

Pochodna porfiryny, spolimeryzowana warstwa zawierająca pochodną porfiryny i jej zastosowanie do oznaczania i uwalniania nikotyny

Przedmiotem wynalazku jest (a) nowy związek chemiczny, pochodna porfiryny, (b) spolimeryzowana warstwa zawierająca tę pochodną porfiryny, oraz (c) zastosowanie tej warstwy jako elementu rozpoznającego chemicznego czujnika do oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy oraz (d) zastosowanie tej warstwy do powolnego uwalniania nikotyny.

Nikotyna jest głównym neuroaktywnym alkaloidem w liściach tytoniu (*Nicotiana L.*) (Fig. 1) stosowanych do produkcji wyrobów tytoniowych [1]. Alkaloid ten łatwo absorbuje się w organizmie człowieka uszkadzając DNA i wywołując wiele negatywnych skutków fizjologicznych obejmujących szereg chorób, takich jak choroby nowotworowe, choroby płuc czy układu krążenia [2]. Oprócz wysokiej toksyczności znane są również terapeutyczne działania nikotyny w leczeniu chorób neurodegeneratywnych (np. choroby Alzheimer'a i Parkinsona). Oznaczanie stężenia nikotyny w wyrobach tytoniowych jak i w farmaceutykach (gumy do żucia, cukierki i plastry nikotynowe) jest istotne dla celów przemysłowych. Ponadto oznaczanie nikotyny i produktów jej metabolizmu, takich jak kotynina, lub alkaloidów jej towarzyszących, takich jak miosmina, w organizmie ludzkim jest istotne z punktu widzenia medycznego, terapeutycznego i toksykologicznego, ponieważ umożliwia korelację ilości nikotyny w organizmie (a tym samym wpływu pasywnego i aktywnego palenia lub żucia wyrobów tytoniowych) na występowanie i rozwój ww. chorób. W organizmie ludzkim nikotyna ulega szybkiemu rozkładowi (średni połowiczny czas zaniku wynosi 2-3 godz.). Dlatego istotne jest również oznaczanie jej najważniejszych metabolitów, które można wykryć w płynach ustrojowych po znacznie dłuższym czasie. Głównym metabolitem nikotyny jest kotynina (70%) wytwarzana w organizmie w wyniku dwuetapowego utleniania nikotyny [3, 4]. Czas zaniku kotyniny w organizmie ludzkim jest dłuższy niż nikotyny i wynosi średnio ok. 17 godz. Miosmina to alkaloid występujący obok nikotyny w tytoniu, jednakże w niższym stężeniu. Również i ona rozkłada ludzkie DNA [5, 6]. W przeciwieństwie do nikotyny, miosmina występuje także w wielu powszechnych produktach spożywczych, owocach i warzywach [7].

W ciągu ostatnich dwóch dekad opracowano szereg procedur oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy. Należy do nich wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [8, 9], chromatografia gazowa (GC) [10, 11], elektroforeza kapilarna (CE) [12, 13] i metody radiometryczne [14] oraz metody spektrofotometryczne [15] poprzedzone zateżaniem tych

związków na kolumnach wypełnionych złożem zawierającym polimer wdrukowany molekularnie (MIP) [16]. Stosunkowo niedawno opracowane zostały również enzymatyczne metody oznaczania nikotyny i kotyniny [17, 18]. Testowane były także piezomikrogravimetryczne i amperometryczne chemoczuJNIKI do oznaczania nikotyny z warstwą MIP wdrukowaną nikotyną jako selektywnym elementem rozpoznającym ten analit [19-21]. Opisane są również w literaturze chemoczuJNIKI do oznaczania nikotyny i kotyniny z amperometrycznym i impedymetrycznym przetwarzaniem sygnału detekcji [22-24].

Jednakże wszystkie powyżej wymienione metody oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy wykazują szereg wad. Metody spektrofotometryczne zwykle wymagają zastosowania czasochłonnych procedur wydzielania analitu z pobranej próbki. Metody HPLC, GC i CE wymagają długiego czasu oznaczania, zastosowania kosztownego sprzętu i pracy wykwalifikowanego personelu do jego obsługi. Okres aktywności enzymów stosowanych w enzymatycznych czujnikach do oznaczania nikotyny i kotyniny jest stosunkowo krótki, dlatego wymagają one rygorystycznych warunków przechowywania. Ponadto enzymy te są stosunkowo drogie. Trudności te sprowokowały opracowanie i wykonanie czujników elektrochemicznych do oznaczania nikotyny. Chemosensory te są stosunkowo tanie i nie wymagają ani kosztownego sprzętu, ani wykwalifikowanego personelu do ich obsługi. Co więcej czujniki te można stosunkowo łatwo zminiaturyzować. Jednakże wszystkie trzy ww. alkaloidy wykazują nieodwracalne zachowanie elektrodowe, które silnie zależy od rodzaju stosowanego materiału elektrody i elektrolitu [23] oraz parametrów kinetycznych stosowanej techniki elektroanalizy. Ta zależność sprawia, że odtwarzalność czujników elektrochemicznych do oznaczania tych alkaloidów jest stosunkowo niska. Ponadto metody elektrochemiczne zwykle nie są selektywne względem oznaczanego analitu. W literaturze podane są nieliczne przykłady połączenia warstwy rozpoznającej, selektywnej względem nikotyny, z detektorem elektrochemicznym [20, 21]. W jednym z tych czujników detekcja polega na obniżaniu prądu utleniania próbnika redoks, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, dyfundującego z roztworu do elektrody przez warstwę rozpoznającą w wyniku blokowania miejsc aktywnych w tej warstwie przez nikotynę [21]. Jednakże ten sposób detekcji wymaga dodania do badanej próbki próbnika redoks a rejestrowany ujemny sygnał detekcji jest czuły na wszelkie zanieczyszczenia blokujące elektrodę pokrytą warstwą rozpoznającą. Drugi ze wspomnianych czujników [20] wykorzystuje bezpośrednią amperometryczną detekcję nikotyny, jednakże jego wytworzenie wymaga zastosowania skomplikowanej, wieloetapowej procedury przygotowania kompozytowej warstwy rozpoznającej. Ponadto warstwa

rozpoznająca tego czujnika ulega starzeniu w wyniku czego sygnał detekcji spada o ok. 50% w ciągu 3 dni składowania.

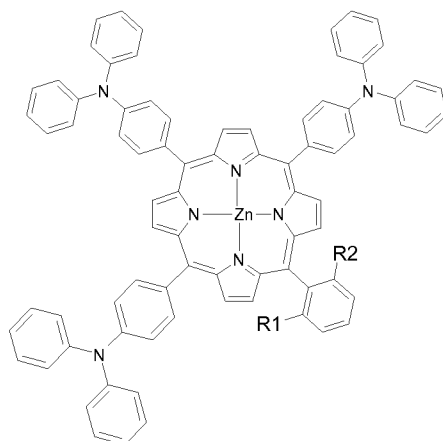
Tak więc pożądane byłoby opracowanie czujnika o podwyższonej selektywności względem nikotyny, kotyniny i miosminy poprzez zastosowanie specjalnie opracowanego do ich oznaczania elementu rozpoznającego.

Próbując uwolnić się od nałogu, uzależnieni od nikotyny pobierają dziennie jej niewielkie dawki, na przykład wchłaniając przez skórę (za pomocą odpowiednich plastrów z nikotyną), doustnie (stosując odpowiednie pigułki, cukierki, lub gumy do żucia z nikotyną), lub poprzez inhalację (inhalatory aplikowane do nosa) [25-27]. Dawki te są stopniowo zmniejszane aż do pełnego wyleczenia z uzależnienia. Inhalatory, cukierki, pigułki oraz gumy do żucia stosowane są w celu szybkiego uwolnienia nikotyny do organizmu, aby szybko zaspokoić głód nikotynowy, np. w sytuacji stresowej. Substancją aktywną stosowaną w gumach i cukierkach jest nikotyna unieruchomiona w matrycy słabego kationitu - żywicy jonowymiennej (kwas polimetakrylowy). Z kolei plastry służą do powolnego uwalniania zawartego w nich alkaloidu. Dlatego stosowane są w sytuacjach, w których konieczne jest długotrwałe powolne dozowanie nikotyny pacjentowi w niewielkich dawkach. Plastry z nikotyną składają się z matrycy polimerowej (na bazie kopolimerów octanu winylu z octanem etylenu, polyisobutyleny, metakrylanu butylu i politeraftalanu etylenu) nasączonej nikotyną wraz z substancjami pomocniczymi, takimi jak wodorotlenek potasu, kroskarmeloza sodu, acetyloacetonian glinu i trójglicerydy. Takie komercyjnie dostępne plastry zapewniają stopniowe uwalnianie odpowiednio niewielkiej dawki (10-25 mg) nikotyny w ciągu 16 godzin. Jednakże szybkość uwalniania nikotyny z tych plastrów drastycznie maleje w czasie od $8 \mu\text{g cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ w ciągu pierwszych kilkunastu minut do ok. $1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ w trakcie dalszego uwalniania [28]. Celowe jest więc opracowanie nowego składnika plastrów i gum stosowanych w terapii antynikotynowej, który zapewniałby kontrolowane, równomierne w czasie uwalnianie nikotyny oraz na obniżenie jej lotności i podwyższenie jej stabilności chemicznej. Dotychczasowe próby opracowania takich materiałów obejmują zastosowanie β -cyklodekstryny [29], krzemianu magnezowo-glinowego w połączeniu z alginianem sodu [30], sproszkowanej celulozy [31] oraz żywic jonowymiennych [32, 33]. Z wyjątkiem β -cyklodekstryny, materiały te wykazują niespecyficzną absorpcję nikotyny.

Dlatego też celem obecnego wynalazku jest opracowanie i wykonanie substancji chemicznej, która mogłaby z jednej strony być wykorzystana do budowy chemicznego czujnika do oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy, a z drugiej służyć jako aktywny

składnik materiałów do stopniowego uwalniania nikotyny (plastry, gumy do żucia), pozbawionego powyższych wad.

Przedmiotem wynalazku jest związek chemiczny o wzorze strukturalnym (1)



(1)

w którym R1 jest atomem wodoru lub fragmentem cząsteczki oksyacetamidu, kwasu oksooctowego, lub estru metylowego kwasu oksooctowego a R2 jest fragmentem cząsteczki oksyacetamidu, kwasu oksooctowego, lub estru metylowego kwasu oksooctowego.

Wynalazek obejmuje także spolimeryzowaną warstwę takiego związku chemicznego.

Korzystnie, grubość tej warstwy wynosi od 10 nm do 500 nm, korzystniej około 100 nm.

Korzystnie, szorstkość powierzchni R_{RMS} tej warstwy wynosi od 1 nm do 20 nm, korzystniej od 2 nm do 5 nm.

Korzystnie, warstwa według wynalazku jest elektroaktywna w zakresie potencjałów dodatnich względem standardowej elektrody wodorowej.

Wynalazek obejmuje także zastosowanie tej warstwy jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do oznaczania nikotyny, kotyniny lub miosminy, a także jej zastosowanie jako materiału do powolnego uwalniania nikotyny.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony poniżej w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków.

Fig. 1 Ogólny wzór strukturalny zsyntetyzowanych pochodnych porfiryny cynkowej.

Fig. 2 Zarejestrowana równocześnie za pomocą stacjonarnej elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej EQCM 5710 zależność (I i I') prądu, (2 i $2'$) zmian częstotliwości rezonansowej oraz (3 i $3'$) zmian oporności dynamicznej od potencjału w trakcie potencjodynamicznego osadzania warstwy polimeru z 1,2-dichlorobenzenowego roztworu (a) 0,48 mM ZnPATDPP i (b) 0,70 mM ZnPDATDPP i 0,1 M (TBA)ClO₄ na elektrodzie złotej 10-MHz rezonatora kwarcowego cięcia AT. Szybkość zmian potencjału wynosiła 0,1 V s⁻¹.

Fig. 3 Zależność zmian częstotliwości rezonansowej od stężenia nikotyny dla 10-MHz rezonatora kwarcowego stacjonarnej mikrowagi EQCM 5710, pokrytego warstwą polimeru (1) ZnPATDPP oraz (2) ZnPDATDPP w wodno-etanolowym (1 : 1, v : v) 0,1 M buforze octanowym o pH = 4,2. Pomiary prowadzone były w warunkach stacjonarnych. Warstwy polimerów osadzono w trakcie 6 cykli potencjałowych w zakresie od 0 do 1,30 V w 1,2-dichlorobenzenowym roztworze odpowiedniego monomeru i 0,1 M (TBA)ClO₄. Szybkość zmian potencjału wynosiła 0,1 V s⁻¹.

Fig. 4 Zależność od czasu zmian częstotliwości rezonansowej 10-MHz rezonatora kwarcowego mikrowagi przepływowej EQCM 5610, pokrytego warstwą polimeru ZnPDATDPP, zarejestrowana w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej, po zastrzyknięciu roztworu nikotyny do roztworu nośnego, wodno-etanolowego (1 : 1, v : v) 0,1 M buforu octanowego o pH = 4,2. Szybkość przepływu roztworu nośnego wynosiła 100 μL min⁻¹. Objętość zastrzyku roztworu nikotyny wynosiła 100 μL. Odległość wylotu kapilary doprowadzającej roztwór nośny od rezonatora kwarcowego w oprawce przepływowej mikrowagi wynosiła 50 μm. Warstwa polimeru została osadzona potencjodynamicznie na elektrodzie złotej rezonatora w trakcie 10 cykli potencjałowych w zakresie od 0 do 1,30 V w 1,2-dichlorobenzenowym roztworze 0,70 mM ZnPDATDPP i 0,1 M (TBA)ClO₄, z szybkością przemiatania potencjału 0,1 V s⁻¹.

Fig. 5. Krzywe kalibracyjne uzyskane za pomocą wstrzykowej analizy przepływowej dla (1) nikotyny, (2) kotyniny i (3) miosminy z zastosowaniem 10-MHz rezonatora kwarcowego mikrowagi przepływowej EQCM 5610, pokrytego warstwą polimeru ZnPDATDPP. Szybkość przepływu roztworu nośnego, wodno-etanolowego (1 : 1, v : v) 0,1 M buforu octanowego o pH = 4,2, wynosiła 100 μL min⁻¹. Objętość zastrzyku roztworu alkaloidu wynosiła 100 μL a odległość wylotu kapilary doprowadzającej roztwór nośny od rezonatora kwarcowego w oprawce przepływowej

mikrowagi wynosiła 50 μm . Polimer osadzono w trakcie 10 potencjodynamicznych cykli zmian potencjału w zakresie od 0 do 1,30 V, w 1,2-dichlorobenzenowym 0,70 mM roztworze monomeru i 0,1 M (TBA)ClO₄, przy szybkości zmian potencjału 0,1 V s⁻¹.

Fig. 6. Uwalnianie nikotyny z cienkiej warstwy polimeru (1, 1') ZnPATDPP i (2, 2') ZnPDATDPP naniesionego na 10-MHz rezonator kwarcowy przepływowej mikrowagi EQCM 5610, w przeliczeniu na 1 g polimeru zarejestrowane w warunkach (a) przepływowych i (b) stacjonarnych. Polimery równoważone były ze 100 mM nikotynowym roztworem (a) 0,067 M NaH₂PO₄ o pH = 4,4 lub (b) wodno-etanolowym (1 : 1, v : v) 0,1 M buforem octanowym o pH = 4,2. W warunkach przepływowych, szybkość przepływu roztworu nośnego, 0,067 M NaH₂PO₄ o pH = 7,40, wynosiła 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Warstwy polimerów osadzono potencjodynamicznie w trakcie 10 cykli zmian potencjału w zakresie od 0 do 1,30 V, w 1,2-dichlorobenzenowym 0,48 lub 0,70 mM roztworze odpowiedniego monomeru i 0,1 M (TBA)ClO₄, przy szybkości zmian potencjału 0,1 V s⁻¹.

Bibliografia

- [1] S. S. Yang, I. Smetena, and A. I. Goldsmith, *J. Chromatogr.* **746** (1996), 131.
- [2] A. J. Alberg, *Drugs Today* **44** (2008), 895.
- [3] E. S. Messina, R. F. Tyndale, and E. M. Sellers, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282** (1997), 1608.
- [4] P. J. Murphy, *J. Biol. Chem.* **248** (1973), 2796.
- [5] J. B. Havla, C. E. Hill, S. Z. Abdel-Rahman, and E. Richter, *Food Chem. Toxicol.* **47** (2009), 237.
- [6] S. Vogt, K. Fuchs, and E. Richter, *Toxicology* **222** (2006), 71.
- [7] S. Glas, S. Tyroller, W. Zwickenpflug, K. Steiner, G. Kiefer, and E. Richter, *Arch. Toxicol.* **81** (2007), 151.
- [8] H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, and K. Saito, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49** (2009), 108.
- [9] W. Zwickenpflug and S. Tyroller, *Chem. Res. Toxicol.* **19** (2006), 150.
- [10] F. Lafay, E. Vulliet, and M. M. Flament-Waton, *Anal. Bioanal. Chem.* **396** (2010), 937.
- [11] K. Schutte-Borkovec, C. W. Heppel, A.-K. Heiling, and E. Richter, *Biomarkers* **14** (2009), 278.
- [12] A. Marsh, B. J. Clark, and K. D. Altria, *Electrophoresis* **25** (2004), 1270.
- [13] Z. X. Zhang, X. W. Zhang, J. J. Wang, and S. S. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* **390** (2008), 1645.
- [14] G. D. Byrd, R. A. Davis, and M. W. Ogden, *J. Chromatogr. Sci.* **43** (2005), 133.
- [15] Y. Y. Zhou, H. P. Yu, L. Zhang, H. W. Xu, L. A. Wu, J. Y. Sun, and L. Wang, *Microchim. Acta* **164** (2009), 63.
- [16] W. M. Mullett, E. P. C. Lai, and B. Sellergren, *Anal. Commun.* **36** (1999), 217.
- [17] C. Giuliano, V. Parikh, J. R. Ward, C. Chiamulera, and M. Sarter, *Neurochem. Int.* **52** (2008), 1343.

- [18] S. Park, D. H. Lee, J. G. Park, Y. T. Lee, and J. Chung, *Clin. Chim. Acta* **411** (2010), 1238.
- [19] Y. Tan, J. Yin, C. Liang, H. Peng, L. Nie, and S. Yao, *Bioelectrochemistry* **53** (2001), 141.
- [20] C. T. Wu, P. Y. Chen, J. G. Chen, V. Suryanarayanan, and K. C. Ho, *Anal. Chim. Acta* **633** (2009), 119.
- [21] Z. Wu, X. Zhang, Y. Yang, G. Shen, and R. Yu, *Front. Chem. China* **2** (2006), 183.
- [22] K. Liu, W.-Z. Wei, J.-X. Zeng, X.-Y. Liu, and Y.-P. Gao, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006), 724.
- [23] M. J. Sims, N. V. Rees, E. J. F. Dickinson, and R. G. Compton, *Sens. Actuators, B* **144** (2010), 153.
- [24] H. Y. Xiong, Y. F. Zhao, P. Liu, X. H. Zhang, and S. F. Wang, *Microchim. Acta* **168** (2010), 31.
- [25] J. E. Rose, F. M. Behm, and E. C. Westman, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **68** (2001), 187.
- [26] D. W. Wetter, M. C. Fiore, T. B. Young, J. B. McClure, C. A. de-Moor, and T. B. Baker, *Exp. Clin. Psychopharmacol.* **7** (1999), 135.
- [27] N. A. Rigotti, J. H. Arnsten, K. M. McKool, K. M. Wood-Reid, D. E. Singer, and R. C. Pasternak, *Am. J. Prev. Med.* **17** (1999), 255.
- [28] J. Østergaard, E. Meng-Lund, S. W. Larsen, C. Larsen, K. Petersson, J. Lenke, and H. Jensen, *Pharm. Res.* **27** (2010), 2614.
- [29] S. Davaran, M. R. Rashidi, R. Khandaghi, and M. Hashemi, *Pharmacol. Res.* **51** (2005), 233.
- [30] T. Pongjanyakul and H. Suksri, *Carbohydrate Polym.* **80** (2010), 1018.
- [31] A. Mihranyan, S.-B. Andersson, and R. Eka, *Eur. J. Pharm. Sci.* **22** (2004), 279.
- [32] P. B. Borodkin, in *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Vol. 8 (J. Swarbrick and J. C. Boylan, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, p. 203.
- [33] Y.-H. Cheng, P. Watts, M. Hinchcliffe, R. Hotchkiss, R. Nankervis, N. F. Faraj, A. Smith, S. S. Davis, and L. Illum, *J. Control. Release* **79** (2002), 243.
- [34] http://ichf.edu.pl/offers/instrum/quartz_pliki/5710/a_mnu.htm.
- [35] A. Kochman, K. Krupka, J. Grissbach, W. Kutner, B. Gniewińska, and L. Nafalski, *Electroanalysis* **18** (2006) 2168.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

Przykład 1 – Synteza nowych pochodnych porfiryny według wynalazku

Syntezę 5-(2-fenoksyacetamido)-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfirynatocynku(II), ZnPATDPP, i 5-[2,2'-(2,5-fenilenobis(oksy)diacetamido)]-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfirynatocynku(II), ZnPDATDPP, prowadzono zgodnie z procedurami opisanymi poniżej.

1. Synteza 5-(2-metoksyfenylo)-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny i 5-[2,2'-(2,5-dimetoksyfenylo)]-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny.

Przygotowano 500-mL roztwór CH_2Cl_2 zawierający 1,025 g (3,75 mmola) 4-formyltrifenylaminy, 1,25 mmola odpowiedniego aldehydu i 5 mmola świeżo przedestylowanego pirolu. Do tego roztworu dodano 12 μL ($1,2 \times 10^{-2}$ mmola) BF_3EtO_2 i 0,35 mL (4,5 mmola) kwasu trójfluorooctowego. Następnie mieszaninę tę utrzymywano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny. Gdy tylko aldehydy całkowicie przereagowały, do mieszaniny dodano 570 mg (3,73 mmola) 2,3-dichloro-5,6-dicjanobenzochinonu i mieszano ją przez 3 godziny. Następnie dodano 5 mL trietyloaminy i mieszano roztwór przez dalsze 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik odparowano a otrzymany produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie krzemionkowej.

2. Synteza 5-(2-hydroksyfenylo)-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny i 5-[2,2'-(2,5-dihydroksyfenylo)]-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny.

Do CH_2Cl_2 roztworu metoksyfenylporfiryny (1 mmola) o temperaturze -78°C wkroplono próbkę 4-mL dichlorometanowego roztworu 1 M BBr_3 . Temperatura roztworu była utrzymywana przy tej niskiej wartości do końca dodawania roztworu BBr_3 . Otrzymany roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Następnie roztwór ten doprowadzono o temperatury poniżej 5°C i dodano do niego, kolejno, 100 mL zimnej wody i nasycony roztwór węgla sodu. Mieszaninę tę mieszano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej a następnie warstwę organiczną wyekstrahowano za pomocą CH_2Cl_2 i wysuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . W końcu rozpuszczalnik odparowano a surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie krzemionkowej.

3. Synteza 5-(2-fenylksyacetamido)-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny i 5-[2,2'-(2,5-fenilenobis(oksy)diacetamido)]-10,15,20-tri-*N,N*-difenylporfiryny.

Do roztworu 2-bromoacetamidu (1,2 mmola) w suchym acetonie dodano 0,5 mmola hydroksyfenylporfiryny i nadmiar bezwodnego węgla potasu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 5 godz. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej, mieszaninę odsączano a przesącz odparowywano. Surowy produkt oczyszczano za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie krzemionkowej.

4. Synteza porfiryn cynkowych.

W 30 mL chloroformu rozpuszczono 0,0125 mmola uprzednio zsyntetyzowanej porfiryny w postaci wolnej zasady. Do tego roztworu dodano nadmiar octanu cynku(II) (50 gramorównoważników) w metanolu. Postęp reakcji monitorowano za pomocą spektroskopii UV-vis. Po zakończeniu reakcji, tj. po ok. 1 godz., rozpuszczalnik odparowano a produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie krzemionkowej.

W wyniku wykonania opisanych powyżej procedur otrzymano szereg związków w tym ZnPATDPP i ZnPDATDPP. Produkty końcowe oraz poszczególne półprodukty scharakteryzowano a ich budowę potwierdzono za pomocą spektroskopii ^1H NMR tych substancji rozpuszczonych w CDCl_3 .

Przykład 2 – Otrzymywanie spolimeryzowanych warstw nowych pochodnych porfiryny według wynalazku

W celu wykonania czujników chemicznych do oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy według wynalazku osadzono warstwy polimerów rozpoznających te alkaloidy na powierzchni elektrod. Spolimeryzowanie przedstawionych powyżej monomerów porfirynowych ZnPDATDPP i ZnPATDPP (Schemat 1) prowadzi do otrzymania tych polimerów. Monomery te zawierają trzy podstawniki *N,N*-difenylaminowe, tj. trzeciorzędowe aminy które w wyniku elektrochemicznego utlenienia łatwo polimeryzują tworząc trwałe warstwy polimerów porfirynowych.

Warstwy te osadzono na elektrodach według procedury opisanej poniżej. Najpierw przygotowano roztwór do elektropolimeryzacji o stężeniu pochodnej porfiryny w zakresie od 0,1 do 1 mM, korzystnie 0,48 mM dla ZnPATDPP i 0,70 mM dla ZnPDATDPP. Pochodne te następnie rozpuszczono w 1,2-dichlorobenzenowym roztworze 0,1 M nadchloranu tetra-*n*-butyloammoniumowego, $(\text{TBA})\text{ClO}_4$. W końcu z tak przygotowanego roztworu, przelanego do naczynka elektrochemicznego, na dwa sposoby osadzono warstwy polimerów.

W jednym z tych sposobów polimer osadzono na elektrodach złotych rezonatorów kwarcowych mikrowagi kwarcowej typ EQCM 5710 produkcji Instytutu Chemii Fizycznej PAN (Warszawa) [34] w celu przeprowadzenia równoczesnych badań potencjodynamicznych i piezomikrograwimetrycznych. W oprawce mikrowagi zamontowano rezonator kwarcowy o średnicy 14 mm i podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz z centralnie naparowaną

warstwą złota o średnicy 5 mm, która służyła jako elektroda pracująca. W układzie tym oprawkę zamontowano poziomo w taki sposób, aby wnęka oprawki z rezonatorem kwarcowym na jej dnie stanowiła mininaczyńko elektrochemiczne o małej, submililitrowej, objętości. Naczyńko to napełniono 150 μ L próbką roztworu do elektropolimeryzacji. W roztworze, pionowo, umieszczono elektrodę pomocniczą w postaci zwiniętego w spiralę o średnicy ok. 6 mm drutu platynowego o średnicy 0.5 mm. Elektrodę tę zamontowano w taki sposób, aby spirala umieszczona była równolegle do złotej elektrody rezonatora w niewielkiej, kilkumilimetrowej, od niej odległości. W roztworze umieszczono ponadto elektrodę pseudoodniesienia w postaci cienkiego drutu srebrnego. Elektrodę tę umieszczono w taki sposób, aby koniec drutu znajdował się w odległości kilku milimetrów od rezonatora. Następnie potencjał elektrody pracującej zmieniany był liniowo według zadanego programu, z kontrolowaną szybkością (od 0,01 do 1 V/s, korzystnie 0,1 V/s) w sposób cykliczny w zakresie od 0 do 1,3 V, za pomocą kontrolera mikrowagi EQCM 5710 i potencjostatu EP21 firmy ELPAN (Lubawa). W trakcie zmian potencjału, jednocześnie mierzone były zmiany prądu, i , częstotliwości rezonansowej rezonatora kwarcowego, Δf , oraz jego oporności dynamicznej, ΔR . Wyniki tych pomiarów przedstawione są na Fig. 2. Gdy potencjał elektrody pracującej w trakcie cyklicznych zmian potencjału przekraczał 1,0 V, wówczas stopniowo osadzała się na niej warstwa polimeru. Pożądaną grubość warstwy uzyskano dobierając odpowiednią liczbę cykli zmian potencjału. Grubość warstwy osadzanego polimeru monitorowano jednocześnie rejestrując zmiany częstotliwości rezonansowej i przepływający przez elektrodę ładunek. Po osadzeniu warstwy polimeru, wyjęty z oprawki rezonator przemyto, kolejno, metanolem i 2-propanolem a następnie osuszono w strumieniu argonu.

W innym sposobie, warstwy polimerów osadzono na płytkach szklanych (którymi były podstawowe szkiełka mikroskopowe) z naparowanymi warstwami złota. Roztwór do polimeryzacji przygotowano jak w sposobie poprzednim opisanym powyżej. Do osadzania warstw polimerów zastosowano trójszyjne, jednokomorowe mininaczyńko elektrochemiczne, w którym zamontowano jedną z tych płytek jako elektrodę pracującą, elektrodę pomocniczą w postaci spirali z drutu platynowego i elektrodę pseudoodniesienia w postaci drutu srebrnego. Każdą elektrodę umieszczono w innej szyjce naczyńka, przy czym elektrodę pomocniczą zamontowano naprzeciwko elektrody pracującej. Następnie do mininaczyńka wiano roztwór do elektropolimeryzacji. Polimeryzację tę przeprowadzono w warunkach potencjodynamicznych z zastosowaniem opisanego powyżej cyklu potencjałowego z

wykorzystaniem potencjostatu/galwanostatu Autolab PGSTAT 13 produkcji Eco Chemie (Utrecht, Holandia) sterowanego oprogramowaniem GPES 4.9 tego samego producenta. W trakcie elektropolimeryzacji zarejestrowano jedynie zmiany prądu a grubość warstwy kontrolowana była za pomocą odpowiedniej liczby cykli potencjałowych. Po zakończeniu elektropolimeryzacji płytkę szklaną pokrytą polimerem przemyto, kolejno, metanolem i 2-propanolem a następnie osuszono w strumieniu argonu.

Alternatywnie, w tym drugim sposobie, zamiast liniowych zmian potencjału elektrody pracującej z określoną szybkością, tj. metody potencjodynamicznej, zastosowano metodę potencjostatyczną z nałożonym prostokątnym pulsem potencjału, tj. skokową zmianą potencjału pomiędzy 0 i 1,3 V. Czas trwania pulsu wynosił od 0,1 do 100 ms. Grubość osadzonej warstwy polimeru kontrolowana była za pomocą liczby pulsów potencjałowych.

Właściwości otrzymanych warstw polimerów

Warstwy obu polimerów porfiryn, osadzone w opisany powyżej sposób na elektrodach złotych rezonatorów kwarcowych i na złożonych płytkach szklanych, posłużyły do określenia szeregu istotnych właściwości tych polimerów.

Najpierw, za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) zbadano morfologię osadzonych warstw stosując mikroskop Multimode Nanoscope 3D firmy Veeco Metrology Group (Woodbury NY, USA). Do obrazowania AFM wykorzystano warstwy polimerów osadzone na złożonych płytkach szklanych. Warstwy polimeru ZnPATDPP są jednorodne. Składają się ze sferoidalnych ziaren o średnicy ~46 nm. Warstwy polimeru ZnPDATDPP są natomiast znacznie bardziej porowate i niejednorodne. Wyznaczona szorstkość warstwy polimeru ZnPDATDPP wynosi, $R_{RMS}(ZnPDATDPP) = 4,8$ nm, i jest niemal dwukrotnie wyższa niż szorstkość polimeru ZnPATDPP dla którego $R_{RMS}(ZnPATDPP) = 2,4$ nm. Wyznaczona za pomocą AFM grubość warstw naniesionych w trakcie 5 potencjodynamicznych cykli potencjałowych była zbliżona dla obu polimerów wynosząc 110 i 94 nm, odpowiednio, dla polimeru ZnPATDPP i ZnPDATDPP.

Właściwości utleniająco-redukujące w acetonitrylowym roztworze 0,1 M (TBA)ClO₄ warstw obu polimerów zbadano za pomocą woltamperometrii cyklicznej. Badania te wykazały, że warstwy obu polimerów wykazują odwracalne zachowanie elektrodowe w zakresie od 0,9 do 1,1 V, charakterystyczne dla porfiryn unieruchomionych na elektrodzie. Oznacza to, że opisane pochodne porfiryn pozostają elektroaktywne również po ich spolimeryzowaniu.

Centralny atom cynku w makrocyklu porfiryńnym wbudowanym w polimer jest miejscem wiążącym zdolnym do kompleksowania heteroatomu azotu pirydynowego pierścienia nikotyny, kotyniny, lub miosminy. Warto zaznaczyć, że każdy z tych analitów może być koordynowany osiowo przez centralny atom cynku po obu stronach płaszczyzny pierścienia makrocyklu. Dlatego struktura tego pierścienia nie powinna ulegać zaburzeniu w trakcie polimeryzacji monomerów podstawionej porfiryńnej opisanych powyżej. Za pomocą badań spektroskopii UV-vis i Ramana wykazano, że w przypadku polimerów ZnPATDPP i ZnPDATDPP zaburzenia te nie występują. To znaczy, w widmach obu spektroskopii wykryto pasma charakterystyczne dla nieuszkodzonych makrocykli porfiryńnych w roztworach.

Przykład 3 – Oznaczanie nikotyny

Przed piezomikrogravimetrycznymi oznaczeniami nikotyny z zastosowaniem opisanych powyżej warstw polimerów porfiryńnych cynkowych przeprowadzono wstępne pomiary oddziaływań nikotyny z warstwami polimerów cynkowych za pomocą spektroskopii UV-vis. W tym celu zarejestrowano widma UV-vis świeżo przygotowanych warstw polimerów porfiryńnych cynkowych oraz tych warstw równoważonych przez 1 godzinę ze 100 mM roztworem nikotyny w wodno-etanolowym (1:1, v:v) 0,1 M buforze octanowym (pH = 4,0). Widma tych ostatnich warstw wykazywały przesunięcie charakterystycznego dla porfiryń pasma Soreta w stronę dłuższych fal względem takich pasm w widmach warstw przed równoważeniem. Przesunięcie to wskazuje, że centralny atom metalu porfiryńny jest osiowo skompleksowany ligandem [23]. Dlatego przesunięcie to potwierdza tworzenie kompleksu zarówno polimeru ZnPATDPP jak i ZnPDATDPP z nikotyną.

Dalsze badania oddziaływania nikotyny z warstwami polimerów porfiryńnych przeprowadzono za pomocą mikrogravimetrii piezoelektrycznej zarówno w warunkach stacjonarnych jak i wstrzykowej analizy przepływowej, FIA. W tym celu warstwy polimerów ZnPATDPP i ZnPDATDPP osadzono na elektrodach złotych rezonatorów kwarcowych w sposób opisany w Przykładzie 2. W celu wykonania pomiarów w warunkach stacjonarnych, tak pokryte rezonatory zamontowano w oprawce mikrowagi kwarcowej typ EQCM 5710 produkcji IChF PAN (Warszawa). Dane doświadczalne zbierano komputerowo i przetwarzano za pomocą oprogramowania EQCM 5710-S2 produkcji IChF PAN (Warszawa). Oprawka zanurzona była w dedykowanym naczynku elektrochemicznym zawierającym 15 mL intensywnie mieszanego wodno-etanolowego (1:1, v:v) 0,1 M buforu octanowego (pH = 4,2). Następnie jednocześnie rejestrowano zmiany Δf i ΔR po dodaniu do roztworu w

tym naczynku kolejnych porcji stężonego roztworu nikotyny w 0,1 M buforze octanowym o pH = 4,2. Po dodaniu kolejnej porcji tego roztworu częstotliwość rezonansowa skokowo malała wskazując na sorpcję nikotyny przez warstwę polimeru. Natomiast oporność dynamiczna rezonatora malała po każdym zastrzyku tylko nieznacznie, tj. o kilka omów, wskazując na zanedbywalnie małe zmiany viskoelastyczności warstwy polimeru towarzyszące sorpcji analitu. Zależność zmian Δf od stężenia nikotyny w roztworze, w warunkach stacjonarnych, pokazana jest dla obu polimerów na Fig. 3.

Tabela 1. Parametry analityczne opracowanego pieozmikrograwimetrycznego chemoczuJNIka do oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy z rozpoznającą warstwą polimeru ZnPDATDPP.

Parametry analityczne	Analit		
	Nikotyna	Kotynina	Miosmina
Wykrywalność, mmol dm ⁻³	0,12	0,47	0,19
Czułość, Hz dm ³ mol ⁻¹	-3729,3	-971,2	-2534,3
Zakres liniowości, mmol dm ⁻³	0,5 – 10	0,5 – 10	0,5 – 10

Pomiary w układzie FIA przeprowadzono za pomocą zestawu aparatury złożonego ze sterowanej komputerowo pompy strzykawkowej NE-500 produkcji New Era Pump System, Inc. (Wantagh NY, USA), pętlowego zaworu dozującego Rheodyne 7725i (Cotati CA, USA) oraz mikrowagi kwarcowej EQCM 5610 [35], wyposażonej w przepływową oprawkę do kwarców, produkcji IChF PAN (Warszawa). Dane doświadczalne gromadzono i przetwarzano komputerowo za pomocą oprogramowania EQCM 5710-S2, tego samego producenta. Rezonatory kwarcowe były przygotowane w ten sam sposób jak do pomiarów stacjonarnych opisanych powyżej w Przykładzie 2. Przez tak przygotowany zestaw FIA przepuszczano z szybkością 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ roztwór nośny, wodno-etanolowy (1:1, v:v) 0,1 M bufor octanowy (pH = 4,2). Następnie do roztworu nośnego wstrzykiwano 100- μL porcje roztworu nikotyny o różnym stężeniu i równocześnie mierzono zmiany Δf i ΔR w czasie. Przykładowy zestaw krzywych zmian Δf w czasie dla wstrzykiwanych roztworów nikotyny o różnych stężeniach pokazany jest na Fig. 4. Na krzywych tych występują ujemne piki

wskazujące na spadek Δf w wyniku sorpcji nikotyny przez warstwę polimeru a następnie wzrost Δf związany z jej wymywaniem z warstwy przez roztwór nośny. Zachowanie to wskazuje na odwracalność wiązania nikotyny w warstwie polimeru i możliwość jej swobodnego uwalniania. Zmiana Δf jest tym większa im większe jest stężenie nikotyny w roztworze wstrzykiwanym do roztworu nośnego. Zależność minimalnej częstotliwości, Δf_{\min} , od stężenia wstrzykniętego roztworu nikotyny przedstawia Krzywa 1 na Fig. 5 a parametry analityczne mikrogravimetrycznego czujnika chemicznego do oznaczania nikotyny z rozpoznającą warstwą polimeru ZnPDATDPP zebrane są w Tabeli 1.

Przykład 4 – Oznaczanie miosminy

Podobnie jak oznaczanie nikotyny opisane w Przykładzie 4, miosminę oznaczano w układzie FIA złożonym z pompy strzykawkowej NE-500, zaworu dozującego Rheodyne 7725i oraz mikrowagi kwarcowej EQCM 5610. Dane doświadczalne gromadzono i przetwarzano komputerowo za pomocą oprogramowania EQCM 5710-S2. Rezonatory kwarcowe były przygotowane w ten sam sposób jak w przypadku oznaczania nikotyny (Przykład 3). Przez tak przygotowany układ FIA przepuszczano z szybkością 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ roztwór nośny, wodno-etanolowy (1:1, v:v) 0,1 M bufor octanowy (pH = 4,2). Następnie do roztworu nośnego wstrzykiwano 100- μL porcje roztworu nośnego zawierającego miosminę o różnym stężeniu i rejestrowano zmiany Δf i ΔR w czasie. Zależność minimalnej wartości częstotliwości, Δf_{\min} , od stężenia wstrzykniętego roztworu miosminy przedstawia Krzywa 2 na Fig. 5 a parametry analityczne mikrogravimetrycznego czujnika do oznaczania miosminy z rozpoznającą warstwą polimeru ZNPDATDPP przedstawione są w Tabeli 1.

Przykład 5 – Oznaczanie kotyniny

Podobnie jak przy oznaczeniach nikotyny i miosminy opisanych powyżej, odpowiednio, w Przykładzie 3 i 4, kotyninę oznaczono za pomocą zestawu FIA złożonego ze sterowanej komputerowo pompy strzykawkowej NE-500, zaworu dozującego Rheodyne 7725i oraz mikrowagi kwarcowej EQCM 5610. Dane doświadczalne gromadzono i przetwarzano za pomocą oprogramowania EQCM 5710-S2. Rezonatory kwarcowe były przygotowane w ten sam sposób jak w przypadku oznaczania nikotyny i miosminy (Przykład 3 i 4). Przez tak przygotowany układ FIA przepuszczano z szybkością 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ roztwór nośny, wodno-

etanolowy (1:1, v:v) 0,1 M bufor octanowy (pH = 4,2). Następnie do roztworu nośnego wstrzykiwano 100- μ L porcje roztworu nośnego zawierającego kotyninę o różnym stężeniu i jednocześnie rejestrowano zarówno zmiany Δf jak i ΔR w czasie. Zależność minimalnej wartości częstotliwości, Δf_{\min} , od stężenia wstrzykniętego roztworu kotyniny przedstawia Krzywa 3 na Fig. 5 a parametry analityczne mikrogravimetrycznego czujnika do oznaczania kotyniny z rozpoznającą warstwą polimeru ZnPDATDPP zebrane są w Tabeli 1.

Przykład 6 – Stopniowe uwalnianie nikotyny

W celu zastosowania opisanych powyżej polimerów porfiryńowych jako materiałów aktywnych do stopniowego uwalniania nikotyny przeprowadzono serię pomiarów pozwalających ocenić pod tym względem właściwości tych materiałów. Pomiarów te przeprowadzono na dwa sposoby.

W jednym z tych sposobów badania przeprowadzono w układzie przepływowym FIA stosowanym uprzednio w badaniach oznaczania nikotyny, kotyniny i miosminy, opisanym w Przykładach 3-5. W tym celu rezonator kwarcowy pokryty warstwą polimeru umieszczono w oprawce przepływowej mikrowagi kwarcowej EQCM 5610 a następnie przez tak przygotowany układ przepuszczano z szybkością 200 μ L/min roztwór nośny, 0,067 M roztwór NaH_2PO_4 (pH = 7,4). Następnie do roztworu nośnego wstrzykiwano 1 mL porcję 100 mM roztworu nikotyny w 0,067 M NaH_2PO_4 (pH = 4,4) i rejestrowano zmiany Δf i ΔR w czasie. W wyniku powolnego przepływu roztworu nikotyny najpierw polimer wysycił się nikotyną a następnie stopniowo ją uwalniał do strumienia przepływającego roztworu nośnego. Zmiany Δf w czasie przeliczono następnie na zmiany masy stosując równanie Saurebrya i znormalizowano względem masy osadzonego za pomocą elektropolimeryzacji polimeru. Tak zarejestrowaną Krzywą 1 i 2 uwalniania nikotyny, odpowiednio, z polimeru ZnPATDPP i ZnPDATDPP przedstawiono na Fig. 6a.

W innym sposobie pomiarów uwalniania nikotyny rezonator kwarcowy pokryty polimerem umieszczono w oprawce stacjonarnej mikrowagi EQCM 5710. Następnie tę oprawkę zamocowano poziomo w taki sposób, aby wnęka oprawki z rezonatorem kwarcowym na jej dnie stanowiła mininaczyńko o małej, submililitrowej, objętości. W mininaczyńku tym umieszczano 200- μ L porcję 100 mM nikotyny w wodno-etanolowym (1:1, v:v) 0,1 M buforze octanowym (pH = 4,2). W tych warunkach polimer sorbował nikotynę przez 10-15 min, po czym rejestrowano Δf i ΔR w czasie. Następnie mininaczyńko

opróżniono z roztworu nikotyny a oprawkę umieszczono w naczynku zawierającym 20-mL porcję 0,067 M roztworu NaH_2PO_4 ($\text{pH} = 7,4$). Ze względu na drastyczną (~ 2 kHz) zmianę Δf w trakcie zanurzania oprawki do roztworu, fałszującą wyniki pomiaru uwalniania nikotyny, rejestrację Δf i ΔR rozpoczynano z kilkusekundowym opóźnieniem w trakcie którego sygnał Δf stabilizował się. Zarejestrowane zmiany częstotliwości przeliczono, za pomocą równania Saurebrea, na masę uwolnionej nikotyny i znormalizowano względem masy osadzonego za pomocą elektropolimeryzacji polimeru. Tak zarejestrowane Krzywe 1' i 2' uwalniania nikotyny, odpowiednio, z polimeru ZnPATDPP i ZnPDATDPP przedstawiono na Fig. 6b.

Tabela 2. Wyznaczone w warunkach przepływowych i stacjonarnych parametry uwalniania nikotyny z polimerów ZnPATDPP i ZnPDATDPP.

Polimer	Masa zaabsorbowanej nikotyny, mg g^{-1}	Masa uwolnionej nikotyny, mg g^{-1}	Odzyskiwanie nikotyny, %	$t_{25\%}$, min	Średni strumień uwalnianej nikotyny, $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$
Warunki stacjonarne					
ZnPATDPP	57,70	35,50	61,50	2,33	2,04
ZnPDATDPP	535,30	435,70	81,40	0,13	225,70
Warunki przepływowe					
ZnPATDPP	14,30	14,3	100,00	2,72	0,40
ZnPDATDPP	36,40	28,6	78,60	1,19	1,66

W obu sposobach pomiaru, dla obu polimerów, nikotyna jest stopniowo uwalniana z warstwy polimeru. Ilość uwolnionej nikotyny po kilkunastu minutach osiąga plateau. Zarówno masa zaabsorbowanej nikotyny przypadająca na jednostkę masy polimeru jak i czas w którym krzywa uwalniania nikotyny osiąga plateau oraz stopień odzyskania zaabsorbowanego alkaloidu silnie zależy od rodzaju polimeru (Tabela 2). Masa uwolnionej nikotyny jest w większości przypadków dla obu polimerów niższa niż masa zaabsorbowanej nikotyny co wskazuje na występowanie w polimerze miejsc wiążących o różnym powinowactwie do nikotyny. Polimer ZnPDATDPP jest w stanie zaabsorbować więcej

nikotyny w przeliczeniu na gram polimeru niż polimer ZnPATDPP. Również uwalnianie tego alkaloidu z polimeru ZnPDATDPP jest znacznie szybsze niż z polimeru ZnPATDPP. Wskazuje to na bardziej otwartą, porowatą strukturę polimeru ZnPDATDPP. Z tego też względu średni strumień uwalnianej nikotyny jest większy w przypadku polimeru ZnPDATDPP niż polimeru ZnPATDPP. Wielkość strumienia uwalnianej nikotyny silnie zależy od ilości nikotyny uprzednio zaabsorbowanej w warstwie polimeru.

Podziękowania

Prace prowadzące do niniejszego patentu były współfinansowane przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka poprzez grant nr POIG 01.01.02-00-008/08.