

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242327 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **431633**

(22) Data zgłoszenia: **2019.10.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.05.04 BUP 09/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.13 WUP 07/2023**

(51) MKP:

C07D 417/14 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

KAMILA SPYCHALSKA, Wrocław, PL

FRANCESCA MELONI, Stintino, IT

JOANNA CABAJ, Wrocław, PL

DOROTA ZAJĄC, Krzeczyn, PL

(74) Pełnomocnik:

Katarzyna Paprzycka, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Pochodna benzotiadiazolu – 4,7-bis(5-(2-pirydyno)tiofen-2-ylo)benzotiadiazol, sposób jej otrzymywania oraz elektroda enzymatyczna do wykrywania epinefryny

PL 242327 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest pochodna benzotiadiazolu – 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazol oraz sposób jego wytwarzania, znajdująca zastosowanie do modyfikacji urządzeń sensorowych.

Przedmiotem wynalazku jest również elektroda enzymatyczna do wykrywania epinefryny w roztworach wodnych przeznaczona zwłaszcza do diagnostyki chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Elektroda przeznaczona do detekcji neuroprzekaźnika składa się z elementu biologicznie aktywnego oraz elementu przetwornikowego, przetwarzającego sygnał odebrany przez element receptorowy.

Z przeglądu literatury, znane jest zgłoszenie patentowe PL419890 (A1) dotyczące biosensora elektrochemicznego służącego do detekcji dopaminy, zawierającego białkową warstwę aktywną zimmobilizowaną na powierzchni elektroprzewodzącego filmu otrzymanego z poli[2,7-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)-N-heksyloakrydonu].

Kolejne zgłoszenie patentowe PL419891 (A1) dotyczy biosensora enzymatycznego do wykrywania epinefryny, charakteryzującego się tym, że zawiera białkową warstwę aktywną w postaci lakazy zimmobilizowanej na powierzchni polimerowego filmu otrzymanego metodą voltamperometrii cyklicznej z poli(N-heksylo-2,7-bis(tiofeno)akrydonu).

W koreańskim zgłoszeniu patentowym nr KR20170127758 (A) ujawniono biosensor do pomiaru ilości glukozy, w którym warstwę receptorową stanowią nanowłókna powlekane oksydazą glukozową. Zastosowanie tego typu rozwiązania umożliwia szybkie i dokładne zmierzenie stężenia glukozy we krwi bez wpływu na poziom hematokrytu.

Istotę wynalazku stanowi pochodna benzotiadiazolu – 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazol o wzorze 1.

Symetryczne wielopierścieniowe przewodzące układy typu donor-akceptor obecne w strukturze 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu nadają jej właściwości półprzewodnikowe. Sposób wytwarzania 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu o wzorze 1, według wynalazku polega na tym, że do 4,7-bis(2-bromo-5-tiofeno)-2,1,3-benzotiadiazolu dodaje się 2-(tributylocyno)pirydyny w obecności katalizatora palladowego dichlorku bis(trifenylfosfino)palladu (II) w środowisku bezwodnego tetrahydrofuranu, roztwór miesza się w temperaturze 55°C w atmosferze azotu przez 48 godzin, następnie mieszaninę poddaje się ekstrakcji octanem etylu i wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu, otrzymując produkt końcowy w postaci 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu.

Korzystnie otrzymany produkt w postaci 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu o wzorze 1 oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.

Istotą wynalazku jest również elektroda enzymatyczna, która ma warstwę aktywną w postaci tyrozynazy zimmobilizowanej adsorpcyjnie w filmie otrzymanym z 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu.

Elektroda enzymatyczna według wynalazku wytworzona jest z ultracienkiego filmu polimerowego o grubości około 60 nm i nadaje się do wykrywania epinefryny w roztworach wodnych. Zaletą elektrody jest jej bardzo duża czułość oraz fakt, że znajduje zastosowanie w badaniu szerokiego zakresu stężeń. Istotna jest również dość długa żywotność zimmobilizowanego biokatalizatora, który zachowuje swoją aktywność katalityczną w ciągu kolejnych kilkudziesięciu cykli reakcyjnych. Enzymatyczna warstwa bioaktywna według wynalazku i powtarzalność otrzymanych wyników oraz różne odpowiedzi czujnika zbudowanego z 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu na różne stężenia neurotransmitera, typują ten materiał do budowy czujników stosowanych między innymi w diagnostyce klinicznej.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania nie ograniczając jednocześnie jego zakresu oraz na rysunku na którym na:

Fig. 1 przedstawiono proces elektrochemicznej polimeryzacji 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu metodą chronoamperometryczną.

Fig. 2 przedstawiono układ pomiarowy na który składają się: celka pomiarowa, chlorosrebrowa elektroda odniesienia (Eo), elektroda pomocnicza w formie platynowego drutu (Ep) oraz elektroda pracująca (Ew) zmodyfikowana poli(4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolem) (P) oraz białkiem enzymatycznym (B).

Fig. 3 przedstawiono zakres liniowy pracy czujnika.

Przykład 1

Sposób otrzymywania 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu o wzorze 1 jest przedstawiony na schemacie. W celu zsyntetyzowania pochodnej benzotiadiazolu – 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu, do kolby trójszyjnej dodano 4,7-bis(2-bromo-5-tiofeno)-2,1,3-benzotiadiazolu (1) (2,18 mmol, 1,00 g), bezwodnego tetrahydrofuranu (50 ml), 2-(tributylocyno)pirydyny (2) (4,80 mmol, 1,77 g) oraz katalizator – dichlorek bis(trifenylfosfino)palladu (II) – PdCl₂(PPh₃)₂ (0,44 mmol, 0,306 g). Roztwór mieszało w temperaturze 55°C w atmosferze azotu przez 48 godzin. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu i wodą. Fazę wodną ekstrahowano następnie chloroformem (3 x 30 ml). Zebrane frakcje organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po przesączeniu, rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Osad oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w gradiencie polarności (heksan : octan etylu). Uzyskano 0,417 g produktu (3), w postaci czerwonego ciała stałego, z wydajnością 42,2%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): δ 8.64 (d, J=4.8 Hz, 2H, arom. H), 8.18 (t, J=3.4 Hz, 2H, arom. H), 7.95 (t, J=9.4 Hz, 2H, arom. H), 7.82 – 7.78 (m, 6H, arom. H), 7.15 (t, J=3.4 Hz, 2H, arom. H).

¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): δ 152.57, 152.44, 152.32, 152.18, 152.04, 149.32, 141.36, 140.68, 140.53, 137.05, 132.45, 130.89, 130.74, 128.91, 128.80, 127.33, 127.24, 126.04, 125.78, 125.68, 125.32, 125.19, 125.08, 122.18.

MS (m/z): [M⁺] 455,0464.

Proces elektropolimeryzacji prowadzono w układzie trójelektrodowym złożonym z elektrody pracującej wykonanej ze złota o powierzchni 3,14 mm², platynowej elektrody pomocniczej oraz chlorosrebrowej elektrody odniesienia (Ag/AgCl). Pomiar prowadzono za pomocą aparatu PGSTAT 128N. Film polimerowy otrzymano na drodze chronoamperometrii, stosując 1 mM roztworu monomeru, przyłożony potencjał – 1,8 V w czasie 900 s względem Ag/AgCl. 0,1 M roztwór tetrabutylloheksafluorofosforanu amonu (BU₄NPF₆) w dichlorometanie został użyty jako elektrolit pomocniczy.

Przykład 2

Elektroda enzymatyczna zawierająca tyrozinazę zimmobilizowaną adsorpcyjnie w elektroprzewodzącym materiale otrzymanym z 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu (P) została wytworzona w wyniku depozycji tyrozinazy na elektrodzie wykonanej z platyny (Pt) modyfikowanej materiałem przewodzącym (P). Proces depozycji białka (B) na modyfikowanej elektrodzie platynowej prowadzono za pomocą sieciowania kowalencyjnego w obecności glutaraldehydu w buforze fosforowo-cytrynianowym o pH 5,2 w czasie 2-óch godzin. Następnie biosensor białkowy według wynalazku wprowadzono do naczynia pomiarowego, o pojemności 10 ml zaopatrzonego w układ trzech elektrod: elektrody chlorosrebrowej jako elektrody referencyjnej E_o, elektrody wykonanej ze złota jako elektrody pracującej E_w oraz platynowej elektrody pomocniczej E_p. Pomiar przeprowadzono w warunkach tlenowych metodą woltamperometrii cyklicznej (CV) oraz pulsowo – różnicowej (DPV) wobec szerokiego zakresu stężenia epinefryny (10 nM – 50 μM w buforze fosforanowym o pH 7,0) przepuszczając przez badany roztwór prąd w zakresie potencjału 0 – 0,2 w przypadku metody DPV oraz w zakresie potencjału -0,6 – 0,6 V w przypadku metody CV. Zmian natężenia prądu rejestrowano przy użyciu galwanostatu/potencjostatu PGSTAT 128N AUTOLAB. Układ pomiarowy w trakcie procesu zmieniał sygnał chemiczny na mierzalny sygnał amperometryczny.

Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność materiału zbudowanego z 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu ze względu na mediacyjny charakter elektroprzewodzącego układu, usprawnia transport elektronów, przez co znacznie poprawia aktywność katalityczną unieruchomionego białka.

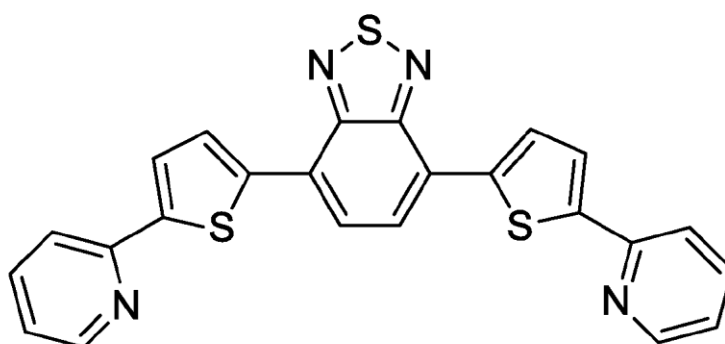
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodna benzotiadiazolu, którą stanowi 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazol o wzorze 1.
2. Sposób wytwarzania 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu o wzorze 1, **znamienny tym**, że do 4,7-bis(2-bromo-5-tiofeno)-2,1,3-benzotiadiazolu dodaje się 2-(tributylocyno)pirydyny w obecności katalizatora palladowego dichlorku bis(trifenylfosfino)palladu (II) w środowisku bezwodnego tetrahydrofuranu, roztwór miesza się w temperaturze 55°C w atmosferze azotu przez 48 godzin, następnie mieszaninę poddaje się ekstrakcji octanem etylu

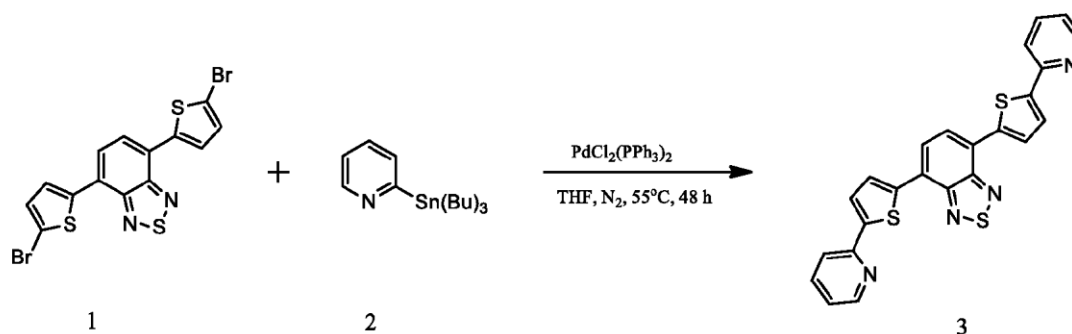
i wodą, suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu, otrzymując produkt końcowy w postaci 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że otrzymany produkt w postaci 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu o wzorze 1 oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.
4. Elektroda enzymatyczna do wykrywania epinefryny, **znamienna tym**, że ma warstwę aktywną w postaci tyrozynazy zimmobilizowanej adsorpcyjnie w filmie otrzymanym z 4,7-bis(5-(2-pirydino)tiofen-2-ylo)benzotiadiazolu.

Rysunki



Wzór 1



Schemat 1

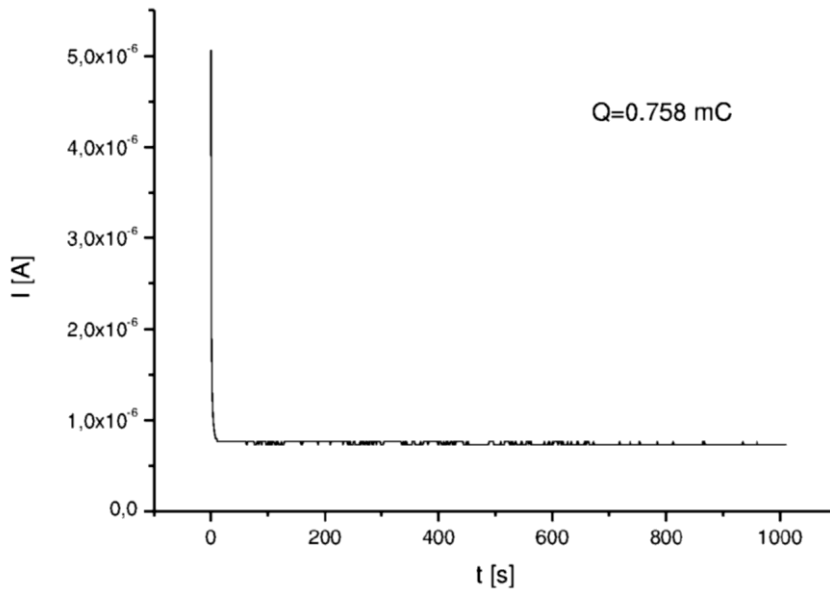


Fig. 1

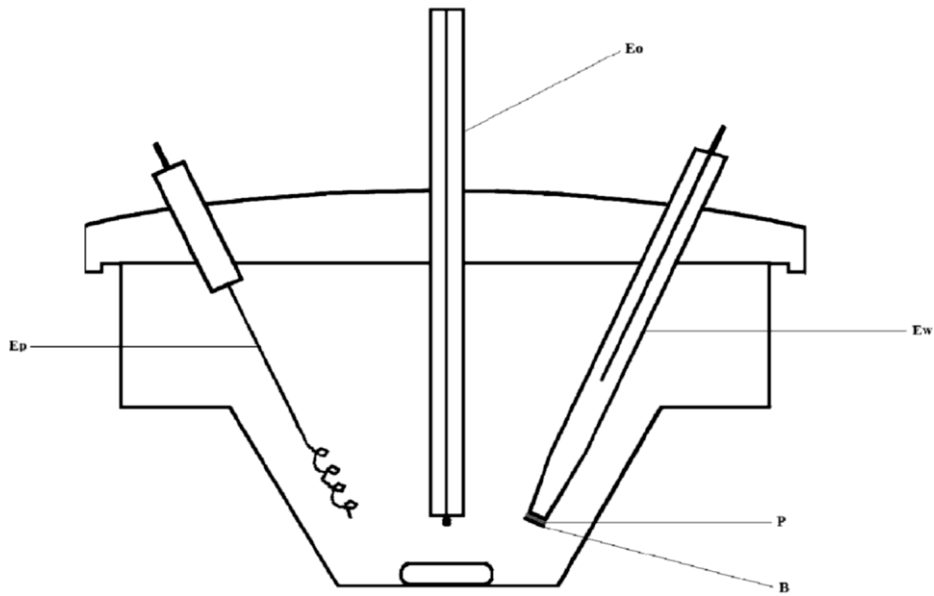
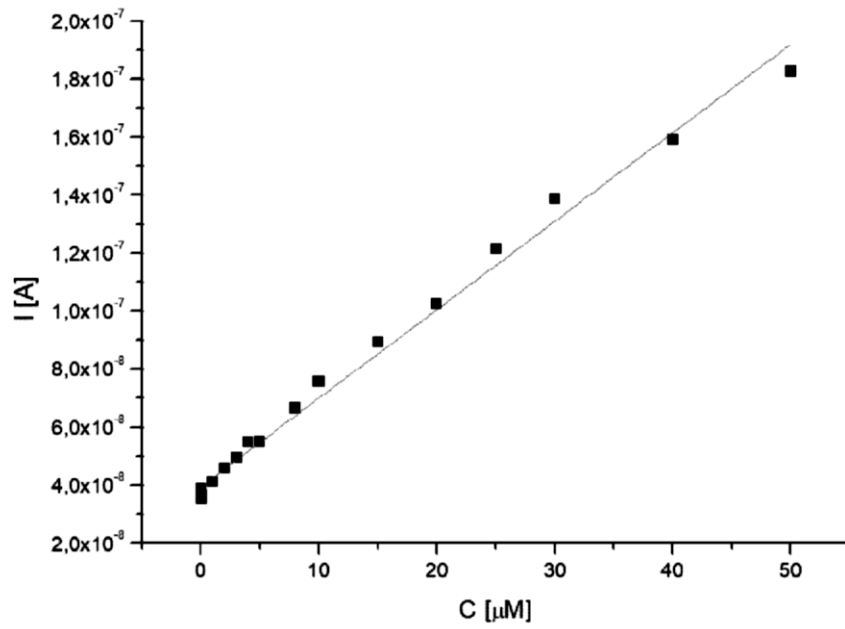


Fig. 2

**Fig. 3**