

# **Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce**

## **Chemia**



[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

Poznań 2021

**Redakcja naukowa**

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

**Wydawca**

Młodzi Naukowcy

[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

[wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com](mailto:wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com)

**ISBN (całość 978-83-66392-91-5)**

**ISBN (wydanie online 978-83-66743-33-5)**

**ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-34-2)**

Ilość znaków w książce: 318 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 8.0

Data wydania: maj 2021

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

## Spis treści

<b>1. Metody analityczne badania fentanyli na miejscu zdarzenia</b>	<b>7</b>
<i>Biel Iwona, Woźniakiewicz Michał</i>	
<b>2. Mieszanki eutektyczne jako rozpuszczalniki ekstrakcyjne</b>	<b>15</b>
<i>Gołąb Małgorzata, Woźniakiewicz Michał</i>	
<b>3. Rhamnolipid – budowa, właściwości i zastosowanie</b>	<b>21</b>
<i>Rekiel Edyta</i>	
<b>4. Surfaktyna – synteza, właściwości i zastosowanie</b>	<b>26</b>
<i>Rekiel Edyta</i>	
<b>5. Simple fluorescence assay for detection of hydrogen sulfide</b>	<b>31</b>
<i>Słowiński Daniel, Podsiadły Radosław</i>	
<b>6. Recent progress in the fluorogenic probes for H<sub>2</sub>S detection</b>	<b>38</b>
<i>Słowiński Daniel, Podsiadły Radosław</i>	
<b>7. Zwiększenie czułości oznaczeń metodami elektroforezy kapilarnej</b>	<b>47</b>
<i>Stelmaszczyk Paweł, Wietecha-Posłuszny Renata</i>	
<b>8. Substancje chemiczne używane przez sprawców przestępstw seksualnych</b>	<b>54</b>
<i>Stelmaszczyk Paweł, Wietecha-Posłuszny Renata</i>	
<b>9. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej – początki, podstawy i perspektywy</b>	<b>61</b>
<i>Magdalena Świądro, Alicja Chromiec, Wietecha-Posłuszny Renata, Dominika Dudek</i>	
<b>10. Novel "turn-on" fluorescent probe for the detection of hypochlorous acid - synthesis and preliminary study</b>	<b>67</b>
<i>Świerczyńska Małgorzata, Podsiadły Radosław</i>	
<b>11. Recent development of a "turn-on" fluorescent probes for the detection of hypochlorous acid</b>	<b>73</b>
<i>Świerczyńska Małgorzata, Podsiadły Radosław</i>	
<b>12. Ciecze jonowe z anionem herbicydowym jako związki o budowie amfifilowej</b>	<b>81</b>
<i>Wojcieszak Marta, Syguda Anna, Materna Katarzyna</i>	
<b>13. Wpływ dodatku alkoholi na aktywność powierzchniową cieczy jonowych</b>	<b>89</b>
<i>Wojcieszak Marta, Syguda Anna, Materna Katarzyna</i>	



Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk przyrodniczych, nauk technicznych i inżynierskich, nauk medycznych i nauk o zdrowiu, szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych oraz nauk prawnych i ekonomicznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

*Redakcja*



## 1. Metody analityczne badania fentanyli na miejscu zdarzenia

Analytical methods for testing fentanyl at the scene

Biel Iwona, Woźniakiewicz Michał

Pracownia Chemii Sądowej, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Opiekun naukowy: dr hab. Michał Woźniakiewicz, prof. UJ

Iwona Biel: i.biel@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: fentalogi, IMS, TD-DART-MS, SERS

### Streszczenie

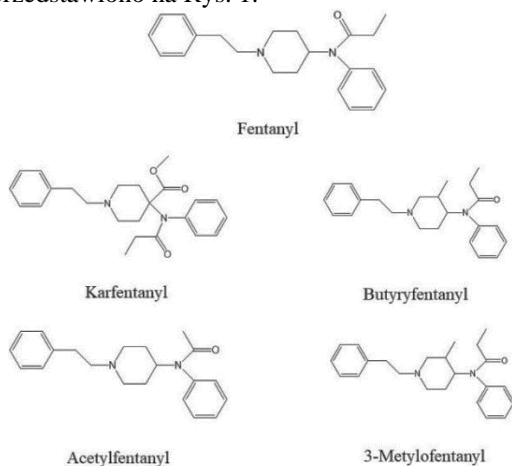
Fentanyl i jego pochodne zyskały w ostatnich latach popularność jako środki odurzające. Związki te już w niewielkich dawkach wywołują efekt narkotyczny, z tego powodu często na miejscu zdarzenia występują w śladowych ilościach. Wykonujący pracę policjanci i strażacy są narażeni na negatywne działanie fentanyli, dlatego ważne jest skuteczne wykrywanie oraz identyfikacja tych związków. Szybka i wiarygodna identyfikacja pozwala na poprawne zabezpieczenie dowodów oraz podjęcie odpowiednich środków ochrony osobistej przez służby mundurowe.

Jednymi z podstawowych metod przesiewowych wykorzystywanych w celu analizy dowodu w postaci białego proszku jest metoda spektrometrii ruchliwości jonów oraz spektrometria mas z termiczną desorpcją z analizą w czasie rzeczywistym. W literaturze można spotkać również metody wykorzystujące czujniki elektrochemiczne. Dzięki wykorzystaniu przenośnych aparatów możliwe jest szybkie wykrycie fentanylu i jego analogów jak i innych substancji psychoaktywnych w ilościach nanogramowych.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie przeglądu literaturowego stosowanych metod analitycznych w celu wykrycia i identyfikacji fentanylu i jego analogów bezpośrednio na miejscu zdarzenia.

### 1. Wstęp teoretyczny i opis zagadnienia

Fentanyl i jego analogi, nazywane często fentalogami należą do grupy opioidów syntetycznych działających antagonistycznie na receptory opioidowe. Wzory strukturalne fentanylu i kilku jego pochodnych przedstawiono na Rys. 1.



**Rys. 1.** Wzory strukturalne fentanylu, karfentanylu, butyrylfentanyli, acetylfentanylu oraz 3-metylofentanylu

Ze względu na swoją budowę fentalogi są pochodnymi piperydyny. W latach 60 ubiegłego wieku przeprowadzono badania, ukazujące, że fentanyl wykazuje około 100-krotnie silniejsze działanie przeciwbólowe niż morfina, dodatkowo bardzo dobrze rozpuszcza się w tłuszczach i posiada wysoki indeks terapeutyczny, dzięki czemu znalazł zastosowanie w medycynie jako lek znieczulający. Fentanyl był podawany pacjentom następującymi drogami: dożylnie, domięśniowo, przezskórnie (w postaci plastrów), doustnie (pastyłki do ssania, tabletki podjęzykowe, podpoliczkowe filmy adhezyjne, tabletki podjęzykowe), w postaci lizaków, w formie aerozolu do nosa (ChPL 2014).

Różne sposoby dawkowania fentanylu pozwoliły na stosowanie go zarówno u osób mających problemy z połykaniem, jak i osób borykających się z chorobami śluzówki nosa. Użytkowanie fentalogów wywołuje skutki takie jak: analgezję, senność, depresję oddechową, świąd oraz zaburzenia nastroju.

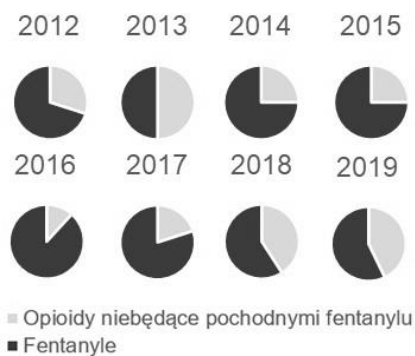
Fentalogi są również wykorzystywane w celach pozamedycznych, między innymi jako składniki gazu bojowego. W październiku 2002 roku rosyjskie siły specjalne użyły gazu bojowego w celu odbicia zakładników z rąk czeczeńskich terrorystów podczas ataku na moskiewski teatr na Dubrowce. Po kilku dniach negocjacji zaczęto tłoczyć gaz przez klimatyzację. Jego głównymi składnikami były: fentanyl, remifentanyl oraz karfentanyl, powodujące skurcz górnych dróg oddechowych. Zostały one rozpuszczone w halotanie w celu zwiększenia ich lotności. W wyniku próby odbicia zakładników zginęło 40 terrorystów oraz 139 widzów i pracowników teatru (Zawadzki i Nowak 2018).

Fentanyle znalazły również inne, pozaterapeutyczne użycie – jako środki odurzające. Już w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku stosowano fentanyle w celach rekreacyjnych. Wtedy były one sprzedawane pod nazwą „china white” lub „syntetyczna heroina”. Gdy jedna z pochodnych fentanylu ( $\alpha$ -metylofentanyl) została wpisana na listę substancji kontrolowanych w Polsce pod koniec lat osiemdziesiątych, na rynku zaczęły pojawiać się coraz to nowsze pochodne o zbliżonym działaniu. Uważa się, że fentanyle sprzedawane na czarnym rynku pochodzą nie tylko z przemysłu narkotycznego, ale również z nielegalnego obrotu wyrobami medycznymi (Zawadzki i Nowak 2018). W Polsce fentalogi podlegają regulacji ustawy z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii. Zalicza je ona do środków odurzających grup I-N oraz IV-N. Natomiast w Stanach Zjednoczonych zaliczane są do I i II grupy substancji kontrolowanych. Jak ukazuje Europejski raport narkotykowy z 2020 roku syntetyczne opioidy (w tym fentanyle) zaczęły zyskiwać popularność w Europie już w 2012 roku (EMCDDA 2020). Zaledwie 4 lata później wykryto około 4 razy więcej nowych syntetycznych opioidów. W kolejnych latach ilość wykrywanych opioidów w niewielkim stopniu wzrosła. Dla porównania, wśród nowych substancji psychoaktywnych tak duży wzrost wykrywania zarejestrowano tylko dla fenyloacetyloamin w latach 2011 i 2012, aczkolwiek w późniejszym czasie zgłoszenie ich do unijnego systemu wczesnego ostrzegania spadło około 5 – krotnie. Wykrywanie pozostałych nowych substancji psychoaktywnych (np. tryptamin, benzodiazepin, piperazyn) cały czas utrzymuje się na takim samym poziomie. Pomimo tego, iż tempo wprowadzania nowych substancji psychoaktywnych ustabilizowało się w ostatnich latach, nadal wykrywa się rocznie po raz pierwszy około 50 nowych substancji psychoaktywnych.

W 2019 roku liczba rejestrowanych nowych opioidów spadło o około 25%, co ukazuje, iż rosnący poziom świadomości na temat zagrożeń związanych z ich użytkowaniem zaskutkowało zwiększeniem ograniczeń w krajach producentów.

Na podstawie Rys. 2 można zauważyć, iż w latach 2018 i 2019 synteza nowych pochodnych fentanylu znacznie spadła. W 2019 roku zgłoszono po raz pierwszy osiem nowych syntetycznych opioidów, a zaledwie dwa z nich były pochodnymi fentanylu. Dane te ukazują, że działania podjęte w kierunku ograniczeń związanych z produkcją i użytkowaniem nowych substancji psychoaktywnych zostały zastrzone. W Europejskim raporcie narkotykowym z 2020 roku można znaleźć również informację, iż opioidy wykrywane są w 82% przypadków przedawkowania ze skutkiem śmiertelnym (EMCDDA 2020).





**Rys. 2.** Procentowa liczba nowych pochodnych fentanylu wchodzących w skład zgłoszonych po raz pierwszy opioidów w latach 2012-2019 (EMCDDA 2020)

Ze względu na niską masę cząsteczkową oraz lipofilowość fentanyl jest podatny na wchłanianie przezskórne, a błony śluzowe (w porównaniu do skóry) wykazują ponad 30-krotnie większe wchłanianie opisywanych związków. Dlatego też występujące na miejscu zdarzenia fentalogi stanowią zagrożenie dla służb ratowniczych (policjantów, strażaków) oraz psów tropiących. W swojej pracy M. Moss i inni zalecają stosowanie przez służby ratownicze podstawowych środków ochrony osobistej, takich jak rękawiczki nitylowe i maski ochronne N95, aby uniknąć przypadkowego wchłaniania się przez skórę toksycznych fentalogów (Moss i in. 2017). W sytuacji, gdy narażenie na negatywne działanie opioidów jest podwyższone należy korzystać z kombinezonów ochronnych. Po ekspozycji, negatywne działanie fentalogów można zniwelować naloxonem (chlorowodorkiem naloksonu) - lekiem odwracającym niepożądane działanie opioidów. Chlorowodorek naloksonu jest półsyntetyczną pochodną morfiny. Podawany jest w formie roztworu do wstrzykiwań (dożylnie, domięśniowo, podskórnie) oraz w formie aerozolu. Ostatnia z nich stosowana jest szczególnie u psów tropiących, które miały kontakt z fentanylem.

Wykonywanie badań bezpośrednio na miejscu zdarzenia narzuca pewne wymagania technikom analitycznym. Wśród najważniejszych wymienić należy stosunkowo krótki czas analizy, odpowiednio niskie granice wykrywalności ilości substancji przy względnie prostym przygotowaniu próbki lub wręcz jego braku oraz wymóg, aby aparatura była przenośna lub transportowalna. Aparatura przenośna może być dostarczona (z wykorzystaniem siły mięśni) na miejsce zdarzenia bezpośrednio przez osobę wykonującą badanie, gdyż jej masa jest stosunkowo niewielka, do maksymalnie 15-20 kg. Natomiast aparatura transportowalna potrzebuje np. dodatkowego źródła zasilania, szczególnego środowiska pracy (stabilny stół, odpowiednia temperatura otoczenia) oraz jej waga wynosi ponad 20 kg. Uniemożliwia to jej ręczne przenoszenie, aczkolwiek może być przewieziona na miejsce zdarzenia w pojeździe specjalistycznym lub zwykłym, niepoddanym szczególnym modyfikacjom.

## 2. Metody analityczne

Wzrost stosowania fentanyli w celach rekreacyjnych doprowadził do opracowania wiarygodnych metod, pozwalających na wykrywanie i w niektórych przypadkach oznaczanie fentalogów. Jak już wcześniej wspomniano, ze względu na zagrożenie związane z toksycznością fentalogów niezbędna jest ich analiza w miejscu bezpośredniego występowania, w celu poprawnego zabezpieczenia dowodów oraz podjęcia odpowiednich środków ochrony osobistej przez służby mundurowe. Takie możliwości stwarzają następujące metody analityczne:

- ▶ Spektrometria ruchliwości jonów (**IMS**, ang. *Ion Mobility Spectrometry*),
- ▶ Spektrometria mas z termiczną desorpcją z analizą w czasie rzeczywistym (**TD-DART-MS**, ang. *Thermal Desorption Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry*),
- ▶ Metody elektrochemiczne (woltamperometria),

- ▶ Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska (**SERS**, ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)

### 2.1 Spektrometria ruchliwości jonów

Podstawą techniki IMS jest pomiar ruchliwości jonów analitu w gazie pod wpływem pola elektrycznego. Rozdzielenie jonów jest wynikiem licznych zderzeń z cząsteczkami gazu obojętnego w polu elektrostatycznym. W zależności od masy, ładunku i wielkości jony osiągają różną prędkość w tubie i w różnym czasie docierają do detektora. Po zarejestrowaniu widma mobilności jonów następuje porównanie go z widmem substancji wzorcowych. Uzyskane widmo nie jest tak charakterystyczne jak widmo masowe, jednak może być wykorzystane do identyfikacji. Ze względu na niewielkie rozmiary urządzenia, jego łatwą przenośność, technika ta szybko znalazła zastosowanie w analizach polowych, w tym w kryminalistyce, m.in. do wykrywania substancji psychoaktywnych czy materiałów wybuchowych przez służby mundurowe. W literaturze można napotkać wiele przykładów wykorzystania techniki IMS do wykrywania i identyfikowania substancji psychoaktywnych. Jednym z nich jest praca Sisco i współpracowników (Sisco i in. 2017), gdzie zaproponowano sposób wykrywania fentalogów (m.in. fentanylu, acetylfentanylu, karfentanylu oraz butyryfentanylu) oraz innych opioidów (m.in. heroiny, naloksonu, metadonu) bezpośrednio na miejscu zdarzenia przy użyciu przenośnego spektrometru IMS. Pomimo krótkiego czasu analizy (mniej niż 10 sekund), na różnych matrycach (odcisk palca, brud, plastikowa torebka) wykryto substancje na w ilościach nanogramowych. Opisywana metoda oprócz licznych zalet, takich jak niskie granice wykrywalności, krótki czas analizy oraz przenośna aparatura, posiada również wady. Jedną z nich jest brak możliwości rozróżnienia sygnałów fentanylu oraz heroiny, zarejestrowanych podczas analizy różnych matryc. Stwierdzono również, że metoda daje fałszywie dodatni wynik w przypadku obecności naloksonu oraz nie pozwala na rozróżnienie pary izomerów. Ten ostatni problem może zostać rozwiązany poprzez zastosowanie bardziej zaawansowanej techniki IMS-MS, jednak która jest jednak droższa i trudniejsza w transporcie.

Technikę IMS wykorzystali również Verkouteren i współpracownicy do wykrywania fentanylu i jego ośmiu analogów (m.in. acetylfentanylu, karfentanylu, cyklopropylofentanylu) oraz dwóch innych syntetycznych opioidów (4-ANPP i U-47700), nie należących do grupy fentalogów (Verkouteren i in. 2019). Badane związki były w 2015 roku najczęściej spotykanymi syntetycznymi opioidami identyfikowanymi w dowodach rzeczowych badanych przez służby w USA, testując siedem komercyjnie dostępnych aparatów IMS. Zaproponowana metoda umożliwiła identyfikację poszczególnych związków, a ponadto dzięki niej można przewidzieć sygnał uzyskiwany dla nowo napotkanych pochodnych fentanylu. Badane związki wykrywane są w ilościach nanogramowych. Opracowana metoda nie pozwala na identyfikację indywidualną izomerów (np. butyryfentanylu i 3-metylofentanylu), gdyż ze względu na tę samą ścieżkę fragmentacji, zarejestrowane sygnały nakładają się na siebie. Zbadano również próbkę zawierającą opisaną mieszaninę badanych związków z dodatkiem potencjalnych interferentów (m.in. heroiny, prokainy i chininy), które mogą powodować przesunięcie lub zmianę intensywności (obniżenie) sygnału analitycznego pochodzącego od fentanylu, lub wprost generować fałszywie pozytywne wyniki. Wykazano, że zmianę położenia sygnału (np. dla heroiny) można zmieniając algorytm wykrywania analitu, natomiast ryzyko obniżenia sygnału analitycznego można skompensować poprzez dodatek związków promujących jonizację fentanylu. Granica wykrywalności dla wszystkich badanych związków jest na poziomie nanogramów.

Bardzo ciekawa jest praca Forbesa i współpracowników, którzy opracowali czułą metodę pozwalającą wykrywać fentanylnę w pojazdach na przejściach granicznych oraz przesyłkach kontrolowanych w placówkach pocztowych (Forbes i in. 2019). Analizowanymi substancjami były fentanylnę, jego 15 analogów (m.in. 3-metylofentanylnę, karfentanylnę, franylfentanylnę), heroina oraz U-47700. Badania przeprowadzono dla ponad 10000 próbek zebranych z pojazdów dostawczych. Analizę prowadzono dla różnych temperatur, czasów analizy oraz dodatków jonów reagentów. Opracowana metoda pozwoliła na zmniejszenie fałszywie dodatnich wyników, a granica wykrywalności również była na poziomie nanogramów. Ponadto wykazuje się bardzo krótkim

czasem analizy – zaledwie kilka sekund. Wzmocniono również sygnały pochodzące od badanych substancji, aby posiadały większą intensywność w stosunku do tła środowiskowego.

## 2.2 Spektrometria mas z termiczną desorpcją z analizą w czasie rzeczywistym

Kolejną techniką jest TD-DART-MS, której podstawę stanowi desorpcja analitu z powierzchni stałej połączona z jonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym. Analizowana próbka umieszczana jest pod strumieniem gazu obojętnego, np. helu lub argonu. Wzbudzenie atomów gazu odbywa się poprzez generowanie plazmy za pomocą wyładowań jarzeniowych w celu stworzenia zarówno naładowanych, jak i metastabilnych indywiduów chemicznych. Naładowane cząsteczki są neutralizowane przez elektrodę w źródle, w wyniku czego powstaje strumień atomów metastabilnych, które są podgrzewane i kierowane na próbkę. Technika ta służy do analizy zarówno próbek ciekłych jak i stałych.

Technika TD-DART-MS służy do detekcji bardzo wielu związków chemicznych na różnych powierzchniach (matrycach). Znajduje głównie zastosowanie w analizie materiałów wybuchowych, jednakże wykorzystano ją również w celach analizy substancji psychoaktywnych, czy badania materiału biologicznego (krew, moczu i ślina). Sisco i współpracownicy analizowali mieszaninę 22 substancji (w tym fentanyl i 16 jego analogów oraz heroina) (Sisco i in. 2017). Pomiar opracowaną metodą trwał maksymalnie 10 sekund, a substancje wykrywano na poziomie nanogramów. Wykorzystana aparatura była przenośna, co umożliwiło analizę na miejscu zdarzenia, a tym samym zapobiegło kontaminacji próbki i negatywnemu działaniu fentalogów w trakcie transportu jej do laboratorium, a pozwoliło na stosowne zabezpieczenie materiału. Ponadto sprawdziła się podczas badania różnych matryc, istotnych z punktu widzenia analiz sądowych (odcisk palca, brud, plastikowa torebka) i umożliwiła odróżnienie fentanylu od heroiny.

Ta sama grupa badawcza, wykorzystwała również metodę TD-DART-MS do analizy śladowych ilości substancji znajdujących się na zewnętrznej części opakowań w celu identyfikacji ich zawartości (Sisco i in. 2019). Analizowanym materiałem były próbki z rzeczywistych dowodów rzeczowych: plastikowe oraz papierowe torby na dowody, koperty, butelki oraz woreczki strunowe; łącznie analizie poddano 144 próbki. Część analizowanego materiału dała wynik fałszywie negatywny, co było związane z czasem, który upłynął od przejścia dowodu do wykonania analizy zaproponowaną metodą. W wyniku przeprowadzonych badań opracowana metoda TD-DART-MS została uznana za wiarygodne narzędzie do ustalenia zawartości badanego opakowania, na podstawie śladowych, mikrogramowych ilości.

## 2.3 Voltamperometria

Techniki elektrochemiczne, takie jak voltamperometria również zyskały zastosowanie w chemii sądowej. Podstawą voltamperometrii jest pomiar natężenia prądu przepływającego przez elektrodę w funkcji przyłożonego do niej potencjału. Zmiana potencjału wywołuje pobieranie lub oddawanie elektronu przez cząsteczkę, co prowadzi do procesu redukcji lub utlenienia. W wyniku reakcji chemicznej płynie prąd elektryczny. Technika ta głównie znajduje zastosowanie w laboratoriach klinicznych, kryminalistycznych jak i przemysłowych.

Bardzo ciekawe i innowacyjne wykorzystanie voltamperometrii w celu analizy opioidów (w tym fentanyli) zaproponowali w swojej pracy Barfidokht i współpracownicy. Stworzyli oni nietypową aparaturę pomiarową: przenośny analizator elektrochemiczny zintegrowany z rękawiczkami z czujnikami elektrochemicznymi umieszczonymi na opuszkach palców (Barfidokht i in. 2019). Zmierzone dane wysyłane są do smartfonu lub tabletu poprzez Bluetooth, a następnie odpowiednio zinterpretowane. Analizie poddano fentanyl, kofeinę, glukozę oraz teofilinę. Zaproponowana metoda umożliwiła identyfikację fentanylu w obecności wyżej wymienionych substancji, zarówno w postaci stałej jak i płynnej, w ilościach mikrogramowych. Stosunkowo krótki czas analizy (poniżej 1 minuty) umożliwia wykorzystanie metody na miejscu zdarzenia jak i na lotniskach w celu zidentyfikowania zagrożenia. Integracja czujnika z rękawiczkami pozwala na bezpieczne przeprowadzenie pomiaru w odzieży ochronnej noszonej przez strażników granicznych czy funkcjonariuszy policji.

Technikę adsorpcyjnej voltamperometrii stripingowej z falą prostokątną wykorzystali Ott i współpracownicy w celu oznaczenia fentanylu w próbkach o nieznanym składzie (proszki) za

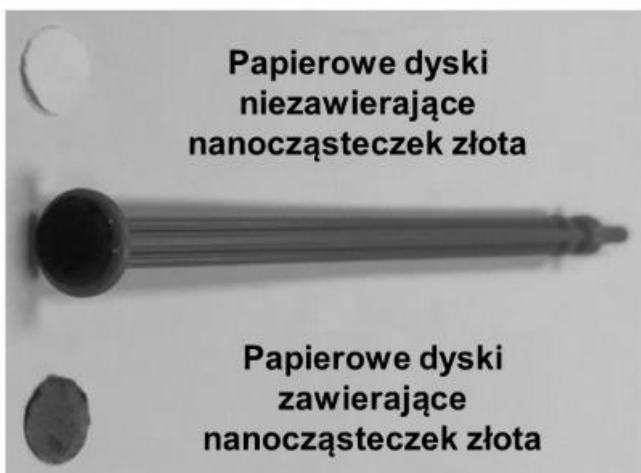
pomocą przenośnego urządzenia (Ott i in. 2020). Opracowaną metodę charakteryzuje szybkie i proste podejście do wykrywania, identyfikacji i półilościowego oznaczania fentanylu w próbkach. Zbadano również wpływ interferentów, takich jak paracetamol, kokaina, metamfetamina, chinina czy kofeina na otrzymywany sygnał. Zarówno paracetamol jak i kofeina nie wpływały na przesunięcie i intensywność pików pochodzącego od fentanylu. W przypadku rozcieńczonych próbek sygnały pochodzący od metamfetaminy i fentanylu nakładały się na siebie. Natomiast kokaina i chinina zwiększały intensywność pików. Dzięki zaproponowanej metodzie można wykryć fentanyl w ilościach nanogramowych, ponadto przeprowadzane są dalsze badania w celu jej zastosowania do analizy próbek śliny (wykrycie potencjalnej jazdy pod wpływem narkotyków).

Technikę woltamperometrii fali prostokątnej zastosowali również Mishra i współpracownicy do wykrywania opioidów (w tym fentanylu), przy użyciu przenośnego urządzenia, w postaci niewielkiego plastra (Mishra i in. 2020). Umożliwia ona wykrycie fentanylu w obecności interferentów, jakim jest między innymi morfina. Pomimo nakładania się na woltamperogramie pików pochodzących od obydwu związków, pojawia się również dodatkowy pik pochodzący od morfiny, na podstawie którego można stwierdzić, iż w badanej próbce występują obydwa związki. Sprawdzone również możliwość zastosowania metody do identyfikacji opioidów występujących na fantomowym modelu ludzkiej skóry, co okazało się sukcesem. Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką czułością, powtarzalnością i selektywnością, a czas analizy wynosi poniżej 1 minuty.

#### 2.4 Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska

Wśród technik przenośnych stosowanych w analizach kryminalistycznych konieczne trzeba wspomnieć o technice SERS, wykorzystującej wzmocnienie sygnału pochodzącego od efektu Ramana, poprzez umieszczenie badanej próbki na chropowatej powierzchni. Technika ta znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak badania polimerów, korozji, próbek biologicznych, czy substancji psychoaktywnych.

Shende i współpracownicy wykorzystali technikę SERS do wykrywania śladowych ilości opioidów (kodeiny i fentanylu) na odzieży oraz opakowaniach (Shende i in. 2019). Wykorzystanie przenośnych spektrometrów ramanowskich umożliwiło detekcję zarówno fentanylu i kodeiny w wodzie, na ubraniach, drewnie jak i na szklanej powierzchni. W tym celu zaprojektowano papierowe dyski nasycone nanocząsteczkami złota (przedstawione na Rys. 3), które pozwoliły na analizę wyżej wymienionych związków znajdujących się na dowolnej powierzchni. Wykonano również pomiary wyschniętych kropli roztworów fentanylu (o różnym stężeniu) na szkle, a otrzymane wyniki były satysfakcjonujące. Czas analizy wynosił około 5 minut, a granica wykrywalności była na poziomie pikogramów. Wyniki świadczą o tym, że zaproponowana metoda może zostać wykorzystana na lotniskach, w trakcie nalotów narkotykowych jak i na miejscach zbrodni.



**Rys. 3.** Papierowe dyski niezawierające nanocząsteczek złota i po naniesieniu nanocząstek złota, gotowe do pomiarów SERS (Shende i in. 2019).

Występującą w Stanach Zjednoczonych „epidemia opioidów” skłania badaczy do rozwijania nowych metod analitycznych. Mirsafavi i współpracownicy stworzyli metodę opierającą się na technice SERS w celu wykrywania i identyfikacji fentanylu i jego dwóch prekursorów – 4ANPP oraz NPP (Mirsafavi i in. 2020). Wymienione związki badane metodą spektroskopii ramanowskiej wykazują bardzo podobne widma, przez co ich analiza i identyfikacja jest utrudniona. Autorzy opracowali metodę opierającą się na technice SERS, a dodatkowo zastosowali hierarchiczny algorytm analizy dyskryminacyjnej metodą najmniejszych kwadratów w celu rozróżnienia widm charakteryzujących się podobnymi cechami. Zaproponowane podejście pozwoliło na identyfikację i rozróżnienie tych substancji w czasie poniżej 2 minut.

### 3. Podsumowanie

Zaproponowane metody pozwalają na wykrycie fentanylu, jednakże różnią się parametrami takimi jak: czas analizy, granica wykrywalności i rodzaj aparatury. Dodatkowo, niektóre z nich posiadają wady, które w przypadku innych metod nie były zgłaszane przez autorów. W Tab. 1. przedstawiono porównanie opisywanych metod.

**Tab. 1.** Porównanie opisywanych metod.

Literatura	Czas analizy	LOD <sup>a</sup>	Aparat <sup>b</sup>	Uwagi
Technika IMS				
Sisco i in. 2017	10 s	ng	P	Nie rozróżnia izomerów
Verkouteren i in. 2019	20 s	ng	P	Podatna na interferencje
Forbes i in. 2019	< 10 s	ng	P	Odporna na interferencje
Technika TD-DART-MS				
Sisco i in. 2017	10 s	ng	T	Możliwość zastosowania metody dla różnych matryc
Sisco i in. 2019	2 s	µg	T	Możliwość zastosowania metody dla różnych matryc
Technika woltamperometrii				
Brafidokht i in. 2019	< 1 min	ng	P	Nowoczesna aparatura
Ott i in. 2020	ok. 4 min	ng	P	Podatna na interferencje
Mishra i in. 2020	< 1 min	ng	P	Nowoczesna aparatura
Technika SERS				
Shende i in. 2019	ok. 5 min	pg	P	Nowoczesna aparatura
Mirsafavi i in. 2020	< 2 min.	ng	P	Wykorzystuje metody chemometryczne

<sup>a</sup> LOD – granica wykrywalności

<sup>b</sup> P – urządzenie przenośne; T – urządzenie transportowalne

Metody analityczne stosowane bezpośrednio na miejscu zdarzenia, powinny charakteryzować się krótkimi czasami analizy, jednak na podstawie Tab. 1. można zauważyć, że dłuższa metoda może posiadać niższą wartość LOD, przy zastosowaniu nieco dłuższego czasu analizy, co udało się osiągnąć Shende i in. (2019). Niezwykle ważne jest, aby stosowana aparatura była przenośna, gdyż zmniejsza to ryzyko kontaminacji próbki oraz zagrożenia dla służb

ratowniczych, straży granicznej i policji. Praktycznie wszystkie wymienione techniki wykorzystują aparaturę przenośną; wyjątek stanowi technika TD-DART-MS, dla której opracowano jednak protokoły transportu urządzenia na miejsce zdarzenia. Zastosowanie techniki analitycznej adekwatnej do potrzeby sytuacji wymaga przeanalizowania zarówno jej zalet jak i wad. Na przykład, podczas kontroli narkotykowej mającej miejsce na lotnisku ważny jest czas oraz granica wykrywalności, nie ma potrzeby rozróżnienia pary izomerów, gdyż może to zostać przeprowadzone w późniejszym czasie, w specjalistycznym laboratorium.

Zaproponowane metody dają możliwość przeprowadzenia szybkiej i dokładnej analizy dowodu w postaci białego proszku, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia analiz kryminalistycznych.

#### 4. Literatura

- Barfidokht A, Mishra RK, Seenivasan R, et. al. (2019) Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl. *Sensors & Actuators B. Chemical* 296: 126422.
- Charakterystyka produktu leczniczego, ChPL (2014) Naloxonum hydrochloridum WZF, 400 mikrogramów/mL, Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A.
- Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii, EMCDDA (2020), Europejski raport narkotykowy 2020: Najważniejsze kwestie, Urząd Publikacji Unii Europejskiej, Luksemburg.
- Forbes TP, Lawrence J, Verkouteren JR, et. al. (2019) Discriminative potential of ion mobility spectrometry for the detection of fentanyl and fentanyl analogues relative to confounding environmental interferents. *Analyst* 144: 6391-6403.
- Mirsafavi R, Moskovits M, Meinhart C, (2020) Detection and classification of fentanyl and its precursors by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* 145: 3440-3446.
- Mishra RK, Koragiri YG, Li Z, et. al. (2020) Continuous Opioid Monitoring along with Nerve Agents on a Wearable Microneedle Sensor Array. *Journal of the American Chemical Society* 142: 5991-5995.
- Moss M, Warrick B, Nelson L. S, et. al. (2017) ACMT and AACT Position Statement: Preventing Occupational Fentanyl and Fentanyl Analog Exposure to Emergency Responders. *Journal of Medical Toxicology*, 13(4): 347-351.
- Ott CE, Cunha – Silva H, Kuberski SL (2020) Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 873: 114425.
- Sisco E, Robinson EL, Burns A, et. al. (2019) What's in the bag? Analysis of exterior drug packaging by TD-DART-MS to predict the contents. *Forensic Science International* 304: 109939.
- Sisco E, Verkouteren J, Staymates J, et. al. (2017) Rapid detection of fentanyl, fentanyl analogues, and opioids for on-site or laboratory based drug seizure screening using thermal desorption DART-MS and ion mobility spectrometry. *Forensic Chemistry* 4: 108-115.
- Shende C, Farquharson A, Brouillette C, et. al. (2019), Quantitative Measurements of Codeine and Fentanyl on a Surface-Enhanced Raman-Active Pad. *Molecules* 24: 2578
- Verkouteren JR, Lawrence J, Verkouteren M, et. al. (2019) Method for evaluating ion mobility spectrometers for trace detection of fentanyl and fentanyl-related substances. *Analytical Methods* 11: 6043-6052.
- Zawadzki M, Nowak K, (2018) Fentanyl i jego pochodne jako grupa nowych substancji psychoaktywnych (dopalaczy). *Postepy Hig Med. Dosw* 72: 547-556.

## 2. Mieszaniny eutektyczne jako rozpuszczalniki ekstrakcyjne

Deep eutectic solvents as extraction solvents

Gołąb Małgorzata, Woźniakiewicz Michał

Pracownia Chemii Sądowej, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Opiekun naukowy: dr hab. Michał Woźniakiewicz, prof. UJ

Gołąb Małgorzata: mgolab@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: DES, NaDES, ekstrakcja, chemia analityczna

### Streszczenie

Interesujące właściwości mieszanin powstałych w wyniku połączenia donora i akceptora wiązania wodorowego zostały przedstawione po raz pierwszy w 2003 roku. Wkrótce potem nastąpił gwałtowny wzrost zainteresowania tymi układami, które obecnie określa się mieszaninami (głęboko) eutektycznymi (ang. *deep eutectic solvents*, DES). Ich główną cechą jest temperatura topnienia, istotnie niższa od temperatury topnienia któregośkolwiek ze składników stałych, co najprawdopodobniej jest skutkiem tworzenia się wielu wiązań wodorowych w układzie. Ponadto charakteryzują się: niskimi kosztami produkcji, biodegradowalnością (coraz częściej stosuje się związki naturalnie występujące w środowisku), niskim napięciem powierzchniowym i prężnością pary, a także ograniczoną palnością. W związku z tym rozpuszczalniki DES znalazły wiele zastosowań w większości dziedzin chemicznych. Okazały się bardzo obiecującym rozpuszczalnikiem w analizie chemicznej, w szczególności w procesach ekstrakcji i analitycznych technikach rozdzielania, jako eluenty lub ich modyfikatory. Najczęściej rozpuszczalniki DES wykorzystywane są do ekstrakcji bioaktywnych związków z materiału roślinnego.

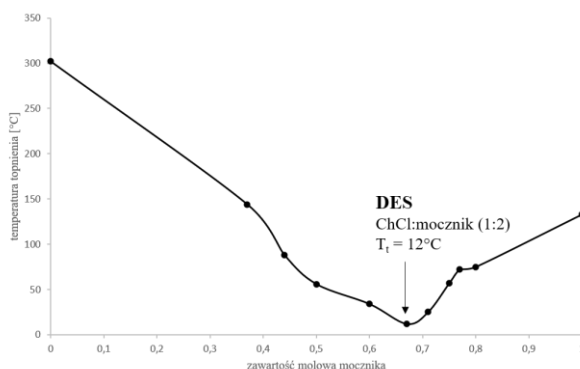
### 1. Wstęp

Proces ekstrakcji, czyli wydobywania wybranych składników ze złożonej próbki jest wykorzystywany od wielu lat. Jako pierwszy i podstawowy rozpuszczalnik ekstrakcyjny można przyjąć wodę, a przykładem takiej ekstrakcji z codziennego życia, jest np. przygotowanie herbaty. Jednak na potrzeby chemii analitycznej występujące silne oddziaływania hydrofilowe są ograniczeniem, uniemożliwiającym analizę związków hydrofobowych np. olejów. Rozwiązaniem tego problemu było wprowadzenie rozpuszczalników organicznych takich jak: heksan, metanol, czy acetonitryl. Te substancje jednak wykazują wysokie obciążenie dla środowiska. Z myślą o zasadach „zielonej chemii analitycznej” sprawdzono potencjał ekstrakcyjny związków powierzchniowo czynnych. Okazało się, że ich wodne roztwory umożliwiają ekstrakcję zarówno substancji hydrofilowych, jak i hydrofobowych, a toksyczność jest istotnie niższa niż rozpuszczalników organicznych. W ostatnich latach rozwijane są układy zwane cieczami molekularnymi, w ramach których można wyróżnić: ciecze jonowe, mieszaniny eutektyczne oraz ciecze supramolekularne.

Niniejszy artykuł ma na celu przybliżenie tematyki mieszanin eutektycznych, ich właściwości oraz zastosowań w chemii analitycznej ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania ich jako rozpuszczalniki ekstrakcyjne w procesie przygotowania próbek.

### 2. Opis zagadnienia

W 2003 roku A. Abbott i współpracownicy (Abbott i in. 2003) przedstawili właściwości układów powstałych poprzez połączenie chlorku choliny (ChCl) i mocznika, w różnych stosunkach molowych. Zaproponowali oni nazwę *deep eutectic solvents* (DES), czyli mieszaniny głęboko eutektyczne. Określenie ‘deep’ miało odnosić się do największego obniżenia temperatury topnienia otrzymanej mieszaniny względem temperatur topnienia pojedynczych składników.



**Rys. 1.** Zależność temperatury topnienia od molowego składu mieszaniny chlorku choliny i mocznika (Abbott i in. 2003).

Przykład mieszaniny chlorku choliny i mocznika dobrze obrazuje występujący problem z ogólnym nazewnictwem takich układów. Temperatura topnienia chlorku choliny wynosi 302°C, mocznika 133°C, a mieszaniny w stosunku molowym 1:2 zaledwie 12°C. Nazwanie tego układu mieszaniną głęboko eutektyczną (DES) jest poprawne, ponieważ jest to największy spadek temperatury topnienia w układzie chlorku choliny i mocznika możliwy do uzyskania (Rys.1.). Jednak na przestrzeni lat okazało się, że interesujące właściwości wykazują również mieszaniny o innych stosunkach molowych. W literaturze są one również określane skrótem DES, co wprowadza pewne zamieszanie. Niemniej jednak zainteresowanie naukowców zastosowaniem mieszanin eutektycznych ciągle wzrasta. Znalazły one wiele zastosowań w większości dziedzin chemicznych, m.in.: jako rozpuszczalnik podczas syntez związków organicznych (Avalos i in. 2006), do elektroobróbki metali (elektroosadzania, elektropolowania) (Lawes i in. 2010), przy przetwarzaniu biomasy (Abbott i in. 2007), w nanotechnologii, czy też w analizie chemicznej (Santana-Mayor i in. 2020).

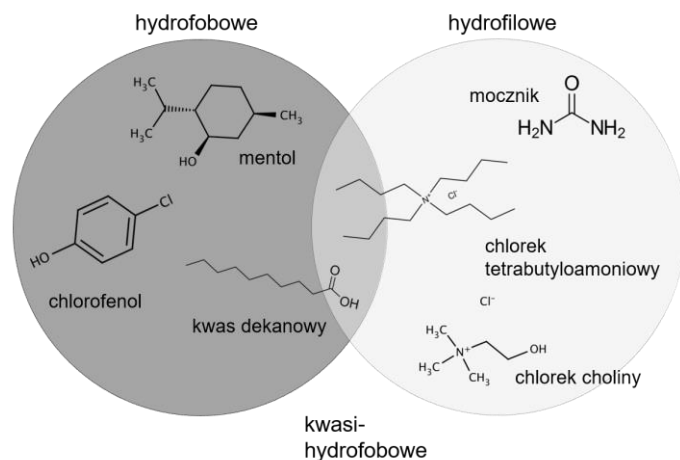
Opisując właściwości mieszanin eutektycznych należy zaznaczyć, że są to układy tworzone z połączenia donora i akceptora wiązania wodorowego. W związku z tym wiele właściwości jest wynikiem występowania licznych wiązań wodorowych w układzie, część z nich jest dla niektórych zastosowań negatywna jak np. wysoka lepkość czy wysokie napięcie powierzchniowe powodujące znacznie trudniejszy transfer masy, co za tym idzie obniżoną wydajność ekstrakcji. Natomiast wiele jest pożądanych i korzystnych, również w aspekcie tzw. „zasad zielonej chemii”, które to mają prowadzić do projektowania i przeprowadzania procesów chemicznych w sposób ograniczający zużycie i produkcję substancji szkodliwych dla środowiska. Najważniejsze z tych cech mieszanin eutektycznych to: wysoka stabilność termiczna, niska lotność, niepalność, nietoksyczność oraz biodegradowalność, a także niskie koszty produkcji (Zainal-Abidin i in. 2017). Ze względu na zastosowanie podczas ekstrakcji istotne jest, że w temperaturze pokojowej, są to ciecze oraz wykazują dużą zdolność rozpuszczania różnych związków chemicznych. Ostatnie badania pokazują, że najprawdopodobniej takie układy występują również w roślinach, co może wyjaśniać zawartość flawonoidów i antocyjanin w komórkach roślinnych, w ilościach powyżej poziomu rozpuszczalności tych związków w wodzie (Benvenuti i in. 2020).

### 3. Przegląd literatury

Początkowo uważano, że w celu uzyskania mieszaniny głęboko eutektycznej można wykorzystać jedynie związki hydrofilowe, takie jak chlorek choliny i mocznik, co skutkowało otrzymaniem rozpuszczalników DES o właściwościach hydrofilowych. Jednak badania pokazały, że można połączyć np. hydrofobowy kwas dekanowy, pełniący rolę donora wiązania wodorowego z hydrofilowym chlorkiem tetrabutylamoniowym, będącym akceptorem wiązania wodorowego. Początkowo takie układy nazywano hydrofobowymi układami DES. Podążając za pracą A. Shishov'a i współpracowników, takie układy należy raczej określać kwasi-hydrofobowymi (Rys. 2.), ponieważ w przypadku dodania do nich wody następuje rozkład, spowodowany dysocjacją soli aminy



czwartorzędowej oraz niską rozpuszczalnością drugiego składnika mieszaniny eutektycznej w wodzie (np. kwasu tłuszczowego). Mianem hydrofobowych rozpuszczalników DES należy określać jedynie układy powstałe z połączenia dwóch hydrofobowych związków, np. mentolu i kwasu dekanowego. Charakteryzują się one niską rozpuszczalnością w fazie wodnej, ale są w niej stabilne (Shishov i in. 2020).



**Rys. 2.** Podział mieszanin eutektycznych ze względu na polarność składników wyjściowych.

Wśród mieszanin eutektycznych wyróżniane są tzw. naturalne mieszaniny eutektyczne (ang. *natural deep eutectic solvents*, NaDES), które są złożone z dwóch lub więcej związków będących pierwotnymi metabolitami roślin. Są to na przykład: kwasy organiczne, cukry, alkohole, aminy czy aminokwasy (Owczarek i in. 2016). Ten rodzaj rozpuszczalników jest w pełni zgodny z „zasadami zielonej chemii”, a ponad to badania potwierdzają, że ekstrahowane z roślin związki fenolowe są stabilniejsze w naturalnych mieszaninach eutektycznych niż w tradycyjnie stosowanych rozpuszczalnikach organicznych. W pracy Dai i współpracowników porównano stabilność pigmentów izolowanych z krokosza barwierskiego (*Carthamus tinctorius L.*) otrzymanych z wykorzystaniem naturalnych mieszanin eutektycznych (prolina:kwas jabłkowy, kwas mlekowy:glukoza, glukoza:chlorek choliny, sacharoza:chlorek choliny, ksylitol:chlorek choliny), 40% etanolu oraz wody. Ekstrakty otrzymane stosując NaDES były stabilniejsze niż te otrzymane za pomocą 40% etanolu, niezależnie od narażenia na różne warunki, takie jak: wysoka temperatura, światło, czy czas przechowywania (Dai i in. 2014). Jednocześnie należy mieć na uwadze, że najprawdopodobniej wzrasta również stabilność innych składników obecnych w próbce, co może skutkować gorszym oddzieleniem od składników matrycy i koniecznością wprowadzenia etapu oczyszczania ekstraktu.

Przedstawione właściwości mieszanin DES wyjaśniają duże zainteresowanie tymi układami w chemii analitycznej. W publikacji przeglądowej A. Shishov'a i współpracowników, przeanalizowano wszystkie prace naukowe wydane od 2004 roku w dziedzinie chemii analitycznej i podzielono je ze względu na zastosowanie. Niemal 75% stanowiły procedury ekstrakcji z próbek stałych i ciekłych. Pozostałe obejmowały zastosowanie w elektrochemii, chromatografii (jako faza ruchoma lub jej modyfikator), w syntezie i modyfikacji sorbentów oraz do sorpcji gazów (Shishov i in. 2020). Najczęściej ekstrahowane z próbek roślinnych są związki organiczne takie jak: flawonoidy, saponiny, aminy aromatyczne, cukry czy związki fenolowe, jednak stosuje się mieszaniny DES również jako rozpuszczalniki ekstrakcyjne przy oznaczaniu metali. W wielu przypadkach możliwe jest utworzenie mieszaniny eutektycznej *in situ*, poprzez dodanie do próbki składnika, który wraz z analitami lub innymi składnikami próbki utworzy układ DES. Jednym z przykładów takiego zastosowania jest usuwanie fenolu i krezoli z olejów (heksanu, toluenu i p-ksylenu) na skutek formowania układu DES z chlorkiem choliny (Pang i in. 2012).

Poprzez odpowiednie dobranie właściwości składników wyjściowych można w pewnym zakresie dostosować polarność, a także pozorne pH otrzymanej mieszaniny eutektycznej do potrzeb analizy. Również modyfikując stosunek molowy tych składników wpływa się na lepkość mieszaniny, która jest ściśle związana z możliwością tworzenia wiązań wodorowych. Jednak duża lepkość negatywnie wpływa na wydajność ekstrakcji, dlatego w celu jej obniżenia najczęściej stosuje się: podniesienie temperatury lub dodatek wody, która oprócz tego wpływa na hydrofilowość mieszaniny, a w nadmiarze powoduje jej rozkład. Dai i współpracownicy (Dai i in. 2013) badając ekstrakty kroszoza barwierskiego otrzymane z wykorzystaniem trzech różnych mieszanin eutektycznych sprawdzili jak na wydajność ekstrakcji wpływa zawartość wody w stosowanych mieszaninach ekstrakcyjnych. W efekcie okazało się, że optymalna zawartość wody zależy zarówno od składników tejże mieszaniny, jak i charakterystyki analitów. Dla bardziej polarnych analitów (żółcieni saflorowej) i układu sacharoza:chlorek choliny najwyższa wydajność została osiągnięta, gdy zawartość wody wynosiła powyżej 50%, natomiast dla układu kwas mlekowy:glukoza wpływ wody był zanedbywalny. Zupełnie inaczej sprawa wyglądała dla bardziej hydrofobowej kartaminy, gdzie w przypadku pierwszego układu optymalna była 25% zawartość wody, natomiast dla drugiego jakiegokolwiek dodatek wody obniżał wydajność ekstrakcji kartaminy.

Interesującą pracą, również ze względu na to że jest to jedna z niewielu publikacji, gdzie ekstrakty analizowane są techniką elektroforezy kapilarnej, jest praca Křížka i współpracowników (Křížek i in. 2018). Do oznaczania fitokannabinoidów w kwiatostanach konopi siewnych (*Cannabis sativa*) autorzy testowali różne mieszaniny eutektyczne sprawdzając wpływ donora wiązania wodorowego na wydajność ekstrakcji. Wszystkie mieszaniny były przygotowane w stosunku molowym 1:1 akceptora (hydrofobowy mentol) i donora wiązania wodorowego. Otrzymane mieszaniny eutektyczne były kwasi-hydrofobowe lub hydrofobowe w zależności od właściwości użytego donora wiązania wodorowego, którymi były kwasy organiczne o różnej długości łańcucha węglowodorowego. Zaobserwowano, że wydajność ekstrakcji kannabinoidów malała w szeregu homologicznym dla kwasów C2-C6, aby następnie zacząć wzrastać. Niestety, na podstawie otrzymanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić jaki mechanizm jest za to odpowiedzialny. Autorzy uzyskane obserwacje tłumaczyli następująco: po pierwsze wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego wzrasta lepkość mieszaniny, co skutkuje obniżeniem transferu masy w układzie ekstrakcyjnym. Jednocześnie wzrasta jej hydrofobowość, co pozytywnie wpływa na ekstrakcję związków o wyższej wartości współczynnika podziału (logP). Jednak najprawdopodobniej jest to współwystępowanie wyżej wymienionych procesów oraz dodatkowych oddziaływań. Z pośród zastosowanych mieszanin eutektycznych najlepszą wydajność izolacji analitów uzyskano stosując mieszaninę mentolu i kwasu octowego w stosunku molowym 1:1. Dodatkowo, jej zastosowanie okazało się także bardziej wydajne w porównaniu do klasycznych rozpuszczalników ekstrakcyjnych: metanolu, etanolu oraz mieszaniny metanol-chloroform (9:1, v/v).

Dobierając składniki wyjściowe mieszaniny głęboko eutektycznej poza oczekiwanymi parametrami ekstrakcyjnymi należy zastanowić się nad kompatybilnością ze stosowaną techniką analityczną lub typem detektora. W szczególności podczas pracy ze spektrometrem mas lub chromatografią gazową, gdzie wymagane jest stosowanie związków o wysokiej lotności jonowe mieszaniny eutektyczne mogą nie być korzystne (Santana-Mayor i in. 2020). Ostatnie badania pokazują, że rozwiązaniem (w przypadku chromatografii gazowej) mogą być niejonowe mieszaniny DES (np. tymol:mentol), które wykazują się znacznie wyższą lotnością w stosunku do jonowych mieszanin DES, porównywalną do tradycyjnych rozpuszczalników organicznych (Abranches i in. 2019). Do analizy ekstraktów otrzymanych z wykorzystaniem mieszanin eutektycznych można wykorzystać techniki: spektrofotometryczne (w zakresie UV-Vis, fluorescencja), spektroskopii atomowej, spektroskopii w podczerwieni czy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Jednak najczęściej stosuje się techniki chromatograficzne, z czego częściej chromatografię cieczową (LC). Jest to spowodowane niską lotnością większości mieszanin eutektycznych, możliwością wystąpienia dużego efektu matrycy lub innymi interferencjami. Zastosowanie mieszanin eutektycznych w technice elektroforezy kapilarnej jest dosyć ograniczone. Głównie wykorzystywane są w procesie przygotowania fazy stacjonarnej w elektrochromatografii kapilarnej (ang. *capillary electrochromatography*, CEC), która od chromatografii cieczowej różni się przede wszystkim

zjawiskiem wywołującym przepływ fazy ruchomej; w przypadku CEC jest to zjawisko elektroosmozy, a nie różnica ciśnień. Dotychczas nieliczne są doniesienia o zastosowaniu mieszanin eutektycznych jako modyfikatora buforu separacyjnego (Mu i in. 2019) lub rozpuszczalnika ekstrakcyjnego podczas przygotowania próbek do analizy techniką elektroforezy kapilarnej (Křížek i in. 2018; Yu i in. 2020).

#### 4. Podsumowanie

Mieszaniny eutektyczne prezentują wiele interesujących właściwości dzięki czemu w ostatnich latach zyskują coraz więcej zastosowań w wielu dziedzinach chemii, w tym chemii analitycznej, gdzie głównie stosuje się je jako rozpuszczalniki ekstrakcyjne, najczęściej w połączeniu z analizą techniką chromatografii cieczowej. Jednak w tym przypadku problematyczna okazuje się ich wysoka lepkość, wpływająca negatywnie na wydajność ekstrakcji. Rozwiązaniem tutaj może być dodanie do układu wody. Jest to jedna z możliwości dostosowania, w ograniczonym zakresie, właściwości układu DES do potrzeb danej analizy. Inne to wybór składników wyjściowych prezentujących interesujące właściwości oraz modyfikacja ich stosunku molowego. Niestety dotychczas nie ma prostej relacji pomiędzy tymi parametrami a właściwościami otrzymanej mieszaniny eutektycznej, dlatego konieczne są dalsze badania w kierunku zrozumienia tych procesów. Umożliwi to pełniejsze powiązanie właściwości otrzymanego układu DES z charakterystyką chemiczną analitów i matrycy, ułatwiając planowanie eksperymentów, które obecnie polegają na przygotowaniu i przetestowaniu wielu mieszanin eutektycznych.

#### 5. Literatura

- Abbott A, Capper G, Davies D i in. (2003) Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chemical Communications* 1: 70–71.
- Abbott A, Cullis P, Gibson M i in. (2007) Extraction of glycerol from biodiesel into a Eutectic Based Ionic Liquid. *Green Chemistry* 9(8): 868–72.
- Abranches D, Martins M, Silva L i in. (2019) Phenolic Hydrogen Bond Donors in the Formation of Non-Ionic Deep Eutectic Solvents: The Quest for Type V DES. *Chemical Communications* 55(69): 10253–56.
- Avalos M, Babiano R, Cintas i in. (2006) Greener Media in Chemical Synthesis and Processing. *Angewandte Chemie International Edition* 45(24): 3904–3908.
- Benvenuti L, Sanchez-Camargo A, Zielinski A i in. (2020) NADES as Potential Solvents for Anthocyanin and Pectin Extraction from Myrciaria Cauliflora Fruit By-Product: In Silico and Experimental Approaches for Solvent Selection. *Journal of Molecular Liquids* 315: 113761.
- Dai Y, Verpoorte R, Choi Y, (2014) Natural Deep Eutectic Solvents Providing Enhanced Stability of Natural Colorants from Safflower (*Carthamus Tinctorius*). *Food Chemistry* 159: 116–121.
- Dai Y, Witkamp G, Verpoorte R i in. (2013) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius* L. *Analytical Chemistry* 85(13): 6272–6278.
- Křížek T, Bursová M, Horsley R i in. (2018) Menthol-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: Towards Greener and Efficient Extraction of Phytocannabinoids. *Journal of Cleaner Production* 193: 391–96.
- Lawes S, Hainsworth S, Blake P i in. (2010) Lubrication of Steel/Steel Contacts by Choline Chloride Ionic Liquids. *Tribology Letters* 37(2): 103–110.
- Mu Y, Wu X, Huang Y i in. (2019) Investigation of Deep Eutectic Solvents as Additives to  $\beta$ -CD for Enantiomeric Separations of Zopiclone, Salbutamol, and Amlodipine by CE. *Electrophoresis* 40(15): 1992–1995.
- Owczarek K, Szczepańska N, Płotka-Wasyłka J i in. (2016) Natural Deep Eutectic Solvents in extraction process. *10(4): 601-606.*
- Pang K, Hou Y, Wu W i in. (2012) Efficient Separation of Phenols from Oils via Forming Deep Eutectic Solvents. *Green Chemistry* 14(9): 2398–2401.

- Santana-Mayor Á, Rodríguez-Ramos R, Herrera-Herrera A i in. (2020) Deep Eutectic Solvents. The New Generation of Green Solvents in Analytical Chemistry. Trends in Analytical Chemistry 116108.
- Shishov A, Pochivalov A, Nugbienyo L i in. (2020) Deep Eutectic Solvents Are Not Only Effective Extractants. Trends in Analytical Chemistry 129:115956.
- Yu K, Yue M, Xu J i in. (2020) Determination of Fluoroquinolones in Milk, Honey and Water Samples by Salting out-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvent Combined with MECC. Food Chemistry 332: 127371.
- Zainal-Abidin M, Hayyan M, Hayyan A i in. (2017) New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. Analytica Chimica Acta 979: 1–23.

### **3. Rhamnolipid – budowa, właściwości i zastosowanie**

Rhamnolipid – build, properties, and applications

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, rhamnolipid, biofilm

#### **Streszczenie**

Surfaktanty to substancje towarzyszące człowiekowi w życiu codziennym od niemal 100 lat. Ich historia dotyczy przede wszystkim detergentów i środków piorących, substancji ‘zmiękczających’ wodę oraz kosmetyków. Bardzo szybko znalazły one zastosowanie w różnego rodzaju przemysłach (np. włókienniczym, farbiarskim czy nawet spożywcym) stając się substancjami niezbędnymi do uzyskiwania odpowiednich produktów i usług. Co więcej, człowiek posiada swój naturalny surfaktant produkowany w płucach, który pozwala na zmniejszenie napięcia powierzchniowego przy jednoczesnym zwiększaniu powierzchni płucnej, co sprawia, że jest on niezbędny w odpowiedniej pracy respiratorowej. Same surfaktanty składają się z dwóch części – hydrofilowej głowy oraz hydrofobowego ogona – które nadają im charakterystyczną amfifilową budowę. Ze względu na wysokie zużycie syntetycznych surfaktantów, coraz częściej prowadzi się badania nad substancjami pochodzenia naturalnego – biosurfaktantami – które produkowane są przez różnego rodzaju grzyby, drożdże lub bakterie. Część takich substancji jest też charakterystyczna dla niektórych roślin i stworzeń morskich. Biosurfaktanty są związkami biodegradowalnymi i nietoksycznymi dla środowiska naturalnego. Często mają również lepsze właściwości fizykochemiczne niż surfaktanty syntetyczne i bardziej obniżają napięcie powierzchniowe przy ich mniejszym zużyciu.

#### **1. Wstęp**

*Rhamnolipidy* to związki glikolipidowe, składające się z  $\beta$ -hydroksykwasu tłuszczowego połączonego końcem karboksylowym z cząsteczką ramnozy. Za produkcję rhamnolipidu odpowiada szczep *Pseudomonas*, głównie gatunek *Pseudomonas aeruginosa*. Oprócz niego, rhamnolipid produkuje *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas plantarii*, *Pseudomonas putida* oraz *Pseudomonas fluorescens*. Rhamnolipidy mogą zawierać jedną cząsteczkę ramnozy – monorhamnolipid lub dwie – dirhamnolipid. Część bakterii produkuje tylko monorhamnolipidy, część z nich zarówno mono- jak i dirhamnolipidy. W zależności od warunków prowadzenia hodowli bakteryjnej można zmieniać stosunek poszczególnych rhamnolipidów w uzyskiwanej mieszaninie, a także istnieją odpowiednie enzymy, które pozwalają na zamianę monorhamnolipidów w dirhamnolipidy. Biosurfaktanty te cieszą się niegasnącym zainteresowaniem ze względu na ich niską toksyczność, biodegradowalność i specyficzność, które spełniają wymagania Rozporządzenia (WE) nr 648/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. w sprawie detergentów. Rozporządzenie to wymaga dokładnego i precyzyjnego opisu biodegradowalności danego surfaktantu jak również metod, które ją zapewniają. Tym samym, europejska dyrektywa stawia jasne warunki odpowiedniego przepływu detergentów i surfaktantów na światowym rynku, zapewniając wysoki stopień ochrony środowiska i zdrowia ludzkiego (Sekhon Randhawa i Rahman 2014).

#### **2. Opis zagadnienia**

Odkrycie rhamnolipidów sięga 1946 roku, kiedy to Bergström i współpracownicy opisali oleisty glikolipid (który wtedy nazwano kwasem piolipinowym). Glikolipid ten składał się z L-ramnozy oraz kwasu  $\beta$ -hydroksydekanowego. Dopiero 24 lata później połączenie to zostało opisane przez Edwardsa i współpracowników jako wiązanie  $\alpha$ -1,2-glikozydowe. Tym samym, pełna nazwa

dirhamnolipidu brzmi: 2-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo- $\alpha$ -L-ramnopiranozylo- $\beta$ -hydroksydekanoilo- $\beta$ -hydroksydekanoian. Był to pierwszy glikolipidowy związek, który zawierał połączenie między cząsteczką cukru a hydroksylovaną pozostałością kwasu tłuszczowego. Pomiędzy 1972 a 2000, opisano wiele różnych rhamnolipidów, które otrzymano na różnych podłożach węglowych (m.in. na n-parafinowym, glicerolowym, n-alkanowym, glukozowym), a ich ilość zwiększyła się razem z ulepszeniem metod analitycznych (Rikalović i in. 2011).

W ciągu ostatnich lat rhamnolipidy stały się istotną konkurencją dla syntetycznych surfaktantów. Można wyróżnić ich pięć głównych zastosowań w przemyśle:

- a) Bioremediacja i ulepszone odzyskiwanie oleju (Enhanced Oil Recovery, EOR); rhamnolipidy wykazują świetne właściwości emulgujące i skutecznie usuwają ropę naftową z zanieczyszczonej gleby, i ułatwiają bioremediację ewentualnych wycieków (Rahman i in. 2003).
- b) Farmaceutyki i środki terapeutyczne; rhamnolipidy wykazują niską toksyczność, odpowiednie właściwości powierzchniowe i antybakteryjność (np. przeciwko *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), tym samym wykazując obiecujące zastosowanie jako składniki leków (Magalhaes i Nitschke 2013).
- c) Kosmetyki; rhamnolipidy są środkami efektywnie działającymi w leczeniu chorób skóry, np. przy wparciu w gojeniu ran ze zmniejszonym zwłóknianiem, leczeniu szoku poparzeniowego, redukowaniu zmarszczek (Sekhon Randhawa i Rahman 2014).
- d) Środki czyszczące i detergenty; rhamnolipidy są naturalnymi emulgatorami i środkami aktywnymi powierzchniowo co pozwala na wykorzystanie ich w pastach czyszczących, środkach piorących, a nawet przy produkcji mydeł czy szamponów (Sekhon Randhawa i Rahman 2014).
- e) Agrokultura; rhamnolipidy poprawiają jakość gruntów i bada się je pod kątem eliminowania roślinnych patogenów oraz jako biopestycydy polepszające wchłanianie nawozów i składników odżywczych przez korzenie (Sachdev i Cameotra 2013).

Chociaż rhamnolipidy mają wiele zalet jeśli chodzi o ich aplikację, do 2016 roku masowa produkcja nie istniała ze względu na trudny proces pozyskiwania jak i jego niską wydajność. Pierwszą firmą produkującą rhamnolipid na szeroką skalę był Evonik Industries (Niemcy). Wykorzystali oni rekombinowany *Pseudomonas putida* oraz butan. Oprócz tego, niemiecka firma biotechnologiczna Biotensidon GmbH jest pierwszą firmą, która rozwija ekonomiczny proces produkcji rhamnolipidu na skalę przemysłową (5000 ton/rok). Inne firmy, które produkują rhamnolipidy w celach komercyjnych to: TeeGene Biotech (Wielka Brytania), AGAE Technologies LLC (Stany Zjednoczone), Janeil Biosurfactant (Stany Zjednoczone), Paradigm Biomedical Inc. (Stany Zjednoczone) oraz wiele chińskich firm, m.in. Shaanxi Pioneer Biotech Company (Eslami i in. 2020)

Przyjmuje się, że rhamnolipidy to związki produkowane przez mikroorganizmy rozkładające węglowodory, jako że amfipatyczne właściwości rhamnolipidów są dla bakterii niezbędne w mechanizmie pobierania i wykorzystywania hydrofobowych związków jako źródła węgla. Niektóre mikroorganizmy mogą również powodować szpitalne zakażenia, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością – rhamnolipidy mogą mieć wpływ na patogenność danego szczepu (Chong i Li 2017). Oprócz oczywistych właściwości obniżających napięcie powierzchniowe, rhamnolipidy odgrywają istotną rolę w regulacji zależnej od gęstości populacji komórek kontroli ekspresji genów zwanych 'wykrywaniem kworum' (ang. Quorum sensing, QS) lub 'komunikacją międzykomórkową'. Są one również zaangażowane jako czynniki transkrypcyjne mogące sygnalizować cząsteczki oraz szereg innych metabolitów wtórnych (w tym lipazy zewnątrzkomórkowej), których to ekspresja jest regulowana wraz z samymi rhamnolipidami na poziomie genetycznym (Rikalović i in. 2011).

Głównym producentem rhamnolipidów jest szczep *Pseudomonas*, gatunek *Pseudomonas aeruginosa*. Aby zrozumieć geny potrzebne do biosyntezy rhamnolipidu wykorzystano właśnie tę bakterię. Sama produkcja obejmuje kilka etapów. Prekursorem syntezy rhamnolipidu jest ramnoza oraz ugrupowanie hydrofobowe takie jak 3-(3-hydroksyalkanoiloksy) kwas karboksylowy.

Ugrupowanie cukrowe można łatwo zsyntetyzować z glukozy, kwas tłuszczowy z kolei na drodze syntezy jednostek dwuwęglowych. Większość bakterii zawiera wymagane enzymy do syntezy odpowiednich prekursorów rhamnolipidów, ale tylko szczep *Pseudomonas* oraz szczep *Burkholderia* zawierają odpowiednie enzymy do syntezy kwasów. Synteza rhamnolipidów i ich prekursorów odbywa się tylko poprzez indukowanie odpowiednich genów do sekrecji enzymów (Chong i Li 2017). Teoretycznie niepatogenne szczepy są w stanie wytwarzać rhamnolipidy po wprowadzeniu odpowiednich genów. Podobnie ma się sytuacja ze zmianą stosunku mono- i dirhamnolipidów, który można kontrolować poprzez zmianę poziomów ekspresji odpowiednich enzymów. Przeprowadzono również wiele badań aby uzyskać produkujące rhamnolipid szczepy bakteryjne na drodze inżynierii metabolicznej. Rekombinowane w ten sposób bakterie zawierają geny, które pozwalają na produkcję rhamnolipidów. (Chong i Li 2017).

*Pseudomonas aeruginosa* jest oportunistycznym patogenem człowieka, który jest wszechobecny w otaczającym nas środowisku. Ma zdolność do wywoływania szerokiego wachlarza infekcji, a jego zjadliwość regulowana jest przez QS, który dotyczy trzech głównych układów: las, rhl i chinolonu. Układ las składa się z aktywatora transkrypcji, LasR i LasI, który kieruje syntezą laktonu autoinduktora N-(3-oksododekanoilo) homoseryny (PAI-1). Indukcja lasB (kodującego elastazę) i innych genów odpowiedzialnych za wirulencję wymaga LasR i PAI-1. Układ rhl składa się z domnianego aktywatora transkrypcji RhlR i RhlI, który kieruje syntezą laktonu N-butyrylohomoseryny (PAI-2). W przypadku rhamnolipidów, *Pseudomonas* wymaga zarówno układu rhl jak i układu rhlAB, który koduje ramnozylotransferazę (Pearsons i in. 1997). Dodatkowo istnieje układ chinolonu (2-heptylo-2-hydroksychinolonu), który oddziałuje z aktywatorem PqsR. W hierarchii systemu regulatorowego, układ las reguluje zarówno układ rhl jak i chinolonu (Laabei i in. 2014). Syntazy LasI i RhlI wytwarzają odpowiednie cząsteczki sygnałowe, które wiążą i modulują odpowiednio LasR i RhlI. RsaL może wpływać na biosyntezę rhamnolipidów przez hamowanie LasI jak i LasR. Układ rhl również bezpośrednio reguluje biosyntezę rhamnolipidów poprzez czynnik transkrypcyjny RhlR i jego autoinduktor C4-HSL. C4-HSL pozwala na stworzenie kompleksu RhlR, który aktywuje transkrypcję genów rhlAB, aby zainicjować biosyntezę rhamnolipidu podczas fazy równowagi (Chong i Li 2017). Wykazano, że 1  $\mu\text{M}$  RhlI lub 10% pozbawionego komórek supernatantu wystarcza do pełnej indukcji biosyntezy rhamnolipidów. Następuje to zwykle po 3 godzinach. Maksymalna produkcja rhamnolipidów przypada na 20-36 godzin po zainicjowanej indukcji (Ochsner i Reisner 1995). Sam dodatek C4-HSL do pożywki nie pomaga w zainicjowaniu ekspresji rhlAB, co świadczy o tym, że istnieją dodatkowe czynniki regulatorowe, które wstrzymują biosyntezę rhamnolipidów przed początkiem fazy równowagi. Jedną z funkcji rhamnolipidów jest zwiększanie biodostępności substratów węglowodorowych jako podłoża węglowego. Stąd, synteza rhamnolipidów może być indukowana przez obecność w pożywce fermentacyjnej nierozpuszczalnych w wodzie substratów. Taka właściwość może stać się strategią do zwiększonej produkcji rhamnolipidów (Chong i Li, 2014).

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących produkcji biosurfaktantów (w tym rhamnolipidów), aby je odpowiednio scharakteryzować i ocenić ich właściwości. Takie badania przeprowadzono również na różnych pożywkach i w różnych warunkach hodowli bakterii. W produkcji rhamnolipidu optymalizacja tych dwóch czynników odgrywa istotną rolę. Rozpuszczalność źródła węglowego, pH, temperatura, szybkość napowietrzania, ilość rozpuszczonego tlenu czy gęstość komórek i zdolność do usuwania produktu metodą *in situ* to podstawowe czynniki umożliwiające odpowiednią wydajność fermentacji, która znacząco wpływa na ilość wytwarzanego przez bakterie rhamnolipidu (Eslami i in. 2020).

Jednym z ważnych czynników, które zwiększają wydajność rhamnolipidu jest rozpuszczalność źródła węglowego w pożywce hodowlanej. Przykładowo, olej palmowy i napędowy, które są nierozpuszczalnymi źródłami węglowymi generalnie pozwalają na wytworzenie większej ilości rhamnolipidów w porównaniu z tymi rozpuszczalnymi w wodzie (np. glukoza). Innym ważnym parametrem jest zapewnienie bakteriom odpowiedniego profilu podłoża do optymalnego wzrostu aż do fazy spowolnienia, gdzie pH pożywki powinno być ustalone na około 7-7,5. W fazie równowagi i w fazie wymierania powinna przeważać lekka kwasowość (pH 6-6,5). Oprócz tego, odpowiedni poziom rozpuszczonego w pożywce tlenu prowadzi do wyższej produkcji biosurfaktantów. Okazuje

się, że pożywka i warunki hodowli muszą być różne dla każdego ze szczepów bakteryjnych. Na ogół 37°C to temperatura optymalna dla wzrostu *Pseudomonas aeruginosa*, chociaż te drobnoustroje potrafią przetrwać w zakresie temperatur od 4°C do 42°C. Niektóre źródła węgla posiadające azotan mogą być wykorzystywane jako beztlenowe środowiska dla tej bakterii. Ponieważ węgiel jest głównym składnikiem dla produkcji rhamnolipidów, tanie odpady zawierające cukier, pozostałości rolne, produkty po serwatkowej mogą być ciekawą alternatywą i możliwością obniżenia kosztów produkcji. Przy okazji, proces oczyszczania jest też łatwiejszy, gdyż w produkcji używa się cukru (zakupiony komercyjnie lub uzyskiwany z odpadów) jako źródła węgla. Zawartość białek, aminokwasów i lipidów jest również ważna przy produkcji rhamnolipidów i ich odpowiedni poziom należy wziąć pod uwagę w czasie przyszłego optymalizowania procesów przemysłowych (Eslami i in. 2020). Odpowiednią pożywką dla bakterii może być również glicerol i oleje roślinne (Sekhon Randhawa i Rahman 2014).

Detekcja oraz analiza rhamnolipidów pozwala na lepsze zrozumienie ich różnych struktur oraz funkcji. W literaturze istnieje kilka metod pozwalających na ich odpowiednie scharakteryzowanie. Metody te można podzielić na jakościowe i ilościowe. Do metod jakościowych zalicza się między innymi pomiary napięcia powierzchniowego. Rhamnolipidy mają zdolność do obniżenia napięcia powierzchniowego wody z 72 do mniej niż 30 mN m<sup>-1</sup>. Pomiary napięcia powierzchniowego to jedna z dokładniejszych metod pozwalająca na udowodnienie, że badana kultura bakteryjna produkuje rhamnolipid. Niestety, u części bakterii wolne kwasy tłuszczowe również mogą powodować obniżenie napięcia powierzchniowego wody, więc aby potwierdzić obecność rhamnolipidów, należy ten biosurfaktant wcześniej wyekstrahować (Eslami i in. 2020). Drugą metodą jest metoda zapadającej się kropli, która pozwala na wykrycie obecności biosurfaktantów w hodowli. Test jest przeprowadzany na płytce z mikrostudzienkami. Zapadanie się kropeł hodowli w pokrytych olejem studzienkach może wskazywać na obecność rhamnolipidu. Jest to metoda szybka i łatwa do przeprowadzenia, nie wymaga wyspecjalizowanego sprzętu. Niestety, ma ona niską czułość ze względu na to, że dość wysokie stężenie biosurfaktantów musi być obecne by spowodować zapadnięcie się wodnej kropli na powierzchni oleju bądź szkła (George i Jayachandran 2013). Trzecią metodą opisywaną w literaturze jest Test Rozpływania Oleju (Oil Spreading Test, OST). Test został opracowany przez Morikawę i współpracowników. Wykorzystuje się 10 µL ropy naftowej podanej na powierzchnię 40 mL wody destylowanej na szalce Petriego tak aby utworzyć cienką warstwę oleju. Następnie 10 µL supernatantu hodowli bakteryjnej umieszcza się delikatnie na jego powierzchni. Obecność biosurfaktantów potwierdza formowanie się strefy „oczyszczenia” a aktywność powierzchniową określa się za pomocą jej średnicy. Zazwyczaj istnieje liniowa korelacja pomiędzy ilością czystego biosurfaktantu i średnicą strefy. OST jest bardzo szybkim i prostym testem, aczkolwiek nie określa on typu otrzymywanego rhamnolipidu (Morikawa i in. 2000).

Do metod ilościowych zalicza się przede wszystkim metody spektrofotometryczne, chromatograficzne oraz spektroskopowe. Metody spektrofotometryczne wykorzystują orcynol (roztwór orcynolu w kwasie siarkowym), który jest przygotowany bezpośrednio przed użyciem. Mieszaninę próbki i odczynnika podgrzewa się, a następnie studzi do temperatury pokojowej. Następnie mierzy się absorbancję, a stężenie rhamnolipidu szacuje się na podstawie uzyskanej krzywej. Niestety, dużym problemem jest fakt, że wyniki mogą się różnić od siebie w zależności od proporcji mono- i dirhamnolipidu w hodowli. Metody chromatograficzne wykorzystywane do ilościowej oceny produkowanego przez bakterie rhamnolipidu to: chromatografia cienkowarstwowa (TLC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrem mas (LC-MS). Metody spektroskopowe to przede wszystkim spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FTIR) i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Aby uzyskać jak najlepsze wyniki zaleca się łączenie różnych metod. (Eslami i in. 2020).

### 3. Podsumowanie

Wprowadzenie nowych związków na rynek jest zawsze wielkim wyzwaniem, szczególnie jeśli są to związki takie jak rhamnolipid. Wiele bio-materiałów i bio-produktów posiada bardzo znaczące udogodnienia i przewagę nad syntetycznymi odpowiednikami, ale istnieje pewne ‘wąskie



gardło' dotyczące skali komercyjnej produkcji. Rhamnolipidy nie są toksycznymi związkami, nie działają drażniąco na ludzką skórę. Są z kolei środkiem do przeciwdziałania wzrostowi bakteryjnemu, są też rozkładane przez bakterie w naturalnym środowisku. Do ich produkcji można wykorzystać materiały odpadowe, np. oleje czy pozostałości ropy naftowej. Pomimo tak licznych zalet, głównym problemem okazują się wysokie koszty produkcji – wiele badań zostało zaniechanych z powodu problemów z optymalizacją hodowli i użyciem substratów odpadowych. Trudno również uzyskać całkowicie czyste substancje, a takie są wymagane przy zastosowaniach w przemyśle farmaceutycznym czy kosmetycznym. Z drugiej strony sam mechanizm biosyntezy rhamnolipidu nie jest jeszcze dobrze poznany. Potrzeba więc więcej badań aby poznać go dokładniej i opracować odpowiednie oraz ekonomiczne procesy produkcji rhamnolipidów na skalę przemysłową (Eslami i in. 2020).

#### **4. Literatura**

- Chong H, Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*, 16: 137.
- Eslami P, Hajfarajollah H, Bazsefidpar S (2020) Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances* 10: 34014-34032.
- George S, Jayachandran K (2013) Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology* 114 (2): 373-383.
- Laabei M, Jamieson WD, Lewis SE i in. (2014) A new assay for rhamnolipid detection – important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 7199-7209.
- Magalhaes L, Nitschke M (2013) Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29: 138–142.
- Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T (2000) A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488 (3): 211-218.
- Ochsner UA, Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 6424– 6428.
- Pearsons JP, Pesci EC, Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *Journal of Bacteriology*, 179 (18): 5756-5767.
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y i in (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 90: 159–168.
- Rikalović M, Gojgić-Cvijović G, Vrvić MM i in. (2011) Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. *Journal of the Serbian Chemical Society* 77: 27-42.
- Sachdev DP, Cameotra SS (2013) Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 1005–1016.
- Sekhon Randhawa KK, Rahman PK (2014) Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5: 454

## 4. Surfaktyna – synteza, właściwości i zastosowanie

Surfactin – synthesis, properties, and applications

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, surfaktyna, biofilm

### Streszczenie

Surfaktanty, czyli związki aktywne powierzchniowo to klasa substancji o szerokim zastosowaniu w naszym życiu codziennym. Ich wykorzystanie w przemyśle stale rośnie, znajdując nisze do zastosowań w produktach kosmetycznych, produkcji żywności, włókiennictwie, produkcji papieru czy w gospodarstwach rolnych. Z powodów ekologicznych, co raz większym zainteresowaniem zaczynają cieszyć się substancje spełniające zasady zielonej chemii. Zaczęto poszukiwać alternatywy dla syntetycznych surfaktantów – biodegradowalnej i bezpiecznej dla środowiska naturalnego. Biosurfaktanty posiadające taką samą amfifilową budowę, co syntetyczne surfaktanty (polegającą na obecności hydrofilowej „głowy” i „hydrofobowego „ogona”) okazały się związkami, które posiadają właściwości podobne, a niekiedy lepsze niż klasyczne surfaktanty. Są one metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez bakterie, grzyby oraz drożdże. Biosurfaktanty można podzielić na pięć głównych grup: 1) glikolipidy, 2) fosfolipidy i kwasy tłuszczowe, 3) lipopeptydy i lipoproteiny, 4) surfaktanty polimerowe oraz 5) surfaktanty cząsteczkowe.

### 1. Wstęp

Cykliczne lipopeptydy, takie jak fengicyna, ituryna i surfaktyna są związkami głównie produkowanymi przez *Bacillus subtilis*. Wymienione lipopeptydy zbudowane są z pierścienia peptydowego składającego się od 7 do 10 aminokwasów z przyłączonym długim łańcuchem hydrofobowego kwasu tłuszczowego. Długość łańcucha tłuszczowego różni się w zależności od związku, dla surfaktyny jest to zazwyczaj między 13 a 16 atomami węgla, dla ituryny między 14 a 17 atomami, a dla fengicyny między 14 a 18 (Hu i in. 2019). Surfaktyna odkryta i opisana przez Arimę i współpracowników pochodziła z hodowli bulionowej *Bacillus subtilis* (Arima i in. 1968). Substancja ta otrzymała swoją nazwę ze względu na posiadane właściwości powierzchniowo czynne. Naturalnie występująca surfaktyna to mieszanina izoform A, B, C oraz D. Zawierają one przynajmniej osiem różnych depsyptydów z liczbą atomów węgla pomiędzy 13 a 16 jako część układu pierścienia. Na początku surfaktynę zidentyfikowano jako inhibitor skrzepu fibrynowego, a później jako substancję zdolną do lizy erycytów, protoplastów i sferoplastów (Shaligram i Singhal 2010). Niestety, wysokie koszty produkcji surfaktyny jak i innych biosurfaktantów są głównym powodem ich niskiego wykorzystania komercyjnego. Wielokrotnie próbowano je zmniejszyć, poszukując coraz nowszych rozwiązań technologicznych, jak również wdrażano nowe strategie, inżynierię genetyczną, optymalizowano medium i pożywkę, projektowano nowe bioreaktory lub korzystano z odpadów rolno-przemysłowych w celu zmienienia warunków fermentacji (Shaligram i Singhal 2010).

### 2. Opis zagadnienia

Początek biosyntezy surfaktyny pojawia się w czasie fazy spoczynku, kiedy kultura bakteryjna zaczyna odczuwać braki składników odżywczych i tlenu. W tych warunkach, bakteria aktywuje różne strategie przetrwania, w tym syntezę antybiotyków, tworzenie endospor czy produkcję zewnątrzkomórkowych enzymów rozkładających (Santos i in. 2018). Ekspresja SrfA jest indukowana w późnej fazie wzrostowej i jest kontrolowana przez mechanizmy regulacyjne ComP-ComA i Spo0A-AbrB, które wyczuwają stres związany z niedoborem składników odżywczych

i reagują na niego odpowiednią modulacją ekspresji różnych genów. Dodatkowo, bakterie mają zdolność do zmiany swojej genetyki poprzez pobieranie pozakomórkowego DNA ze środowiska (tzw. „natural competence”). Gen ComS zaangażowany w ten proces u *Bacillus subtilis* znajduje się w obrębie i w ramach genu SrfA (Seydlová i Svobodová 2008).

Badania nad biosyntezą surfaktyny zaczęły się od pracy Kluge i współpracowników (Kluge i in. 1988), którzy zaproponowali nierybosomalny mechanizm otrzymywania surfaktyny katalizowany przez wieloenzymatyczne tiomatryce. Kompleks ten składa się z czterech enzymatycznych podjednostek: SrfA (E1A, 402 kDa), SrfB (E1B, 401 kDa), SrfC (E2, 144 kDa) oraz SrfD (E3, 40 kDa), które odgrywają istotną rolę w reakcji inicjacji produkcji surfaktyny (Shaligram i Singhal 2010).

Każdy moduł syntetazy peptydowej składa się z różnych domen i jest odpowiedzialny za włączenie, i modyfikację jednego określonego aminokwasu do peptydu. Moduł ma sekwencję współliniową z sekwencją syntetyzowanego peptydu. Kompleks syntetazy surfaktyny jest kodowany przez indukowalny operon o nazwie SrfA (25 kb), który jest odpowiedzialny m.in. za tworzenie endospor. Moduł składa się z trzech domen: 1) z pokrewnego aminokwasu oraz trifosforanu adenozy (ATP), gdzie domena adenylacyjna katalizuje tworzenie aminoacyloadenozy i uwalnia pirofosforan, 2) domeny tworzenia wiązania kowalencyjnego aktywowanego aminokwasu z 4'-fosfopantetheinyłową grupą prostetyczną obecną na peptydylowym białku nośnikowym (PCP) poprzez wiązanie tioestrowe, 3) domeny kondensacji katalizującej bezpośrednio tioestryfikowany związek pośredni przy wydłużającym się łańcuchu (Shaligram i Singhal 2010). Chemia wydłużania łańcucha jest inna dla każdego modułu. W syntetazie peptydów nierybosomalnych (NRPS) linie gromadzenia umieszczone są zarówno w górę jak i w dół tworzenia wiązania amidowego C-N. Po ukończeniu syntezy całego łańcucha acylowego, łańcuch odłącza się od tioeteru za pomocą C-końcowej domeny tioesterazy (TE). Domeny TE kończące łańcuchy są ugrupowaniami białkowymi o wielkości 25-30 kDa, które po raz pierwszy zaobserwowano przy biosyntezie kwasów tłuszczowych. Część domen TE jest hydrolazami, np. wankomycyna czy duanomycyna, a część jest odpowiedzialna za regio- i stereospecyficzne reakcje, np. erytromycyna. Co więcej, wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja jest najbardziej uderzającą cechą domen TE dla SrfA-C. Pośredni produkt O-TE nie ulega hydrolizie, natomiast jest wewnątrzcząsteczkowo wychwytywany przez grupę nukleofilową w łańcuchu acylowym. Genetycznie wycięta domena TE z syntetazy surfaktyny SrfA-C (SrfTE) katalizuje stereo i regiospecyficzną makrolaktonizację poprzez dodanie hydroksylovanego tlenu 3-(R)-3-hydroksyacyloheptapeptydylo-tioestru do grupy karbonylowej Leu7 w celu wytworzenia mikrolaktonu charakterystycznego dla surfaktantu (Bruner i in. 2002). Okrągła struktura heptapeptydu obejmuje hydrofilowe reszty aminokwasowe takie jak kwas asparginowy i glutaminowy oraz leucynę, które zawierają typową sekwencję peptydową Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu (ELLVDLL) z sekwencją chiralną LLDLLDL (Kakinuma i in. 1969).

Aby uzyskać odpowiednią aktywność katalityczną, domena PCP syntetaz peptydów musi zostać przekształcona z apo- do holoformy poprzez specyficzne transferazy fosfopantetheinyłowe. Enzymy te przenoszą 4'-fosfopantetheinyłową resztę koenzymu A (CoA) na hydroksylowany łańcuch boczny reszty seryny we wszystkich domenach PCP. Produkcja surfaktyny z *Bacillus subtilis* zależy więc od fosfopantetheinyłotransferazy Sfp, która przekształca nieaktywne formy domen PCP w aktywne. Interakcja pomiędzy CoA a Sfp jest nieco specyficzna, ponieważ kilka reszt Sfp, które są zaangażowane w interakcje z CoA, nie jest przekształcana w inne typy transferaz fosfonateinyłowych. 4'-fosfopantetyna (Ppant) jest niezbędną grupą prostetyczną kilku acylowych białek nośnikowych zaangażowanych we wtórny metabolizm bakterii. Ppant przeprowadza dwie ważne reakcje: 1) wiąże związki pośrednie do wielofunkcyjnych matryc enzymatycznych poprzez wysokoenergetyczne wiązania, 2) poprzez swoją elastyczność i długość (około 20 Å) wspomaga transport związków pośrednich do różnych centrów reakcji. Ugrupowanie Ppant jest potranslacyjnie przenoszone na boczny łańcuch seryny, a reakcja ta jest zależna od obecności  $Mg^{2+}$  i katalizowana przez odpowiednie transferazy (Shaligram i Singhal 2010).

W roztworze wodnym, surfaktyna wykazuje stabilne pofałdowanie, a ujemnie naładowane aminokwasy Glu i Asp reprezentują mniejszą domenę polarną. Pierścień peptydowy przedstawia topologię „siodłkową” znaną również jako struktura  $\beta$ -harmonijki, która ma przyczyniać się do

szerokiego zakresu właściwości biologicznych tej cząsteczki. Różne izoformy surfaktyny mogą występować naturalnie i różnić się swoimi właściwościami fizykochemicznymi takimi jak: a) długość łańcucha i rozgałęzienie hydroksykwasy tłuszczowego, b) rodzaj aminokwasów pierścienia peptydowego na drugiej, czwartej i siódmej pozycji. Isoformy zależą nie tylko od samego szczepu *Bacillus*, ale również od warunków środowiskowych i użytej pożywki (Santos i in. 2018).

Aby pokonać wyzwania dotyczące produkcji surfaktyny, zaczęto używać genetycznie modyfikowanych szczepów *Bacillus*, co miało zwiększyć biosyntezę tego lipopeptydu i w konsekwencji polepszyć wyniki produkcji na skalę komercyjną. Przetestowano kilka strategii, opierając je na mechanizmach syntezy surfaktyny, w których pośredniczą peptydy nierybosomalne, modyfikujące niektóre elementy regulatorowe genów, aby te promowały nadekspresję specyficznych białek sygnalizacyjnych, białek pomocnych i transporterów surfaktyny. Co więcej peptydy te mogą zastępować natywną syntazę surfaktyny *srfA*. Z drugiej strony do syntezy zaczęto wykorzystywać odpady przemysłowe, ponieważ zawierają one dużą ilość węglowodanów i lipidów, które są niezbędne w rozwoju mikroorganizmów. Opracowywanie tańszych procesów i zastosowanie tanich substratów zmniejsza koszty produkcji o niemal 30%. Wykorzystuje się tutaj zarówno produkty odpadowe z rolnictwa oraz surowce odnawialne w tym mąkę maniokową, otręby, kukurydzę, melasę z trzciny cukrowej, ziemiaki, słomę pszenną i olej sojowy (Santos i in. 2018).

Produkcja surfaktyny wymaga określonego obszaru w chromosomie (locusu) zajmowanego przez gen *SrfAB*. Takim miejscem jest operon (27 kb) czyli fragment nici DNA zawierający położone obok siebie, wspólnie transkrybowane geny. Kontrolę sprawuje promotor (w przypadku surfaktyny: promotor *Psrf*) czyli odcinek DNA, który ułożony jest tuż przed początkiem genu, a do którego przyłącza się polimeraza RNA. Przyłączenie polimerazy do promotora rozpoczyna proces transkrypcji czyli przepisania informacji genetycznej z DNA na RNA. Ponieważ obcopolodna ekspresja *SrfA* jest trudna, zamiana promotora *Psrf* została uznana za preferowany sposób polepszenia produkcji surfaktyny przez bakterie. Obecnie istnieją trzy typy promotorów wykorzystywanych przy *Bacillus subtilis*: promotory specyficzne dla induktorów, promotory konstytutywne i promotory autoindukowalne. *Psrf* jest promotorem autoindukowalnym, wyzwalanym przez cząsteczki sygnałowe działające na szlaku „wykrywania kworum” (quorum sensing, QS). Za pomocą prowadzonych badań udało się zwiększyć wydajność surfaktyny używając szczepów wytwarzających ją naturalnie w dużej ilości (Hu i in. 2019). W pracy Sun i współpracowników użyto hybrydy indukowanego IPTG (izopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozyd) promotora *Pspac* aby zamienić promotor *Psrf* *Bacillus subtilis* *fmbR*, co spowodowało dziesięciokrotne zwiększenie wydajności ekspresji surfaktyny (do około 3,86 g/L). (Sun i in. 2010). W badaniach wykorzystywano również promotory syntetyczne. Aby ustalić, które genetycznie zmodyfikowane szczepy bakteryjne produkują surfaktynę z odpowiednią wydajnością, ustalono za pomocą inżynierii promotorowej ich transkryptom i zdolność produkcyjną. Tym samym możliwe, że stworzenie ukierunkowanego, silnego promotora lub promotora hybrydowego, specyficznego dla każdego ze szczepów okaże się najbardziej skutecznym środkiem zwiększenia produkcji surfaktyny. Należy jednak wziąć pod uwagę, że istnieje wiele niewiadomych w układzie genetycznym szczepów ‘dzikich’, co znacznie zwiększa trudność w jego modyfikacjach (Hu i in. 2019).

Powód wydzielania surfaktyny przez bakterie pozostaje niejasny. Ponieważ dotychczas nie udało się zidentyfikować żadnego aktywnego transportera tej substancji, powszechnie przyjmuje się, że surfaktyna biernie dyfunduje przez błonę cytoplazmatyczną (Seydlová i Svobodová 2008).

Surfaktyna obniża napięcie powierzchniowe wody z 72 mN m<sup>-1</sup> do 27 mN m<sup>-1</sup>. Jest odporna na temperaturę i stabilna w obecności soli. Duża aktywność powierzchniowa surfaktyny odpowiada za jej szerokie zastosowanie w ulepszonym odzyskiwaniu oleju (enhanced oil recovery, EOR) oraz mikrobiologicznym ulepszonym odzyskiwaniu oleju (microbial enhancement of oil recovery, MEOR). Co więcej, surfaktyna jest dobrym kandydatem do stosowania w bioremediacji zanieczyszczonych gleb i środowisk podpowierzchniowych (Hu i in. 2019). Zdolność do znacznego obniżenia napięcia powierzchniowego ma miejsce przy stężeniu niższym niż 10  $\mu$ mol/L, które jest znacząco niższe niż krytyczne stężenie micelizacji surfaktyny w wodzie (23 mg L<sup>-1</sup>) i w przybliżeniu dwa rzędy wielkości mniejsze niż większości innych surfaktantów. Krytyczne stężenie micelizacji (critical micelle concentration, CMC) określane jest jako najmniejsze stężenie surfaktantów w roztworze, powyżej

którego samorzutnie zaczynają tworzyć się micelle. Tworzenie micel jest bardzo ważne przy właściwościach czyszczących oraz solubilizacyjnych surfaktantów. CMC definiuje skuteczność surfaktantu do obniżania napięcia powierzchniowego, jest również krytycznym wskaźnikiem ekonomicznym i wskaźnikiem dla procesów przemysłowych, ponieważ niskie CMC odpowiada za stosunkowo niskie stężenie surfaktantu pozwalające na otrzymanie roztworów zawierających formy zagregowane (Seydlová i Svobodová 2008). Surfaktyna posiada silną zdolność do samoorganizacji i do formowania niehomogenicznych micel o różnych konfiguracjach, w zakresie od sferycznych do elipsoidalnych i/lub cylindrycznych struktur, których średnica wynosi od 4 do 20 nm i o długości do 160 nm. Lipopeptyd ten tworzy duże agregaty nawet przy stężeniu sześciokrotnie niższym niż CMC, co wskazuje, że silne wiązanie wodorowe między pętlami peptydów sprzyja agregacji miceli przy niskich stężeniach (Zou i in. 2010). Wykazano, że surfaktyna potrafi tworzyć micelle o kształcie przypominającym pręty (osiągające wagę micelną równą 179000 oraz liczbę agregacyjną 173) przy CMC równym  $9,4 \cdot 10^{-6}$  M i napięciu powierzchniowym  $30 \text{ mN m}^{-1}$  w 0,1 M roztworze  $\text{NaHCO}_3$  o pH 8,7 (Ishigami i in. 1995).

Surfaktyna badana jest również pod kątem jej potencjalnego zastosowania w dziedzinie medycyny. Przykładem mogą być badania nad wykorzystaniem jej w zwalczaniu mykoplazmy. Mykoplazma powoduje stany zapalne dróg oddechowych, choroby układu moczowo-płciowego, a także bierze udział w patogenezie AIDS (Vollenbroich i in. 1997). Użycie antybiotyków w walce z mykoplazmą nie przyniosło oczekiwanych rezultatów, szczególnie, że zaczęły pojawiać się komórki na nie odporne. Wysokie stężenie surfaktyny powoduje wyciek w błonie komórkowej mikoplazmy i ostatecznie prowadzi do jej całkowitego rozpadu. Działa na błonę będąc w postaci micelarnej, indukując osmotyczny napływ medium, który powoduje zniszczenie błony, tym samym otwierając drogę dla antybiotyków. Wadą surfaktyny jest natomiast brak możliwości jej użycia w układach z dużą ilością białek z powodu ich konkurencyjnego wiązania. Surfaktyna wykazuje również działanie na błony komórkowe podobne do detergentu. Detergenty powodują zaburzenie w łańcuchach acylowych błony, zmniejszając jej grubość i gęstość upakowania. Surfaktyna przechyla łańcuchy acylowe, tak, że jej część białkowa umieszczona zostaje w hydrofobowej części błony. Efekt ten zależy od temperatury (Shaligram i Singhal 2010). Co więcej, surfaktyna ma właściwości antyadhezyjne, które są niezmiernie ważne w przypadku tworzonego przez bakterie biofilmu. Bakterie w biofilmie są wysoce odporne na antybiotyki, obronę immunologiczną gospodarza i przetrzymują chemioterapię przeciwko drobnoustrojom. Surfaktyna zmniejsza adhezję biofilmu, a sugerowany mechanizm obejmuje adsorpcję cząsteczki na stałej powierzchni, a następnie modyfikację jej hydrofobowości, tak by utrudnić proces adhezji i tworzenie biofilmu. Może być to potencjalnym zastosowaniem medycznym, szczególnie przy usuwaniu niepożądanego biofilmu bakteryjnego by chronić materiały takie jak implanty oraz narzędzia chirurgiczne (Santos i in. 2018). Co więcej surfaktyna wykazuje właściwości przeciwwirusowe, szczególnie przeciwko wirusom otoczkowym m.in. retowirusom i wirusowi opryszczki. Działa ona bezpośrednio na strukturę otoczki wirusa, tym samym mogąc być skutecznym narzędziem do ich inaktywacji i zapobieganiu zakażeniom wirusowym (Vollenbroich i in. 1997, Santos i in. 2018). Potwierdzono również, że ten biosurfaktant jest ważnym doustnym immunoadiuwantem, który jest w stanie chronić antygeny przed degradacją enzymatyczną spowodowaną przez trypsynę i pepsynę w układzie pokarmowym, tym samym poprawiając wchłanianie antygenów przez komórki nabłonka jelit. Warto podkreślić, że surfaktyna ma potencjał w chronieniu podawanej doustnie insuliny i polepszeniu jej wchłaniania przez błony komórkowe (Santos i in. 2018). Surfaktyna przyciąga również uwagę ze względu na swoje właściwości emulgujące, szczególnie wobec substancji ropopochodnych (np. olej napędowy, heksadekan, nafta), co może być bardzo przydatne w bioremediacji i usuwaniu zanieczyszczeń środowiskowych (Abdel-Mawgoud i in. 2008). Surfaktynę bada się również pod kątem kontroli populacji komarowatych ponieważ ma ona działanie larwobójcze, wykazując skuteczność w różnych warunkach oraz działa przeciwko gatunkom takim jak *Aedes aegypti* (komar egipski), *Anopheles stephensi* czy *Culex quinquefasciatus*.

### 3. Podsumowanie

Surfaktyna jest interesującym biosurfaktantem i charakteryzuje się ciekawymi właściwościami fizykochemicznymi. Dzięki temu, że jest substancją biodegradowalną oraz nietoksyczną, staje się potencjalnym środkiem do zastosowań w różnego rodzaju gałęziach przemysłu. Niestety, produkcja surfaktantów syntetycznych na skalę przemysłową jest wciąż bardziej opłacalna niż produkcja biosurfaktantów, głównie ze względu na niższe koszty ich syntezy. Tym samym, dalsze badania nad surfaktyną (a także innymi biosurfaktantami) powinny skupić się nie tylko na lepszym poznaniu mechanizmów jej wytwarzania przez bakterie, ale również na znalezieniu bioprosesów i warunków produkcji, które pozwolą na zoptymalizowanie hodowli bakteryjnych i lepszy odzysk wytwarzanego biosurfaktantu. Najważniejszą przewagą nad surfaktantami syntetycznymi jaką posiada surfaktyna jest możliwość jej strukturalnego modyfikowania. Wykorzystując fragmenty cząsteczek surfaktyny, które są dostępne w dużych ilościach, można budować zestawy całkiem nowych substancji, uzupełniając w ten sposób obecne możliwości genetyki molekularnej i zapewniając większą swobodę w badaniach aktywności biologicznej oraz konformacji tych biosurfaktantów (Peypoux i in. 1999).

### 4. Literatura

- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NA (2008) Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 15: 289-303.
- Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31: 488-494.
- Bruner SD, Weber T, Kohli RM i in. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* 10: 301-310.
- Hu F, Liu Y, Li S (2019) Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microbial Cell Factories* 18, 42.
- Ishigami Y, Osman M, Nahakara H i in. (1995) Significance of  $\beta$ -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4 (6): 341-348.
- Kakinuma A, Sugino H, Isono M i in. (1969) Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agricultural and Biological Chemistry* 33: 973-976.
- Kluge B, Vater J, Salnikow K i in. (1988) Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letters* 231: 107-110.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 553-563.
- Santos VSV, Silveira E, Pereira BB (2018) Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 21: (6-8): 382-399.
- Seydlová G, Svobodová J (2008) Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine* 3(2): 123-133.
- Shaligram NS, Singhal RS (2010) Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation and Applications. *Food Technology and Biotechnology* 48 (2): 119-134.
- Sun H, Bie X, Lu F i in. (2010) Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 1003-1006.
- Vollenbroich D, Pauli G, Özel M i in. (1997) Antimycoplasmal properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 44-49.
- Zou A, Liu J, Garamus VM i in. (2010) Micellization activity of the natural lipopeptide [Glu1, Asp5] surfactin-c15 in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B* 114: 2712-2718.

## 5. Simple fluorescence assay for detection of hydrogen sulfide

Słowiński Daniel, Podsiadły Radosław

Institute of Polymer and Dye Technology, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology  
Science tutor: Radosław Podsiadły, PhD, DSc

Słowiński Daniel: daniel.slowinski@dokt.p.lodz.pl

Keywords: fluorescent probe, coumarin-based probe, H<sub>2</sub>S

### Abstract

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), as one of the important gasotransmitters, plays an essential role in a many physiological and pathological processes. Commonly used methods for H<sub>2</sub>S detection and quantification are too complicated to real-time measure of release of H<sub>2</sub>S in the in vitro and in vivo settings. In this report we present a simple fluorescence assay based on H<sub>2</sub>S-sensitive fluorogenic probe. Electron-deficient naphthoquinone unit was used as a suitable reagent for nucleophilic aromatic substitution (S<sub>N</sub>Ar) reactions and 4-methyl-7-hydroxycoumarin as a strong fluorescent dye which serve as leaving fluorophore. Thiolysis of coumarin naphthoquinone ether (Nq-Cm) at physiological pH releases 4-methyl-7-hydroxycoumarin and causes an 7-fold fluorescence enhancement at 448 nm (with excitation at 320 nm). At the same time, the resulting thionaphthoquinone derivatives give the solution a purple color, which allow its naked-eye detection. The efficacy of the Nq-Cm was demonstrated in buffer with associated submicromolar detection limit as low as 130 nM. These results suggest that probe is a good quantitative detection tool for H<sub>2</sub>S.

### 1. Introduction

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), as one of the important gasotransmitters, plays an essential role in a many physiological and pathological processes (Wang 2012). Endogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is mainly produced by four enzymes: cystathionine beta-synthase (CBS), cystathionine gamma-lyase (CSE), 3-mercaptopyruvate sulfotransferase (MST) and cysteine aminotransferase (CAT). Recently, it has shown that thiosulfate sulfur transferase (TST) and selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are H<sub>2</sub>S producing enzyme (Sunzini et al. 2020; Nagahara et al. 2018; Pol et al. 2018 ) It has been shown that flaws in the H<sub>2</sub>S synthesizing enzyme system are involved in a variety of humans' diseases including cancer and a series of neurodegenerative diseases. Antiviral activity of H<sub>2</sub>S have been also demonstrated. Recently, sodium thiosulfate, H<sub>2</sub>S-producing compounds, has been propose to treat patients at any stage of the COVID-19 virus infection. Thus, the last decade has brought enormous interest in H<sub>2</sub>S releasing agents and its efficient scavengers (Bhattacharyya et al. 2016; Bazhanov et al. 2017; Evgen'ev and Frenkel 2020; Yu et al. 2014).

It has been postulated that action of hydrogen sulfide is concentration-dependent. At low levels H<sub>2</sub>S was recognized as tumor growth factor whereas the high concentrations of exogenous H<sub>2</sub>S could suppress the growth of cancer cells. Thus H<sub>2</sub>S and its donors have been used in antitumor and antimetastatic therapies (Szabo et al. 2013; Giuffrè et al. 2020; Wu et al. 2015; Haonan et al. 2020).

Likewise, the ability of H<sub>2</sub>S to scavenge reactive oxygen and nitrogen species depends on kinetic factors, i.e., products of the rate constant and the concentration of hydrogen sulfide (Carballal et al. 2011).

The most common way to produce H<sub>2</sub>S for biologic experiments is to use easily accessible salts such: sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) or sodium hydrosulfide (NaHS). Currently, aqueous solutions of these salts are still the most often used H<sub>2</sub>S sources in this field. These donors rapidly generate H<sub>2</sub>S in an instantaneous and pH-dependent manner. Although these releasing agents have the advantage of boosting H<sub>2</sub>S concentration fast, the uncontrollable H<sub>2</sub>S release makes then not ideal. In addition, hydrogen sulfide can quickly escape from solution due to volatilization under laboratory conditions. For these reasons, every effort should be made when preparing the samples (Hughes et al. 2009; Yu et al. 2014).

In this context, not only the detection but, above all, the quantitative determination of H<sub>2</sub>S in the in vitro and in vivo settings is of great importance. Methylene blue (MB) assay, ion selective

electrodes (ISE), and gas chromatography are too complicated to real-time measure of release of H<sub>2</sub>S. The best method to quantify of high reactive species including H<sub>2</sub>S, is fluorescence based assays. So far, H<sub>2</sub>S fluorogenic probes which work according to (i) reduction, (ii) nucleophilic attack, and (iii) metal precipitation have been design. However, only few of them can be applied in real biological sample due to slow reaction rate and/or low sensitivity (Ubuka 2002; Yu et al. 2014).

In the present work, we used electron-deficient naphthoquinone unit as suitable reagent for nucleophilic aromatic substitution (S<sub>N</sub>Ar) reactions, and 4-methyl-7-hydroxycoumarin as a strong fluorescent dye which serve as leaving fluorophore. This strategy gave us coumarin naphthoquinone ether Nq-Cm (Fig.1), a novel probe and scavenger of H<sub>2</sub>S. Notably, the thiolysis of naphthoquinone ethers has not previously been exploited in the design of fluorogenic probes for H<sub>2</sub>S.

## 2. Materials and methods

All reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used as received. Thin layer chromatography (TLC) was performed in silica plate (with fluorescent indicator F<sub>254</sub>) and column chromatography was carried out on silica gel (70-230 mesh). NMR spectra were collected on a Bruker Avance spectrometer. UV-Vis absorption spectra were recorded by spectrometer JASCO V670. Fluorescence spectra were measured on spectrofluorometer FLS-920 Edinburgh Instruments with both excitation ( $\lambda_{ex}$  320 nm) and emission slit widths set at 1.0 nm. Purity of probe and analysis of product formed during reaction of probe with H<sub>2</sub>S were done using Shimadzu high pressure liquid chromatograph. Quantum yield of fluorescence of **Nq-Cm** was determined using 4-methylumbelliferone ( $\Phi = 0.87$ ) as reference in PB buffer (0.1M, pH 7.4, with 30% ACN, v/v).

All spectroscopic measurements were performed in phosphate buffer (PB), (0.1 M, pH 7.4), containing 30% acetonitrile (ACN) at room temperature. Distilled water was used throughout all experiments. Compounds were dissolved into ACN to prepare the stock solutions with a concentration of 10 mM. Stock solution of Na<sub>2</sub>S (10 mM) in PB was used as H<sub>2</sub>S source. Probe was diluted in PB (0.1 M, pH 7.4, containing 30% ACN) to afford the final concentration of 1-20  $\mu$ M. All measurements were performed in a 3.5 mL cuvette with 3 mL solution. The reaction mixture was shaken uniformly at room temperature before measurements. The limit of the detection was calculated from equation 1

$$LOD = 3.3\sigma/S \quad (1)$$

where,  $\sigma$  is the standard deviation of probe solution (blank), S is the slope of the linear calibration plot between the fluorescence emission intensity and the concentration of Na<sub>2</sub>S.

### 2.1 Synthesis of **Nq-Cm**

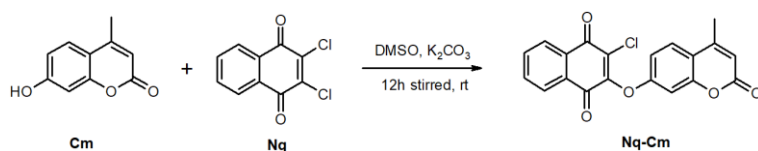
To a solution of 7-hydroxy-4-methylcoumarin (0.5 g, 2.9 mmol) in DMSO (20 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4 g, 2.9 mmol) was added. 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone (0.59 g, 2.6 mmol) was added to the mixture after several minutes of stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. After confirmation by TLC (eluent DCM:EtOAc 10:1 (v/v)), the mixture was poured into ice water and extracted with EtOAc (2 x 30 mL). Organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The crude Nq-Cm was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>) using DCM:EtOAc (10:1) to obtain pure compound as yellow solid (0.33g, 35%).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Preparation of **Nq-Cm**

Since coumarins have good stability and desired spectroscopic properties (i.e. excitation and emission in visible region, large absorption extinction coefficient and good quantum yield) we designed our fluorogenic probe **Nq-Cm** based on 4-methylumbelliferone scaffold. The presence of a hydroxyl group in the coumarin skeleton allows for relatively easy attachment of fluorescence quenching groups. The title compound was synthesized according to literature procedure (Tandon and Maurya 2009). The synthetic route is illustrated in Figure 1. The purity of the final probe was checked by HPLC and its structure was confirmed by <sup>1</sup>H NMR.

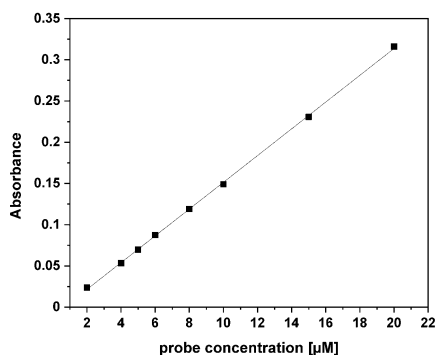




**Fig. 1.** Synthesis of probe Nq-Cm.

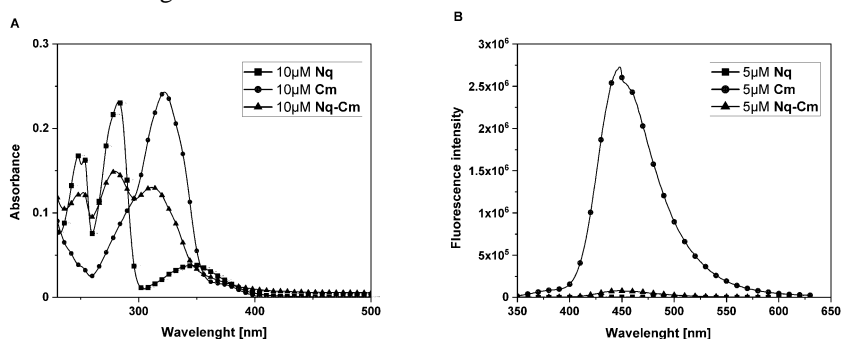
### 3.2 UV-vis and fluorescence response of Nq-Cm towards H<sub>2</sub>S

To determine the suitability of Nq-Cm probe, firstly we tested the solubility of Nq-Cm in aqueous solution containing phosphate buffer (100 mM, pH 7.4). The linear dependence of the absorbance on the concentration of the probe in the range at 2-20 μM (Fig.2) confirms the possibility of using the Nq-Cm probe for tests in aqueous solutions.



**Fig. 2.** Solubility test of probe Nq-Cm in concentration range of 2-20 μM.

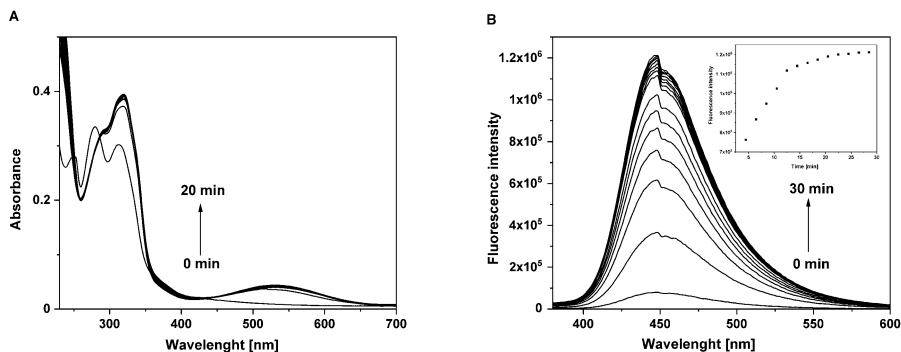
Further, we compared the optical properties of Nq-Cm with the properties of 7-hydroxy-4-methylcoumarin (Cm) and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (Nq), and the absorbance and emission profiles are illustrated in Figure 3.



**Fig. 3.** (A) UV-Vis absorption and (B) emission spectra of Nq, Cm, Nq-Cm.

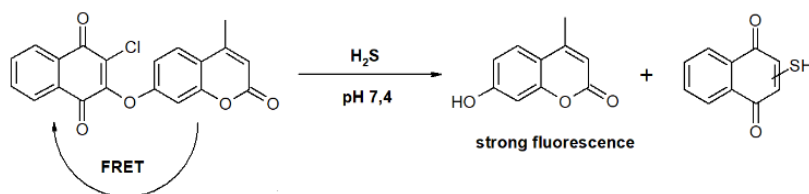
As shown in Figure 4A, Nq-Cm has absorption bands located at approximately 279 nm and 312 nm, which can be assigned to the naphthoquinone and coumarin core, respectively. When Nq-Cm was mixed with Na<sub>2</sub>S as a standard source of hydrogen sulfide, the increase in intensity of absorbance peaks appeared between 319 nm and 530 nm, which could be assigned to the yielding of Nq-SH products (Fig.5). Probe exhibit a weak fluorescence ( $\Phi < 0.08$ ). However, upon addition of Na<sub>2</sub>S to this solution maximum emission peak gradually increase reaches the emission peak at 448 nm after about 15 minutes (Fig.4B). Probe reacting with the hydrogen sulfide source give a very fast fluorescent response. After the first minutes of reaction, the fluorescence increases several times and may be sufficient to confirm the presence of hydrogen sulfide or its donors in various biosystems.

The resulting fluorescent spectra of Nq-Cm after addition of Na<sub>2</sub>S was found almost the same to that of 4-methylumbelliferone. This result suggests that H<sub>2</sub>S had cleaved the ether bond in Nq-Cm, releasing the fluorescent coumarin.



**Fig. 4.** (A) Electronic absorption spectra of Nq-Cm (20 μM) obtained upon addition Na<sub>2</sub>S (80 μM) (time interval, 60 s). (B) Fluorescence spectra of Nq-Cm (5 μM) recorded after addition of Na<sub>2</sub>S (20 μM); ( $\lambda_{\text{ex}}$ =320 nm, time interval, 60 s). Spectra were collected from sample dissolved in PB buffer.

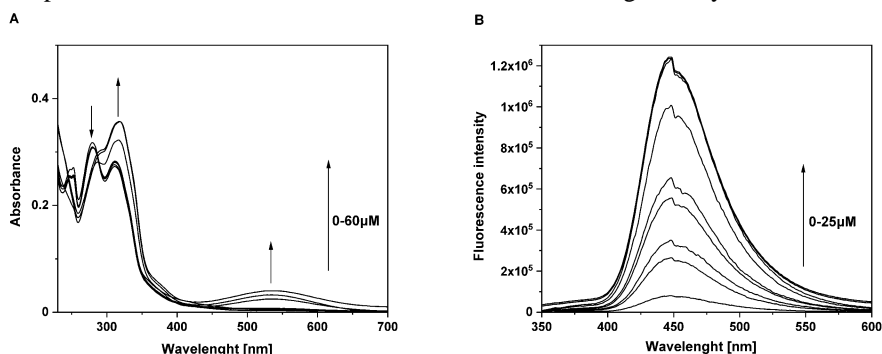
Spectral investigations showed that our probe operated by breaking the ether bond, which generated a Nq-SH products and highly fluorescent 7-hydroxy-4-methylcoumarin (Fig.5).



**Fig. 5.** Probe Nq-Cm and proposed reaction with H<sub>2</sub>S.

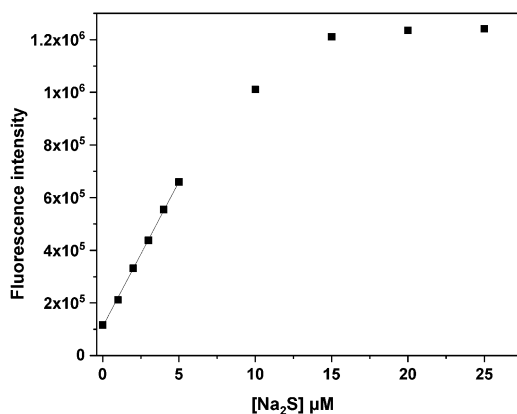
### 3.3 Absorption and fluorescence titration

A solution of probe in acetonitrile was added to the phosphate buffer containing different concentrations of Na<sub>2</sub>S (0–60 μM) and the absorption spectra were recorded after 5 min of incubation. As shown in Fig.6A, with increasing Na<sub>2</sub>S concentration, the absorption band at 279 nm slowly decreases and simultaneously the absorption band at 319 nm increases. Moreover, a new absorption band at 530 nm is formed. The three-fold and greater excess of hydrogen sulfide used during titration do not change the absorption spectrum of the Nq-Cm. Figure 6B shows that intensity of fluorescence emission of probe at 448 nm also increases when Na<sub>2</sub>S was added gradually into the solution.



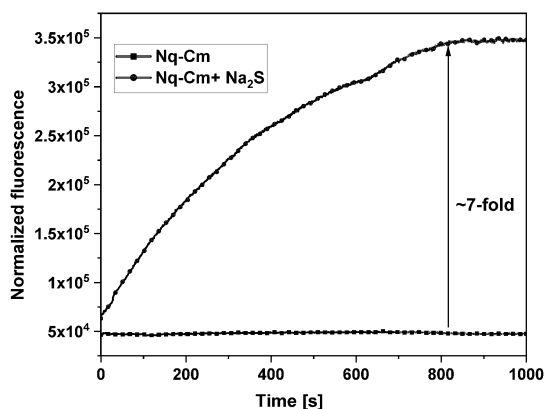
**Fig. 6.** (A) Absorptive and (B) fluorescent responses during the reaction between Nq-Cm probe and Na<sub>2</sub>S in PB buffer. Absorption spectra of Nq-Cm (20 μM) were obtained after the addition of various amounts of Na<sub>2</sub>S (0-60 μM). Fluorescence spectra of Nq-Cm (5 μM) were obtained after the addition of various amounts of Na<sub>2</sub>S (0-25 μM).

In addition, there was a linear correlation between the fluorescence intensity and the concentrations of  $\text{Na}_2\text{S}$  from 0 to  $5\ \mu\text{M}$  (Fig.7), and the limit of detection (LOD) was calculated to be  $130\ \text{nM}$ . These results suggest that probe is a good quantitative detection tool for  $\text{H}_2\text{S}$ .



**Fig. 7.** Fluorescence intensity at 448 nm during the course of the titration.

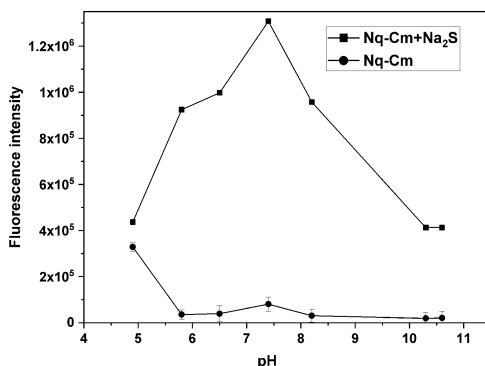
In next step, the reaction of Nq-Cm with excess of  $\text{H}_2\text{S}$  (30 equiv.) was studied. The recorded time-dependent fluorescence at 448 nm (Fig.8) shows that the maximal fluorescence signal was reached within 15 min with a 7-fold enhancement, indicating the sensor can achieve real-time detection of  $\text{H}_2\text{S}$ . Therefore, 15 min reaction time was chosen for the following experiments. In the absence of any analyte, the fluorescence intensity of Nq-Cm had no significant change, indicating that Nq-Cm had a good stability in the system.



**Fig. 8.** Reaction time profiles of Nq-Cm ( $5\ \mu\text{M}$ ) alone or in the presence of  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $150\ \mu\text{M}$ ) in PB buffer ( $0.1\ \text{M}$ ,  $\text{pH}\ 7.4$ ) containing ACN ( $30\%$ ),  $\lambda_{\text{ex}}=320\ \text{nm}$ , slites  $1,0/1,0\ \text{nm}$ .

### 3.4 pH effect on the fluorescence intensity of Nq-Cm

The pH of the environment often affect the colorimetric and fluorescent response of the probes. To determine whether Nq-Cm operate correctly under physiological conditions, we studied its response toward  $\text{H}_2\text{S}$  at various pHs. The fluorescence intensity changes of probe induced by  $\text{H}_2\text{S}$  were investigated at  $\text{pH}\ 4-11$ . As is evident of the data presented in Figure 9 in the absence of  $\text{H}_2\text{S}$ , probe is very stable over the relevant pH range of  $>5-10$ . Importantly, Nq-Cm displays a strong fluorescent enhancement in the presence of  $\text{H}_2\text{S}$  in the pH range  $7-8$  which suggest that it can work under physiological conditions.



**Fig. 9.** The fluorescence intensity at 448 nm of Nq-Cm (5  $\mu$ M) in the absence and presence of Na<sub>2</sub>S (20  $\mu$ M) at different pH values,  $\lambda_{ex}$ =320 nm, slites 1,0/1,0 nm. Test was repeated three times.

#### 4. Conclusions

In summary, we have synthesized a fluorogenic probe **Nq-Cm** based on coumarin scaffold. This probe shows rapid and significant fluorescence response in the blue emission region when a hydrogen sulfide donor Na<sub>2</sub>S is added to the phosphate buffer. In addition, **Nq-Cm** can be used as a selective „naked eye” indicator for H<sub>2</sub>S. The probe exhibits a high selectivity toward H<sub>2</sub>S and can respond to a low concentration of H<sub>2</sub>S in the real time. The convenient detection process (within 15 min), a good linearity range, and a low detection limit of H<sub>2</sub>S (130 nM) are huge advantages of **Nq-Cm**. With all of these positive results, we believe that this probe can be used as a valuable tool for fluorescent detection of H<sub>2</sub>S in living systems.

#### 5. References

- Bazhanov N, Escaffre O, Freiberg AN et al. (2017) Broad-range antiviral activity of hydrogen sulfide against highly pathogenic RNA viruses. *Scientific Reports* 7:41029.
- Bhattacharyya S, Saha S, Giri K et al. (2013) Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *Plos One*. 8:e79167.
- Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E et al. (2011) Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radical Biology and Medicine* 50:196–205.
- Evgen'ev MB, Frenkel A (2020) Possible application of H<sub>2</sub>S-producing compounds in therapy of coronavirus (COVID-19) infection and pneumonia. *Cell Stress Chaperones* 14: 1–3.
- Giuffrè A, Tomé CS, Fernandes DGF et al. (2020) Hydrogen Sulfide Metabolism and Signaling in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1219:335-353.
- Haonan L, Fanxing X, Gang G et al. (2020) Hydrogen sulfide and its donors: Novel antitumor and antimetastatic therapies for triple-negative breast cancer. *Redox Biology* 34: 101564.
- Hughes MN, Centelles MN, Moore KP (2009) Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology and Medicine* 47:1346–1353.
- Nagahara N, Koike S, Nirasawa T et al. (2018) Alternative pathway of H<sub>2</sub>S and polysulfides production from sulfurated catalytic-cysteine of reaction intermediates of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496:648–653.
- Pol A, Renkema GH, Tangerman A et al. (2018) Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nature Genetics* 50:120–129.
- Sunzini F, De Stefano S, Chimenti M et al. (2020) Hydrogen sulfide as potential regulatory gasotransmitter in arthritic diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1180.
- Szabo C, Coletta C, Chao C et al. (2013) Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- $\beta$ -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon

- cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (30):12474-12479.
- Tandon V, Maurya H (2009) Facile and efficient synthesis of novel oxazine, oxazepine and phenoxazine of chromenones fused with 1,4-naphthoquinone. *Heterocycles* 77:611-615.
- Ubuka T (2002) Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life sciences* 781: 227-249.
- Wang R (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews* 92:791–896.
- Wu D, Si W, Wang M et al. (2015) Hydrogen sulfide in cancer: Friend or foe?. *Nitric Oxide* 50:38-45.
- Yu F, Xiaoyue H, Chen L (2014) Fluorescent probes for hydrogen sulfide detection and bioimaging, *Chemical Communications* 50:12234-12249.
- Yu Z, Biggs T, Xian M (2014) Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chemical Communications* 50:11788- 11805.
- Yu Z, Kang J, Chung P et al. (2014) Thiol-Activated gem-Dithiols: A New Class of Controllable Hydrogen Sulfide Donors. *Organic Letters* 16:4536-4539.

## 6. Recent progress in the fluorogenic probes for H<sub>2</sub>S detection

Słowiński Daniel, Podsiadły Radosław

Institute of Polymer and Dye Technology, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology  
Science tutor: Radosław Podsiadły, PhD, DSc

Słowiński Daniel: daniel.slowinski@dokt.p.lodz.pl

Keywords: hydrogen sulfide, fluorescence, small-molecule

### Abstract

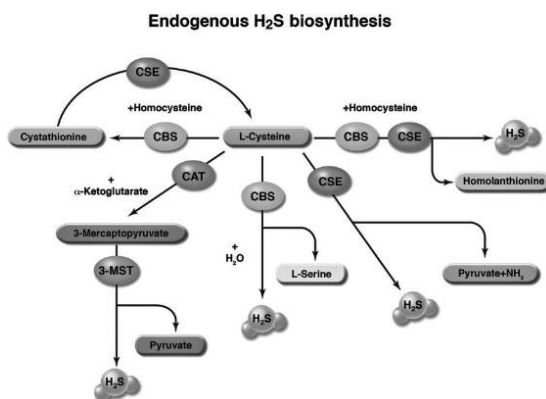
Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a gaseous species produced by eukaryotic organisms or several bacteria, has attracted attention in recent years for its contribution to human health and disease. Since attributed to the involvement in important physiological and pathological processes, hydrogen sulfide is regarded as another gasotransmitter like nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO). It is very indispensable to trace and measure this small molecule for the studies with biological specimens. However, current major methods for H<sub>2</sub>S detection, such as colorimetric reactions, gas chromatography, electrochemical assays, often require complicated sample processing and destruction of cells or tissues. A fluorescence based method has recently emerged as an efficient approach for real time detection on H<sub>2</sub>S. The reaction-based fluorogenic probes offer a versatile set of screening tools to visualize H<sub>2</sub>S in various living systems. Three main strategies have used in probe development for H<sub>2</sub>S detection include: H<sub>2</sub>S-triggered reduction, nucleophilic attack, and precipitation of copper sulfide (CuS). The present review highlights the basic characteristics of probes for H<sub>2</sub>S. This review aims to offer a comprehensive summary for researchers to inspire new probe design, and also push forward the advancement of simultaneous detection of H<sub>2</sub>S based on fluorescence assays.

### 1. Introduction

Hydrogen sulfide, the simplest biothiol was considered as a toxic gas with unpleasant rotten egg smell. In the central nervous system, the biological concentration of that biothiol is in the range of 50-160 μM. The sulfide level in plasma blood is in the range 10-100 μM. Abnormal levels of H<sub>2</sub>S in human bodies have been associated with various diseases, such as Down's syndrome, liver cirrhosis, chronic kidney disease or diabetes. It was reported that H<sub>2</sub>S can act as antioxidant. Therefore, it presents a significant research value to develop efficient chemical or advanced methods for selective and sensitive detection of H<sub>2</sub>S (Zhang et al. 2016; Xuan et al. 2012).

Hydrogen sulfide is produced endogenously in humans tissues through enzymatic and non-enzymatic processes. Using L-cysteine as the substrate, endogenous H<sub>2</sub>S production is related to the participation of cystathionine-β-synthase (CBS), cystathionine-γ-lyase (CSE), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) and cysteine aminotransferase (CAT) (Fig.1). CBS and CSE are enzymes dependent on pyridoxal phosphate, referred to as vitamin B<sub>6</sub>. CBS and CSE are produced in many organs and systems in the body. In the central nervous system, CBS plays a dominant role, CSE it is mainly used in the circulatory system. Expression of 3-MST is observed in the brain.

The first way to obtain hydrogen sulfide by an enzymatic reaction is to convert cysteine into cystine. In the presence of CSE cystine breaks down to give thiocysteine and pyruvate. Thiocysteine is converted to cysteine, which releases hydrogen sulfide in the process. In the second method, cysteine reacts with homocysteine in the presence of CBS to form cystathionine and H<sub>2</sub>S. In third method 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in combination with cysteine aminotransferase (CAT) is responsible for the production of H<sub>2</sub>S from L-cysteine in the presence of α-ketoglutarate. Expression of 3-MST is observed in the brain (Brodek and Olas 2016).



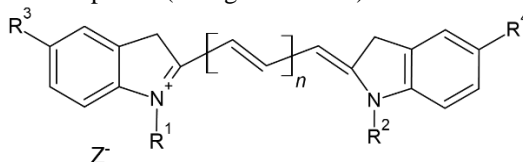
**Fig. 1.** Endogenous enzymatic synthesis of hydrogen sulfide H<sub>2</sub>S (Donnarumma et al. 2017).

## 2. Fluorophore for H<sub>2</sub>S detection

Fluorescence imaging are powerful tools for visualizing and analyzing the localization of biomolecules, such as H<sub>2</sub>S because of their high spatiotemporal resolution. While several commercial and easy-to-prepare fluorescent dyes are available as a fluorophore, only a few compounds are used for H<sub>2</sub>S probes. Certain limitations such as low quantum yield, poor hydrophilicity, photostability, poor water solubility, and low detection sensitivity under biological conditions make most dyes unsuitable for designing probes sensitive for H<sub>2</sub>S. For the design of probes used to detect H<sub>2</sub>S most commonly used fluorescent dyes are cyanine dyes, dicyanoisophorone (DCO), dicyanomethylene-4H-pyran (DCM) dyes, BODIPY, xanthene and coumarin-based analogs (Jose et al. 2020). The structural features, photophysical features, and uses of these bioimaging dyes are briefly summarized in this section.

### 2.1 Cyanine (Cy) dyes

Cyanine dyes (Fig.2) are often used as fluorophores due to their high quantum efficiency, high molar extinction coefficients, relatively long absorption and emission wavelengths. Cyanine dyes consist of two nitrogen-containing heterocycles, one of which is positively charged and attached to other N-center through a conjugated chain of an odd number of carbon atoms. Most cyanine dyes have two mesomeric structures that are responsible for the color intensity of these dyes. Depending upon the number of methine (–CH=) groups, these are divided as monomethine cyanine dye (Cy<sub>1</sub>), trimethine cyanine dye (Cy<sub>3</sub>), pentamethine cyanine dye (Cy<sub>5</sub>) or heptamethine cyanine dye (Cy<sub>7</sub>). The absorption and emission maxima of the Cy<sub>5</sub> and Cy<sub>7</sub> fit well in the near infrared (NIR) region and are used in the development of various analytes responsive NIR chemosensors. Cyanine dyes are relatively low molecular weight dyes that do not cause much interference in a way that reduces the efficiency of a labeled biomolecule to reach its targeted site. The absorption spectra of cyanine dyes in aqueous buffers of various pH give bathochromic shifts in alkaline media. Cyanine dyes are suitable for H<sub>2</sub>S sensing due to excellent biocompatibility and emission at the NIR region but these fluorophores are sensitive to sulfur species (Wang et al. 2017).

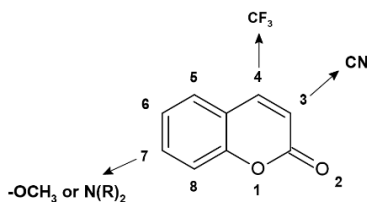


**Fig. 2.** General structures of cyanine dyes.

### 2.2 Coumarin based dyes

Coumarins (Fig.3) have good stability and desired spectroscopic properties (i.e. excitation and emission in visible region, large absorption extinction coefficient and good quantum yield). Three

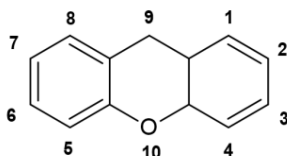
critical approaches, (i) the introduction of electron withdrawing or donating groups (such as 4-CF<sub>3</sub>, 3-CN, 7-methoxy, or 7-dimethylamino groups), (ii) the synthesis of benzo coumarin dyes, and (iii) extending the  $\pi$ -conjugation, are mainly used to prepare coumarin-based probes with large Stokes shifts, photostability, and emission wavelengths longer than 800 nm (Niu et al. 2016).



**Fig. 3.** Coumarin-based dye structure.

### 2.3 Xantene based dyes

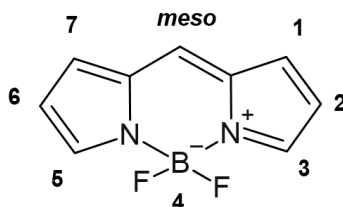
Xanthene dyes containing the xanthene core as the chromophore (Fig.4) with amine or hydroxyl group located at meta position to the oxygen. Xanthene dyes possess outstanding spectroscopic and photophysical properties. They have high quantum yield, narrow emission bands of yellow to pink to bluish red, high molar absorption coefficients, and high solubility, but they also have low lightfastness and poor water-fastness. Fluorone, fluorescein, rhodamine and rhodamine B are some well-known dyes derived from the xanthene. The substitution of a hydroxyl or amine group at the 3 and 6 positions intensifies its chromogenic and fluorogenic behavior. Substitution of a halogen at the 2, 4, 5, and 7 positions enhances the dye's quantum yield (Wright 2014).



**Fig. 4.** Xantene based-dye structure.

### 2.4 BODIPY based dyes

BODIPY dyes (Fig.5) have been considered a potential scaffold for functional fluorescent probe development because of relatively high photostability, neutral total charge, high fluorescence quantum yield, and sharp absorption and emission spectra. The fluorescence properties of BODIPY can be controlled by Förster resonance energy transfer (FRET) or photo-induced electron transfer (PET). Therefore, various BODIPY-based fluorogenic probes have been developed. Usually, the introduction of substituents in the meso position or fourth position does not substantially modify the molecule's absorption and emission properties. Those substituents are not involved in the  $\pi$ -system of BODIPY. However, conjugation at the 2/6 position or 3/5 position through substituents makes the dyes emit at the NIR region. A hydrophilic group such as a sulfonate or a carboxylate is often substituted at the 2 or 6 position to increase water solubility (Ni and Wu 2014).



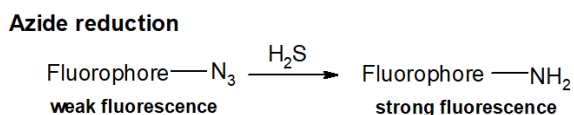
**Fig. 5.** General structure of BODIPY dye.



### 3. Strategies used in probe development for H<sub>2</sub>S detection

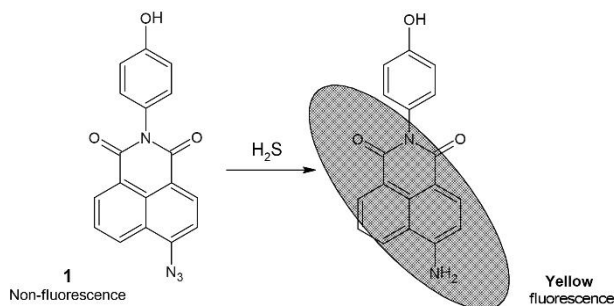
#### 3.1 Azide reduction

Organic azides have been used in chemical biology as a biofunctional group. Their compatibility with living cellular systems combined with the relative ease attachment of azide to the fluorophores has led to the rapid preparation of a wide variety of fluorescent azide-based probes. Reduction of N<sub>3</sub> group using H<sub>2</sub>S source (e.g. Na<sub>2</sub>S or NaHS) generates amine (Fig.6), which display significantly different electronic properties (Lin et al. 2015).



**Fig. 6.** Strategy based on azide reduction.

Zhang Y and Zhang L designed fluorescent probe **1** based on naphthalimide (Fig.7). Probe can detect the H<sub>2</sub>S without assistance of organic solvent or surfactant. When H<sub>2</sub>S is present, the azide group in **1** was reduced to amine group, resulting in a turn-on fluorescence signal. The probe displays highly selective and sensitive recognition to H<sub>2</sub>S, with a low detection limit of 50.8 nM. The free **1** solution exhibited a weak fluorescence, which was ascribed to the electron-withdrawing azide group. However, after being reacted with H<sub>2</sub>S, the corresponding emission peak at 552 nm was observed. The fluorescence intensity of the **1** grew fast and gradually reached fluorescence equilibrium within 15 min. The fluorescence intensity changes of **1** toward glutathione and cysteine were negligible.

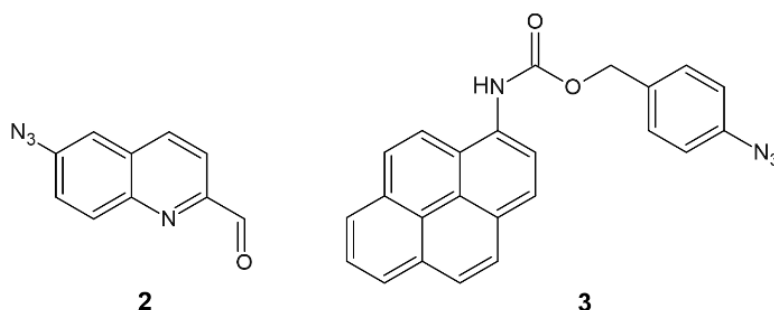


**Fig. 7.** Chemical structure of probe **1** and proposed reaction with H<sub>2</sub>S.

Ma et al. reported a novel water-soluble fluorescence probe **2** based on ICT lighten for detecting hydrogen sulfide (Fig.8). They designed probe based on quinoline. The aldehyde group as the electron absorbing group was connected to quinoline group. This compound have good properties including faster response speed, lower detection limits, and lower toxicity. Reacting with H<sub>2</sub>S, the azido group was reduced to amino group, leading to fluorescence “turn on” response. Quinoline-based probe **2** showed excellent properties of higher selectivity and lower detection limit (80 nM). Probe **2** (10 μM) initially had weakly fluorescence intensity at 476 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ ) but upon addition with Na<sub>2</sub>S (15 μM) showed dramatic red shifts (>50 nm) and 11-fold fluorescence enhancement at 533 nm.

Thirumalaivasan et al. reported a novel pyrene-based fluorescent probe **3** (Fig.8), as a H<sub>2</sub>S turn-on sensor via reduction of azide to amine, which subsequently undergoes self-immolation through intramolecular 1,6-elimination of the *p*-aminobenzyl moiety, releasing 1-aminopyrene and leading to the recovery of fluorescence intensity. The fluorescence emission gradually increased and reached a plateau within 2 h after the addition of 15 equivalents of H<sub>2</sub>S. During H<sub>2</sub>S titration with **3**, a new fluorescence emission band at 453 nm appeared. A noticeable blue fluorescence was observed only upon addition of H<sub>2</sub>S to the **3** solution. Cysteine and glutathione did not cause significant changes

in fluorescence. Probe 3 showed ability to detect H<sub>2</sub>S at a low detection limit (158 nM), which make it an attractive tool for H<sub>2</sub>S study in cell imaging and live zebra fish imaging.



**Fig. 8.** Structures of fluorescent H<sub>2</sub>S probe **2** and **3** based on the chemoselective reduction of aryl azides to amines.

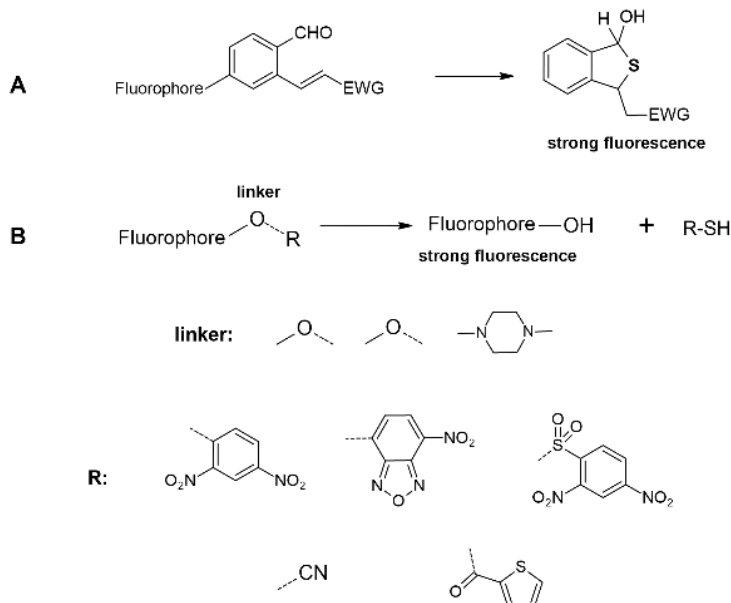
### 3.2 Fluorescence probes based on nucleophilic reactions of H<sub>2</sub>S

HS<sup>-</sup> as a strong nucleophile can undergo addition to electrophilic centers in fluorescent molecules with the *p*-conjugation system. This strategy has been applied to the development of H<sub>2</sub>S probes, and relies on disruption of conjugated systems to shift fluorescence emission. The major issue in H<sub>2</sub>S detection is to distinguish H<sub>2</sub>S from other biological nucleophiles, such as cysteine and glutathione, which are present within cells. The pK<sub>a</sub> of H<sub>2</sub>S is ~7.0 in aqueous solution and its lower than pK<sub>a</sub> values of Cys (~8.3) or GSH (~9.2). Therefore, H<sub>2</sub>S is considered to be a stronger nucleophile than other biothiols. H<sub>2</sub>S can undergo dual nucleophilic reaction as a non-substituted biothiol, however mono-substituted thiols can only undergo one nucleophilic reaction (Yu et al. 2014).

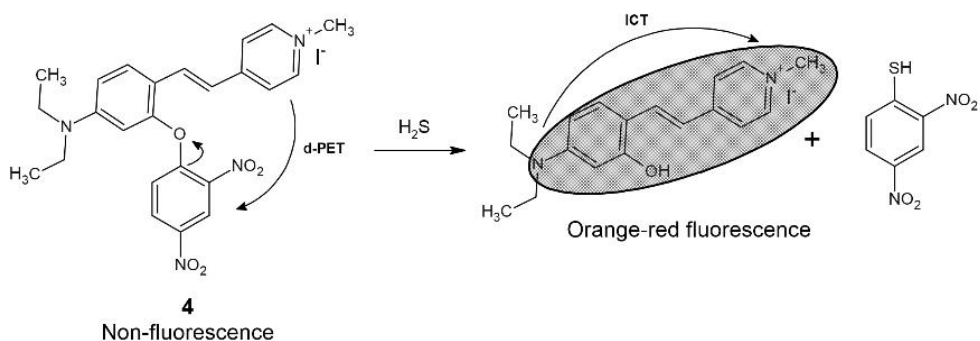
H<sub>2</sub>S can react with the more electrophilic moiety of the fluorescent probe to form an intermediate containing free mercapto (-SH) group. If another electrophilic site is present at a suitable position, such as an ortho-ester group or an  $\alpha,\beta$ -unsaturated acrylate group, the -SH group can undergo Michael addition (Fig.9A) or a spontaneous cyclization to enhancement intensity of fluorescence. As a strong nucleophile, H<sub>2</sub>S can also interrupt the  $\pi$ -conjugation of the probe, leading to a change in the emission wavelength of the probe. The removal of the strong electron-withdrawing group by H<sub>2</sub>S can release the fluorophore (Fig.9B) (Yu et al. 2014). In the H<sub>2</sub>S-induced thiolysis reaction, the design strategy of the H<sub>2</sub>S fluorescent probes is based on HS<sup>-</sup> selectively attacking a single electrophilic position on the probe scaffold, which is followed by removal of electrophilic functionalities to generate fluorescent signals. The fluorescence of these probes is typically protected with an incorporated strong electron withdrawing group such as: 2,4-dinitrophenyl (DNP), nitrobenzofuran (NBD), 2,4-dinitrobenzenesulfonyl (DNPS) and other electron withdrawing ester moieties that can be cleaved in the presence of H<sub>2</sub>S. At present, many fluorescent probes based on thiolysis reaction have been reported (Wang et al. 2020).

Zhong *et al.* designed simple H<sub>2</sub>S selective fluorescent probe **4** through two-step facile synthesis. The probe contains a 4-*N,N*-diethylamino group which can act as an electron-donor group and the 1,4-dimethylpyridinium iodide group which was introduced as an electron-withdrawing group (Fig.10). The dangled 2,4-dinitrophenyl segment was used as fluorescence quencher through donor-excited photoinduced electron transfer (PET) and H<sub>2</sub>S recognition site. Probe **4** (10  $\mu$ M) displays a weak fluorescence emission in DMF:H<sub>2</sub>O (4:6 v/v) solution ( $\lambda_{\text{ex}} = 496$  nm). The fluorescence emission intensity of **4** at 607 nm concomitantly enhanced when the HS<sup>-</sup> concentration continuously increased, and the titration reached saturation when 50 equiv. of HS<sup>-</sup> was employed. The fluorescence emission increased gradually with prolonging time and reached an equilibrium at about ~20 min. The detection limit of **4** for HS<sup>-</sup> was calculated to be 339 nM.

**Nucleophilic reaction**



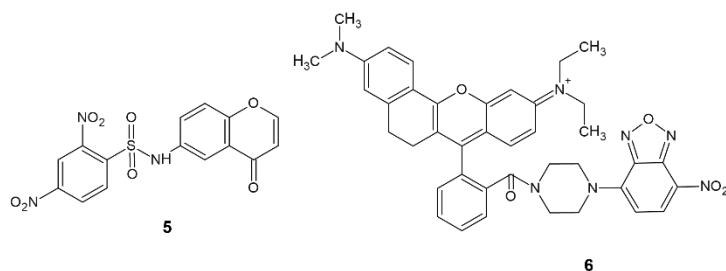
**Fig. 9.** Reactions for fluorescent probes based on the nucleophilic property of H<sub>2</sub>S.



**Fig. 10.** Chemical structure of probe **4** and proposed reaction with H<sub>2</sub>S.

*Hou et al.* designed and synthesized a novel fluorescent probe **5** for measurement of H<sub>2</sub>S through introducing 2,4-dinitrobenzenesulfonamide into the 6-position of chromone to obtain **N**-(2-methyl-4-oxo-4H-chromen-6-yl)-2,4-dinitrobenzenesulfonamide (Fig.11). When the **5** probe coexists with H<sub>2</sub>S, a nucleophilic substitution reaction took place between 2,4-dinitrobenzenesulfonamide and H<sub>2</sub>S to release amino group. A weak fluorescence of probe was observed at 515 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm) at pH values from 3.00 to 10.30, meaning that the **5** probe is very stable in water solution. As Na<sub>2</sub>S was added into the probe solution, the fluorescence increased obviously under acidic conditions. The fluorescence intensity at 515 nm increased linearly with time and reached a plateau in 60 min. The detection limit was calculated as 17 nM.

*Ismail et al.* designed a fast-response red shifted fluorescent probe **6** (Fig.11). The probe is based on a rhodamine derivative as the red shifted fluorophore and the thiolysis of 7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole (NBD) amine as the H<sub>2</sub>S receptor. The probe **6** showed weak fluorescence (quantum yield 0.021). When compound reacted with H<sub>2</sub>S, an excellent fluorescence change in a red shifted range with high brightness was observed with 10-fold turn-ons at 660 nm.

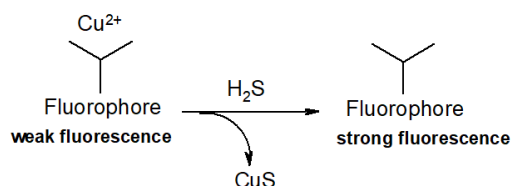


**Fig. 11.** Chemical structure of probe **5** and **6**.

### 3.3 CuS precipitation

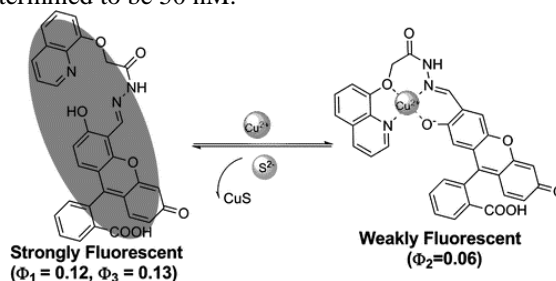
Precipitation of copper sulfide (II) (CuS) is classical method for quantitative analysis of the sulfide species. This way has been successfully adapted for fluorogenic H<sub>2</sub>S detection. After forming stable metal complexes with Cu(II), organic chelators have an efficacious quenching effect on fluorophores. This is due to the paramagnetic properties of copper, which can accept excited electrons in fluorophores. After the removal of Cu<sup>2+</sup> from the complex, fluorescence is turned on and the copper sulfide is released (Fig.12). According to the theory, S<sup>2-</sup> is has a strong affinity for Cu (II) and the precipitated salt is relatively stable. CuS precipitation strategy have been reported for fluorescein or anthracene (Choi et al 2009).

#### CuS precipitation



**Fig. 12.** Strategy based on precipitation of copper sulfide.

*Hou et al.* reported a highly selective fluorogenic probe **7** based on fluorescein and 8-hydroxyquinoline as the receptor (Fig.13). The receptor can combine Cu<sup>2+</sup> to form complex, which displays high sensitivity and selectivity for S<sup>2-</sup>. After S<sup>2-</sup> was added to the complex solution, a new band appeared at 534 nm. The fluorescence intensity increased 6-fold in 15 minutes.. The detection limitation of S<sup>2-</sup> was determined to be 50 nM.



**Fig. 13.** Chemical structure of probe **7** and proposed reaction with H<sub>2</sub>S.

## 4. Summary

The development of perfect probes is a challenging task. Future reaction-based design principles must be pay attention to endogenous H<sub>2</sub>S as a reactive small molecule under normal physiological conditions. The desirable probes should respond remarkably to a minor concentration change, give dependable results, and meanwhile avoid interference from other biothioles such as glutathione and cysteine. It require the probes to exhibit good selectivity, high sensitivity, good

photostability, low cytotoxicity, suitable water solubility, and the ability to work within physiological pH range. For real applications of fluorogenic probes, especially in clinical diagnostic imaging, is the ultimate goal.

In this article, we summarized the latest design strategies for developing fluorogenic probes sensitive for H<sub>2</sub>S. Most of the probes mentioned in this article have the desired properties (Tab.1) and could be used in diagnostics.

**Tab. 1.** Summary of fluorogenic probes for the detection of H<sub>2</sub>S.

Probe	Detection mechanism, time	Medium, limit of detection	Fluorescence enhancement probe's concentration	Detection in living cells
1	azide reduction, 15 min	PBS buffer, 50 nM	10-fold at 552 nm (30 μM)	yes
2	azide reduction, 3.4 min	H <sub>2</sub> O, 80 nM	11-fold at 533 nm (10 μM)	yes
3	azide reduction, 120 min	H <sub>2</sub> O:DMSO, 150 nM	28 fold at 410 nm (10 μM)	yes
4	thiolysis, 20 min	DMF:H <sub>2</sub> O, 340 nM	13 fold at 607 nm (10 μM)	yes
5	thiolysis, 60 min	PBS, 170 nM	15 fold at 515 nm (10 μM)	yes
6	thiolysis, 10 min	PBS:DSMO, 270 nM	10 fold at 660 nm (5 μM)	yes
7	CuS precipitation 15 min	PBS:ACN, 50 nM	6 fold at 534 nm (10 μM)	yes

## 5. References

- Brodek P, Olas B (2016) Biochemistry and therapeutic potential of hydrogen sulfide – reality or fantasy?: *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70:820-829.
- Choi M, Cha S, Lee H et al. (2009) Sulfide-selective chemosignaling by a Cu<sup>2+</sup> complex of dipicolylamine appended fluorescein: *Chemical Communications*: 7390-7392.
- Donnarumma E, Trivedi R, Lefer D (2017) Protective actions of H<sub>2</sub>S in acute myocardial infarction and heart failure: *Comprehensive Physiology* 7: 583-602.
- Hou F, Huang L, Xi P et al. (2012) A retrievable and highly selective fluorescent probe for monitoring sulfide and imaging in living cells: *American Chemical Society* 51: 2454–2460.
- Hou F, Zhu L, Zhang H et al. (2020) A highly selective and sensitive fluorescent probe based on the chromone fluorophore for imaging hydrogen sulfide in living cells: *New Journal of Chemistry* 44:1537-1541.
- Ismail I, Chen Z, Ji X et al. (2020) A fast-response red shifted fluorescent probe for detection of H<sub>2</sub>S in living cells: *Molecules* 25(437):1-13.
- Jose D, Sakla R, Sharma N et al. (2020) Sensing and bioimaging of the gaseous signaling molecule hydrogen sulfide by near-Infrared fluorescent probes: *American Chemical Society* 5:3365-3391.

- Lin V, Chen W, Xian M et al. (2015) Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems: *Chemical Society Reviews* 44:4596-4618.
- Ma T, Huo F, Wen Y et al. (2019) A novel water-soluble fluorescence probe based on ICT lighten for detecting hydrogen sulfide and its application in bioimaging: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 214:355-359.
- Ni Y, Wu J (2014) Far-red and near infrared BODIPY dyes: synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging: *Organic and Biomolecular Chemistry* 12:3774-3791.
- Niu G, Liu W, Xiao H et al. (2016) Keto-benzo[h]-coumarin-based near-infrared dyes with large stokes shifts for bioimaging applications: *Chemistry: An Asian Journal* 11:498-504.
- Thirumalaivasan N, Venkatesan P, Wu S (2017) Highly selective turn-on probe for H<sub>2</sub>S with imaging applications in vitro and in vivo: *New Journal of Chemistry* 41:13510-135515.
- Wang J, Huo F, Yue Y et al. (2020) A review: Red/near-infrared (NIR) fluorescent probes based on nucleophilic reactions of H<sub>2</sub>S since 2015: *Luminescence*: 1-18.
- Wang Y, Meng Q, Zhang R et al. (2017) A mitochondria-targeted ratiometric probe for the fluorescent and colorimetric detection of SO<sub>2</sub> derivatives in live cells: *Journal of luminescence* 192: 297-302.
- Wright P (2014) Xanthene Dyes: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ.
- Xuan W, Sheng C, Cao Y et al. (2012) Fluorescent probes for the detection of hydrogen sulfide in biological systems: *Angewandte Chemie* 51:2282-2284.
- Yu F, Han X, Chen L (2014) Fluorescent probes for hydrogen sulfide detection and bioimaging: *Chemical Communications* 50:12234-12249.
- Zhang C, Wang R, Cheng L et al. (2016) A redox-nucleophilic dual-reactable probe for highly selective and sensitive detection of H<sub>2</sub>S: Synthesis, spectra and bioimaging: *Scientific Reports* 6: 30148.
- Zhang Y, Zhang L (2020) A novel "turn-on" fluorescent probe based on hydroxy functionalized naphthalimide as a logic platform for visual recognition of H<sub>2</sub>S in environment and living cells: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 235:118331.
- Zhong K, Zhou S, Yan X et al. (2020) A simple H<sub>2</sub>S fluorescent probe with long wavelength emission: Application in water, wine, living cells and detection of H<sub>2</sub>S gas: *Dyes and Pigments* 174:108049.

## 7. Zwiększenie czułości oznaczeń metodami elektroforezy kapilarnej

### Increasing the sensitivity of determinations by capillary electrophoresis

Stelmaszczyk Paweł, Wietecha-Posłuszny Renata

Pracownia Chemii Sądowej, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, prof. UJ

Paweł Stelmaszczyk: pawel.stelmaszczyk@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: techniki separacyjne, spiętrzanie, CE-MS

#### Streszczenie

Elektroforeza kapilarna jest techniką, która znajduje coraz szersze zastosowanie w analizie chemicznej jako technika zastępcza dla wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Jednym z wyzwań w opracowaniu nowych metod bazujących na technice elektroforezy kapilarnej jest jej mniejsza czułość w stosunku do metod HPLC. Jednakże, współczesne osiągnięcia chemii analitycznej umożliwiają poprawę tego parametru. Przy użyciu prostych zabiegów, takich jak zateżanie próbki “poza” lub “w” układzie pomiarowym, czy zastosowanie czułych detektorów możliwe jest opracowanie metod, które pod względem czułości konkurować mogą z metodami HPLC. Nowoczesne metody ekstrakcji oraz spiętrzanie analitów umożliwia zateżanie próbki, natomiast zastosowanie czułego detektora na poprawę parametrów detekcji, co wpływa na poprawę czułości metody. Połączenie niewątpliwych zalet elektroforezy kapilarnej, do których należą m.in. wysoka sprawność rozdziału, krótki czas analizy oraz produkcja małej ilości odpadów z czułością jaką można uzyskać poprzez zastosowanie zabiegów zwiększających czułość oznaczeń, czyni elektroforezę kapilarną idealną techniką na drodze do opracowywania nowych metod realizujących założenia zielonej chemii i zrównoważonego rozwoju.

#### 1. Wstęp

W technikach elektroforezy kapilarnej (*ang. Capillary Electrophoresis, CE*) podstawą rozdziału składników mieszaniny jest różnica w prędkości cząsteczek obdarzonych ładunkiem w stałym polu elektrycznym. Kapilarę o znanej średnicy wewnętrznej i długości, wykonanej najczęściej ze stopionej krzemionki, wypełnia roztwór nazywany buforem separacyjnym (*ang. Background Electrolyte, BGE*), w którym zachodzi rozdział mieszaniny. Do układu pomiarowego przyłożone jest napięcie generowane przez źródło wysokiego napięcia poprzez elektrody zanurzone w naczynkach z buforem separacyjnym, w których znajdują się końce kapilary. Próbka wstrzykiwana jest w pobliżu anody bezpośrednio do kapilary. Okno detekcyjne, w którym dochodzi do identyfikacji składników mieszaniny, znajduje się w pobliżu katody, w której kierunku poruszają się cząsteczki po nastrzyknięciu próbki (Grossman i Colburn 2012; Buszewski i in. 2012).

Prędkość poruszania się danej cząsteczki w buforze separacyjnym zależy od prędkości elektroforetycznej danej cząsteczki oraz przepływu elektroosmotycznego (*ang. Electroosmotic Flow, EOF*). Obecność przepływu elektroosmotycznego jest konsekwencją jonizacji grup funkcyjnych materiału, z którego wykonana jest kapilara i adsorpcji składników jonowych buforu separacyjnego. Powstała w wyniku obecności tych zjawisk podwójna warstwa elektryczna, nazywana warstwą Sterna, wymusza przepływ buforu separacyjnego w jednym kierunku. Przepływ ten powoduje, że wszystkie cząsteczki, niezależnie od ładunku, wędrują w kierunku zgodnym z przepływem elektroosmotycznym. Z powyższego wynika, że obserwowana prędkość migracji jonów ( $\mu_{ob}$ ) zależy zarówno od rychłości elektroforetycznej jonu jak i ruchliwości elektroosmotycznej. Dla kationów obserwowana ruchliwość elektroforetyczna jest sumą ruchliwości elektroosmotycznej i elektroforetycznej kationu ( $\mu_{ob} = \mu_{EOF} + \mu_{ef}^{(+)}$ ), natomiast dla anionów jest ona różnicą ruchliwości elektroosmotycznej i elektroforetycznej anionu ( $\mu_{ob} = \mu_{EOF} - \mu_{ef}^{(-)}$ ). Obserwowana ruchliwość cząsteczek nieposiadających ładunku jest równa ruchliwości elektroosmotycznej ( $\mu_{ob} = \mu_{EOF}$ ).

Efektywna prędkość elektroforetyczna danej cząsteczki ( $v_{ef}$ ) przedstawia się wzorem  $v_{ef} = \mu_{ob} \cdot E$ ; gdzie  $E$  to natężenie pola elektrycznego (Grossman i Colburn 2012; Buszewski i in. 2012).

Elektroforeza kapilarna posiada wiele zalet do których zaliczyć można wysoką sprawność rozdzielania, możliwość automatyzacji procesu, krótki czas pomiaru i dobrą selektywność. Współcześnie, ze względu na dbałość o zrównoważony rozwój w laboratoriach chemicznych, dużą wagę przykłada się do wykorzystania tzw. „technik zielonych” - ze względu na niewielkie zużycie odczynników, elektroforezę kapilarną można uznać za technikę przyjazną środowisku (de la Guardia i Garrigues 2012). Wadami tej techniki są m.in. niższa czułość oznaczeń oraz mniejsza powtarzalność wyników w porównaniu z techniką wysokosprawną chromatografii cieczowej (Simonet i in. 2003). Autorzy (Grossman i Colburn 2012; Altria 1996) wskazują rozwiązanie tych problemów poprzez stosowanie standardów wewnętrznych, detektorów o wysokiej czułości oraz zateżania analizów „poza” i/lub „w” układzie pomiarowym.

## 2. Sposoby zwiększenia czułości oznaczeń elektroforetycznych

Parametrami walidacyjnymi, które ściśle powiązane są z czułością metod analitycznych są granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), które mają wyższe wartości w przypadku metod o mniejszej czułości. Konsekwencją mniejszej czułości metod bazujących na technice elektroforezy kapilarnej w stosunku do wysokosprawnej chromatografii cieczowej jest więc uzyskanie wyższych wartości LOD i LOQ w przypadku elektroforezy kapilarnej. Spowodowane jest to głównie dwoma czynnikami: ograniczeniem drogi optycznej w najczęściej stosowanej w metodach CE detekcji spektrofotometrycznej oraz ograniczeniem objętości próbki, która może być wprowadzona do kapilary. Maksymalna objętość próbki jaką można wprowadzić do kapilary wynosi od 1% do 3% objętości wewnętrznej kapilary. Wstrzyknięcie większej ilości próbki do kapilary może skutkować zmniejszeniem rozdzielczości i poszerzeniem rejestrowanych pików (Breadmore i in. 2019).

Czułość metod elektroforetycznych można zwiększyć poprzez zastosowanie detektora o wysokiej czułości oraz zateżanie analitu w próbce „poza” lub „w” układzie pomiarowym. Czułymi detektorami stosowanymi w technikach CE są m.in. detektory chemiluminescencyjne (*ang. Chemiluminescence Detection*), elektrochemiczne (*ang. Electrochemical Detection*) lub z laserowo indukowaną fluorescencją (*ang. Laser-Induced Fluorescence, LIF*). Coraz popularniejsze jest również połączenie techniki CE ze spektrometrem mas (Buszewski i in. 2012; Almeda i in. 2010; Simonet i in. 2003).

### 2.1 Zateżanie analizów „poza” i „w” układzie pomiarowym

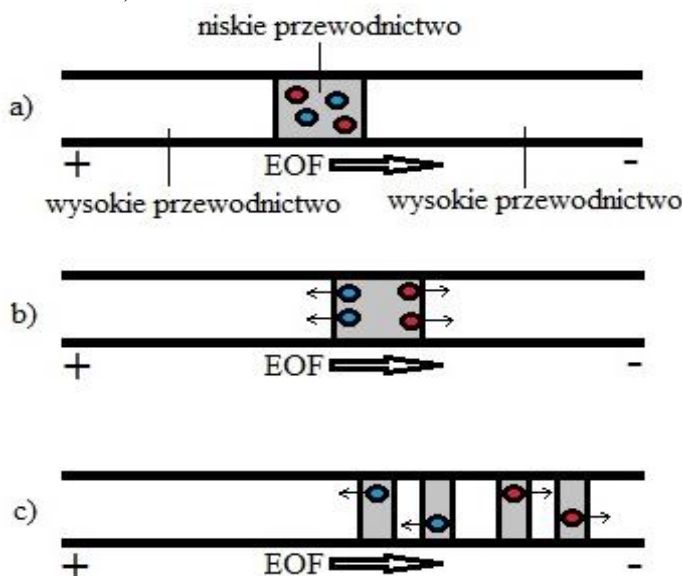
Zateżanie analizów poza układem pomiarowym jest możliwe przy użyciu nowoczesnych technik ekstrakcji takich jak ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (*ang. Microwave-Assisted Extraction, MAE*) czy mikroekstrakcji do fazy stałej (*ang. Solid-Phase Microextraction, SPME*). Użycie zoptymalizowanej metody ekstrakcji umożliwia zwiększenie czułości około 100-krotnie (Simpson Jr i in. 2008).

W technikach elektroforezy kapilarnej powszechnie stosowane są sposoby zateżania analizów w układzie pomiarowym, które zachodzi wewnątrz kapilary. Sposoby te określane są terminem spiętrzanie (*ang. Stacking*). Zateżanie przy użyciu spiętrzania bazuje na koncentracji analizów na granicy próbka-bufor separacyjny i zmianie ich prędkości elektroforetycznych (Simpson Jr i in. 2008; Breadmore i in. 2019; Gebauer i Bocek 2009).

Najczęściej stosowaną metodą spiętrzania w strefowej elektroforezie kapilarnej jest metoda zateżania analitu przez spiętrzanie ze wzmocnieniem pola (*ang. Field Amplified Sample Stacking, FASS*), którego mechanizm działania przedstawia Rys. 1. W metodzie tej próbka przygotowana jest w roztworze o niższym przewodnictwie niż bufor separacyjny. Najprostszym sposobem osiągnięcia tego efektu jest przygotowanie próbki w rozcieńczonym 100- lub 1000-krotnie buforze separacyjnym. Po wprowadzeniu do kapilary próbki o niższym przewodnictwie, w strefie wprowadzonej próbki powstaje silne pole wywołane wysokim napięciem przyłożonym do kapilary. Prowadzi to do natychmiastowego wzrostu prędkości migracji analizów. Kiedy jony docierają na granicę strefy próbki i buforu separacyjnego, maleje natężenie pola elektrycznego, co skutkuje spadkiem prędkości



migracji jonów oraz spiętrzeniem analitów w obrębie wąskiej strefy (Breadmore i in. 2019; Almeda i in. 2010; Simonet i in. 2003).



**Rys. 1.** Uproszczony mechanizm spiętrzenia analitów ze wzmocnieniem pola: a) wprowadzenie próbki do kapilary; b) gromadzenie się analitów na granicy strefy próbki; c) spiętrzenie analitów w obrębie wąskiej strefy (Almeda i in. 2010).

## 2.2 Sprzężenie elektroforezy kapilarnej z czułym detektorem na przykładzie układu CE-MS

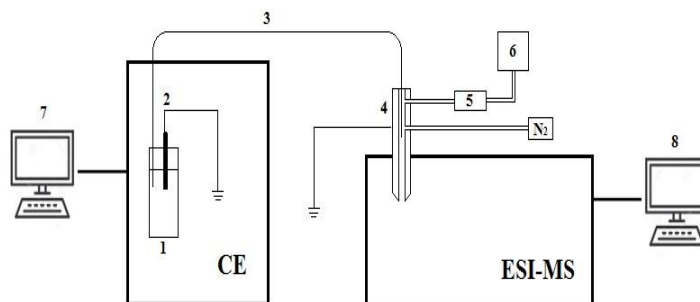
Sprzężenie techniki elektroforezy kapilarnej ze spektrometrią mas (*ang. Spectrometry Mass, MS*) pozwala na znaczne zwiększenie czułości oznaczeń. Spektrometr mas jest jednym z najbardziej uniwersalnych i czułych detektorów, który umożliwia identyfikację związków, których masy cząsteczkowe zawierają się w zakresie rejestrowanych przez spektrometr (Buszewski i in. 2012; Simonet i in. 2003). W przypadku połączeń CE-MS najczęściej stosowaną jonizacją, ze względu na największą stabilność pracy spektrometru przy niskich wartościach przepływu cieczy, jest jonizacja z elektrorozpylaniem (*ang. Electrospray Ionization, ESI*) (Schlecht i in. 2018; Gahoual i in. 2018). Na Rys. 2. przedstawiono schemat połączenia CE-ESI-MS.

W technice łączonej CE-MS stosowane są bufor o odmiennym składzie niż w klasycznej strefowej elektroforezie kapilarnej. W przypadku buforów o niskich wartościach pH stosowane są mieszaniny kwasu octowego lub mrówkowego w połączeniu z rozpuszczalnikiem organicznym, najczęściej metanolem lub acetonitrylem. Bufory o wyższych wartościach pH zawierają w swoim składzie octan lub wodorotlenek amonu (Schlecht i in. 2018).

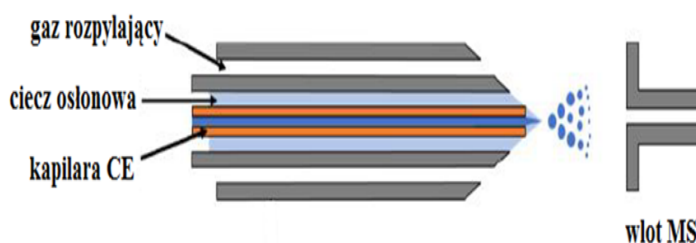
Spektrometr mas ze źródłem jonów typu elektroospray w łatwy sposób połączyć można z zestawem do elektroforezy kapilarnej. Kapilara doprowadzająca roztwór w źródle jonów, do której przykładane jest napięcie elektryczne, pełni w tym połączeniu rolę katody (Gahoual i in. 2018; Sudera i Silberring 2006). Problemem w połączeniu CE-ESI-MS jest niekompatybilność przepływu buforu separacyjnego z przepływem zapewniającym stabilny sygnał spektrometru mas. W celu zapewnienia odpowiedniego przepływu buforu separacyjnego na wlocie do spektrometru mas stosuje się płyn osłonowy doprowadzany do wylotu kapilary źródła jonów. Bufor ulega zmieszaniu z płynem osłonowym, a następnie mieszanina ulega jonizacji. Opisane połączenie w postaci uproszczonego schematu przedstawia Rys. 3. Zastosowanie płynu osłonowego stabilizuje sygnał rejestrowany przez spektrometr mas, należy jednak zwrócić uwagę, że jego użycie prowadzi do rozcieńczenia próbki, co wpływać może na spadek czułości metody (Gahoual i in. 2018; Sudera i Silberring 2006).

Możliwe jest również połączenie CE-ESI-MS bez płynu osłonowego. W tym przypadku należy stosować bufor separacyjny o niskim napięciu powierzchniowym i niskim przewodnictwie,

dotatkowo w skład takiego buforu powinny wchodzić składniki o wysokiej lotności. Zastosowanie takiego buforu umożliwi uzyskanie stabilnego stożka rozpylania cieczy, bez konieczności stosowania cieczy osłonowych oraz uzyskania stabilnego sygnału detektora masowego (Buszewski i in. 2012; Gahoual i in. 2018).



**Rys. 2.** Uproszczony schemat układu CE-ESI-MS z cieczą osłonową; 1 – fiołka z buforem separacyjnym, 2 – elektroda, 3 – kapilara, 4 – igła elektrozpylacza, 5 – pompa doprowadzająca ciecz osłonową, 6 – zbiornik z cieczą osłonową, 7 – komputer połączony z aparatem do elektroforezy kapilarnej, 8 – komputer połączony ze spektrometrem mas.



**Rys. 3.** Schemat układu CE-ESI-MS z zastosowaniem płynu osłonowego.

### 2.3 Zastosowanie techniki CE-MS

Czułość oznaczeń jaką można osiągnąć poprzez sprzężenie techniki elektroforezy kapilarnej spektrometrem mas spowodowała coraz większe zainteresowanie tą techniką m.in. w badaniach toksykologicznych. Przykładem innowacyjnego zastosowania tej techniki łączonej jest metoda opracowana przez Świądro i in. (Świądro i in. 2020), w której zastosowanie ekstrakcji MAE umożliwia efektywny proces wyodrębnienia wybranych leków przeciwdepresyjnych i nasennych. Zastosowanie metody suchej kropli krwi (*ang. Dried Blood Spot, DBS*) na etapie pobrania i przygotowania próbki, umożliwia dodatkowo przeprowadzenie analizy przy użyciu niewielkiej ilości próbki krwi. Granice oznaczalności tej metody wynoszą od 5,25 do 49,0 ng/ml w zależności od leku.

Metoda zaproponowana przez Woźniakiewicz i in. (Woźniakiewicz i in. 2015), która również wykorzystuje ekstrakcję MAE połączoną z techniką CE-MS, umożliwiła wykrycie i oznaczenie leków z grupy pochodnych benzodiazepiny i 1-benzylopiperazyny w próbkach krwi pełnej. Granice wykrywalności i oznaczalności metody wynoszą odpowiednio od 0,4 do 1,2 ng/ml oraz od 1,3 do 4,1 ng/ml w zależności od leku. Ponadto, zmiana parametrów ekstrakcji MAE umożliwiła zastosowanie tej metody również w analizie próbek ludzkich włosów. W przypadku analizy włosów, granice wykrywalności i oznaczalności wyniosły odpowiednio od 6,0 do 23,0 pg/mg i od 20,0 do 77,0 pg/mg włosów.

Publikacja Švidnoch i in. (Švidnoch i in. 2018) przedstawia zastosowanie metody NACE-MS (*ang. Non-Aqueous Capillary Electrophoresis, NACE*) z kapilarną pokrytą wewnątrz wieloma

warstwami polimeru jonowego SMIL, która została zastosowana w celu oznaczania 9 nowych benzodiazepin w surowicy krwi ludzkiej. Granice wykrywalności tej metody w zależności od analitu wynoszą od 1,5 do 15,0 ng/ml surowicy.

W literaturze znaleźć można również wiele metod bazujących na technice łączonej CE-MS, w których w celu wyodrębnienia analitów z matrycy próbki biologicznej wykorzystano technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Przykładem może być metoda zaproponowana przez Sasajima i in. (Sasajima i in. 2010), dzięki której możliwe jest oznaczenie 20 różnych leków przeciwdepresyjnych w osoczu krwi. W metodzie tej wykorzystano technikę elektroforezy kapilarnej prowadzonej w środowisku niewodnym (NACE), a ekstrakcja SPE przeprowadzana była z użyciem kolumnek Oasis HLB. Granice wykrywalności proponowanej metody dla konkretnych leków zawierają się w granicach 0,5 – 1,0 ng/ml, natomiast granice oznaczalności w granicach od 1 do 5 ng/ml. Innym zastosowaniem techniki CE-MS w połączeniu z ekstrakcją SPE jest metoda proponowana przez Elhamili i in. (Elhamili i in. 2011) z wykorzystaniem kolumn SCX-SPE w celu oznaczania leków z grupy trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych. W metodzie tej stosowano zmodyfikowaną kapilarę pokrytą wewnątrz polimerem o akronimie M7C4I. Granice wykrywalności i oznaczalności tej metody wynoszą odpowiednio 1,0 ng/ml i 5,0 ng/ml dla każdego z analitów.

W Tab. 1 zebrano informacje dotyczące wyżej opisanych metod wykorzystujących technikę sprężoną CE-MS.

**Tab. 1.** Przykłady zastosowania techniki CE-MS w analizie materiału biologicznego.

Anality	Materiał biologiczny	Rodzaj ekstrakcji	Parametry kapilary	Bufor separacyjny	Lit.
BZDs <sup>1</sup> , SSRI <sup>2</sup> , TLPD <sup>3</sup> , Zolpidem	krew pełna	MAE	kapilara ze stopionej krzemionki powlekana poliamidem	mieszanina 50 mM kwasu octowego i metanol (60:40, v/v);	Świądrowicz i in. 2020
BZDs	krew pełna	MAE	kapilara ze stopionej krzemionki powlekana poliamidem	mieszanina 100 mM kwasu mrówkowego i acetonitrylu (80:20, v/v);	Wozniakiewicz i in. 2015
BZDs	surowica	LLE	kapilara ze stopionej krzemionki pokrytej od strony wewnętrznej powłoką wielokrotnej warstwy jonowo-polimerowej (SMIL)	mieszanina 20 mM octanu amonu i 100 mM kwasu trifluoroctowego	Świdmoch i in. 2018
SSRI, TLPD	osocze	SPE	kapilara ze stopionej krzemionki	mieszanina 60 mM octanu amonu, 1M kwasu octowego i wody (100:1:0,5; v/v/v);	Sasajima i in. 2010
TLPD	osocze	SPE	kapilara ze stopionej krzemionki pokrytej wewnątrz polimerem M7C4I	roztwór 30 mM octanu amonu	Elhamili i in. 2011

<sup>1</sup> BZDs – pochodne benzodiazepiny

<sup>2</sup> SSRI - selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny

<sup>3</sup> TLPD - trójcykliczne leki przeciwdepresyjne

### 3. Podsumowanie

Metody bazujące na technice elektroforezy kapilarnej ze względu na zalety takie jak wysoka sprawność rozdzielania, możliwość automatyzacji pomiaru, niskie zużycie odczynników stanowi konkurencję dla powszechnie stosowanych metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Technika ta jednak posiada również wady, związane głównie niższą czułością metod. Jednakże stosując proste zabiegi, takie jak zatężanie próbki “poza” lub “w” układzie pomiarowym lub wykorzystanie czułego detektora, możliwe jest poprawienie tego parametru oraz ściśle związanych z nim parametrów walidacyjnych takich jak granice wykrywalności i oznaczalności.

Zatężanie próbki poza układem pomiarowym można osiągnąć poprzez uwzględnieniem w procedurze analitycznej odpowiednio zoptymalizowanego procesu ekstrakcji. Obiecującymi i dającymi dobre rezultaty są jednocześnie wykorzystywane techniki ekstrakcji takie jak ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) (Woźniakiewicz i in. 2015; Świądło i in. 2020) czy mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) (Majda i in. 2020). Popularnymi metodami zatężania analitów w układzie pomiarowym są metody spiętrzania, których celem jest doprowadzenie do koncentracji analitów w wąskiej sferze wewnątrz kapilary. Ze względu na prostotę w osiągnięciu tego efektu najczęściej stosowane jest spiętrzanie ze wzmocnieniem pola (FASS).

Zwiększenie czułości oznaczeń można osiągnąć również poprzez sprzężenie elektroforezy kapilarnej z czułym detektorem. Opracowanie czułych metod opartych na połączeniu elektroforezy kapilarnej sprzężonej ze spektrometrem mas, posiadającej zarówno zalety efektywnej metody separacyjnej generującej niewielką ilość odpadów, jak również czułego detektora jest obiecującym narzędziem w realizacji założeń zielonej chemii. Ze względu na wiele korzyści płynących z połączenia techniki elektroforezy kapilarnej ze spektrometrem mas znalazła ona szerokie zastosowanie w analizie materiału biologicznego.

### 4. Finansowanie

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego R. Wietecha-Posłuszny Preludium BIS 1 o nr 2019/35/O/ST4/00978 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

### 5. Literatura

- Almeda S, Arce L, Valcárcel M (2010) The more and less common approaches to enhancing sensitivity in capillary electrophoresis. *Current Analytical Chemistry* 6(2): 126-143.
- Altria KD (1996) Fundamentals of capillary electrophoresis theory. In *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Humana Press, 3-13.
- Breadmore MC, Grochocki W, Kalsoom U, Alves MN, Phung SC, Rokh MT, Keyon ASA (2019) Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2016–2018). *Electrophoresis* 40(1): 17-39.
- Buszewski B, Dziubakiewicz E, Szumski M (2012) Techniki elektromigracyjne: Teoria i praktyka, Malamut, 21-93, 254-264.
- de la Guardia M, Garrigues S (2012) *Handbook of Green Analytical Chemistry*, Wiley, 153-174.
- Elhamili A, Samuelsson J, Bergquist J, Wetterhall M (2011) Optimizing the extraction, separation and quantification of tricyclic antidepressant drugs in human plasma with CE-ESI-TOF-MS using cationic-coated capillaries. *Electrophoresis* 32(6-7): 647-658.
- Gahoual R, Leize-Wagner E, Houzé P, François YN (2019) Revealing the potential of capillary electrophoresis/mass spectrometry: the tipping point. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33: 11-19.
- Gebauer P, Boček P (2009) Electrophoretic sample stacking. *Electrophoresis* 30(S1): 27-33.
- Grossman PD, Colburn JC (2012) *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Academic Press, 14-22.
- Majda A, Mrochem K, Wietecha-Posłuszny R, Zapotoczny S, Zawadzki M (2020) Fast and efficient analyses of the post-mortem human blood and bone marrow using DI-SPME/LC-TOFMS method for forensic medicine purposes. *Talanta* 209: 120533.

- Sasajima Y, Lim LW, Takeuchi T, Suenami K, Sato K, Takekoshi Y (2010) Simultaneous determination of antidepressants by non-aqueous capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(48): 7598-7604.
- Schlecht J, Jooß K, Neusüß C (2018) Two-dimensional capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-CE-MS): coupling MS-interfering capillary electromigration methods with mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 410(25): 6353-6359.
- Simonet BM, Rios A, Valcárcel M (2003) Enhancing sensitivity in capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry* 22(9): 605-614.
- Simpson Jr SL, Quirino JP, Terabe S (2008) On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A* 1184(1-2): 504-541.
- Sudera P, Silberring J (2006) *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego: 175-178
- Švidrnoch M, Boráňová B, Tomková J, Ondra P, Maier V (2018) Simultaneous determination of designer benzodiazepines in human serum using non-aqueous capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry with successive multiple ionic–polymer layer coated capillary. *Talanta* 176: 69-76.
- Świądro M, Stelmaszczyk P, Wietecha-Posłuszny R, Dudek D (2020) Development of a new method for drug detection based on a combination of the dried blood spot method and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*: 1157, 122339.
- Woźniakiewicz A, Wietecha-Posłuszny R, Woźniakiewicz M, Bryczek E, Kościelniak P (2015) A quick method for determination of psychoactive agents in serum and hair by using capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 111: 177-185.

## 8. Substancje chemiczne używane przez sprawców przestępstw seksualnych

Substances using by perpetrators of sexual offense

Stelmaszczyk Paweł, Wietecha-Posłuszny Renata

Pracownia Chemii Sądowej, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, prof. UJ

Paweł Stelmaszczyk: pawel.stelmaszczyk@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: DFSA, „date-rape drugs”, substancje odurzające

### Streszczenie

Przestępcy seksualni odurzają ofiary przy użyciu substancji chemicznych, które mają spowodować m.in. utratę przytomności oraz zaniki pamięci. Powszechność i łatwy dostęp do substancji odurzających powoduje, że coraz częściej odnotowywane są przypadki świadomego zażycia substancji psychoaktywnej przez ofiarę, co w konsekwencji zostało wykorzystane przez sprawcę przestępstwa. Substancje te określane są terminem „date-rape drugs”. Powszechnie w sprawach kryminalnych odnotowywane są użycia związków chemicznych działających depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), takich jak kwas 4-hydroksybutanowy, ketamina, benzodiazepiny, barbiturany, jednakże na popularności w tego typu sprawach zyskuje użycie substancji stymulujących OUN np. amfetaminy, MDMA, kokainy. Krótki okres półtrwania we krwi niektórych z wymienionych substancji stanowi wyzwanie dla chemii analitycznej. Konieczne jest opracowywanie nowych metod szybkiego zabezpieczania próbek materiału biologicznego od ofiar oraz czułych metod instrumentalnych umożliwiających wykrycie substancji psychoaktywnej w organizmie ofiary.

### 1. Wstęp

Według statystyk polskiej Policji, w latach 2010-2019 co roku stwierdzanych było ok. 1300-1500 przestępstw zgwałcenia, natomiast wskaźnik wykrywalności tych przestępstw (będący ilorazem liczby przestępstw wykrytych przez liczbę przestępstw stwierdzonych) wynosił ok. 80%. Oznacza to, że średnio na 5 zgłoszonych gwałtów, w 4 przypadkach udało się ustalić choć jednego podejrzanego o popełnienie czynu (wg. Statystyk policyjnych). Ofiarami tych przestępstw były głównie kobiety. Według statystyk Głównego Urzędu Statystycznego, rocznie zgłaszanych jest jedynie ok. 20-40 przypadków gwałtów, których ofiarami byli mężczyźni (wg. Statystyk Urzędu Statystycznego). Przyпуска się, że skala tego rodzaju przestępstw jest dużo większa, a liczba notowanych przestępstw jest bardzo niedoszacowana. Spowodowane jest to faktem, że jedynie niewielki ułamek ofiar zgłasza zdarzenie na policję. Najczęstszymi powodami niezgłaszania przestępstw seksualnych przez ofiary są poczucie wstydu, obawa przed piętnem społecznym czy niewiarą innych oraz obawa przed zemstą sprawcy przestępstwa (Grela i in. 2018).

Popełnienie przestępstwa gwałtu często wiąże się z odurzeniem ofiary przez sprawcę. W raporcie „Guidelines for the Forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts” opublikowanym przez Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (ang. United Nations’ Office and Drugs and Crime, UNODC) wyszczególnionych jest wiele substancji, które są używane przez sprawców przestępstw seksualnych. Do substancji najczęściej wyszczególnianych należą: kwas 4-hydroksybutanowy (ang. Gamma-Hydroxybutyric Acid, GHB), ketamina, benzodiazepiny, barbiturany, opioidy, produkty konopi indyjskich, kokaina, pochodne amfetaminy, leki przeciwdepresyjne oraz alkohol (wg. Raportu UNODC). Grupa tych substancji określana jest w literaturze terminem „date-rape drugs” (Grela i in. 2018). Klasyczne substancje należące do tej grupy, do których zalicza się GHB, ketaminę i benzodiazepiny, wykazują następujące właściwości sprzyjające wykorzystaniu ich w przestępstwach seksualnych przez sprawców:

- obniżają aktywność ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz prowadzą do utraty pamięci;

- nie mają zapachu i smaku;
- są łatwo rozpuszczalne w alkoholu;
- są szybko wchłaniane do organizmu przy podaniu doustnym oraz szybko usuwane z organizmu (Grela i in. 2018).

Współcześnie, ze względu na powszechność na rynku narkotykowym takich substancji jak m.in. amfetamina, metamfetamina, MDMA, mefedron, kokaina, szczególnie przyjmowanych przez młodych ludzi podczas imprez czy wydarzeń muzycznych, substancje te coraz częściej wykrywane są w materiale biologicznym ofiar gwałtów. Choć są to substancje, które wykazują działanie pobudzające na OUN, ich spożycie często prowadzi do zmniejszenia zahamowań i czujności ofiary, co ułatwia sprawcy gwałtu popełnienie przestępstwa (Grela i in. 2018; Bertol i in. 2018).

## **2. Napaści seksualne z udziałem substancji odurzającej**

Terminem napaści seksualnej z udziałem substancji odurzającej (ang. Drug-Facilitated Sexual Assault, DFSA) określane są przestępstwa, w których sprawca wykorzystał seksualnie ofiarę będącą pod wpływem substancji odurzającej. Wyróżniane są dwa typy przypadków takich przestępstw: pierwszym przypadkiem jest sytuacja, w której sprawca podał ofierze substancję bez jej wiedzy (ang. predatory); drugim przypadkiem są zdarzenia, w których ofiara świadomie i dobrowolnie zażyła substancję, co zostało wykorzystane przez sprawcę i doprowadziło do popełnienia przestępstwa (ang. opportunistic) (Grela i in. 2018).

Nie jest możliwe przypisanie konkretnej substancji do danego typu napaści seksualnej z użyciem substancji odurzającej. Na podstawie analizy przypadków można uogólnić jedynie, że popularniej stosowanymi substancjami w przypadkach potajemnego podania substancji przez sprawcę są związki chemiczne wpływające depresyjnie na OUN, natomiast w przypadkach świadomego zażycia substancji przez ofiarę używane są związki chemiczne o działaniu pobudzającym. Od zależności tej rejestrowanych jest jednak wiele wyjątków, które mogą wynikać m.in. z historii zażywanych przez ofiarę narkotyków lub leków (Grela i in. 2018; Bertol i in. 2018).

Wyzwaniem w badaniu materiału biologicznego pobranego od ofiar przestępstw seksualnych, które znajdowały się pod wpływem substancji chemicznej jest szybkie zabezpieczenie próbek od ofiary i wykrycie substancji w organizmie. Nie wykrycie substancji w organizmie ofiary, która podczas zaistniałego zdarzenia znajdowała się pod wpływem substancji chemicznej, może być spowodowane zmetabolizowaniem i wydalaniem substancji z organizmu przed pobraniem próbki do analizy. Substancje te mogą być obecne w organizmie w stężeniu niższym od granicy wykrywalności zastosowanej metody analitycznej (Grela i in. 2018).

## **3. Charakterystyka substancji stosowanych w napaściach seksualnych**

Wśród substancji chemicznych rejestrowanych w sprawach napaści seksualnych wyszczególnić można związki odurzające będące lekami (m.in. barbiturany, benzodiazepiny, leki przeciwdepresyjne) lub narkotykami (m.in. amfetamina, MDMA, kokaina). W wielu przypadkach ofiara przestępstwa podczas zdarzenia była pod wpływem działania alkoholu etylowego, który w organizmie występował samodzielnie lub w obecności innej substancji psychoaktywnej. Ze względu na działanie jakie wykazuje alkohol (m.in. utrata zahamowań, częściowa utrata pamięci), jego spożycie przez ofiarę ułatwia sprawcy popełnienie przestępstwa seksualnego. Wiele substancji chemicznych wykazuje dobrą rozpuszczalność w napojach alkoholowych, przez co często są one podawane ofiarom doustnie poprzez wprowadzenie ich do napojów (Bertol i in. 2018; de Souza Costa i in. 2020; Świądro i in. 2021).

W Tab.1 przedstawiono charakterystykę substancji psychoaktywnych najczęściej wykorzystywanych przez przestępców w przestępstwach seksualnych.

### **3.1 Kwas 4-hydroksybutanowy (GHB)**

Kwas 4-hydroksybutanowy (GHB) jest substancją naturalnie występującą w organizmie człowieka w śladowych ilościach. Pełni rolę neuroprzekaźnika w układzie GABA-ergicznym. Jest

prekursorem, ale również metabolitem neuroprzekaźnika GABA (kwasu 4-aminobutanowego) (Andresen i in. 2011).

Związek ten znalazł zastosowanie w leczeniu choroby alkoholowej, podawany jest pacjentom w celu złagodzenia symptomów odstawiennych. GHB stosowane było w leczeniu bezsenności, jednakże ze względu na wąskie okno terapeutyczne zaprzestano jego powszechnego stosowania. Substancja ta zyskała na popularności jako jeden z pierwszych tzw. „imprezowych narkotyków”, nazywany „płynnym ecstazy”. Wykazuje depresyjne działanie na OUN. Niewielka dawka GHB działa na organizm człowieka podobnie jak alkohol, zażycie większych dawek może prowadzić do zawrotów głowy, nudności, utraty przytomności, zaników pamięci (Ingels i in. 2000; de Souza Costa i in. 2020).

GHB stosowane jest przez przestępców seksualnych ze względu na powyżej wspomniane działanie na organizm, jak również ze względu na to, że jego dodatek do napojów nie zmienia ich zapachu i smaku. Efekt działania substancji w organizmie odczuwany jest po ok. 30-60 minutach od zażycia. W aspekcie wykorzystania tego związku przez sprawców przestępstw seksualnych, ważne jest również to, że jest to substancja trudna do wykrycia w organizmie człowieka ze względu na jej szybki metabolizm oraz brak specyficznych metabolitów mogących świadczyć o zażyciu GHB (końcowym metabolitem przemian GHB jest woda i dwutlenek węgla powstałe w wyniku cyklu Krebsa). Wykrywany jest w próbkach krwi do 8 godzin po zażyciu, a w moczu do 12 godzin (Busardo i Jones 2015; de Souza Costa i in. 2020).

**Tab. 1.** Charakterystyka wybranych substancji psychoaktywnych wykorzystywanych w przestępstwach seksualnych (Grela i in. 2018; Bertol i in. 2018; Moffat i in. 2011).

Związek	Początek działania [min]	Czas półtrwania [h]	Główne metabolity	Klasyfikacja wg. Ustawy <sup>1</sup>
GHB <sup>2</sup>	20-40	0,5-1	- <sup>3</sup>	II-P
Ketamina	5-30	2-3	norketamina, hydroksynorketamina	II-P
Flunitrazepam	15-30	16-35	7-aminoflunitrazepam	III-P
Diazepam	30-90	20-100	nordazepam, oksazepam, temazepam	IV-P
Temazepam	20-90	8-15	glukuronid temazepamu,	IV-P
Lorazepam	5-30	9-24	glukuronid lorazepamu	IV-P
Nitrazepam	10-40	18-38	7-aminonitrazepam	IV-P
Amobarbital	10-30	8-40	3-hydroksyamobarbital	III-P
Pentobarbital	15-60	15-50	-	III-P
Amfetamina	15-30	12	4-hydroksyaamfetamina, BMK	II-P
Metamfetamina	20-70	9	4-hydroksymetamfetamina, amfetamina	II-P
MDMA <sup>4</sup>	20-70	6-7	MDA	I-P
Mefedron	15-45	2	normefedron, 4-OH-mefedron	I-P
mCPP <sup>5</sup>	20-60	4,5	hydroksy-mCPP	II-P
Citalopram	zmienny <sup>6</sup>	33	desmetylcitalopram	- <sup>7</sup>
Amitryptylina	zmienny <sup>6</sup>	9-26	nortryptylina	- <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 sierpnia 2018 r. w sprawie wykazu substancji psychotropowych, środków odurzających oraz nowych substancji psychoaktywnych;

<sup>2</sup> GHB - kwas 4-hydroksybutanowy;

<sup>3</sup> brak specyficznych metabolitów;

<sup>4</sup> MDMA - 3,4-metylenodioksymetamfetamina;

<sup>5</sup> mCPP - 1-(3-chlorofenyl)piperazyne;

<sup>6</sup> Różny w zależności od osoby przyjmującej lek;

<sup>7</sup> Nie wyszczególniony w Ustawie;



### 3.2 Ketamina

Ketamina jest związkiem chemicznym stosowanym w medycynie w celu znieczulenia przedoperacyjnego. Jej zażycie wywołuje halucynacje słuchowe i wizualne, w większych dawkach prowadzi do bezwładu w ciele i zaników pamięci. Efekt działania tej substancji wzmacniany jest w przypadku jej podania wraz z alkoholem. Ze względu na swoje działanie jest jedną z najpopularniej stosowanych przez sprawców substancji w celu odurzenia ofiary przestępstwa seksualnego. Substancja ta może być zażywana poprzez palenie, wdychanie oparów lub podanie doustne, ze względu na fakt, że dodanie jej do napoju nie zmienia jego koloru i smaku, możliwe jest zatajenie przez sprawcę faktu dodania jej do napoju ofiary (Grela i in. 2018; de Souza Costa i in. 2020).

Ketamina wykazuje szybkie działanie w organizmie człowieka, pierwsze efekty zażycia tej substancji odczuwalne są już po ok. 5-30 minut po zażyciu. Charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania we krwi wynoszącym ok. 2-3 godzin. Jej wykrycie w moczu możliwe jest do ok. 72 godzin po zażyciu (de Souza Costa i in. 2020; Moffat i in. 2011).

### 3.3 Flunitrazepam i inne benzodiazepiny

Benzodiazepiny są lekami stosowanymi w leczeniu zaburzeń lękowych oraz bezsenności. Wykazują działanie depresyjne na OUN. Ich zażycie prowadzi m.in. do zaburzenia myślenia, utraty pamięci, senności, zaburzeń koordynacji ruchowej, zawrotów głowy (Bertol i in. 2018). W aspekcie wykorzystania tych substancji przez sprawców przestępstw seksualnych, są one najczęściej podawane ofierze bez jej wiedzy. Do najczęściej stosowanych przez przestępców należą flunitrazepam oraz diazepam. W materiale biologicznym ofiar wykrywane są rzadziej inne benzodiazepiny takie jak temazepam, lorazepam, nitrazepam (Grela i in. 2018).

Czas po jakim odczuwalny jest efekt działania w organizmie danej benzodiazepiny, silnie zależy od jej rozpuszczalności w tłuszczach. Do najlepiej rozpuszczalnych w tłuszczach leków z grupy benzodiazepin należą lorazepam i nitrazepam, które wywołują efekt odurzenia już po kilku minutach po zażyciu. Mniej rozpuszczalne w tłuszczach flunitrazepam i diazepam zaczynają działać w organizmie odpowiednio po ok. 30 i 90 minutach od zażyciu. Benzodiazepiny różnią się także okresami półtrwania, który np. dla flunitrazepamu wynosi 3 godziny, a dla diazepamu nawet do 100 godzin (Grela i in. 2018; de Souza Costa i in. 2020).

### 3.4 Barbiturany

Barbiturany charakteryzują podobne właściwości farmakologiczne jak benzodiazepiny, na rynku farmaceutycznym zostały właściwie przez nie zastąpione. Wpływają na organizm człowieka powodując senność, uspokojenie, zaburzenia mowy i koordynacji ruchowej oraz zaniki pamięci. Wśród substancji wykorzystywanych przez sprawców przestępstw seksualnych z tej grupy leków wymieniane są m.in. fenobarbital, pentobarbital, amobarbital, sekobarbital (Grela i in. 2018; de Souza Costa i in. 2020).

Początek wystąpienia efektów działania leków z tej grupy w organizmie odczuwalne są po ok. 15-60 minut po zażyciu w zależności od związku. Poszczególne barbiturany, podobnie jak benzodiazepiny, różnią się okresami półtrwania w organizmie od krótko działającego amobarbitalu, dla którego wynosi ok. 8 godzin, do długo działającego fenobarbitalu, dla którego parametr ten wynosi nawet do 100 godzin (Grela i in. 2018).

### 3.5 Produkty konopi indyjskich

Produkty konopi indyjskich, ze względu na fakt, że są najbardziej rozpowszechnionymi i najłatwiej dostępnymi narkotykami, są również wykorzystywane przez sprawców przestępstw seksualnych. Substancją wykazującą działanie odurzające, obecną w produktach konopi indyjskich jest  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC). Notowane są zarówno przypadki przestępstw, w których substancja ta została zażyta dobrowolnie przez ofiarę, jak również przypadki w których sprawca potajemnie (np. w jedzeniu) odurzył ofiarę przy użyciu tych produktów (Grela i in. 2018; Bertol i in. 2018).

Najpopularniejszymi formami pod jakimi dostępne są produkty konopne jest susz roślinny, często zmieszany z tytoniem, sprasowana żywica nazywana haszyszem oraz oleje konopne. Mogą być wchłaniane do organizmu poprzez układ oddechowy podczas palenia lub pokarmowy poprzez

przyjęcie wraz z pokarmem np. w postaci ciastek. Ze względu na formę oraz kolor, susz i haszysz nie są podawane ofierze poprzez dodanie do napojów. Olej konopny, choć jest rozpuszczalny w alkoholu, również nie jest potajemnie dodawany do napojów przez sprawców ze względu na specyficzny zapach produktu oraz zmianę zabarwienia napoju (Grela i in. 2018).

Działanie  $\Delta^9$ -THC w organizmie jest odczuwalne w zależności od drogi podania po ok. 1-10 minut w przypadku palenia i po ok. 30-120 minut w przypadku doustnego podania (Grela i in. 2018).

### 3.6 Stymulanty typu amfetaminy (ATS)

Do grupy stymulantów typu amfetaminy (ang. Amphetamine-Type Stimulants, ATS) zalicza się związki o podobnej budowie strukturalnej i podobnym działaniu farmakologicznym do amfetaminy i metamfetaminy. Związki chemiczne wyszczególniane jako ATS, pod względem chemicznym zaliczane są do grup pochodnych amfetaminy, katynonu lub piperazyny. Cechą wspólną działania farmakologicznego tych związków chemicznych jest działanie stymulujące na OUN. Ich zażycie wywołuje euforię, zwiększenie pewności siebie, poczucie zadowolenia (Grela i in. 2018).

Zażycie substancji z grupy ATS, oprócz wywołania euforii, może prowadzić do obniżenia zahamowań, zwiększenia podatności na sugestie oraz zwiększenia popędu seksualnego ofiary, co może zostać wykorzystane przez sprawcę gwałtu. W większości przypadków ofiary dobrowolnie zażywają wyżej wymienione substancje, jednakże zdarzają się również przypadki potajemnego dodania narkotyku do napoju ofiary. Najczęściej wymienianymi substancjami z grupy ATS, które wykorzystywane są przez przestępców seksualnych są: amfetamina, metamfetamina, MDMA (ecstasy), mefedron i mCPP. Wśród wymienionych, amfetamina, MDMA i mefedron są narkotykami najczęściej zażywanymi przez młodych ludzi podczas imprez (Grela i in. 2018).

### 3.7 Kokaina

Podobnie jak substancje z grupy ATS, kokaina działa stymulująco na OUN. Zwiększa aktywność motoryczną, wywołuje euforię i dobry nastrój, zwiększa libido i obojętność na ból. Kokaina może być przyjmowana doustnie, jednak najczęściej przyjmowana jest donosowo wywołując efekt działania po ok. 15 minutach po zażyciu. Okres półtrwania dla tej substancji wynosi ok. 1,5 godziny (Grela i in. 2018; Moffat i in. 2011).

Kokaina nie jest typową substancją stosowaną przez sprawców przestępstw seksualnych, jednakże zdarzają się przypadki gwałtów z jej użyciem. Zazwyczaj przyjmowana jest przez ofiarę dobrowolnie, choć ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie i etanolu, substancja ta dodawana jest potajemnie przez sprawcę do napoju lub drinka ofiary (Grela i in. 2018).

### 3.8 Leki przeciwdepresyjne

Leki przeciwdepresyjne stosowane są w leczeniu zaburzeń nastroju, takich jak m.in. afektywna choroba jednobiegunowa czy dwubiegunowa. Do leków tych należą substancje, które klasyfikowane są najczęściej do następujących grup: selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRI), inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI) oraz trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TCA). Ich zażycie prowadzi m.in. do wystąpienia zawrotów głowy, senności, zaburzeń wzroku, przez co mogą być użyte przez przestępców seksualnych (Grela i in. 2018).

Najczęściej wymienianymi lekami przeciwdepresyjnymi, stosowanymi przez sprawców są citalopram, należący do grupy leków SSRI oraz amitryptylina, będąca lekiem z grupy TCA. Czas po jakim odczuwalne są efekty działania leków są różne w zależności od osoby zażywającej leki. Czas półtrwania amitryptyliny w organizmie człowieka zależy jest od przyjętej dawki i wynosi 9-26 godzin, natomiast dla citalopramu wynosi ok. 33 godzin (Grela i in. 2018).

## 4. Podsumowanie

Substancje chemiczne będące lekami lub narkotykami używane są przez sprawców przestępstw seksualnych, w celu odurzenia ofiary. Określane są one terminem „date-rape drugs”. Wiele z nich posiada właściwości, które utrudniają ich wykrycie przez potencjalne ofiary. Substancje takie jak GHB, ketamina, flunitrazepam po dodaniu do napoju nie zmieniają ich smaku i zapachu,

dotatkowo tak jak w przypadku ketaminy obecność alkoholu w napoju wspomaga jej działanie odurzające. Wywołują one zaburzenia koordynacji ruchu i mowy ofiary, prowadzą do utraty przytomności i zaników pamięci. Nie bez znaczenia jest również fakt, że substancje te są szybko metabolizowane i usuwane z organizmu człowieka.

Druga grupą substancji używanych przez sprawców są tzw. „narkotyki imprezowe” do których można zaliczyć związki chemiczne z grupy ATS czy kokainę. Są to substancje wpływające pobudzająco na OUN, jednakże wywołują również efekty pożądane przez sprawców przestępstw seksualnych, takie jak zmniejszenie zahamowań czy zwiększenie popędu seksualnego ofiary.

Ze względu na fakt szybkiej eliminacji substancji odurzających, wykorzystywanych przez przestępców seksualnych z organizmu człowieka, wyzwaniem w analizie materiału biologicznego ofiar gwałtów jest opracowanie nowych metod umożliwiających wykrycie głównie ich metabolitów we krwi lub w moczu. Nowe metody powinny bazować na nowoczesnych metodach analizy instrumentalnej i efektywnych metodach ekstrakcji analitów i ich metabolitów z próbek biologicznych, co umożliwi zwiększenie czułości oznaczeń i wykrycie substancji nawet w śladowych ilościach, wskazując na fakt, że ofiara gwałtu podczas zdarzenia była pod wpływem substancji odurzającej.

## 5. Finansowanie

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego R. Wietecha-Posłuszny Preludium BIS 1 o nr 2019/35/O/ST4/00978 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## 6. Literatura

- Andresen H, Aydin BE, Mueller A, Iwersen-Bergmann S (2011) An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. *Drug testing and analysis* 3(9): 560-568.
- Bertol E, Di Milia MG, Fioravanti A, Mari F, Palumbo D, Pascali JP, Vaiano F (2018) Proactive drugs in DFSA cases: Toxicological findings in an eight-years study. *Forensic science international* 291: 207-215.
- de Souza Costa YR, Lavorato SN, de Campos JJCM (2020) Violence against women and drug-facilitated sexual assault (DFSA): a review of the main drugs. *Journal of forensic and legal medicine*, 102020.
- Grela A, Gautam L, Cole MD (2018) A multifactorial critical appraisal of substances found in drug facilitated sexual assault cases. *Forensic science international* 292: 50-60.
- Ingels M, Rangan C, Bellezzo J, Clark RF (2000) Coma and respiratory depression following the ingestion of GHB and its precursors: Three cases. *The Journal of emergency medicine* 19(1): 47-50.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J (2011) *Clarke's analysis of drugs and poisons* (Vol. 3). London: Pharmaceutical press.
- Busardo F, Jones A (2015) GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Current neuropharmacology* 13(1): 47-70.
- Report UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime, Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts, 2011.  
[https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic\\_analysis\\_of\\_drugs\\_facilitating\\_sexual\\_assault\\_and\\_other\\_criminal\\_acts.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analysis_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf) (dostęp: 03.12.2020r.).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 sierpnia 2018 r. w sprawie wykazu substancji psychotropowych, środków odurzających oraz nowych substancji psychoaktywnych.  
<http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20180001591/O/D20181591.pdf> (dostęp: 15.12.2020r.).
- Statystyki policyjne: <https://statystyka.policja.pl/st/przestepstwa-ogolem/przestepstwa-kryminalne/zgwalcenie/122293,Zgwalcenie.html> (dostęp: 03.12.2020r.).

Statystyki Urzędu Statystycznego: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/wymiar-sprawiedliwosci/wymiar-sprawiedliwosci/ofiary-gwaltu-i-przemocy-domowej,1,1.html> (dostęp: 03.12.2020r.).

Świądro M, Stelmaszczyk P, Lenart I, Wietecha-Posuszny R (2021). The double face of ketamine - the possibility of its identification in blood and beverages. *Molecules* 26(4): 813

## 9. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej – początki, podstawy i perspektywy

Solid phase microextraction - beginnings, basics, and perspectives

Magdalena Świądro<sup>(1)</sup>, Alicja Chromiec<sup>(1)</sup>, Wietecha-Posłuszny Renata<sup>(1)</sup>, Dominika Dudek<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Pracownia Chemii Sądowej, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

<sup>(2)</sup>Klinika Psychiatrii Dorosłych, Katedra Psychiatrii, Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny, prof. UJ oraz prof. dr hab. med. Dominika Dudek

Magdalena Świądro: magda.swiadro@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: SPME, technika mikroekstrakcji, anality

### Streszczenie

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) to technika ciesząca się coraz większym zainteresowaniem w gronie naukowców ze względu na swoje szerokie zastosowanie – m.in. w analizach klinicznych, toksykologicznych i przemysłowych. Charakteryzuje się ona prostą metodologią, a podstawowym elementem urządzenia do SPME jest włókno, na którego powierzchni następuje adsorpcja analitów. Ekstrakcja SPME ma wiele znaczących zalet w porównaniu do innych, konwencjonalnych metod przygotowania próbek, m.in. krótki czas ekstrakcji analitów, wysoka czułość, możliwość automatyzacji procesu, niewielkie rozmiary włókien oraz – co najistotniejsze – możliwość analizy próbek o bardzo złożonej matrycy. Atrakcyjność tej techniki związana jest także z możliwością pobierania próbek środowiskowych w terenie (powietrze, woda) oraz z mikroinwazyjną analizą *in vivo* (krew, tkanki). Co więcej, istnieje możliwość łączenia SPME m.in. z ultrawysokosprawnymi i czułymi technikami instrumentalnymi, dzięki czemu analizy są szybsze i dokładniejsze, a sam etap przygotowania próbki nie stanowi problemu.

### 1. Wstęp

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. Solid Phase Microextraction, SPME) jest jedną z popularniejszych metod ekstrakcji. Ta metoda została opracowana w 1990 roku przez Catherine L. Arthur oraz Janusza Pawliszyna. Umożliwia ona ekstrakcję ksenobiotyków z różnorodnego materiału biologicznego i jest bardziej „zieloną” alternatywą dla tradycyjnych metod ich wyosabniania. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej polega na wykorzystaniu cienkiego włókna szklanego lub kwarcowego (Rys.1) pokrytego fazą stacjonarną, mającą zdolność do ekstrakcji różnego rodzaju analitów, które mogą znajdować się w fazie stałej, ciekłej i gazowej. Proces ekstrakcji bazuje na adsorpcji analitów z matrycy, a następnie ich desorpcji. Przedrostek mikro- wskazuje na małą w porównaniu do ilości próbki ilość sorbentu (Arthur i Pawliszyn 1990).

Najczęściej podkreślanymi zaletami metody SPME są jej uproszczona procedura, krótki czas ekstrakcji analitów i dostępność włókien o różnej polarności. Co więcej, metoda SPME znacznie ogranicza, a w niektórych przypadkach nawet całkowicie wyklucza konieczność użycia rozpuszczalników organicznych. Z tego powodu metodę SPME zalicza się do metod przyjaznych środowisku. Miniaturyzacja zestawu do ekstrakcji pozwoliła również na znaczne zmniejszenie ilości próbki potrzebnej do przeprowadzenia analizy. Ponadto proponowana technika ekstrakcji daje możliwość analizy materiałów występujących w różnych stanach skupienia – zarówno próbek ciekłych, standardowo poddawanych ekstrakcji, jak i próbek gazowych i stałych. Opisywana metoda pozwala na pobranie próbki *in situ* lub *in vivo*, dzięki czemu czas procedury analitycznej jest krótszy. (Lord i in. 2000).

Kolejną zaletą metody SPME jest możliwość połączenia jej z technikami instrumentalnymi, m.in. z chromatografią gazową, cieczą i elektroforezą kapilarną. Selektywna ekstrakcja analitów ze skomplikowanej matrycy pozwala na wprowadzenie niewielkich ilości próbki do kolumny chromatograficznej albo kapilary, co niweluje prawdopodobieństwo ich zatkania, a także ułatwia

późniejszą analizę wyników. Możliwość desorpcji bezpośrednio w dozowniku chromatografu ogranicza natomiast błędy przypadkowe analizy. Warto wspomnieć też o takich zaletach metody SPME, jak jej prostota, łatwość automatyzacji i stosunkowo niskie koszty aparatury (Lord i in. 2012; Spletelun i in. 2013).

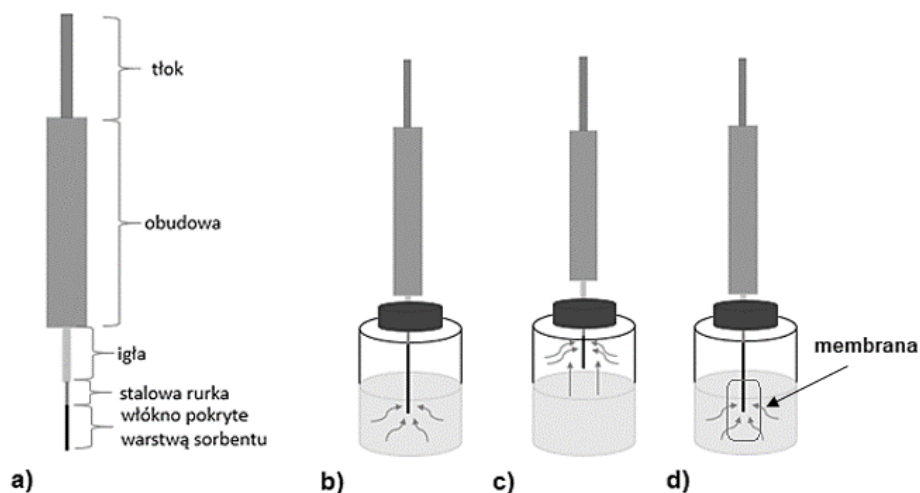
Metoda SPME ma też wady. Największą z nich jest stosunkowo wysoki koszt włókien oraz ograniczony czas ich użytkowania. W niektórych przypadkach może nastąpić degradacja składników próbki w wyniku działania wysokiej temperatury lub sorpcja zanieczyszczeń, co może zaburzyć stan równowagi pomiędzy próbką a sorbentem. Co więcej, metoda SPME nie pozwala na ekstrakcję związków silnie związanych z matrycą próbki. Ponadto – mimo jej selektywności – problemem może być nieodwracalne wiązanie się z fazą stacjonarną niektórych składników matrycy (Boyaci i in. 2015; Bojko i in. 2012).

## 2. Procedura

Metoda SPME składa się z dwóch podstawowych etapów. W pierwszym z nich dochodzi do adsorpcji analitów obecnych w próbce przez sorbent znajdujący się na powierzchni włókna. Zazwyczaj proces mikroekstrakcji uznaje się za zakończony, kiedy osiągnięta zostaje równowaga stężeń analitów pomiędzy matrycą próbki a fazą stacjonarną włókna.

Obecnie można wyróżnić trzy tryby adsorpcji włókien SPME. Początkowo mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej przeznaczona była wyłącznie do analizy próbek ciekłych, a włókno wprowadzane było bezpośrednio do próbki (*DI-SPME – Direct Immersion - Solid Phase Microextraction*). W 1993 roku po raz pierwszy przeprowadzono mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (*HS-SPME – Head Space SPME*) – w tej technice, która znajduje zastosowanie w oznaczaniu związków lotnych, włókno umieszcza się nad próbką. Natomiast kiedy próbka zawiera zarówno nielotne anality, jak i interferenty o dużej masie cząsteczkowej jest możliwe zastosowanie włókien SPME z ochronną membraną (*M-SPME – Membrane - Solid Phase Microextraction*) ograniczającą adsorpcję zanieczyszczeń (Pawliszyn 2012; Lord i in. 2002).

Drugim etapem procesu mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej jest desorpcja związanego analitu. Dużą zaletą SPME jest możliwość wprowadzenia włókna do dozownika chromatografu gazowego. Następuje tam desorpcja termiczna, a substancja oznaczana wędruje ze strumieniem gazu nośnego bezpośrednio do kolumny. Jeżeli oznaczenie wykonywane jest metodą chromatografii cieczowej lub elektroforezy kapilarnej, analit desorbowany jest za pomocą fazy ruchomej lub innego rozpuszczalnika (Lord i in. 2000; Pawliszyn i Chapter 2002). Rysunek 1. przedstawia proces adsorpcji i desorpcji w podziałem na tryby oraz budowę włókna SPME.



**Rys. 1.** Budowa włókna SPME (a), oraz sposoby ekstrakcji: bezpośrednio z próbki (b), z fazy nadpowierzchniowej (c) oraz z membraną (d).

### 3. Zastosowanie metody SPME

W ciągu trzydziestu lat od opisanego przez Pawliszyna i Arthur (Arthur i Pawliszyn 1990) założeń leżących u podstaw mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej ta metoda znalazła zastosowanie do ekstrakcji szerokiego spektrum analitów, oznaczanych w coraz bardziej skomplikowanych matrycach. Początkowo jednak skupiano się na badaniach próbek środowiskowych, głównie wody. Tego też dotyczyła wspomniana pierwsza publikacja, w której autorzy opisali wykorzystanie zaproponowanej metody do oznaczenia wybranych chlorowcopochodnych węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w wodzie. W stosunkowo krótkim czasie (1–2 min) udało się wyekstrahować anality, które następnie poddano termicznej desorpcji w dozowniku chromatografu gazowego. Mimo wąskiego zakresu liniowości i nie do końca zadowalającej precyzji w przypadku niektórych związków, dostrzeżono wielki potencjał tej metody do badania wód gruntowych. Następne badania skupiły się na poszerzeniu gamy analitów i poprawieniu parametrów ekstrakcji (Arthur i in. 1992; Potter i Pawliszyn 1992).

W kolejnych latach pojawienie się nowych sorbentów oraz pogłębienie wiedzy o SPME i o czynnikach wpływających na równowagę próbka – sorbent sprawiły, że podjęto próby ekstrakcji różnorodnych związków z matryc innych niż woda, np. z powietrza (Chai i Pawliszyn 1995). Starano się uprościć procedurę, tak aby możliwe było jej wdrożenie do analiz w warunkach polowych. Ciekawym kierunkiem badań jest też połączenie etapu pobierania próbki z ekstrakcją, tak jak zrobiono to w przypadku adsorpcji z powietrza lotnych związków organicznych wydzielanych przez cytrynę (Fung i in. 2019).

Rozwój SPME otworzył możliwość wykorzystania tej metody do badania produktów spożywczych. Mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej zastosowano jeszcze w latach 90. do analizy próbek ciekłych, np. wina. Te badania skupiły się na oznaczeniu pestycydów najczęściej stosowanych w uprawach winogron w wybranych markach win (Vitalif i in. 1998). Oznaczeniem niektórych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych występujących w żywności zajęli się kilka lat później Martin i Ruiz (Martin i Ruiz 2007). Warto nadmienić, że w tych badaniach wykorzystano metodę SPME w połączeniu z urządzeniem pozwalającym na bezpośrednią ekstrakcję lotnych analitów z próbek stałych (*DED – direct extraction device*). Do wędzonych produktów wprowadzono komorę z umieszczonym w środku włóknem z sorbentem. Dzięki małym otworom w ścianach DED lotne związki mogą się dostawać w pobliże włókna i ulegać adsorpcji. Zastosowanie tego połączenia pozwoliło nie tylko na uproszczenie i skrócenie całej procedury, lecz także na pozostawienie próbki w praktycznie niezmienionym stanie (Martin i Ruiz 2007).

Mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej stosuje się również do ekstrahowania związków naturalnie występujących w żywności lub produktów przemian tych substancji. Opisywana metoda okazuje się w niektórych przypadkach tańszą alternatywą dla tych dotychczas stosowanych w przemyśle spożywczym, a jej wdrożenie pozwala niekiedy na uniknięcie problemów i błędów w oznaczeniach występujących w przypadku innych metod.

Mała ilość próbki konieczna do pojedynczej analizy z wykorzystaniem SPME predestynuje tę metodę do jej wykorzystania w kryminalistyce, w której problemem są często znikome ilości materiału. Jednym z ciekawszych badań z tego zakresu było jej zastosowanie do wykrywania substancji wybuchowych i narkotyków w sposób analogiczny do tego, w jaki robią to psy policyjne. Są one szkolone do reagowania na te związki zapachowe, których obecność jest charakterystyczna dla danego materiału, a nie – na ich główne składniki. Autorzy publikacji zaproponowali więc wykorzystanie techniki HS-SPME do tych właśnie substancji (Lai i in. 2008). Wariantu *Head Space* metody SPME używa się również w analizach pozostałości płynów łatwopalnych (Grafit i in. 2018). Stosunkowo nowym kierunkiem badań jest natomiast zastosowanie opisywanej metody do ekstrakcji z tkanin lotnych związków organicznych pochodzących z perfum. Wyniki otrzymane dzięki takiej analizie mogłyby stanowić dodatkowy dowód w sprawach, w których doszło do bezpośredniego kontaktu między ofiarą i sprawcą przestępstwa i w których występuje prawdopodobieństwo przeniesienia pomiędzy nimi wspomnianych składników zapachowych (Gherghel i in. 2018).

Kolejną dziedziną, w której zastosowanie znalazła mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, jest toksykologia. Także w tym wypadku dużą zaletą SPME jest zużycie małej ilości próbki. Metoda SPME pozwala na ekstrakcję wolnej frakcji leku lub narkotyku, czyli tej jego części, która rzeczywiście wpływa na organizm. Opracowuje się zarówno procedury przeznaczone dla jednego związku i jego metabolitów, jak i obejmujące kilka, a nawet kilkanaście substancji różniących się budową i mechanizmem działania (Gentili i in. 2016; Brown i in. 2007). Co więcej metoda SPME znalazła zastosowanie w analizie materiałów post-mortem. Dobór odpowiednich warunków umożliwia wyizolowanie substancji o bardzo zróżnicowanej budowie i polarności z takich materiałów biologicznych, jak krew czy szpik kostny (Majda i in 2020).

W ostatnich latach dzięki opracowaniu biokompatybilnych sorbentów badane są możliwości zastosowania SPME do badań *in vivo*. Dzięki temu, że nie jest to metoda ekstrakcji wyczerpującej, jest możliwe jej wykorzystanie do badań śródoperacyjnych, a także śledzenie z jej wykorzystaniem przemian biochemicznych, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych zachodzących w organizmach żywych (Roszkowska i in. 2018). Szczegółowe informacje o niektórych z wspomnianych badań umieszczono w Tab.1.

**Tab. 1.** Przykłady wykorzystania ekstrakcji SPME.

Anality	Matryca	Procedura SPME	Metoda oznaczenia	Wyniki/wnioski
chlorowcopochodne wybranych węglowodorów alifatycznych (Arthur i Pawliszyn 1990)	woda	DI-SPME; 171±5 µm poliimid; t <sub>ads</sub> = 2 min, termodesorpcja	GC-ECD	- niezadowalająca precyzja oraz wąski zakres liniowości. Powodem może być zbyt gruba warstwa sorbentu i krótki czas adsorpcji.
chlorowcopochodne wybranych węglowodorów aromatycznych (Arthur i Pawliszyn 1990)	woda	DI-SPME; stopiona krzemionka; t <sub>ads</sub> = 1 min; termodesorpcja	GC-FID	- zadowalające wyniki mimo zastosowania jako sorbentu krzemionki; - autorzy sugerują przydatność tej metody do oznaczania lotnych węglowodorów aromatycznych.
Pestycydy (Vitalif i in. 1998).	wino	DI-SPME; t <sub>ads</sub> = 30 min, termodesorpcja w 250°C, t <sub>des</sub> = 3 min	GC-MS	- możliwe wykrycie analitów w stężeniu µg/l; - słaba precyzja zwłaszcza na niskich poziomach stężeń; - metoda określana jako tańsza, szybsza i prostsza od wcześniej stosowanych
Narkotyki (Brown i in. 2007)	mocz	PDMS, t <sub>ads</sub> = 20 min, 90°C;	GC-MS	- metoda pozwala oznaczyć wybrane narkotyki z



Anality	Matryca	Procedura SPME	Metoda oznaczenia	Wyniki/wnioski
		termodesorpcja $t_{des} = 1 \text{ min}$ , $225^{\circ}\text{C}$		zadowalającą w przypadku próbek biologicznych precyzją i dokładnością; - LOD = 0,1-0,5 $\mu\text{g/ml}$
lotne związki organiczne wydzielane przez cytrynę (Fung i in. 2019).	powietrze	DI-SPME; 75 $\mu\text{m}$ CAR/PDMS; $t_{ads} = 5 \text{ min}$ $t_{des} = 5 \text{ min}$	GC-MS	- zastosowanie adsorpcji aktywnej pozwala na poprawę precyzji i czułości; - procedura nie wymaga specjalnego przygotowania próbki ani otoczenia tak jak wcześniej stosowane rozwiązania.
Leki psychotropowe (Majda i in. 2020)	Krew i szpik kostny	nanowłókno $t_{ads} = 60 \text{ min}$ ; $t_{des} = 30 \text{ min}$	LC-MS	- otrzymano powtarzalne wyniki oznaczeń na wyższych poziomach stężeń,

#### 4. Podsumowanie

Metoda SPME, której początki sięgają lat 90., jest niewątpliwie jedną z najpopularniejszych technik ekstrakcji. Polega ona na adsorpcji analitów na włóknie pokrytym sorbentem. Zależnie od właściwości ekstrahowanych związków stosuje się jeden z jej trzech wariantów: ekstrakcję bezpośrednio z próbki, z fazy nadpowierzchniowej lub z zastosowaniem membrany. Ze względu na szereg zalet tej metody – m.in. prostą metodologię, krótki czas ekstrakcji i możliwość połączenia jej praktycznie z każdą techniką instrumentalną – używa się jej dzisiaj w rutynowo wykonywanych analizach klinicznych, przemysłowych i środowiskowych, a dzięki ciągłemu rozwojowi faz stacjonarnych możliwych do zastosowania możliwe staje się wyizolowanie następných związków z coraz bardziej skomplikowanych matryc.

#### 5. Podziękowania

Magdalena Świądro dziękuje za dofinansowanie w ramach projektu InterDokMed numer POWR.03.02.00-00-I013/16 (studia doktoranckie). The Author gratefully acknowledge the Ministry of Science and Higher Education, National Science Centre, Poland for financial support (R. Wietecha-Posuszny, Sonata Bis 6, no. 2016/22/E/ST4/00054).

#### 6. Literatura

- Arthur CL, Killam LM, Buchholz KD, Pawliszyn J, Berg JR (1992) Automation and optimization of Solid-Phase Microextraction, *Analytical Biochemistry*, 64, 1960-1966.
- Arthur CL, Pawliszyn J (1990) Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Analytical Chemistry* 62, 2145–2148.
- Bojko B, Cudjoe E, Gómez-Ríos GA, Gorynski K, Jiang G, Reyes-Garcés N, Risticovic S, Silva EAS, Togunde O, Vuckovic D, Pawliszyn J (2012) SPME - Quo vadis? *Analytica Chimica Acta* 750, 132-151.

- Boyaci E, Rodríguez-Lafuente Á, Gorynski K, et al. (2015) Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica Chimica Acta*, 873, 14-30.
- Brown SD, Rhodes DJ, Pritchard BJ (2007) A validated SPME-GC-MS method for simultaneous quantification of club drugs in human urine, *Forensic Science International* 171, 142-150.
- Chai M, Pawliszyn J (1995) Analysis of Environmental Air Samples by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 29, 693-701.
- Fung AG, Yamaguchi MS, McCartney MM, Aksenov AA, Pasamontes A, Davis CE (2019) SPME-based mobile field device for active sampling of volatiles, *Microchemical Journal*, 146, 407-413.
- Gentili S, Mortali C, Mastrobattista L, Berretta P, Zaami S (2016) Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 282-287.
- Gherghel S, Morgan RM, Arrebola-Liébanas J, et al. (2018) Development of a HS-SPME/GC-MS method for the analysis of volatile organic compounds from fabrics for forensic reconstruction applications, *Forensic Science International*, 290, 207-218.
- Grafit A, Muller D, Kimchi S, Avissar YY (2018) Development of a Solid-phase microextraction (SPME) Fiber protector and its application in flammable liquid residues analysis, *Forensic Science International*, 292, 138-147.
- Lai H, Guerra P, Joshi M, Almirall JR (2008) Analysis of volatile components of drugs and explosives by solid phase microextraction-ion mobility spectrometry. *Journal of Separation Science*, 31, 402-412.
- Lord H, Bojko B (2012) 10 - Drug Analysis by SPME, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 335-382.
- Lord H, Pawliszyn J (2000) Microextraction of Drugs, *Journal of Chromatography A* 902, 17-63.
- Majda A, Mrochem K, Wietecha-Posłuszny R, Zapotoczny Sz, Zawadzki M (2020) Fast and efficient analyses of the post-mortem human blood and bone marrow using DI-SPME/LC-TOFMS method for forensic medicine purposes, *Talanta* 209,120533.
- Martin D, Ruiz J (2007) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid matrixes by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device, *Talanta*, 71, 751-757.
- Pawliszyn J (2012) Theory of Solid-Phase Microextraction - *Handbook of Solid Phase Microextraction* 13-59.
- Potter DW, Pawliszyn J (1992) Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 625, 247-255.
- Roszkowska A, Tascon M, Bojko B, et al. (2018) Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for in vivo SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue, *Talanta*, 183, 304-310.
- Spietelun A, Marcinkowski Ł, de la Guardia M, Namieśnik J (2013) Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *Journal of Chromatography A*, 321, 1-13.
- Vitalif M, Guidotti M, Giovanazzo R, Cedronet O (1998) Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Additives & Contaminants*, 15, 280-287.

## 10. Novel "turn-on" fluorescent probe for the detection of hypochlorous acid - synthesis and preliminary study

Nowy fluorescencyjny próbnik typu "turn-on" do detekcji kwasu chlorowego (I) - synteza i badania wstępne

Świerczyńska Małgorzata, Podsiadły Radosław

Institute of Polymer and Dye Technology, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology  
Science tutor: Radosław Podsiadły, PhD, DSc

Świerczyńska Małgorzata: malgorzata.swierczynska@dokt.p.lodz.pl

Keywords: pro-fluorescence probe, fluorescence, HOCl detection, fast response

### Abstract

Hypochlorous acid (HOCl) is one of the most important biologically reactive oxygen species (RSO) that plays an important role in immune systems, including defense against pathogens. Many scientific studies indicate that inappropriate HOCl production causes many related diseases, including arthritis neurodegenerative diseases and cardiovascular diseases. In living organisms, chloric acid (HOCl) occurs mainly in the mitochondria, where it is biologically formed as a result of the catalytic action of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in the reaction of chloride ions and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Its complex role in cell signaling pathways and high reactivity make it difficult to study its *in vivo* development and effects on cell function. As part of the research, a new, stable probe was designed and synthesized that can be potentially used in biological and biomedical research for *in vivo* fluorescence HOCl imaging. In a broader perspective, the proposed research is extremely important from a medical point of view and to explain the pathogenesis of diseases related to the overproduction of HOCl by myeloperoxidase.

### 1. Introduction

Reactive oxygen species are radicals, ions, or molecules that have a single unpaired electron in their outermost electron shell. Due to this nature, ROS are highly reactive. ROS can be divided into two groups: oxygen free radicals and non-radical ROS. Free oxygen radicals include superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), nitric oxide ( $NO^{\cdot}$ ), organic radicals ( $R^{\cdot}$ ), alkoxy radicals ( $RO^{\cdot}$ ), peroxide radicals ( $ROO^{\cdot}$ ), thiyl radicals ( $RS^{\cdot}$ ), sulfonyl radicals ( $ROS^{\cdot}$ ) and thyl peroxide radicals ( $RSOO^{\cdot}$ ). Non-radical ROS include hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), organic hydroperoxides (ROOH), hypochloride (HOCl), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), ozone / trioxide ( $O_3$ ), peroxyxynitrite ( $ONOO^-$ ), nitrogen dioxide ( $N_2O_2$ ), nitronium ( $NO_2^+$ ), nitrocarbonate anion ( $O_2=NOCO_2^-$ ), nitrosoperoxy carbonate anion ( $O=NOOCO_2^-$ ), and highly reactive carbonyl compounds derived from lipids or carbohydrates (Liou and Storz 2010).

In general, the reducing environment inside the cells helps prevent free radical damage. This reducing environment is maintained by the action of enzymes and antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), glutathione, glutathione peroxidase, catalase, ascorbate (vitamin C),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), and thioredoxin. Changes in the redox state and depletion of antioxidants through exposure to oxidants lead to oxidative stress and consequent oxidative damage. Various enzymatic and non-enzymatic processes can generate ROS in mammalian cells. The most important sources are reactions catalyzed by the enzymes nicotinamide adenine dinucleotide oxidase (NADPH), xanthine oxidoreductase (XOR) and myeloperoxidase (MPO) (Bayr 2005).

The consequence of cellular metabolism is oxidative stress, i.e. an imbalance in pro-oxidative / antioxidant homeostasis, leading to the formation of reactive oxygen species (ROS), which play a key role in many physiological processes, and thus in the functioning of living organisms (Barnham et al. 2014). ROS are known to have both positive and negative effects on cells. As a result of the excessive production of ROS and the depletion of antioxidant reserves by the body. ROS can interact with a number of cellular components, including DNA, lipids, and proteins. Proteins are oxidized,

which modifies their structure and disrupts their function. It also causes lipid oxidation as well as damage to nucleic acids and thus destroys cells (Łukaszewski et al. 2007).

Hypochlorous acid (HOCl) is one of the most important biologically reactive oxygen species (ROS), playing an important role in the immune system, including protection against invasive pathogens and their elimination (Xu et al. 2013). Due to a pKa of 7.53 (25 ° C), both HOCl and deprotonated  $\text{OCl}^-$  are present at physiological pH. Under existing pathological conditions, its concentration in body fluids can reach 200  $\mu\text{M}$  (Gebicka and Banasiak, 2012). In living organisms, hypochlorous acid occurs mainly in the mitochondria, where it is formed biologically as a result of the catalytic activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in the reaction of chloride ions and hydrogen peroxide (Liu et al. 2018). The production of hypochlorous acid is an integral part of the ability of cells to fight a wide variety of pathogens and also poses a significant risk of exposing the host cell to the same processes that are used to destroy invading microorganisms (Ren et al. 2018). Uncontrolled production of HOCl can lead to disruption of redox homeostasis, which can cause oxidative damage through oxidation or chlorination of biomolecules. HOCl readily reacts with many biological molecules, especially with thiols, thioleter, heme proteins, and amino groups, and can damage target cells and tissues (Yan et al. 2018). Abnormal and overproduction of HOCl can cause tissue damage and cause a number of related diseases, including arthritis, kidney disease, lung injury, cardiovascular disease, asthma, and even cancer (Zhang et al. 2017; Yuan et al. 2015; Pattison and Davies 2001).

It is very important to understand the role of HOCl in cells and its relationship to diseases. Today, the availability of selective and sensitive pro-fluorescent probes that can provide important information about the physiological and biochemical properties of living cells and tissues has opened up new horizons in life sciences. Until recently, real-time monitoring of hypochlorous acid levels in biological systems was difficult due to the lagged response time and insufficient sensitivity of the current fluorescent probes. To solve this problem, new types of sensitive HOCl groups are being developed. Due to their selectivity, high sensitivity and short response time, fluorescent probes are a powerful tool for the detection of reactive oxygen species, including hypochlorous acid (Zhu et al. 2018).

As a strong oxidant with a broad spectrum of reactivity with many biomolecules, HOCl is one of the most mysterious reactive oxygen species in biology (Hu et al. 2016). Due to its low concentration, strong oxidizing properties and short lifetime, effective tools for detecting HOCl at the subcellular level remain a significant challenge for scientists. The small number of suitable fluorescent probes for the selective and sensitive detection of HOCl hampers progress in understanding its role in various biological processes. To meet the requirements of complex biological assays, in particular for quantitative detection in cells, highly versatile and robust HOCl probes with high selectivity and a rapid response must be developed (Yue et al. 2016).

Fluorescent probes are recognized as extremely sensitive HOCl detection tools for use in biomedical and clinical research. Easy operation, quick response, high sensitivity with a low limit of detection, real-time analysis and easier visualization compared to conventional methods are the great advantages of the probes (Chu et al. 2020). In most cases, the action of probe for HOCl is based on its oxidation to the corresponding fluorescent product. The analyte can be determined by the change in spectroscopic properties that occur after its reaction with fluorogenic probes. (Haugland 2005; Chen et al. 2006). To understand the mechanism and to correctly interpret the experimental data, it is very important to define the products formed in this process (Wardman 2007).

Although many fluorescent probes for detecting HOCl have been described in recent years, only a small number have shown practical utility in biological research due to common problems with sensitivity, chemical stability and / or photostability (Hu et al. 2014).

The above considerations inspired us to design and synthesize a selective probe for HOCl that could help clarify its role in biology.

## 2. Material and Methods

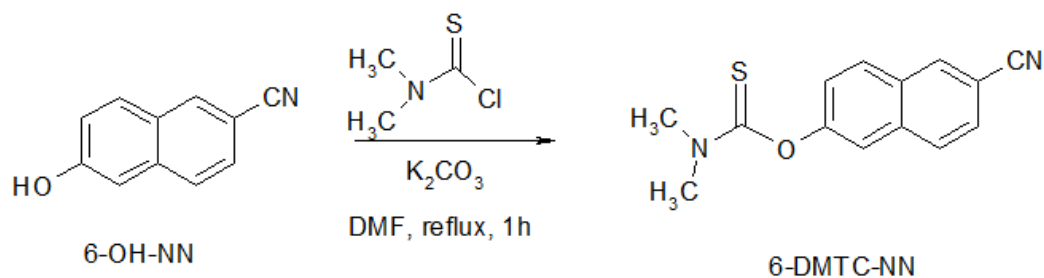
Unless otherwise stated, solvents and reagents were of analytical grade from commercial suppliers and were used without further purification. The progress of the reaction was monitored by

thin-layer chromatography (TLC; Merck 60F-254). Silica gel 60 (70–200 mesh, Sigma) was used for general column chromatography purification purpose. The purity of the synthesized compound was confirmed by high performance liquid chromatography on a Shimadzu apparatus equipped with a diode array detector. Electronic absorption spectra were measured with a Jasco V-670 spectrophotometer. The steady-state emission spectra were recorded with a FLS-920 spectrofluorimeter (Edinburgh Instruments, UK). All spectroscopic measurements were performed in phosphate buffer. A stock solution of compound of 6-DMTC-NN was prepared by dissolving compound in acetonitrile. Fluorescence and absorption spectra were recorded in phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) containing acetonitrile (10%). The stock solution of HOCl was prepared freshly each day and the concentration was determined by spectrophotometry, using the extinction coefficient value of  $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 292 nm, in 0.1 M NaOH.

6-DMTC-NN was readily prepared in one step method. Briefly, to a solution of 6-cyano-2-naphthol (254 mg, 1.5 mmol) in 3 mL DMF, *N,N*-dimethylthiocarbamoyl chloride (352 mg, 3 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (456 mg, 3.3 mmol) were added. The mixture was stirred at 65–70 °C. After stirring for 4h, the mixture was cooled down, and the mixture was poured into ice water (100 ml) and filtered to afford product 6-DMTC-NN (327 mg, yield 85%).

### 3. Results

Many fluorescent probes for HOCl detection have been developed. However, most of them were obtained in a multistep synthesis with a low yield, which limits their application in biological research. Presented in this paper probe 6-DMTC-NN was synthesized in a simple one-step way (Fig. 1.) from commercially available chemicals with good reaction yield.

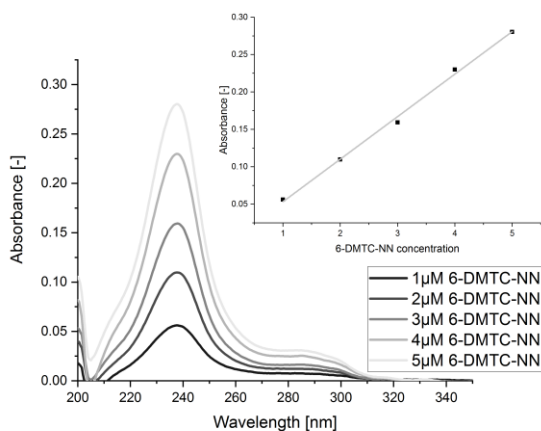


**Fig. 1.** Synthesis route of 6-DMTC-NN.

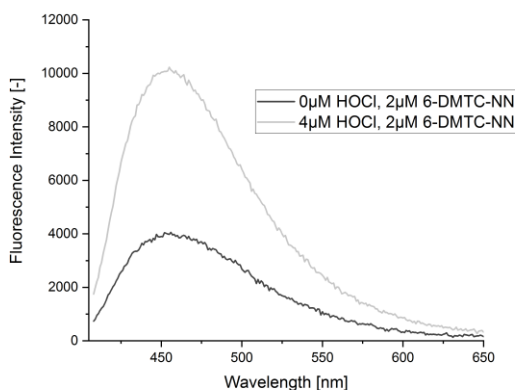
During the probe design, the properties of the fluorophore, i.e. spectral characteristics, commercial availability and easy functionalization, were taken into account. Therefore, our probe is based on 6-cyano-2-naphthol as a signaling unit which was integrated with an *N,N*-dimethylthiocarbamoyl as a recognition group for the detection of hypochlorite.

The electronic absorption spectrum of 6-DMTC-NN in phosphate buffer (0.1M, pH 7.4) is presented in Figure 2. 6-DMTC-NN has the main absorption band at 238 nm with the shoulder around 285 nm. The value of the molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) for the 6-DMTC-NN probe is  $56800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . 6-Cyano-2-naphthol conjugated with *N,N*-dimethylthiocarbamoyl moiety is weakly fluorescent (Fig. 3.), while it shows a response of changing the fluorescence intensity in the presence of hypochlorous acid. The probe consists of a group of *N,N*-dimethylthiocarbamoyl that acts as a fluorophore mask based on an intramolecular charge transfer (ICT) mechanism. After addition of HOCl 6-cyano-2-naphthol (Fig. 4.) is released and fluorescence is “turn on”.

The HOCl concentration dependent fluorescence response of 6-DMTC-NN with HOCl was then tested. The reactivity of the probe was tested by adding various concentrations of HOCl to the buffer containing the probe. Fluorescence titration experiments showed that the fluorescence intensity increased after the addition of HOCl (0–5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5a.). After the addition of HOCl, the fluorescence intensity at 450 nm gradually increased and reached a plateau after the addition of 4  $\mu\text{M}$  of HOCl (Fig. 5b.)

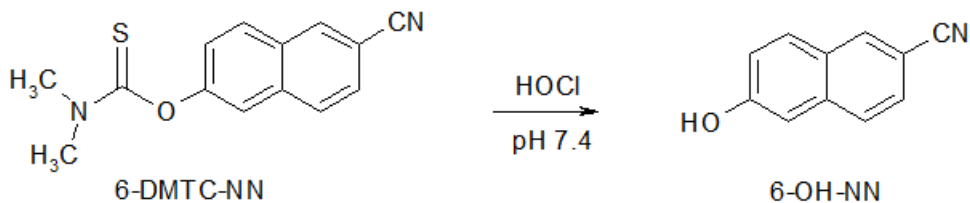


**Fig. 2.** a) Electronic absorption spectra of 6-DMTC-NN. The inset shows the dependence of the 6-DMTC-NN probe absorbance ( $\lambda_{\max}$  238) on its concentration in the buffer.

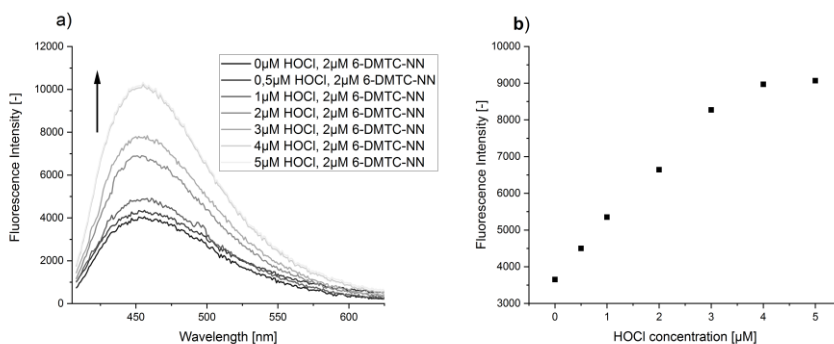


**Fig. 3.** Emission spectra of 6-DMTC-NN (2 μM) before and after addition of HOCl (4 μM). Spectra were recorded after 10 min of incubation in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing acetonitrile (10%).

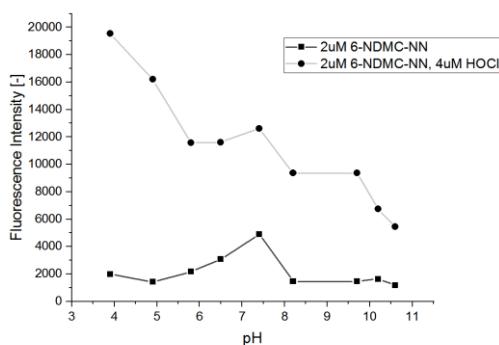
We tested the probe of 6-DMTC-NN response of HOCl under acidic, neutral and alkaline conditions. To test the effect of pH on HOCl detection by 6-DMTC-NN, the probe was incubated in buffers of different pH values in the absence or presence of HOCl. The results reveal that the pH value of solution has a notable influence on the probe response to HOCl. As shown in Figure 6, a slight increase in fluorescence was observed at pH 6.5-7.4 in the absence of HOCl. In the presence of HOCl in the pH range 3.5-4, the corresponding product showed the strongest enhancement of fluorescence (Fig. 6.). As the pH value increased, the fluorescence decreased. This means that the probe is pH dependent for the detection of HOCl.



**Fig. 4.** Proposed mechanism for the response of 6-DMTC-NN to HOCl.



**Fig. 5.** a) Fluorescence spectra of 6-DMTC-NN (2 μM) in the presence of various concentrations of HOCl (0-5 μM) in phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) at room temperature ( $\lambda_{EX}$ : 330 nm); (b) Changes in the fluorescence intensity of 6-DMTC-NN (2 μM) at 450 nm in the presence of various concentrations of HOCl (0-5 μM).



**Fig. 6.** Fluorescence intensities of 6-DMTC-NN (2 μM) in the absence and the presence of HOCl (4 μM) in aqueous solution containing acetonitrile (10%) at various pH.

#### 4. Discussion and conclusions

The main goal of this paper was to design and synthesize a new probe that could potentially be used in biological and biomedical research for *in vivo* HOCl fluorescence imaging. As part of the research, a simple 6-DMTC-NN fluorescent probe was developed. The probe consists of the fluorophore 6-cyano-2-naphthol connected with an *N,N*-dimethylthiocarbamoyl trigger that reacts with HOCl. The *N,N*-dimethylthiocarbamoyl group efficiently suppresses fluorescence through the intramolecular charge transfer (ICT) mechanism. The experimental results presented here indicate that the probe is an efficient tool for detection of HOCl.

In conclusion, we synthesized a simple 6-DMTC-NN fluorescent probe for the detection of HOCl. 6-DMTC-NN can be obtained in a one-step synthesis. Our research confirms that 6-DMTC-NN acts as a practical fluorescent probe which is characterized by a quick response and high sensitivity to HOCl. Importantly, DMTC-NN has the potential to find application in biological systems for the tracking and imaging of hypochlorous acid.

#### 5. References

- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2014) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 205–214.  
 Bayr H (2005) Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* 33: 498–501.

- Chen X, Sun M, Ma H. (2006) Progress in Spectroscopic Probes with Cleavable Active Bonds. *Current Organic Chemistry* 10: 477–489.
- Chu CJ, Wu GS, Ma HI, Venkatesan P, Thirumalaiivasan N, Wu SP, (2020) A fluorescent turn-on probe for detection of hypochlorous acid and its bioimaging in living cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 233: 118234.
- Gebicka L, Banasiak E, (2012) Hypochlorous acid-induced heme damage of hemoglobin and its inhibition by flavonoids. *Toxicology in Vitro* 26: 924–929.
- Haugland RP (2005) *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*. 10th ed. Molecular Probes: Eugene. OR.
- Hu JJ, Wong NK, Gu Q, Bai X, Ye S, Yang D (2014) HKOCl-2 Series of Green BODIPY-Based Fluorescent Probes for Hypochlorous Acid Detection and Imaging in Live Cells. *Organic Letters* 16(13): 3544–3547.
- Hu JJ, Wong NK, Lu MY, Chen X, Ye S, Zhao AQ, Yang D (2016) HKOCl-3: a fluorescent hypochlorous acid probe for live-cell and in vivo imaging and quantitative application in flow cytometry and a 96-well microplate assay. *Chemical Science* 7(3): 2094–2099.
- Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 44(5): 479–496.
- Liu Z, Li G, Wang Y, Li J, Mi Y, Guo L, Wu Y (2018) A novel fluorescent probe for imaging the process of HOCl oxidation and Cys/Hcy reduction in living cells. *RSC Advances* 8(17): 9519–9523.
- Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J, Wawer I, Łącki J, Śliwińska-Stańczyk P (2007) Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 45: 284–289.
- Pattison DI, Davies MJ (2001) Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chemical Research in Toxicology* 14(10): 1453–1464.
- Ren M, Zhou K, He L, Lin W (2018) Mitochondria and lysosome-targetable fluorescent probes for HOCl: recent advances and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B* 6(12): 1716–1733.
- Wardman P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine* 43: 995–1022.
- Xu Q, Lee KA, Lee S, Lee KM, Lee WJ, Yoon J (2013) A Highly Specific Fluorescent Probe for Hypochlorous Acid and Its Application in Imaging Microbe-Induced HOCl Production. *Journal of the American Chemical Society* 135(26): 9944–9949.
- Yan L, Hu C, Li J (2018) A fluorescence turn-on probe for rapid monitoring of hypochlorite based on coumarin Schiff base. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (5568): 1-8.
- Yuan L, Wang L, Agrawalla BK, Park SJ, Zhu H, Sivaraman B, Chang YT (2015) Development of Targetable Two-Photon Fluorescent Probes to Image Hypochlorous Acid in Mitochondria and Lysosome in Live Cell and Inflamed Mouse Model. *Journal of the American Chemical Society* 137(18): 5930–5938.
- Yue Y, Huo F, Yin C, Escobedo JO, Strongin RM (2016) Recent progress in chromogenic and fluorogenic chemosensors for hypochlorous acid. *The Analyst* 141: 1859–1873.
- Zhang YR, Liu Y, Feng X, Zhao BX (2017) Recent progress in the development of fluorescent probes for the detection of hypochlorous acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* 240: 18–36.
- Zhu H, Zhang Z, Long S, Du J, Fan J, Peng X (2018) Synthesis of an ultrasensitive hkocY-derived fluorescent probe for detecting HOCl in live cells. *Nature Protocols* 240: 2348-2361.



## 11. Recent development of a "turn-on" fluorescent probes for the detection of hypochlorous acid

Najnowsze fluorescencyjne sondy typu „turn on” do wykrywania kwasu chlorowego (I)

Świerczyńska Małgorzata, Podsiadły Radosław

Institute of Polymer and Dye Technology, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology  
Science tutor: Radosław Podsiadły, PhD, DSc

Świerczyńska Małgorzata: malgorzata.swierczynska@dokt.p.lodz.pl

Keywords: pro-fluorescence probe, HOCl detection, fluorescence, fast response

### Abstract

Hypochlorous acid (HOCl) as one of the most important reactive oxygen species (ROS), plays an important role in various physiological and pathological processes. However, incorrectly or abnormal levels of HOCl are associated with many diseases. While the production of HOCl by myeloperoxidase (MPO) is beneficial in terms of the immune response to invading pathogens, there is considerable evidence that inappropriate stimulation of HOCl formation by MPO (wrong site, wrong timing, excessive levels) can damage the host cell. Oxidizing hypochlorous acid derived from MPO is involved in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory conditions. Therefore, it is very important to develop a fluorescent probe to detect HOCl. For this purpose, in the last decade, many fluorescent probes have been developed and utilized for the detection of HOCl *in vitro* and *in vivo* settings. Due to the limitations of the currently used methods of monitoring the formation of hypochlorous acid, it is necessary to develop an appropriate method to test the reactivity of selected fluorescent probes towards MPO. In this review, we summarized the recent work on the HOCl probes. Article includes design strategies and mechanisms to detect HOCl.

### 1. Introduction

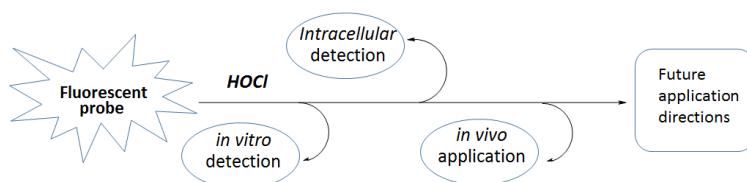
Luminogenic and fluorogenic probes are most commonly used to detect ROS in living cells and tissues. They are easy to apply using a fluorimeter, microscope, plate reader and flow cytometer. In addition, fluorescence microscopy opens up possibilities to visualize cellular ROS production in space-time. Thus, there is need for fluorescent probes with excellent sensitivity and selectivity for the detection of specific ROS in living cells and *in vivo*. Much effort has been made in the last decade to develop small molecule fluorogenic probes for the detection of HOCl to provide valuable molecular tools for explanation the role of HOCl in ROS-related diseases (Gao et al. 2019).

Pro-fluorescent probes are recognized as the extremely sensitive HOCl detection tools used in biomedical and clinical research. Fast response, easy operation, real-time analysis high sensitivity with a low limit of detection and easier visualization compared to conventional methods are the great advantages of these probes (Chu et al. 2020). In most cases, oxidation of the probe leads to the corresponding fluorescent product. Defining the basic products of the process for understanding the mechanism and properly interpreting the experimental data is of paramount importance. The analyte can be determined by the change in the spectroscopic properties associated with the fluorescent probes upon reaction with the analytes (Wardman 2007).

Fluorophores are always present in chemical biology. In this review, we do not intend to discuss all of the reported HOCl probes, but rather identify several classes of representative fluorescent HOCl probes based on their detection mechanisms, their design strategies and chemical properties.

Due to the important role played by HOCl in living cells and tissues, it is very important to detect HOCl *in vitro* and *in vivo*, which allow the interpretation of many biological phenomena (Fig. 1.). Today, fluorescent probes are used in a wide range of biomedical applications such as pharmaceutical research, clinical diagnostics, and high-throughput screening (Warrier and Kharkar 2014). Compared to other traditional sensors, fluorogenic probes have many advantages, such as high

sensitivity, short response time and ease of use. More importantly, in combination with high-resolution confocal microscopy, fluorescence probes enable direct visualization of dynamic HOCl formation in living cells, tissues and animals with high levels of temporal and spatial resolution. Despite important advances in the field of HOCl detection, there are still some problems and challenges. First, so far only a limited number of reaction groups have been developed that are selective for HOCl. In particular, although a significant number of fluorescent probes for HOCl have been designed on the basis of their strong oxidizing properties, other ROS / RNS, especially peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), have comparable oxidation capacity and thus interfere with the detection of HOCl. Second, pro-fluorescent near infrared (NIR) type probes are rare due to the lack of NIR fluorophores that are stable in the presence of HOCl. Moreover, the practical applications of probes developed to detect HOCl-related diseases have not been fully explored (Wu et al. 2019; Hu et al. 2016).



**Fig. 1.** The way from the synthesis of the fluorescent probe for future applications.

## 2. Important factors in the design of probes for the detection of HOCl

### 2.1 Buffers and co-solvents

Buffers such as phosphate buffered saline (PBS), tris-(hydroxymethyl)- aminomethane (Tris), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), and others are often used in fluorescent chemosensory systems to imitate physiological environment. It is worth noting, however, that HEPES is also oxidized by HOCl and as a result is not a good choice for use in <sup>-</sup>OCl detection systems. Since most fluorescent probes have poor solubility in pure aqueous solutions, organic solvents such as *N,N*-dimethyl-formamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), acetonitrile and ethanol are often used as co-solvents. However, DMSO is not a suitable co-solvent for the detection of HOCl as it is easily oxidized by it. Moreover, in biochemical studies, the concentration of organic co-solvents should be as low as possible, because they do not occur in living organisms, and the use of high concentrations of organic solvents usually disturbs the functioning of biomolecules (Xing et al. 2016; Peng et al. 2014).

### 2.2 Fluorophores

The oxidative susceptibility of the fluorophores should be taken into account when probes are used in ROS / RNS detection, especially for highly reactive oxygen species such as HOCl and ONOO<sup>-</sup>. It is very difficult to select the appropriate pro-fluorescent probes for HOCl detection in biological studies. Fortunately, most of the fluorogenic probes for the detection of HOCl have been developed around several classes of "core" fluorophores, with the different HOCl sensitive triggers (Ma et al. 2020).

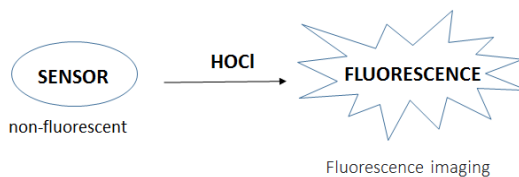
It is generally accepted that "turn on" probes are better than "turn off" probes as the latter are more easily interfered with by background fluorescence resulting in poor sensitivity and reliability. In addition, compared to those that emit in the visible range, NIR fluorogenic probes have many beneficial features, such as less minimal fluorescence interference and light scattering, less photodamage and deeper tissue penetration (Guo et al. 2014).

### 2.3 Receptors for HOCl

The main component of the probes is the receptor, in which the selective binding of the analyte takes place. Due to this specific reaction, it is possible to detect the analyte qualitatively and quantitatively by means of the spectral properties of the product, which differ significantly from those

of the probe itself (Fig. 2.). The effectiveness of a fluorogenic probe depends on the selectivity of the receptor for a given analyte in a complex system and appropriate modulation of the spectral properties of the fluorophore (Vegasna 2014).

Probes usually consist of three different groups: (1) a spectroscopic group or signaling group, the properties of which should change upon reaction with the analyte; (2) a marking or recognition moiety that is responsible for selectively reacting with the analyte; and (3) a suitable link or spacer connecting the two previous groups (sometimes without any link, the two groups are integrated). The detection of the analyte by probes according to the tests is accomplished by one of the following mechanisms: (1) protonation-deprotonation; (2) complexation (including the direct complexity and complexity of crowding out competition); (3) cleavage and covalent bond formation; and (4) redox reaction (Li et al. 2013).

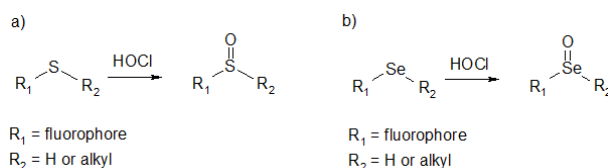


**Fig. 2.** Schematic illustration of turn-on fluorescent probes for HOCl.

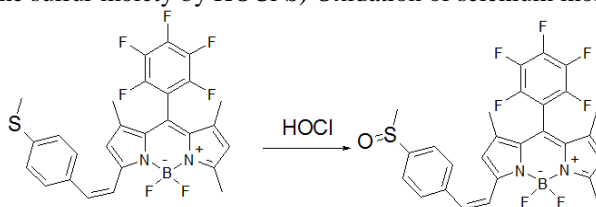
### 3. Classification of probes into HOCl based on their detection mechanisms

#### 3.1 . Sulfur / selenium moiety oxidized by HOCl

The sulfur and selenium moiety are electron donating groups that are easily oxidized by HOCl to form sulfoxides and selenoxides, respectively, which are highly electron withdrawing groups (Fig. 3.). This oxidation enables probes containing sulfur or selenium to useful signal changes in their fluorescence or absorption spectra after reacting with HOCl.



**Fig. 3. a)** Oxidation of the sulfur moiety by HOCl **b)** Oxidation of selenium moiety by HOCl.



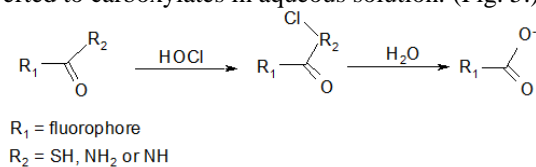
**Fig. 4.** Mechanism of hypochlorite detection.

BODIPYs are characterized by high quantum efficiency and relative insensitivity to the environment. In addition, its low cytotoxicity, polarity and pH insensitivity, and chemical resistance make it ideal for *in vivo* imaging. Kim and Zeng and their research group synthesized a ratiometric fluorescent probe based on the BODIPY fluorophore (Fig. 4.), which can dynamically monitor the concentration of HOCl in living cells. Compared to the other probes described, the above probe showed an obvious change in fluorescence within 30 s of reaction with HOCl. The probe fluorescence intensity increased 7-fold and the detection limit was estimated at 59 nM. The probe also showed excellent photostability. Moreover, the probe showed a high quantum yield of about 0.15 at the

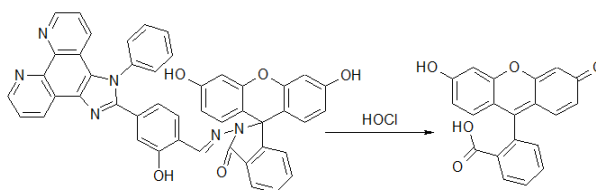
maximum emission wavelength at 619 nm. Experimental results suggest that the probe has low cytotoxicity (Duan et al. 2019).

### 3.2 The chlorination of thioesters and amides by HOCl

As a strong oxidant, HOCl can react with thioesters and amides. Chlorination reaction yields intermediates which are converted to carboxylates in aqueous solution. (Fig. 5.).



**Fig. 5.** The specific chlorination reaction between thiols or amides and HOCl.

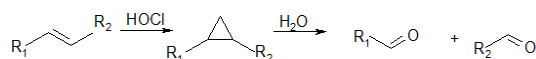


**Fig. 6.** The structure of probe and the proposed mechanism of fluorescence response to HOCl.

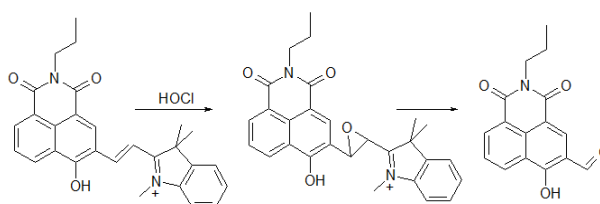
Fluorescent probes based on fluorescein and its derivatives for the detection of HOCl showed excellent photophysical properties - including good photostability and high quantum yield of fluorescence. The Lv group synthesized a "turn on" fluorescent probe which is based on the isomerization of the N = C double bond and the oxidative hydrolysis of the hydrazide (Fig. 6.) The probe is a sensitive and selective for HOCl, and has a short response time. After the addition of hypochlorous acid, the fluorescence at 542 nm can be observed. This probe is capable of imaging exogenous and endogenous HOCl in living cells as well as quantitatively detecting HOCl by flow cytometry. Finally, this probe has a low cytotoxicity and is therefore suitable for practical applications (Zhan et al. 2017).

### 3.3 Oxidation of double bonds

In organic synthesis, olefinic C=C double bonds can undergo oxidative cleavage reaction with HOCl under mild conditions. This results in a variety of double bond cleavage products, including relatively unstable chlorinated compounds, which may be further oxidized to more stable non-chlorinated compounds such as aldehydes and carboxylic acids (Fig. 7.).



**Fig. 7.** HOCl-induced double bond cleavage.



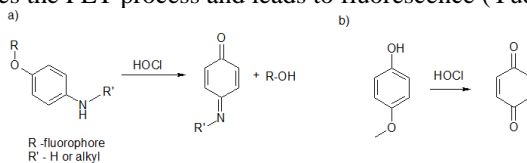
**Fig. 8.** Naphthalimide-based HOCl detection mechanism.

Naphthalimide derivatives are characterized by high sensitivity, good optical parameters, excitation wavelength in the visible light region, and a large Stokes shift. Yin and Huo et al. reported

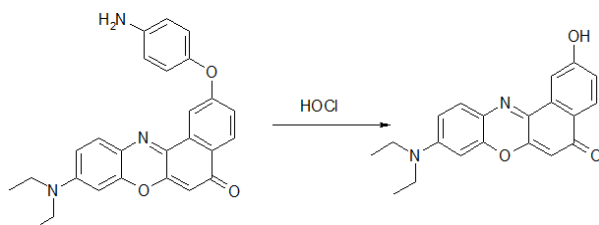
a proportional 1,8-naphthalimide-based fluorescent probe (Fig. 8) that can detect HOCl. Detection is based on intramolecular charge transfer (ICT) with 1,8-naphthalimide as donor and indole iodide as acceptor. The initial probe solution was red, but after the addition of HOCl, the ICT process was terminated, resulting in the disappearance of the red fluorescence and appearance of green fluorescence. The probe showed that the maximum emission wavelength was 620 nm, and there was a large Stokes shift of about 105 nm after reacting with HOCl. The probe was judged to have a detection limit of 53 nM. In addition, the probe was successfully used to monitor HOCl levels in HepG2 cells (Li et al. 2016).

### 3.4 Oxidation of *p*-aminophenol and *p*-methoxyphenol

The specific ability of HOCl to oxidize 4-methoxyphenol, 4-aminophenol and related groups to their corresponding quinones is exploited for the selective detection of HOCl compared to other ROS / RNS by incorporating these and related moieties as functional groups into the molecular structure of the fluorogenic probe. These aromatic groups are electron-rich systems and are easily oxidized to the corresponding quinones. When such moieties are attached to a fluorophore, they quench or reduce the fluorescence intensity in photoinduced electron transfer (PET) processes. After reaction with HOCl electron-deficient quinones are formed or oxidative removal of the quinone occurs. Both of them precludes the PET process and leads to fluorescence (Yudhistira et al. 2019).



**Fig. 9.** a) The oxidation of *p*-aminophenol by HOCl b) The oxidation of *p*-methoxyphenol by HOCl.

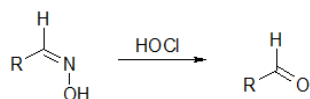


**Fig. 10.** Two-photon Nile Red fluorogenic probe for the detection of HOCl.

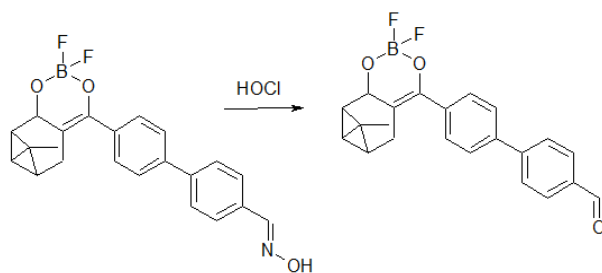
Kong and Qin and their co-workers synthesized a two-photon Nile Red pro-fluorescent probe for the detection of HOCl. The probe showed a good fluorescence response to HOCl at an emission wavelength of about 650 nm (Fig. 10.). In the presence of 30 equivalents of HOCl, the probe fluorescence signal could plateau within 1 minute and the fluorescence intensity showed an approximately 8-fold increase. MTT experiments suggest that the probe is not cytotoxic to cells. Accordingly, the probe was used for the detection of HOCl in HeLa cells as well as in RAW cells. Interestingly, the probe has been used successfully to visualize HOCl in tissues. Finally, they use probes to detect endogenous HOCl in a mouse model with liver damage (Lin et al. 2019).

### 3.5 The oxidative reaction of oxime

Hydroxylamines are converted to aldehydes via a deprotection reaction with HOCl under mild conditions (Fig. 11.).



**Fig. 11.** The specific oxidation reaction between oximes and HOCl.

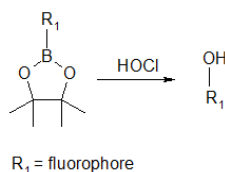


**Fig. 12.** The probe oxidation reaction with HOCl.

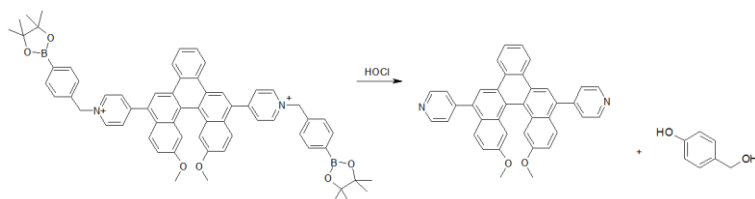
Wang's research group has developed a nopinone-based fluorescent probe for the detection of hypochlorous acid. In addition to good selectivity, high sensitivity, low detection limit and fast response time (within 30 s), the probe also shows obvious fluorescence and color changes. The fluorescence changes from yellow to green and the visible color changes from colorless to yellow. This probe was used to detect HOCl in both water samples and living cells (Jiang et al. 2019).

### 3.6 The oxidative conversion of boronates

The conversion of boronic acid esters by HOCl to the corresponding phenolic product is shown in Fig. 13. The initial reaction step includes an electrophilic boronate and a nucleophilic anion (HOCl).



**Fig. 13.** The specific oxidation reaction between boronate and HOCl.



**Fig. 14.** The oxidation by HOCl.

Duan et al. co-workers synthesized a new probe for HOCl, which consists of benzo[5]helicene-pyridine fluorophore and benzylbenzene boronic acid pinacol ester as a sensitive group to HOCl. In the presence of HOCl, this probe shows a remarkable shift of fluorescence from 536 to 452 nm in aqueous solution and a distinct change in fluorescence color from yellow to blue. Oxidation of the phenylboronic ester by HOCl induces benzyl cleavage as evidenced by <sup>1</sup>H NMR spectra and density functional theory calculations (Duan et al. 2019).

## 4. Discussion and conclusions

In the last years, many small molecule probes for the detection of HOCl have been developed. When used *in vivo* in complex biological environments, these fluorogenic HOCl probes should meet the following criteria: high and fast response sensitivity to HOCl; high selectivity for HOCl compared to other ROS in cells; excellent chemical and photochemical stability; high solubility in water; and fluorescent products with high quantum efficiency. Many of these probes have met the above requirements and have been successfully used in biomedical research, such as fluorescence imaging of endogenous HOCl.

However, biomedical research always requires more appropriate *in vivo* imaging tools, high-throughput screening for drug detection, and dynamic monitoring of HOCl-related cell pathways. In this direction, it is expected that promising fluorogenic probes with desirable properties such as two-photon or near infrared excitation / emission wavelengths will be able to quantify the amount of HOCl. Innovative probes can help solve the mysterious life processes associated with HOCl.

## 5. References

- Chu CJ, Wu G, Ma HI, Venkatesan P, Thirumalaivasan N, Wu SP (2020) A fluorescent turn-on probe for detection of hypochlorous acid and its bioimaging in living cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 233: 118234.
- Duan C, Won M, Verwilt P, Xu J, Kim HS, Zeng L, Kim JS (2019) In vivo imaging of endogenously produced HClO in zebrafish and mice using a bright, photostable ratiometric fluorescent probe. *Analytical Chemistry* 91: 4172–4178.
- Duan YM, Wang S, Cao F, Zhang Q, Chen S, Zhang Y, Hu ZQ (2019) Facile and high selective ratiometric fluorescence probe based on benzo[5]helicene for the detection of hypochlorous acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59: 992–999.
- Gao P, Pan W, Li N, Tang B (2019) Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chemical Science* 10: 6035–6071.
- Guo Z, Park S, Yoon J, Shin I (2014) Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. *Chemical Society Reviews* 43(1): 16–29.
- Hu JJ, Wong NK, Lu MY, Chen X, Ye S, Zhao AQ, Yang D (2016) HKOCl-3: a fluorescent hypochlorous acid probe for live-cell and in vivo imaging and quantitative application in flow cytometry and a 96-well microplate assay. *Chemical Science* 7(3): 2094–2099.
- Hu JJ, Ye S, Yang D (2017) Fluorescent probes for HOCl imaging. *Israel Journal of Chemistry* 57(3-4): 251–258.
- Jiang Q, Wang Z, Xin M, Song J, Yang Y, Xu X, Wang S (2019) Novel nopinone-based fluorescent probe for colorimetric and ratiometric for detection of hypochlorite and its application in water samples and living cells. *Analyst* 145: 1033-1040.
- Li J, Li P, Huo F, Yin C, Liu T, Chao J, Zhang Y (2016) Ratiometric fluorescent probes for ClO<sup>-</sup> and in vivo applications. *Dyes and Pigments* 130: 209–215.
- Lin X, Chen Y, Bao L, Wang S, Liu K, Qin W, Kong F (2019) A two-photon near-infrared fluorescent probe for imaging endogenous hypochlorite in cells, tissue and living mouse. *Dyes and Pigments* 174: 108113.
- Li X, Gao X, Shi W, Ma H (2013) Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes. *Chemical Reviews* 114(1): 590–659.
- Ma C, Zhong G, Zhao Y, Zhang P, Fu Y, Shen B (2020) Recent development of synthetic probes for detection of hypochlorous acid/hypochlorite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 240: 118545.
- Peng T, Wong NK, Chen X, Chan YK, Ho DH, Sun Z, Yang D (2014) Molecular imaging of peroxynitrite with HKGreen-4 in live cells and tissues. *Journal of the American Chemical Society* 136(33): 11728–11734.
- Vegesna GK (2014) Design, synthesis and applications of fluorescent and electrochemical probes. Dissertation. Michigan Technological University.
- Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine* 43(7): 995–1022.
- Warrier S, Kharkar PS (2014) Fluorescent probes for biomedical applications (2009–2014). *Pharmaceutical Patent Analyst* 3(5): 543–560.
- Wu D, Chen L, Xu Q, Chen X, Yoon J (2019) Design principles, sensing mechanisms, and applications of highly specific fluorescent probes for HOCl/OCl<sup>-</sup>. *Accounts of Chemical Research* 52: 2158–2168.

- Xing P, Gao K, Wang B, Gao J, Yan H, Wen J, Sun S (2016) HEPES is not suitable for fluorescence detection of HClO: a novel probe for HClO in absolute PBS. *Chemical Communications* 52(28): 5064–5066.
- Yudhistira T, Mulay SV, Halle MB, Kim Y, Churchill DG (2019) Imaging of hypochlorous acid and hypochlorite by chemiluminescence and application in biological systems. *Chemistry – An Asian Journal* 14(18): 3048-3084.
- Zhan Z, Liu R, Chai L, Li Q, Zhang K, Lv Y (2017) Turn-on fluorescent probe for exogenous and endogenous imaging of hypochlorous acid in living cells and quantitative application in flow cytometry. *Analytical Chemistry* 89(17): 9544–9551.



## **12. Ciecze jonowe z anionem herbicydowym jako związki o budowie amfifilowej**

Ionic liquids with herbicidal anion as amphiphilic structural compounds

Wojcieszak Marta, Syguda Anna, Materna Katarzyna

Zakład Technologii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska  
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Katarzyna Materna, prof. PP; dr inż. Anna Syguda

Wojcieszak Marta: marta.d.wojcieszak@doctorate.put.poznan.pl

Słowa kluczowe: związki powierzchniowo czynne, środki ochrony roślin, zwilżalność

### **Streszczenie**

Ciecze jonowe (ang. *Ionic Liquids ILs*) są to sole o budowie jonowej. Składają się z kationu i anionu, o temperaturze topnienia poniżej 100°C. Asymetryczna budowa jonów ILs determinuje ich niską temperaturę topnienia. Taka struktura związków pozwala na otrzymanie cieczy jonowych III generacji wykazujących szereg właściwości np. aktywność biologiczną wraz z aktywnością powierzchniową (Johnson 2007). Np. w wyniku zdolności chwastobójczej przyczyniają się do poprawy ilości oraz jakości plonów. Przedmiotem niniejszej pracy jest analiza literatury w zakresie właściwości fizykochemicznych w tym zwilżalności i zastosowań herbicydowych cieczy jonowych oraz zbadanie zdolności zwilżających wybranych cieczy jonowych poprzez pomiar kąta zwilżania. Do badań zwilżalności użyto parafinę i powierzchnię teflonu. Wyniki zostały przedstawione schematycznie wraz ze wskazaniem zależności pomiędzy badanymi związkami.

### **1. Wstęp**

Rosnące skażenie środowiska oraz zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, spowodowane stosowaniem konwencjonalnych produktów pestycydowych, stwarza konieczność opracowywania nowych, bezpiecznych oraz przyjaznych przyrodzie, środków ochrony i regulatorów wzrostu roślin (Wyrwas 2012; Syguda i in. 2018; Janiszewska i in. 2010; Castro i in. 2014). Herbicydy to najpowszechniej stosowany typ pestycydów, służący przede wszystkim w celu zwalczania chwastów i innych niepożądanych roślin. Stanowią one ponad 60% wszystkich pestycydów stosowanych w rolnictwie. Sposób działania herbicydów to biochemiczny i fizjologiczny mechanizm, za pomocą którego regulują one wzrost roślin na poziomie komórkowym. Herbicydy o tym samym sposobie działania zazwyczaj wykazują identyczny model translokacji, czyli przemieszczania się substancji biologicznie czynnej do wrażliwych części rośliny, głównie do stożków wzrostu umiejscowionych w łodydzei korzeniu. Na poziomie fizjologicznym, herbicydy kontrolują rośliny poprzez między innymi zaburzanie procesu fotosyntezy, naśladowanie regulatorów wzrostu roślin, blokowanie syntezy aminokwasów oraz hamowanie rozwoju i podziału komórek. Zmiany w roślinie spowodowane powyżej wymienionymi sposobami kontroli mogą mieć charakter odwracalny - kiedy następuje przejściowe zahamowanie rośliny lub nieodwracalny - prowadzący do jej zamierania (Castro i in. 2014; Janiszewska i in. 2010; Śmiglak i in. 2014; Syguda i in. 2018).

Alternatywą dla komercyjnie wykorzystywanych herbicydów mogą stać się herbicydowe ciecze jonowe. Jest to grupa związków o temperaturze topnienia poniżej temperatury wrzenia wody pod ciśnieniem atmosferycznym, przy czym przynajmniej jeden z jonów wchodzących w ich strukturę powinien wykazywać działanie chwastobójcze. Do najbardziej popularnych zaliczają się herbicydy pochodzące od fenoksykwasów, szczególnie 2,4-D (kwas (2,4-dichlorofenoksy)octowy) i MCPA (kwas (4-chloro-2-metylofenoksy)octowy). Są one stosunkowo tanie i mają wysoką efektywność, dlatego ich wykorzystywanie jest tak powszechne. Znaczna aktywność herbicydowych cieczy jonowych pozwala zmniejszyć dawkę używanego produktu oraz zredukować ilość substancji dodatkowych wymaganych przy stosowaniu pestycydów. Herbicydowe ciecze jonowe są praktycznie nietolerne, przez co wykorzystanie ich jest znacznie bezpieczniejsze dla zdrowia ludzi i zwierząt, w porównaniu z obecnie oferowanymi na rynku preparatami chwastobójczymi na bazie glifosatu (Pernak i in. 2012; Polit i in. 2014; Castro i in. 2014).

Z punktu widzenia ekonomicznego, koszty związane z rozpoczęciem produkcji, środków ochrony roślin na bazie herbicydowych cieczy jonowych, nie są wysokie, co umożliwia rozwój nowoczesnych przedsiębiorstw i powstanie nowych miejsc pracy.

Herbicydowe ciecze jonowe są związkami wielofunkcyjnymi, łatwo biodegradowalnymi, nie są mieszaninami i nie przeciążają środowiska. Ich użycie może zmniejszyć nieopłacalne efekty środków chwastobójczych. Według najnowszych doniesień literaturowych, herbicydowe ciecze jonowe nie tworzą kompleksów z metalami ciężkimi, przez co zahamowaniu ulega transport tych metali do rośliny, w wyniku czego uzyskuje się plony pozbawione szkodliwych dla zdrowia, toksycznych związków (Syguda i in. 2018; Johnson 2007; Pernak i in. 2012).

Naukowcy z Politechniki Poznańskiej we współpracy z Instytutem Ochrony Roślin przeprowadzili badania nad syntezą i aktywnością chwastobójczą herbicydowych cieczy jonowych. Wykonano syntezę soli amoniowych, fosfoniowych, pirydyniowych, imidazoliowych, morfoliniowych i piperdydniowych, zawierających aniony np. MCPA, 2,4-D i MCPP (anion kwasu 2-(4-chloro-2-metylofenoksy)propionowego). Synteza ta polegała na reakcji wymiany podwójnej (metatezy) pomiędzy odpowiednim czwartorzędowym halogenkiem zwanym prekursorem cieczy jonowej, a solą sodową herbicydów w rozpuszczalniku wodnym lub organicznym i zachodziła z wysoką wydajnością. Wszystkie otrzymane w ten sposób sole były związkami z temperaturą topnienia poniżej temperatury wrzenia wody pod ciśnieniem atmosferycznym. Nowe sole, uznano za ciecze jonowe. Są one stabilne zarówno na powietrzu, jak i w kontakcie z wodą oraz popularnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Czystość soli (zawartość substancji kationowo czynnej) określono za pomocą miareczkowania dwufazowego i wynosiła ona 96,5 do 98,8% (Syguda i in. 2018; Pernak i in. 2012). Wybór kationu zsyntezowanych ILs determinował hydrofobowość lub hydrofilowość cieczy jonowej. Przy użyciu kationów z długimi podstawnikami alkilowymi, zaobserwowano limitowaną rozpuszczalność w wodzie. Zsyntezowane ciecze jonowe scharakteryzowano za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  oraz analizy elementarnej (Syguda i in. 2018; Cojocar i in. 2013). Typ kationu znacząco wpłynął na aktywność powierzchniową otrzymanych soli i można je było zaliczyć do nowatorskich związków powierzchniowo czynnych, gdyż efektywnie obniżały napięcie powierzchniowe i miały dobre właściwości zwilżające. Wyniki badań pokazały, że zsyntezowane sole wykazują aktywność chwastobójczą i można je zaliczyć do grupy herbicydowych cieczy jonowych (Pernak i in. 2012; Przondo 2007).

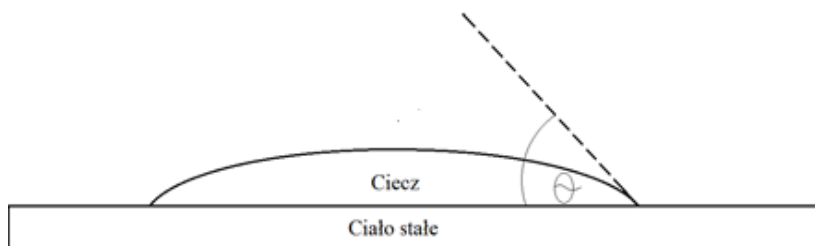
Kombinacja dwóch aktywnych związków chemicznych w formie [kation][anion] w pojedynczej grupie funkcyjnej, redukuje liczbę dodatkowych związków chemicznych, takich jak środki wspomagające lub surfaktanty, wymaganych przy aplikacji środka ochrony lub regulatora wzrostu roślin.

Herbicydowe ciecze jonowe typu [kation][MCPA] wykazują wyższą aktywność biologiczną niż dotychczas stosowany MCPA w formie sodowych lub potasowych soli (Domańska i Lukoshko 2014; Johnson i in. 2007; Syguda i in. 2018). Te nowatorskie formy pochodnych fenoksykwasów, mają zmniejszoną lotność. Są nieszkodliwe dla roślin rosnących w sąsiedztwie. Hydrofobowe herbicydowe ciecze jonowe wykazują znacznie mniejszą rozpuszczalność w wodzie, a więc zminimalizowane ruchy w glebie i wodach gruntowych. Ostra toksyczność herbicydowych cieczy jonowych może być kontrolowana przez odpowiedni dobór kationu (Khupse i Kumar 2010; Markiewicz 2013; Castro i in. 2014).

Jak wspomniano powyżej, w skład herbicydowych cieczy jonowych wchodzi związek o aktywności powierzchniowej zawierające w strukturze ugrupowanie hydrofilowe oraz hydrofobowe. Taka amfifilowa budowa sprawia, że związki te wyróżniają się m. in. zdolnością pianotwórczą czy właściwościami zwilżającymi (You i in. 2009; Ranke i in. 2007; Przondo 2007)

Wartości kątów zwilżania, napięcia powierzchniowego czy też energii powierzchniowej mają podstawowe znaczenie w opisie procesu zwilżania. Jeśli materiał może być zwilżany przez wodę nazywamy go hydrofilowym, jeśli natomiast nie może być zwilżany przez wodę, to nazywamy go hydrofobowym. Wielkością, która charakteryzuje proces zwilżania ciał stałych przez ciecz jest kąt zwilżania  $\theta$ , zawarty między płaszczyznami stycznymi do powierzchni granicznych: gaz-ciecz i ciecz-ciało stałe w tak zwanym punkcie potrójnym, czyli w miejscu zetknięcia się tych powierzchni.

Na Rys.1 pokazano pomiar kąta w przypadku zwilżania ciała stałego przez ciecz (Przondo 2007; Zana i in. 1996).



**Rys. 1.** Określenie zwilżalności w oparciu o kąt zwilżania (Przondo 2007).

Kąt zwilżania  $\theta$  wyznaczany jest jako kąt przechodzący przez przekrój cieczy. Tworzy go styczna poprowadzona do profilu cieczy osadzonej na powierzchni ciała stałego.

W zależności od tego, jaką wartość osiąga kąt  $\theta$ , ciecze można podzielić na:

- całkowicie niezwilżające:  $\theta = 180^\circ$ ,
- częściowo niezwilżające:  $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ,
- częściowo zwilżające:  $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$ ,
- całkowicie zwilżające (rozlewające się na powierzchni):  $\theta = 0^\circ$ .

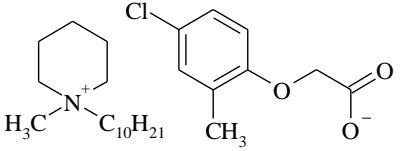
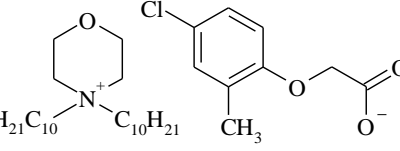
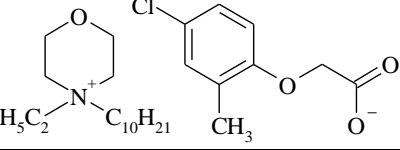
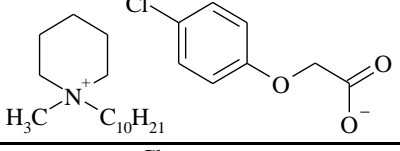
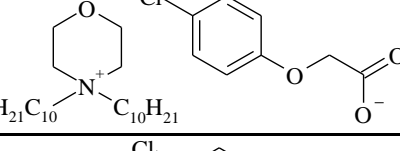
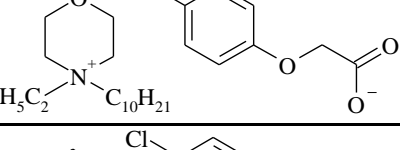
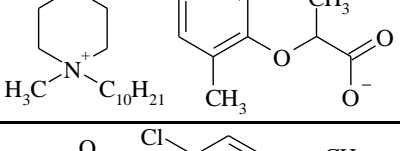
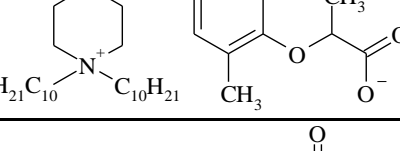
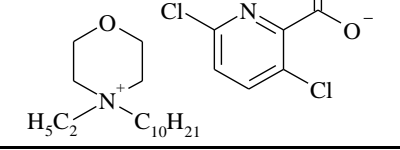
W przypadku, kiedy trzy fazy stykają się ze sobą i nie zachodzą między nimi żadne reakcje chemiczne ani procesy fizyczne, wtedy na granicy zetknięcia się tych faz ustala się równowaga sił napięcia międzyfazowego (Przondo 2007; Tariq i in. 2012; Castro i in. 2014).

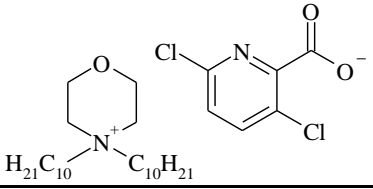
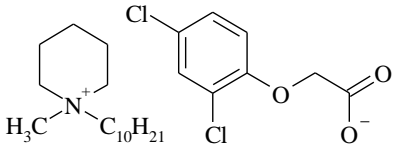
## 2. Materiał i Metody

W Tab. 1 przedstawiono strukturę oraz wzory herbicydowych cieczy jonowych, stosowanych podczas przeprowadzania badań. Jako ciecz wzorcową wykorzystano wodę dejonizowaną o przewodności około  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Ciecze jonowe syntezowane były w Zakładzie Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej (czystość od 98 do 99%).

**Tab. 1.** Ciecze jonowe wykorzystane w badaniach.

Nazwa	Wzór strukturalny
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 1-decylo-1-metylopiperydyniowy [DecMePip][Dikamba]	
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 1-metylopiperydyniowy [MePip][Dikamba]	
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 4-decylo-4-dodecylomorfoliniowy [DecDodecMor][Dikamba]	

Nazwa	Wzór strukturalny
(4-chloro-2-metylofenoksy)octan 1-decylo-1-metylopiperydyniowy [ <b>DecMePip</b> ][ <b>MCPA</b> ]	
(4-chloro-2-metylofenoksy)octan 4,4-didecyломорfoliniowy [ <b>Dec2Mor</b> ][ <b>MCPA</b> ]	
(4-chloro-2-metylofenoksy)octan 4-decylo-4-etyломорfoliniowy [ <b>DecEtMor</b> ][ <b>MCPA</b> ]	
(4-chlorofenoksy)octan 1-decylo-1-metylopiperydyniowy [ <b>DecMePip</b> ][ <b>4-CPA</b> ]	
(4-chlorofenoksy)octan 4,4-didecyломорfoliniowy [ <b>Dec2Mor</b> ][ <b>4-CPA</b> ]	
(4-chlorofenoksy)octan 4-decylo-4-etyломорfoliniowy [ <b>DecEtMor</b> ][ <b>4-CPA</b> ]	
2-(4-chloro-2-metylofenoksy)propionian 1-decylo-1-metylopiperydyniowy [ <b>DecMePip</b> ][ <b>MCP</b> ]	
2-(4-chloro-2-metylofenoksy)propionian 4,4-didecyломорfoliniowy [ <b>Dec2Mor</b> ][ <b>MCP</b> ]	
(3,6-dichloro)-2-pikolinian 4-decylo-4-etyломорfoliniowy [ <b>DecEtMor</b> ][ <b>Chlopyralid</b> ]	

Nazwa	Wzór strukturalny
(3,6-dichloro)-2-pikolinian 4,4-didecylmorfoliniowy <b>[Dec<sub>2</sub>Mor][Chlopyralid]</b>	
(2,4-dichlorofenoksy)octan 1-decylo-1-metylopiperydyniowy <b>[DecMePip][2,4-D]</b>	

Do analizy wybranych zostało 14 roztworów wodnych nowo zsyntezowanych herbicydowych cieczy jonowych o stężeniu  $10^{-2}$  g mol<sup>-1</sup>. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora kształtu kropli DSA100, którego zakres pomiaru kąta zwilżania wynosi od 1 do 180°. Ponadto urządzenie umożliwia wykonanie pomiaru z prędkością aż do 2000 f sec<sup>-1</sup>. Analiza polegała na osadzeniu kropelek cieczy na powierzchni wybranego, hydrofobowego, ciała stałego – teflonu i parafiny, za pomocą strzykawki należącej do aparatury. Ponadto krople cieczy miały stałą objętość w czasie pomiaru. Do obliczeń zastosowano metodę zwaną dopasowaniem Younga-Laplace’a. Jest to jeden z najbardziej skomplikowanych, ale zarazem dokładnych sposobów wyznaczania kąta zwilżania. Na podstawie tej metody analizuje się całkowity profil kropli. Dopasowanie profilu uwzględnia poprawkę, że nie tylko zjawiska międzyfazowe wpływają na kształt kropli, ale również zniekształca ją ciężar cieczy, którą ona w sobie zawiera. Po odpowiednim dopasowaniu równania Younga-Laplace’a, kąt zwilżania wyznaczany jest na zakrzywionej linii konturu profilu, w punkcie zetknięcia się trzech faz.

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1 Wpływ rodzaju powierzchni na wartość kąta zwilżania TEFLON

Na Rys.2 przedstawiono przykładowe zdjęcia mierzonych kropelek cieczy jonowych oraz wody.

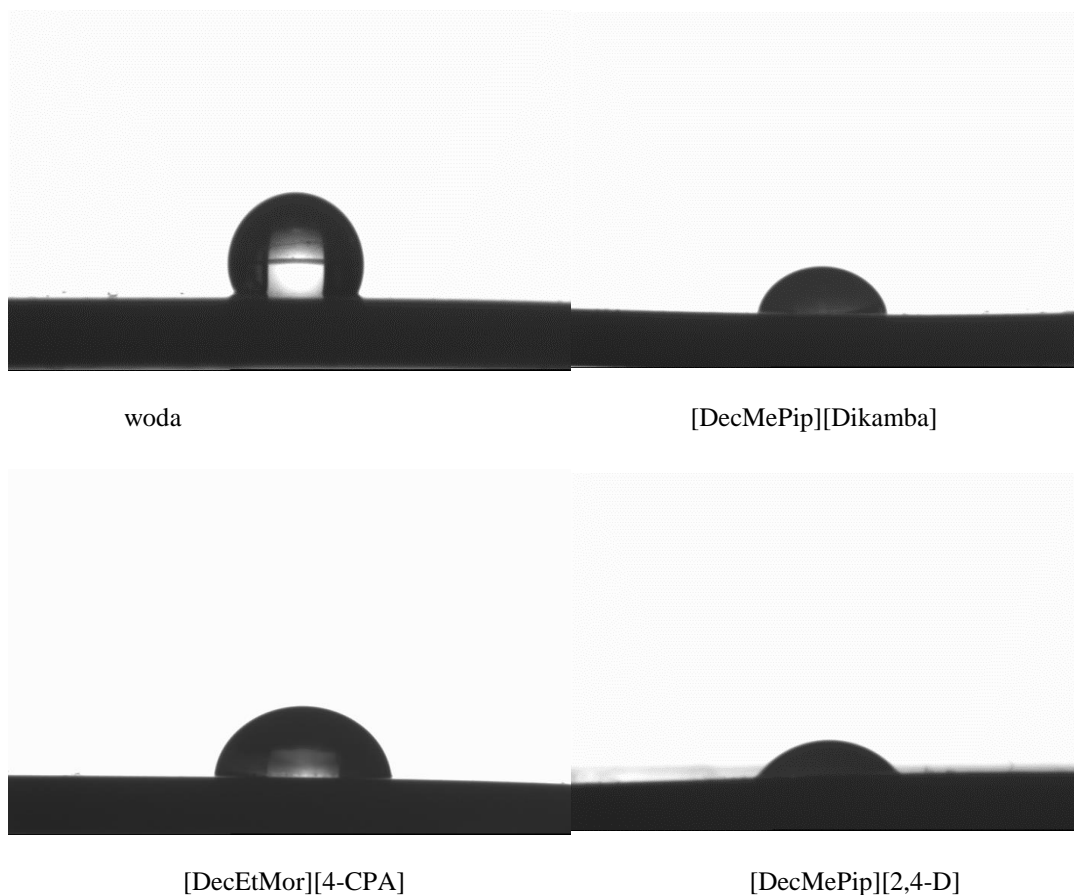
Otrzymane wartości kąta zwilżania  $\theta$  zestawiono na Rys. 3. Każdy z wyników jest średnią obliczoną z sześciu pomiarów przypadających na każdy ze związków.

Według wyników przedstawionych na Rys.3, najniższą wartość kąta zwilżania otrzymano dla roztworu wodnego cieczy jonowej [Dec<sub>2</sub>Mor][4-CPA] - 34,6°. Oznacza to, że badana IL najlepiej zwilża silnie hydrofobową powierzchnię teflonu. Natomiast najwyższe wartości kąta  $\theta$ , otrzymano dla roztworu wodnego cieczy jonowej [MePip][Dikamba] - 86,6°. Otrzymane wyniki badań potwierdzają, że wszystkie analizowane herbicydowe cieczy jonowe można zaliczyć do związków częściowo zwilżających silnie hydrofobową powierzchnię teflonu ( $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$ ). Odmienne wartości kątów zwilżania dla poszczególnych ILs wynikają z budowy cieczy jonowych, która bezpośrednio wpływa na oddziaływania między powierzchnią zwilżaną a substancją zwilżającą.

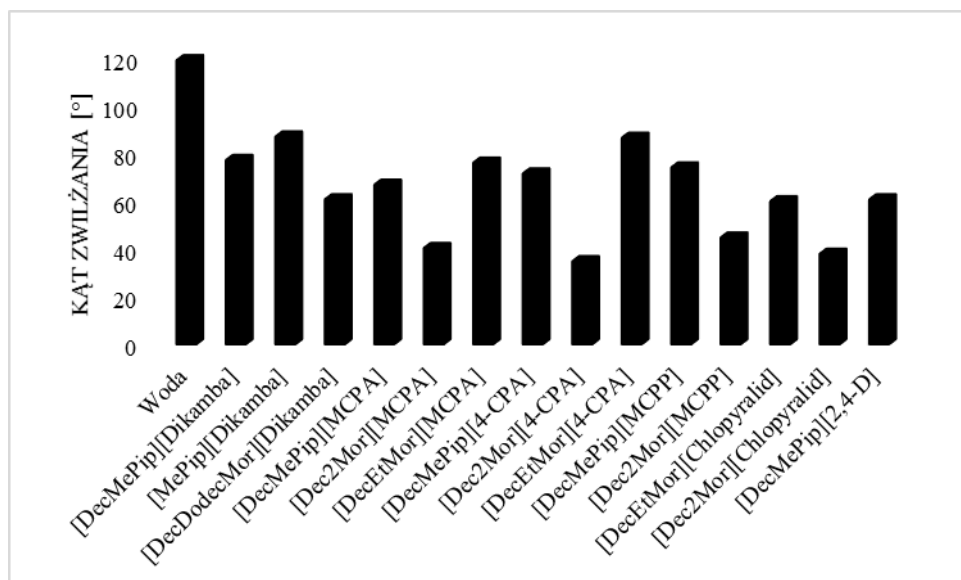
#### PARAFINA

Dla wybranych cieczy jonowych zbadano zdolność zwilżania parafiny. Otrzymane wartości kąta zwilżania  $\theta$  zestawiono w Tab.2.

Na podstawie przedstawionych wyników badań (Tab.2) wnioskuje się, że analizowane cieczy jonowe można zaliczyć do cieczy częściowo zwilżających powierzchnię parafiny ( $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$ ). Zakres uzyskanych wartości kątów zwilżania dla analizowanych ILs to 30,8° do 86,6°. Warto dodać, że w badaniach wykorzystano jako powierzchnię zwilżaną parafinę ponieważ zgodnie z doniesieniami literaturowymi, parafina imituje silnie hydrofobową powierzchnię liścia. Najniższe wartości kąta zwilżania uzyskano dla cieczy jonowej [Dec<sub>2</sub>Mor][4-CPA] oznacza to, że ta IL najlepiej absorbuje się w strukturze komórek chwastów.



**Rys.2.** Zdjęcia kroplel roztworów wodnych cieczy jonowych [DecMePip][Dikamba], [DecEtMor][4-CPA], [DecMePip][2,4-D] oraz wody utworzonych na powierzchni teflonu.



**Rys. 3.** Zestawienie wyników pomiarów kąta zwilżania  $\theta$  (rodzaj powierzchni: teflon)

**Tab. 2.** Zestawienie wyników pomiarów kąta zwilżania  $\theta$  (rodzaj powierzchni: parafina).

Substancja zwilżająca	Kąt zwilżania $\theta$
Woda	111,0°
[DecMePip][Dikamba]	70,8°
[MePip][Dikamba]	86,6°
[DecDodecMor][Dikamba]	52,4°
[DecMePip][MCPA]	61,5°
[Dec <sub>2</sub> Mor][MCPA]	34,1°
[DecEtMor][MCPA]	63,2°
[DecMePip][4-CPA]	62,2°
[Dec <sub>2</sub> Mor][4-CPA]	30,8°
[DecEtMor][4-CPA]	74,1°
[DecMePip][MCPP]	62,7°
[Dec <sub>2</sub> Mor][MCPP]	40,5°
[DecEtMor][Chlopyralid]	50,1°
[Dec <sub>2</sub> Mor][Chlopyralid]	31,1°
[DecMePip][2,4-D]	55,9°

### 3.2 Wpływ budowy cieczy jonowej na wartość kąta zwilżania

Według wyników przedstawionych w Tab.2 i na Rys.3, najlepszymi właściwościami zwilżającymi charakteryzowały się herbicydowe cieczy jonowe z kationem [Dec<sub>2</sub>Mor], o wartości kąta zwilżania w zakresie między 30,8°, a 40,5° (powierzchnia: parafina). Pomimo, iż wszystkie z wybranych związków są cieczami częściowo zwilżającymi (klasyfikacji ze źródła Zieliński 2009), jedno z nich zwilża lepiej, czyli ich wartości kąta  $\theta$  są mniejsze, a drugie zwilżają gorzej, co wynika z ich wyższych wartości kąta  $\theta$ . Analizując ogólnie wartości kąta zwilżania dla wszystkich badanych cieczy, można stwierdzić, że w przeważającej większości kationy będące pochodnymi morfoliniowymi, czyli [Dec<sub>2</sub>Mor], [DecEtMor], [DecDodecMor], wpływają na lepsze właściwości zwilżające herbicydowych cieczy jonowych, w porównaniu z kationami będącymi pochodnymi piperidynowymi, czyli [DecMePip] oraz [MePip]. Wyjątkiem jest ciecz [DecEtMor][4-CPA], o kationie morfoliniowym, która ma największy kąt zwilżania (z wyłączeniem wody) wynoszący na powierzchni teflonu 86,8°, czyli zwilża ona najslabiej spośród wybranych czternastu cieczy jonowych.

Również długość podstawnika przy kationie ma wpływ na właściwości zwilżające. Najlepsze wyniki, a więc najniższe kąty zwilżania, zmierzono dla ILs [Dec<sub>2</sub>Mor][4-CPA] (teflon 34,6° / parafina 30,8°) oraz [Dec<sub>2</sub>Mor][Chlopyralid] (37,7°, powierzchnia teflonu), zawierających dwa, długie, podstawniki alkilowe -C<sub>10</sub>H<sub>12</sub> przy kationie morfoliniowym. Jednak zbyt długi podstawnik i rozbudowana struktura związku, a więc wynikająca z tego wysoka masa molowa związku, w przypadku [DecDodecMor][Dicamba], mogły negatywnie wpłynąć na właściwości zwilżające owej cieczy jonowej, gdyż zmierzona dla niej wartość kąta  $\theta$ , pomimo kationu morfoliniowego wynosi 60,4° (powierzchnia teflonu). Z otrzymanych wyników nie można jednoznacznie wywnioskować, że im krótszy podstawnik tym w mniejszym stopniu zwilżana jest powierzchnia. Natomiast analizując wyniki pomiarów dla ILs (powierzchnia teflonu), mających przy kationie jako jeden z podstawników, krótką grupę metylową -CH<sub>3</sub>, np. [DecMePip][MCPP] (73,7°), [DecMePip][Dicamba] (76,8°) czy też sam wodór -H, jak w przypadku [MePip][Dicamba] (teflon 86,6° / parafina 78,8°), można zauważyć, że właściwości zwilżające owych cieczy jonowych, w istocie są gorsze od tych z dłuższymi podstawnikami.

## 4. Wnioski

Obecnie dąży się do tego, by ograniczyć wchłanianie w glebę i przedostawanie się do wód gruntowych środków ochrony roślin. Jednocześnie jednak trzeba zwrócić uwagę na to by odpowiednio wnikały one w strukturę liścia oraz łodygi rośliny. Wydajność herbicydu zależy przede wszystkim od całkowitego i równomiernego zwilżenia rośliny. Wskopopodobne powierzchnie liści

odpychają wodę, dlatego tak ważne jest użycie preparatu o odpowiedniej zwilżalności, a więc o konkretnie, niskim kącie zwilżania powierzchni. Według doniesień literaturowych herbicydowe cieczki jonowe wykazują dobrą aktywność herbicydową i są idealną alternatywą dla konwencjonalnych produktów pestycydowych. (Syguda i in. 2018). Opierając się na wynikach badań można stwierdzić, że cieczki jonowe o właściwościach chwastobójczych, szczególnie te zawierające kation będący pochodną morfoliniową oraz długie podstawniki przy owym kationie, wykazują dobre właściwości zwilżające. Badania nad herbicydowymi cieczkami jonowymi są w ciągłym rozwoju a popularność tych związków z roku na rok staje się coraz większe.

## 5. Literatura

- Castro M J L, Ojeda C, Fernandez Cirelli A (2014) Advances in surfactants for agrochemical. *Env Chem Lett* 12: 85-95.
- Cojocararu O A, Shamshina J L, Gurau G, i in. (2013) Ionic liquid forms of the herbicide dicamba within creased efficacy and reduced volatility *Green Chem.* 15: 2110-2120.
- Domańska U, Lukoshko E. V (2014) Thermodynamics and activity coefficients at infinite dilution for organic solutes and water in the ionic liquid 1-butyl-1-methylmorpholinium tricyanomethanide. *The Journal of Chem. Thermodynam.* 68: 53.
- Janiszewska D, Syguda A, Pernak J (2010) Ciechowskie cieczki jonowe. *Przem. Chem.* 89(11): 1441-1445.
- Johnson K E (2007) What's an ionic liquid?, *The Electrochemical Society – Interface* 38-41.
- Khupse N D, Kumar A, (2010) Ionic liquids: New materials with wide applications, *Indian Journal of Chemistry*, vol. 49A: 635-648.
- Markiewicz R (2013) Rozprawa doktorska Cykloheksyloamoniowe i 1-metylopiperydyniowe cieczki jonowe, Poznań.
- Pernak J, Syguda A, Materna K, i in. (2012) 2,4-D based herbicidal ionic liquids. *Tetrahedron* 68: 4267-4273.
- Polit J T, Praczyk T, Pernak J, i in. (2014) Inhibition of germination and early growth of rape seed (*Brassica napus* L.) by MCPA in anionic and ester form.. *Acta Physiol. Plant.* 36: 699-711.
- Przondo J (2007) Związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie w produkcji chemii gospodarczej. *Politechnika Radomska*.
- Ranke J, Müller A, Bottin-Weber U, I in. (2007) Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity, *Ecotox. Environ. Safe.*, 67: 430–438.
- Syguda A, Gielnik A, Borkowski A, i in. (2018) Esterquat herbicidal ionic liquids (HILs) with two different herbicides: evaluation of activity and phytotoxicity. *New J. Chem.* 42: 9819-9827.
- Śmiglak M, Pringle J M, Lu X, in. (2014) Ionic liquids for energy, materials, and medicine, *Chem. Comm, Roy. Soc. of Chem.*, 50: 9228-9250.
- Tariq M, Freire M G, Saramago B, i in. (2012) Surface tension of ionic liquids and ionic liquid solutions, *Chem. Soc. Rev.* 41: 829–868.
- Wyrwas B (2012) Rozprawa habilitacyjna metodologiczne aspekty biodegradacji, Poznań.
- Zieliński R (2009) *Surfaktanty budowa właściwości zastosowania*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.
- Zana R (1996) Critical Micellization Concentration of Surfactants in Aqueous Solution and Free Energy of Micellization, *Langumir*, 12:1208-1211.
- You Y, Zhao J, Jiang R, Cao J (2009) Strong effect of NaBr on self-assembly of quaternary ammonium Gemini surfactants at air/water interface and in aqueous solution studied by surface tension and fluorescence techniques, *Colloid Polym. Sci.*, 287: 839–846.



### **13. Wpływ dodatku alkoholi na aktywność powierzchniową cieczy jonowych**

The effect of alcohols addition on surface activity of ionic liquids

Wojcieszak Marta, Syguda Anna, Materna Katarzyna

Zakład Technologii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska  
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Katarzyna Materna, prof. PP; dr inż. Anna Syguda

Wojcieszak Marta: marta.d.wojcieszak@doctorate.put.poznan.pl

Słowa kluczowe: związki powierzchniowo czynne, kąta zwilżania, zwilżalność, herbicydy

#### **Streszczenie**

Nieustanny rozwój przemysłu chemicznego skutkuje poszukiwaniem nowych rozwiązań m. in. na rynku pestycydów. W te obszary badań doskonale wpisują się aktywne powierzchniowo ciecze jonowe. Badania realizowane w ramach niniejszej pracy pozwoliły zaobserwować zachowanie morfoliniowych cieczy jonowych w roztworze wodnym oraz w środowisku z dodatkiem alkoholi krótkołańcuchowych. Głównym przedmiotem przeprowadzonych badań była analiza wartości krytycznego stężenia micelowania CMC i kątów zwilżania morfoliniowych cieczy jonowych, zsyntezowanych w Zakładzie Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Analizie poddane zostały roztwory związków z dodatkiem alkoholi alifatycznych tj. metanolu, etanolu oraz bez dodatku alkoholi. W trakcie badań określono wpływ rodzaju środowiska reakcyjnego na aktywność powierzchniową badanych morfoliniowych cieczy jonowych.

#### **1. Wstęp**

Początki syntez cieczy jonowych przypadają na przełom XIX i XX wieku. Pierwszą niskotemperaturową sól opisał Walden w 1914 roku. Początkowo stosowano ciecze jonowe jako elektrolity do ogniw, następnie w katalizie, z czasem również jako rozpuszczalniki. Dzięki niskiej prężności par ciecze jonowe zaczęły wypierać palne, niebezpieczne dla środowiska rozpuszczalniki organiczne (Domańska i Lukoshko 2014; Khupse i Kumar 2010).

Ciecze jonowe (ang. *Ionic Liquid ILs*) absorbują uwagę zespołu naukowców w zakresie syntezy i badania właściwości tej grupy związków. Wraz ze wzrostem zainteresowania cieczami jonowymi rośnie liczba nowo syntezowanych związków. Charakterystyczny ciekły stan skupienia powodowany jest wysokim stopniem asymetrii układów kation-anion, skąd niska energia sieciowania prowadzi do przejawiania cech cieczy jonowych poniżej umownej wartości temperatury równej 100°C (Abu-Ghunmi i in. 2014; Niemczak i in. 2019).

ILs stanowią ciągle odkrywany obszar chemii organicznej. Nieustające badania na całym świecie nad syntezami nowych związków, motywują do poszerzania zastosowań produktów reakcji oraz do badania ich właściwości. Ciecze jonowe ze względu na budowę najczęściej dzielimy na amoniowe, pirydyniowe, fosfoniowe, imidazoliowe i morfoliniowe (Janiszewska i in. 2010; Niemczak i in. 2019).

Niskotemperaturowe sole organiczne jako zielone rozpuszczalniki znajdują coraz szersze zastosowanie w nowych technologiach przemysłu chemicznego i medycznego. Zastosowanie cieczy jonowych jako związków powierzchniowo czynnych (ang. *Surface Active Agents*) pozwala, nawet przy ich niskich stężeniach, na zmianę napięcia powierzchniowego na granicy rozdziału faz (Pernak i in. 2012; Przondo 2007).

Oferowane rolnictwu środki ochrony roślin stanowią od ponad 20 lat stałą grupę produktów. Niemniej, w związku z licznymi przemianami w tym czasie, jak i wszelkimi nowościami, jakie znalazły się na rynku technologicznym, wprowadzenie innowacji wydawało się nieodzowną częścią rozwoju chemii. Jedną z przyczyn zapoczątkowania zmian w składzie dostępnych produktów było zaobserwowanie odporności chwastów na produkty biobójcze. Herbicydy, jako środki do usuwania chwastów wykorzystuje się praktycznie na każdym kroku, chcąc poprawić wydajność plonów, m.in. w uprawach rolnych, sadownictwie, leśnictwie, jak i w ogrodnictwie. Przez wzgląd na możliwe szkodliwe przenikanie do środowiska środków ochrony roślin, od 2009 roku zostały wprowadzone

zasady integrowanej ochrony roślin. Zasady te mają na celu otrzymanie zdrowych plonów poprzez maksymalne zadbanie o ekosystemy rolnicze, w tym zmniejszenie negatywnego oddziaływania pestycydów na otoczenie (Johnson i in. 2007; Wyrwas 2012).

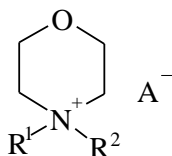
Pierwsze wzmianki na temat herbicydowych cieczy jonowych pojawiły się dopiero w 2011 roku. Herbicydowe cieczy jonowe zawierają przynajmniej jeden jon o działaniu fitotoksycznym. Źródłem anionu współczesnych cieczy jonowych o działaniu chwastobójczym są kwas (4-chloro-2-metylofenoksy)octowy [MCPA] oraz kwas (2,4-dichlorofenoksy)octowy [2,4-D]. Następnie wprowadzono produkty zawierające kwasy: (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesowy [Dikamba], 2-(4-chloro-2-metylofenoksy)propionowy [MCP], (4-chlorofenoksy)octowy. Wymienione związki wykazują niszczące działanie na rośliny dwuliścienne. W postaci produktów użytkowych występują jako sole amoniowe (I, II, III rzędowe), potasowe i sodowe. Natomiast otrzymując cieczy jonowe z anionami MCPA i 2,4-D możliwe było stworzenie związków z kationem zawierającym czwartorzędowy atom azotu o niemierzalnej prężności par. Produkty zawierające tego typu składniki wpływają na zwiększenie bezpieczeństwa zarówno dla pracowników, jak i sąsiadujących ze sobą upraw (Syguda i in. 2018; Pernak i in. 2012).

Herbicydy możemy również określać mianem syntetycznych auksyn, ze względu na hormonalne regulacje rozwoju, w tym wzrostu rośliny, takie jak obserwujemy dla kwasu indolilo-3-octowego (stanowi naturalny hormon w roślinie). Po zaabsorbowaniu herbicydu przez liście i przedostaniu się przez glebę do korzeni, związki te zostają przetransportowane przez tkanki przewodzące rośliny. Dostając się do stożków wzrostu pędu i korzenia, przyspieszają procesy starzenia tkanek roślinnych, hamując fotosyntezę i transport jonów między błonami komórkowymi (Pernak i in. 2012).

W literaturze opisane są dwufunkcyjne herbicydowe cieczy jonowe. Dwufunkcyjność odnosi się do działania, które polega na zahamowaniu wzrostu oraz na niszczeniu rośliny poprzez m.in. wstrzymanie procesu fotosyntezy. Dzięki długim łańcuchom alkilowym badane cieczy jonowe odznaczają się bardzo dobrą biodegradowalnością, jak i dobrymi właściwościami bakteriobójczymi (Syguda i in. 2018; Tariq i in. 2012).

W przypadku esterquatów obserwuje się mniejszą lotność w porównaniu z produktami handlowymi. Dotychczas stosowane herbicydy wykazywały dużą prężność par, która wpływała m.in. na sąsiednie uprawy winorośli czy pomidorów. Odpowiednie regulacje prawne określały bezpieczny obszar ich stosowania.

Morfoliniowe cieczy jonowe zbudowane są z kationu morfoliniowego, natomiast anion może być nieorganiczny lub jak w niniejszej pracy organiczny tj. o działaniu herbicydowym (Rys.1). Cechując się bardzo dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach polarnych, stanowią one interesującą i ciągle rozwijającą się grupę związków.



**Rys. 1.** Ogólna budowa morfoliniowych cieczy jonowych, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>: podstawniki alkilowe, A<sup>-</sup> anion, (Ławniczak i in. 2015; Syguda i in. 2018).

W strukturze morfoliniowej cieczy jonowej pierścień morfoliniowy stanowi silnie elektrofilowe centrum. Z kolei tlen i azot pozwalają morfolinie na wykazywanie właściwości aminy drugorzędowej oraz eteru cyklicznego. Kationy mogą łączyć się z anionami m.in. chlorkowymi, tetrafluoroboranowymi i azotanowymi (Syguda i in. 2018).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano niską toksyczność morfoliniowych cieczy jonowych na organizmy wodne, m.in. na ryby z rodziny karpowatych, algi i rozwielitki. Niski indeks toksykologiczny wynika z obecności tlenu w pierścieniu morfoliniowym. Z tej samej przyczyny mogą być zastosowane do likwidowania m.in. ślimaków z upraw rolnych. Mogą również być

używane jako nowe rozpuszczalniki czy środki obniżające napięcie powierzchniowe (Syguda i in. 2018; Ławniczak i in. 2015; Pernak i in. 2012).

Morfoliniowe ciecze jonowe, co do potencjału aplikacyjnego porównywane są z imidazoliowymi czy pirydyniowymi cieczami jonowymi. Na korzyść nowej grupy związków przemawia ich niski koszt, łatwość syntezy, uzyskiwanie wysokowydajnych produktów, prosty kation i mieszalność soli morfoliniowych i samej morfolinie stwarza szerokie możliwości stosowania produktów. Ciecze jonowe z kationem morfoliniowym wykazują dodatkowo wysoką stabilność elektrochemiczną, dzięki czemu zdolne są do tworzenia ciekawych układów elektrolitów w przemyśle elektrochemicznym (Ławniczak i in 2015; Zhao i Zheng 2011).

Wykorzystanie niskotemperaturowych cieczy jonowych z kationem morfoliniowym pozwala w naszym klimacie na efektywne stosowanie preparatów w niskich zakresach temperatur. W wykorzystywaniu herbicydów istotny jest przede wszystkim zakres temperatur, w których uwalniane są substancje czynne. Stosowanie preparatów w okresie wegetacyjnym w naszej strefie klimatycznej pozwala na tego typu produktów w temp ok. 6°C (Castro i in. 2014; Cojocar i in. 2013).

## 2. Materiał i Metody

W Tab.1 przedstawiono budowę herbicydowych cieczy jonowych, wykorzystanych podczas przeprowadzania badań. Ciecze jonowe syntezowane były w Zakładzie Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej (czystość od 98% do 99%).

**Tab. 1.** Ciecze jonowe wykorzystane w badaniach.

Nazwa	Wzór strukturalny
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 4-decylo-4-dodecylomorfoliniowy <b>[DecDodecMor][Dikamba]</b>	
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 4,4-didecylomorfoliniowy <b>[Dec<sub>2</sub>Mor][Dikamba]</b>	
(2,4-dichlorofenoksy)octan 4-decylo-4-etylomorfoliniowy <b>[DecEtMor][2,4-D]</b>	
(3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesan 4-decylo-4-etylomorfoliniowy <b>[DecEtMor][Dikamba]</b>	

Ponadto w badaniach stosowano następujące odczynniki takie jak: metanol, Sigma-Aldrich, etanol, Sigma-Aldrich, oraz woda demineralizowana o przewodnictwie ok. 0,1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

W pierwszym etapie badań odważono określoną ilość poszczególnych cieczy jonowych. Naważki umieszczono w kolbach o pojemności 25 ml i uzupełniono wodą demineralizowaną. Otrzymano wodne roztwory cieczy jonowych o stężeniach 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Następnie z kolby pobrano

8 cm<sup>3</sup> związku wyjściowego, przeniesiono do fiolki i dodano 8 cm<sup>3</sup> wody, po czym całość dokładnie wymieszano. Postępując analogicznie, metodą kolejnych rozcieńczeń otrzymano 16 roztworów o różnym stężeniu cieczy jonowej.

Do pomiarów napięcia powierzchniowego oraz kątów zwilżania wykorzystano analizator kształtu kropli DSA 100E, firmy Krüss, (Niemcy). Metoda ta polega na zastosowaniu równania Young-Laplace'a i dopasowaniu go do obrazu kropli, adekwatnie do jej kształtu i krawędzi. Ciecz jest wypychana za pomocą tłoka ze strzykawki, która jest zakończona igłą. W ten sposób tworzy się „wisząca kropla”, a jej geometria jest analizowana za pomocą kamery CCD (ang. *charge-coupled device*) oraz specjalnego oprogramowania komputerowego. Gdy kropla nabiera kształt kulisty i ma odpowiednią geometrię, system rozpoczyna pomiar.

Na podstawie pomiaru napięcia powierzchniowego sporządzono wykresy przedstawiające napięcie powierzchniowe w funkcji logarytmu stężenia cieczy jonowych w poszczególnych roztworach i wyznaczono krytyczne stężenie micelizacji CMC.

Badania wykonano dla roztworów wodnych wybranych morfoliniowych cieczy jonowych bez oraz z dodatkiem alkoholu krótkołańcuchowych (metanolu i etanolu, mieszanina woda i alkohol w stosunku 4:1).

Kąty zwilżania zostały zmierzone również za pomocą analizatora kształtu kropli DSA100 firmy Krüss, stosując metodę siedzącej kropli (ang. *sessile drop metod*). Metoda ta polega na wykorzystaniu równania Young-Laplace'a i dopasowaniu go do obrazu kropli, adekwatnie do jej kształtu i krawędzi. Ciecz jest wypychana za pomocą tłoka ze strzykawki, która jest zakończona igłą. Kropla cieczy dozowana jest na określoną powierzchnię, a jej geometria analizowana za pomocą kamery CCD oraz specjalnego oprogramowania komputerowego. Gdy kropla jest już osadzona, pierwsze sekundy jej spoczynku są najistotniejsze do wyznaczenia kąta. Kąt zwilżania określane jest na podstawie nachylenia stycznej w punkcie 3-fazowym (ciało stałe-ciecz, ciecz-powietrze i powietrze-ciało stałe). Taką techniką zostały zmierzone wodne roztwory badanych związków, a analizy przeprowadzono na płytce wzorcowej. Pomiary kąta zwilżania przeprowadzono z wykorzystaniem powierzchni politetrafluoroetyleny (PTFE) (Tuplex Sp. z o.o.).

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1 Ciecze jonowe z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoosanowym

Na Rys.2 przedstawiono zależności napięcia powierzchniowego roztworów wodnych cieczy jonowych z anionem [Dikamba] od stężenia (log C). Na podstawie uzyskanych wyników określono wartości CMC dla poszczególnych roztworów cieczy jonowych.

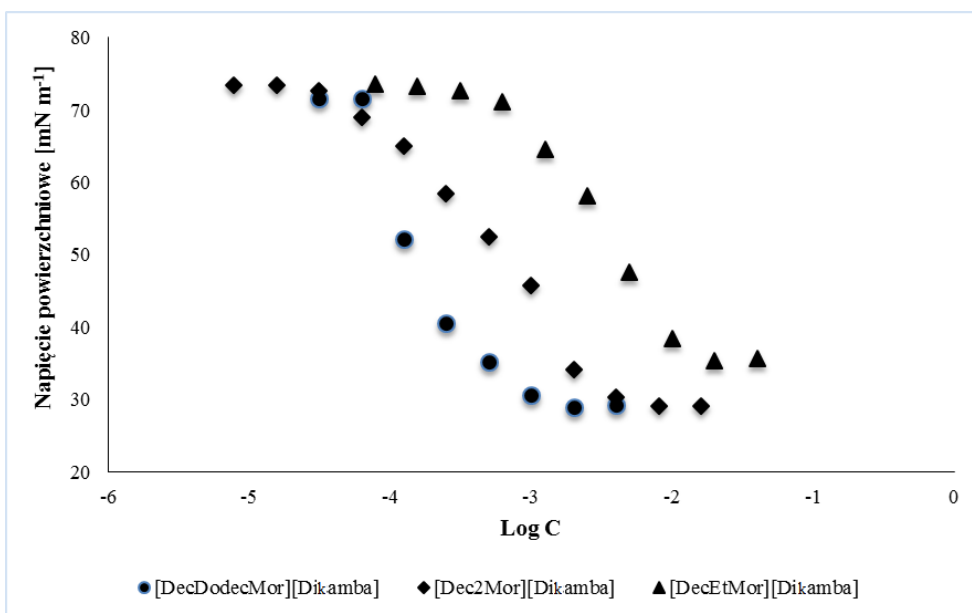
Na podstawie przeprowadzonych pomiarów można stwierdzić, że dodatek [DecDodecMor][Dikamba] obniża napięcie powierzchniowe wody do wartości 27,3 mN m<sup>-1</sup>, dla [Dec<sub>2</sub>Mor][Dikamba] otrzymano wartość 29,7 mN m<sup>-1</sup> natomiast dla [DecEtMor][Dikamba]: 35,1 mN m<sup>-1</sup>. Wyraźnie widoczny jest wpływ długości podstawnika w kationie na wartość napięcia powierzchniowego. Im dłuższy łańcuch węglowodorowy w kationie, tym obserwuje się niższe wartości napięcia powierzchniowego.

W Tab.2 przedstawia wartości CMC oraz  $\gamma_{CMC}$  dla analizowanych cieczy jonowych z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoosanowym.

W przypadku badanych cieczy jonowych z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoosanowym zaobserwowano, iż wartości CMC są uzależnione od budowy analizowanych związków, długie (od 10 atomów węgla) łańcuchy alkilowe sprzyjały tworzeniu się micel dla mniejszych stężeń cieczy jonowych w roztworach wodnych. Wartości CMC mieszczą się w przedziale od  $1,24 \cdot 10^{-2}$  do  $3,27 \cdot 10^{-3}$  mN m<sup>-1</sup>.

Analogiczne pomiary wykonano dla roztworów z dodatkiem metanolu i etanolu (mieszanina wody i alkoholu w stosunku 4:1; wartość napięcia powierzchniowego badanych rozpuszczalników – mieszanina woda-metanol: 46,2 mN m<sup>-1</sup>, woda-etanol: 41,4 mN m<sup>-1</sup>).

W Tab.3 i 4 przedstawiono zestawienia wartości CMC kationów z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoosanowym w roztworach wodnych kolejno z dodatkiem metanolu, następnie z dodatkiem etanolu.



Rys. 2. Morfoliniowe ciecze jonowe z anionem Dikamba.

Tab. 2. Wartości CMC i napięcia powierzchniowego morfoliniowych cieczy jonowych z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesanowym w roztworze wodnym.

Ciecz jonowa	Wartość CMC [mol dm <sup>-3</sup> ]	$\gamma_{\text{CMC}}$ [mN m <sup>-1</sup> ]
[DecDodecMor][Dikamba]	$1,28 \cdot 10^{-3}$	27,3
[Dec <sub>2</sub> Mor][Dikamba]	$3,27 \cdot 10^{-3}$	29,7
[DecEtMor][Dikamba]	$1,24 \cdot 10^{-2}$	35,1

Tab. 3. Wartości CMC morfoliniowych cieczy jonowych z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesanowym w roztworze wodnym z dodatkiem metanolu.

Ciecz jonowa	Wartość CMC [mol dm <sup>-3</sup> ]
[DecDodecMor][Dikamba]	$1,01 \cdot 10^{-3}$
[Dec <sub>2</sub> Mor][Dikamba]	$2,37 \cdot 10^{-3}$
[DecEtMor][Dikamba]	$1,06 \cdot 10^{-2}$

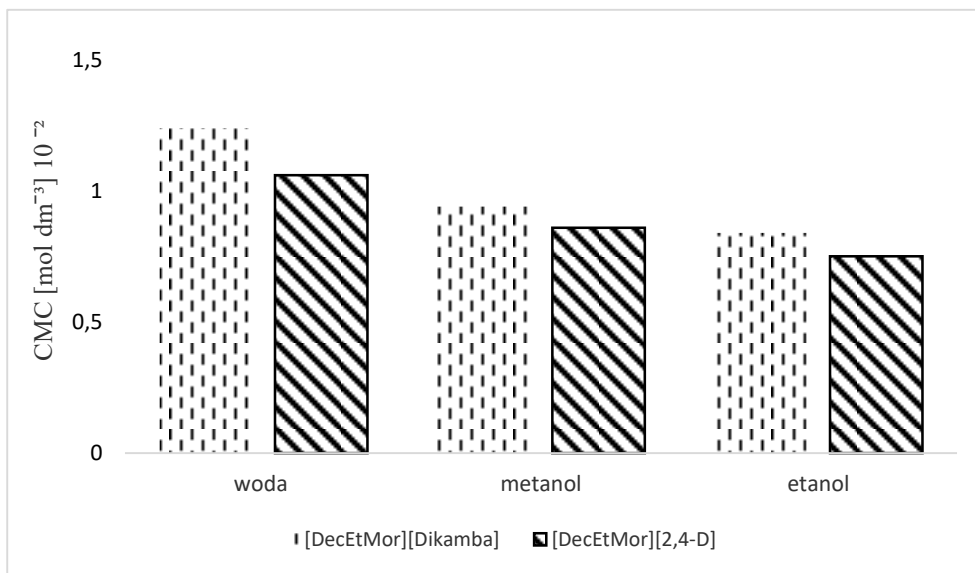
Tab. 4. Wartości CMC morfoliniowych cieczy jonowych z anionem (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesanowym w roztworze wodnym z dodatkiem etanolu.

Ciecz jonowa	Wartość CMC [mol/dm <sup>3</sup> ]
[DecDodecMor][Dikamba]	$0,86 \cdot 10^{-3}$
[Dec <sub>2</sub> Mor][Dikamba]	$1,64 \cdot 10^{-3}$
[DecEtMor][Dikamba]	$0,88 \cdot 10^{-2}$

Zestawione wyniki pozwalają stwierdzić, iż dodatek alkoholu wpływa na obniżenie wartości CMC. Zastosowanie zróżnicowanych pod względem budowy kationów przy anionie (3,6-dichloro-2-metoksy)benzoesanowym, pozwala zauważyć, że najniższe wartości CMC przyjmują związki z kationem zawierającym dłuższe łańcuchy alkilowe przy atomie azotu. W przypadku badanych

cieczy jonowych z dodatkiem metanolu, wartości CMC przyjmują wartości od  $1,01 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  [DecDodecMor][Dikamba] do  $1,06 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  [DecEtMor][Dikamba]. Porównując dane z Tab.3 i 4, obserwuje się obniżenie wartości CMC przy dodatku metanolu dla soli zawierającej kation 4,4-didecyłomorfoliniowy. Ponadto dodatek etanolu bardziej niż metanolu skutkuje obniżeniem wartości CMC. Wartości z tab. 4 mieszczą się w przedziale od  $0,86 \cdot 10^{-3}$  do  $0,88 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ . Zastosowanie alkoholi krótkołańcuchowych jako dodatku w celu obniżenia wartości CMC, co potwierdzają dane literaturowe (Przondo 2007).

### 3.2 Ciecze jonowe z kationem 4-decylo-4-etylmorfoliniowym [DecEtMor]



**Rys. 3.** Wartość CMC oraz napięcia powierzchniowego morfoliniowych cieczy jonowych z kationem 4-decylo-4-etylmorfoliniowym w środowisku wodnym oraz z dodatkiem alkoholu (metanolu, etanolu).

Wykorzystanie alkoholu wpłynęło na obniżenie wartości CMC, co łatwo dostrzec analizując dane przedstawione na Rys.3. Tendencja do obniżania wartości CMC pod wpływem dodatku etanolu jest bardziej widoczna niż dla metanolu. Dodatkowo na podstawie powyższych wyników wnioskuje się, że dla badanych związków na proces tworzenia się agregatów w danym medium reakcyjnym wpływa natura anionu.

### 3.3 Pomiar kąta zwilżania

Do pomiarów kąta zwilżania przygotowano roztwory o stężeniach wyższych od CMC, gdyż najlepszą zwilżalność (minimum kąta zwilżania) obserwuje się przy całkowitym wysyceniu granicy faz.

Tab.5 przedstawia wartości kątów zwilżania dla badanych roztworów wodnych herbicydowych cieczy jonowych oraz wody, materiałem zwilżanym była parafina.

Zmierzone wartości kątów zwilżania dla wodnych roztworów morfoliniowych cieczy jonowych z anionem o działaniu herbicydowym nie przekraczają wartości kąta  $64^\circ$ . Najniższą wartość kąta zwilżania o wartości  $43^\circ$  zaobserwowano w przypadku cieczy z kationem [DecDodecMor]. Można zauważyć niewielki wpływ budowy anionu na otrzymane wartości kąta zwilżania. Uzyskane wyniki wskazują na większy wpływ budowy kationu, gdyż to właśnie zmiany w obrębie budowy kationu morfoliniowego skutkowały zmianami w wartościach kąta zwilżania.

Analogicznie wykonano pomiary dla roztworów cieczy jonowych z dodatkiem odpowiednio metanolu i etanolu. Wyniki zestawiono w Tab.6.

**Tab. 5.** Wartości kąta zwilżania dla badanych cieczy jonowych bez dodatku alkoholi, powierzchnia zwilżana: parafina.

Ciecz jonowa	Kąt zwilżania, $\theta$ [°]
[DecDodecMor] [Dikamba]	43,0
[Dec <sub>2</sub> Mor] [Dikamba]	55,7
[DecEtMor][Dikamba]	64,0
[DecEtMor][2,4-D]	58,7
Woda	115,0

**Tab. 6.** Wartości kąta zwilżania dla badanych cieczy jonowych z dodatkiem alkoholi, powierzchnia zwilżana: teflon.

Ciecz jonowa	Kąt zwilżania, $\theta$ [°]		
	woda:metanol (4:1)	woda:etanol (4:1)	woda
[DecDodecMor] [Dikamba]	38,8	37,3	43,0
[Dec <sub>2</sub> Mor] [Dikamba]	50,4	49,2	55,7
[DecEtMor][Dikamba]	60,4	59,3	64,0
[DecEtMor] [2,4-D]	53,2	52,8	58,7

Wyniki zestawione w tab. 6 potwierdzają wpływ długości łańcucha na obniżenie kąta zwilżania badanych związków. Zmiany wartości kąta zwilżenia są porównywalne dla metanolu i etanolu. Natomiast brak zastosowania alkoholu powoduje zauważalne zmiany zwilżalności teflonu przez ciecze jonowe.

#### 4. Wnioski

Niniejsze badania dotyczące morfoliniowych cieczy jonowych z anionem o działaniu chwastobójczym wykazały, że analizowane związki wykazują zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego wody. Ponadto dowiedziono, iż dodatek alkoholu do roztworów wodnych cieczy jonowej skutkuje obniżeniem wartości krytycznego stężenia micelowania (CMC) i kąta zwilżania. Obniżenie wartości CMC pozwala na zastosowanie znacznie mniejszych ilości aktywnych powierzchniowo cieczy jonowych o działaniu herbicydowym.

#### 5. Literatura

Abu-Ghunmi L, Badawi M, Fayyad M (2014) Fate of Triton X-100 Applications on Water and Soil Environments a Review. *J Surfact. Deterg.* DOI 10.1007/s11743-014-1584-3.

- Castro M J L, Ojeda C, Fernandez Cirelli A (2014) Advances in surfactants for agrochemical. *Env Chem Lett* 12: 85-95.
- Cojocararu O A, Shamshina J L, Gurau G, i in. (2013) Ionic liquid forms of the herbicide dicamba within creased efficacy and reduced volatility *Green Chem.* 15: 2110-2120.
- Domańska U, Lukoshko E. V (2014) Thermodynamics and activity coefficients at infinite dilution for organic solutes and water in the ionic liquid 1-butyl-1-methylmorpholinium tricyanomethanide. *The Journal of Chem. Thermodynam.* 68: 53.
- Janiszewska D, Syguda A, Pernak J (2010) Ciechowskie cieczy jonowe. *Przem. Chem.* 89(11): 1441-1445.
- Johnson K E (2007) What's an ionic liquid?, *The Electrochemical Society – Interface* 38-41.
- Khupse N D, Kumar A, (2010) Ionic liquids: New materials with wide applications, *Indian Journal of Chemistry*, vol. 49A, 2010, 635-648.
- Ławniczak Ł, Materna K, Framski G i in. (2015) Comparative study on the biodegradability of morpholinium herbicidal ionic liquids. *Biodegradation.* 26: 327–340.
- Niemczak M., Rzemieniecki T, Sobiech Ł, i in. (2019) Influence of the alkyl chain length on the physicochemical properties and biological activity in a homologous series of dichlorprop-based herbicidal ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 276: 431-440.
- Pernak J, Syguda A, Materna K, i in. (2012) 2,4-D based herbicidal ionic liquids. *Tetrahedron* 68: 4267-4273.
- Przondo J (2007) Związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie w produkcji chemii gospodarczej. *Politechnika Radomska.*
- Syguda A, Gielnik A, Borkowski A, i in.(2018) Esterquat herbicidal ionic liquids (HILs) with two different herbicides: evaluation of activity and phytotoxicity. *New J. Chem.* 42: 9819-9827.
- Tariq M, Freire M G, Saramago B, i in. (2012) Surface tension of ionic liquids and ionic liquid solutions, *Chem. Soc. Rev.* 41: 829–868.
- Wyrwas B (2012) Rozprawa habilitacyjna metodologiczne aspekty biodegradacji.
- Zhao M, Zheng L (2011) Micelle formation by N-alkyl-N-methylpyrrolidinium bromide in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13: 1332–1337.