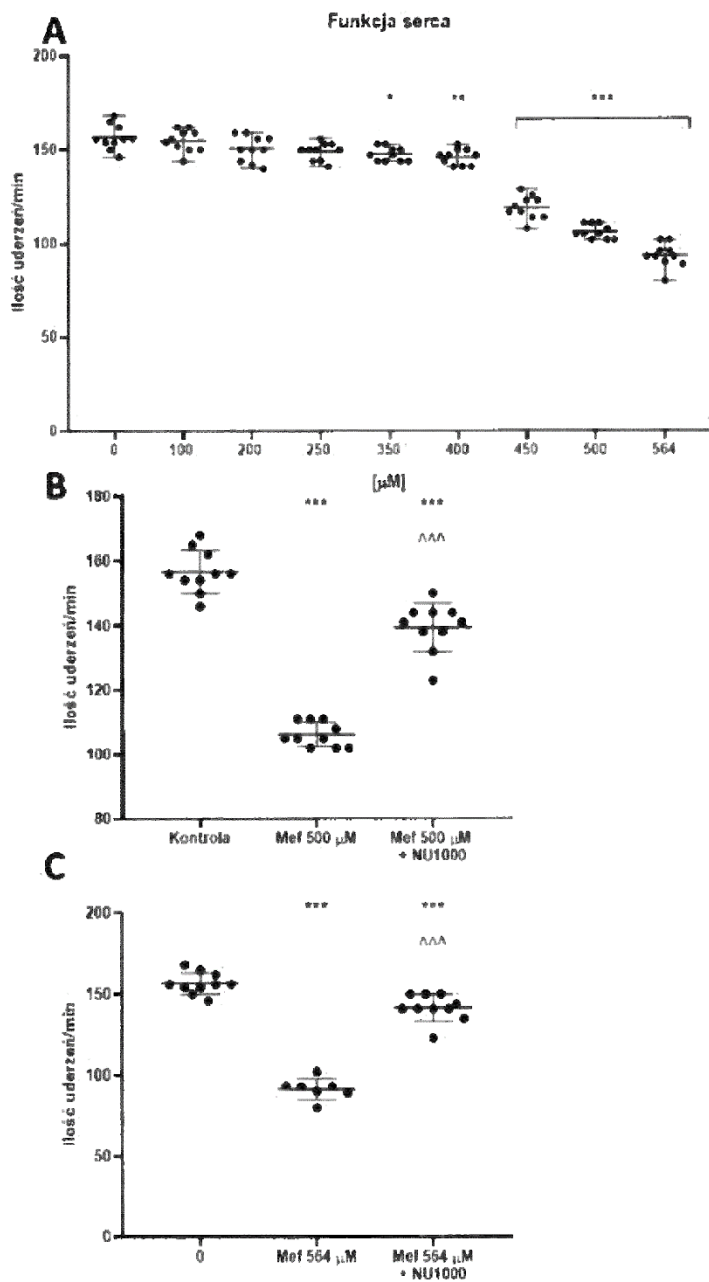


Fig. 10

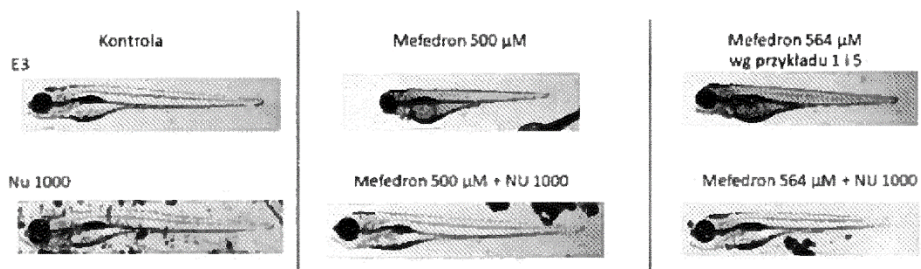


Fig. 11

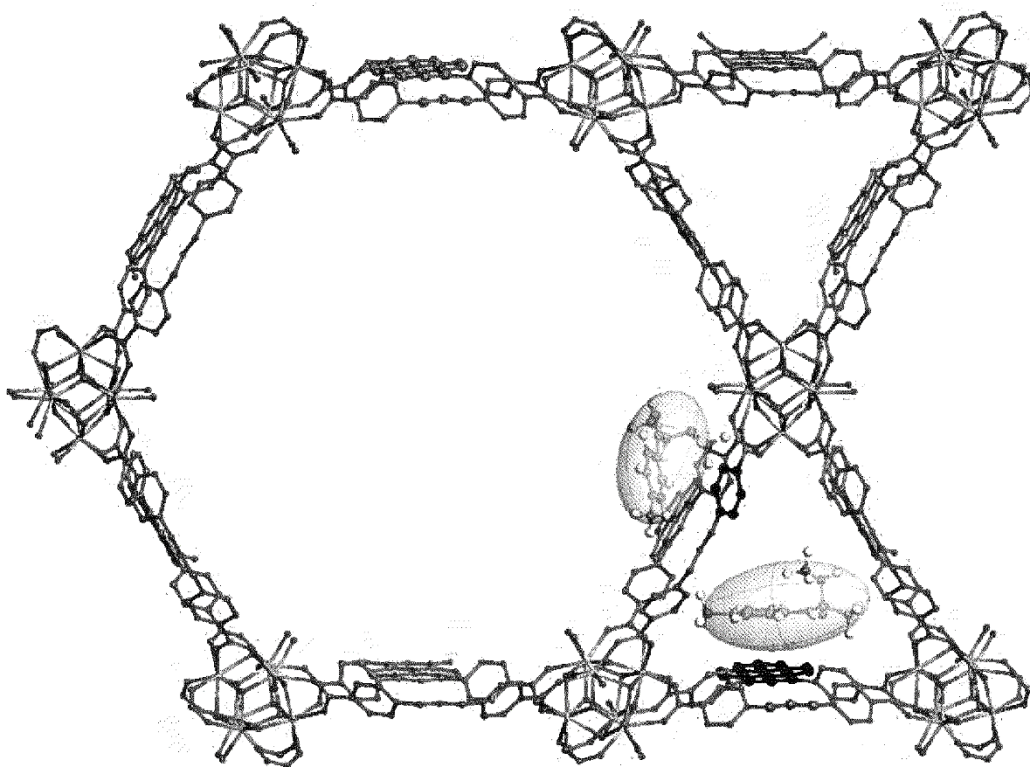
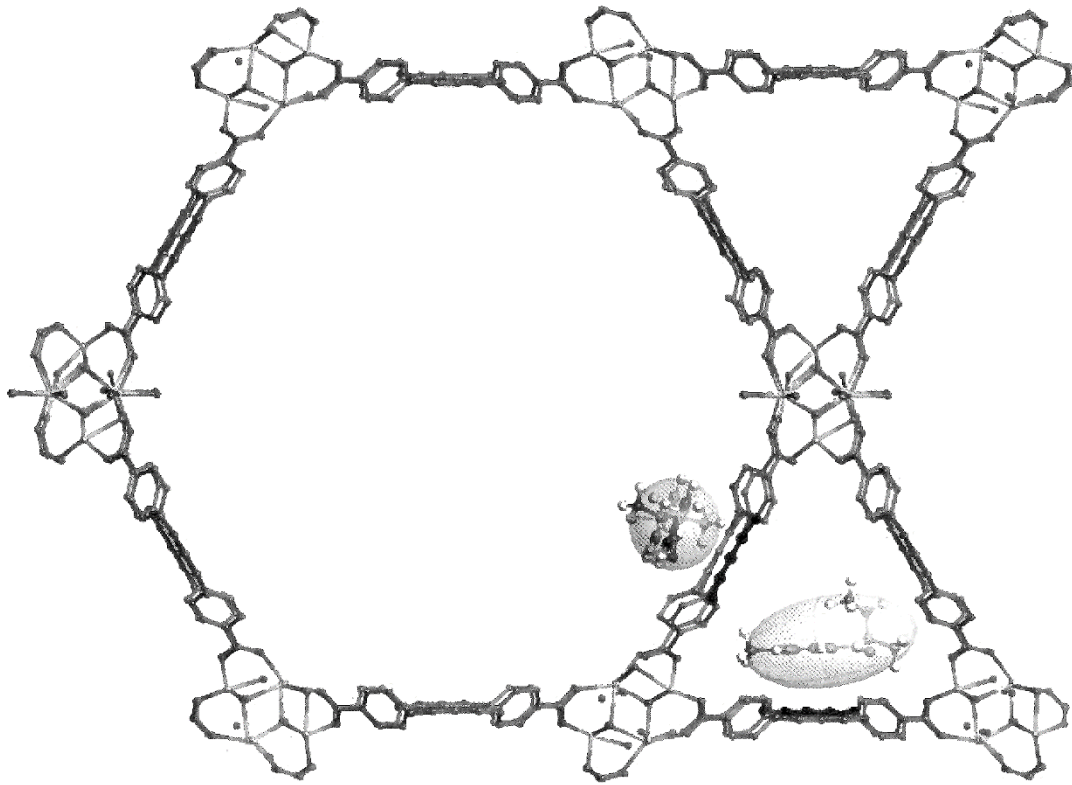


Fig. 12

**Fig. 13**

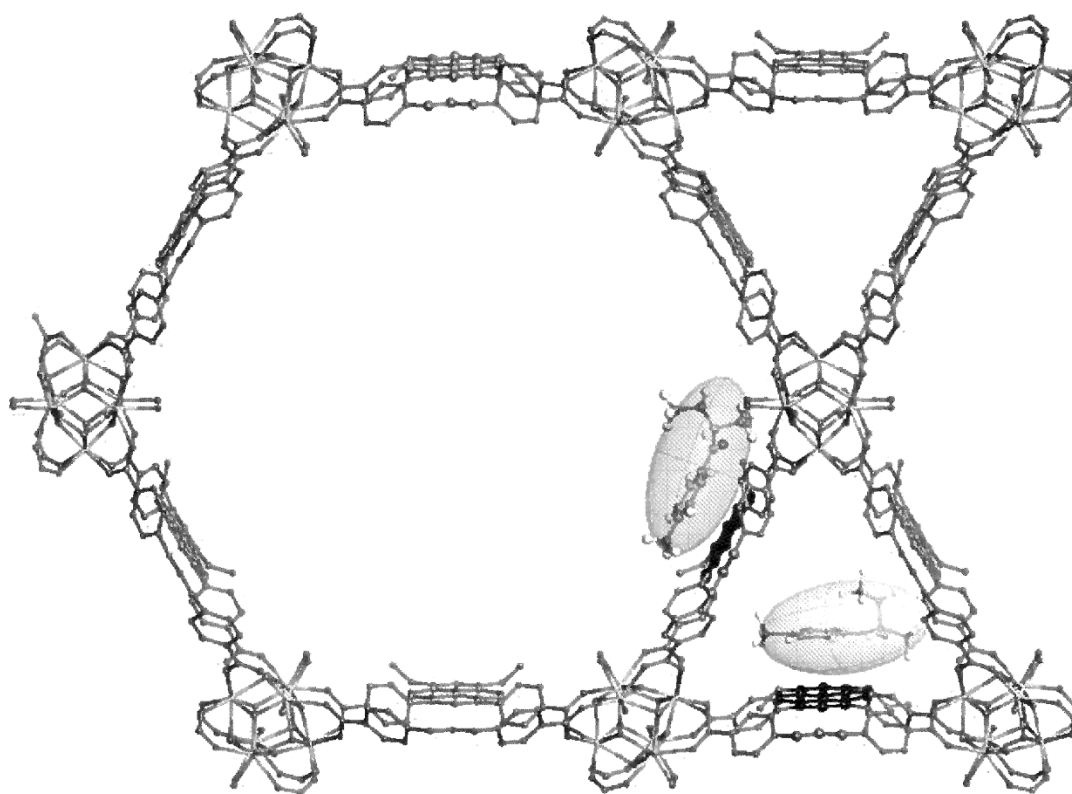


Fig. 14

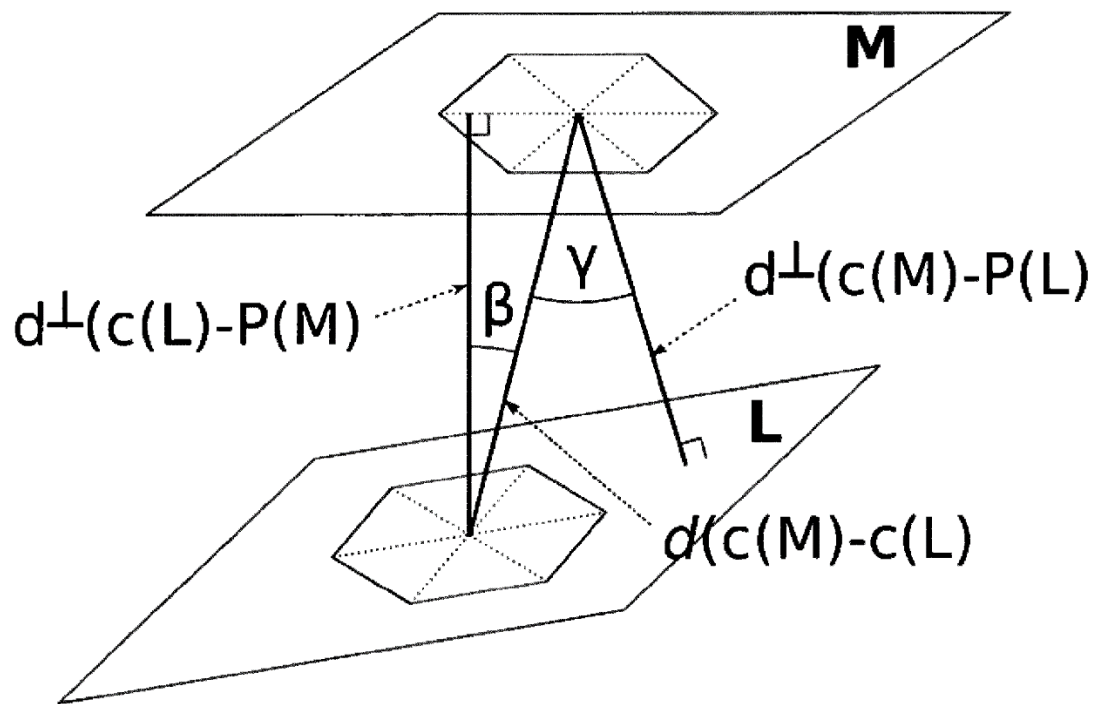


Fig. 15