

ავტორის სტილი დაცულია

ხელნაწერის უფლებით

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტი

თამარ ჩაჩიბაია

ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიის

გამოყენების თანამედროვე ასპექტები აზიდების

შესასწავლად და ჯანმრთელობის რისკების შეფასება

საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დოქტორის აკადემიური ხარისხის

მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

შოთა ცანავა - ასოცირებული პროფესორი

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

მიგელ პერფექტო პასეირო ლოსადა - სრული პროფესორი

სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტი



უნივერსიტეტის  
გამოცემლობა

თბილისი

2015

## შინაარსი

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. შესავალი</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1 აქტუალობა   | 3         |
| 1.2 მიზანი  | 8         |
| 1.3 ამოცანები   | 9         |
| 1.4 მეცნიერული სიახლე   | 10        |
| 1.5 გამოყენების რეკომენდებული სფეროები  | 10        |
| <b>2 დაცვაზე გამოსატანი დებულებები</b>  | <b>11</b> |
| <b>3 გამოქვეყნებული შრომები</b>   | <b>12</b> |
| <b>4 ნაშრომის აპრობაცია</b>   | <b>13</b> |
| <b>5 ლიტერატურის მიმოხილვა</b>  | <b>14</b> |
| 5.1 ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპია   | 14        |
| 5.1.1 მაგნიტური რეზონანსის პრინციპი   | 17        |
| 5.1.2 ბირთვების მაგნიტური თვისებები - სპინი   | 21        |
| 5.1.3 ნატრიუმის აზიდის გამოყენება ფარმაციაში და<br>მონიტორინგის მნიშვნელობა ჯანმრთელობის<br>რისკების შესაფასებლად | 25        |
| 5.1.4 ნატრიუმის აზიდის ზემოქმედება ადამიანის<br>ჯანმრთელობაზე   | 28        |
| 5.1.5 ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის კლინიკური<br>შემთხვევების მიმოხილვა დიალიზის ცენტრში                             | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1.6 ნატრიუმის აზიდის განსაზღვრა თირკმლის<br>ჩანაცვლებითი თერაპიის ცენტრში სადიალიზო<br>ფილტრებში და დიალიზატში | 35        |
| <b>6 მასალა და მეთოდები</b>  | <b>41</b> |
| 6.1 ბმრ- სპექტრომეტრები  |           |
| სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტში  | 42        |
| 6.2 საანალოზო ხსნარის მომზადება კალიბრაციისთვის  | 43        |
| 6.3 რეფერენს სტანდარტული ხსნარის მომზადება   | 43        |
| 6.4 ფიზიურ-ქიმიური ფაქტორები, რომლებიც ზემოქმედებენ<br>რაოდენობრივი ბმრ-ის ანალიზის შედეგებზე                    | 44        |
| 6.5 რეფერირების ტექნიკური გამოყენება ბმრ-ის სპექტოსკოპული<br>ანალიზის დროს                                       | 46        |
| 6.6 სტანდარტის დამატების მეთოდი  | 48        |
| 6.7 კალიბრაციის მრუდის მეთოდი  | 49        |
| 6.8 ბმრ სკანირებების რაოდენობა   | 50        |
| 6.9 ჰიდრატირებული ფულერენის დიფუზიის<br>კოეფიციენტის განსაზღვრა  | 52        |
| <b>7 შედეგები</b>  | <b>54</b> |
| 7.1 პროტონული (1H) ბმრ-სპექტროსკოპიით აზიდების<br>შესწავლა, დერივატიზაციის რეაქციის შედეგები                     | 54        |

|  |            |
|--|------------|
| 7.2 ნატრიუმის აზიდის ( $\text{NaN}_3$ ) დეტექცია $^{14}\text{N}$ -ბმრ<br>სპექტროსკოპიით და რაოდენობრივი განსაზღვრა                                 | 56         |
| 7.3 ნატრიუმის აზიდის კალიბრაციის შედეგები  | 60         |
| 7.4 ნატრიუმის აზიდის ( $\text{NaN}_3$ ) ჰიდრატირებულ ფულერენთან ( $\text{C}_{60}$ )<br>ურთიერთქმედების შესწავლა $^{14}\text{N}$ ბმრ სპექტროსკოპიით | 61         |
| <b>8 შედეგების განხილვა</b>  | <b>68</b>  |
| <b>9 მიღებული შედეგების შეჯამება</b>   | <b>79</b>  |
| <b>10 დასკვნები</b>  | <b>80</b>  |
| <b>11 რეკომენდაციები</b>   | <b>80</b>  |
| <b>12 გამოყენებული ლიტერატურა</b>  | <b>83</b>  |
| <b>13 ინგლისური რეზიუმე</b>  | <b>101</b> |
| <b>14 მადლიერება</b>   | <b>151</b> |

## შესავალი

### აქტუალობა

ნატრიუმის აზიდი ციანიდის ტოლფასი ძლიერმოქმედი შხამია, ამავე დროს არ არსებობს მისი ანტიდოტი (Collman, 2001, Chang & Lamm, 2003) [1, 2]. მიუხედავად საფრთხისა, ხელსაყრელი ფიზიკური და ქიმიური თვისებების გამო გამოიყენება მრავალ სფეროში, მათ შორის სამედიცინო მიზნებისთვისაც.

ნატრიუმის აზიდის წარმოება ყოველწლიურად იზრდება და შეტანილია მსოფლიო სავაჭრო ორგანიზაციის (OECD) ქიმიკატების ნუსხაში, რომლებიც დიდი რაოდენობით სინთეზირდება და ექვემდებარებიან კონტროლს მისალოდნელი საფრთხისა და რისკის გათვალისწინებით.

აზიდები დიდი რაოდენობით გამოიყენება ინდუსტრიული მასშტაბებით, როგორც ფარმაცევტული წარმოებისთვის, ასევე, სხვადასხვა ქიმიური ნაერთების სინთეზში. განსაკუთრებულად საჭიროებს ჯანმრთელობის და გარემოს დაცვის რისკების და ამასთან დაკავშირებული უსაფრთხოების დაცვის საკითხების შეფასებას, როგორც მწვავე, ასევე ქრონიკული ზემოქმედება, გარემოში მოხვედრილი ინდუსტრიული ნარჩენების ზემოქმედება, ასევე, პროფესიული უსაფრთხოება საწარმოში მომუშავეებისთვის და სხვა.

ნატრიუმის აზიდს აქვს გამოყენების ფართო დიაპაზონი. მას გააჩნია ძლიერი ბაქტერიციდული, ინსექტიციდური და ჰერბიციდული თვისებები. იხმარება წყლის დეზინფექციისთვის, როგორც მუნიციპალური წყლის გასუფთავების სისტემებში, დიალიზის ფილტრებში, ასევე, ლოკალურადაც, მაგალითად, საცურაო აუზების გასაწმენდად.

სამედიცინო ლაბორატორიებში გამოიყენება რუტინულად ბაქტერიული ზრდის დასათრგუნად ნიმუშების კონსერვაციისა და

პრეზერვაციისთვის (Gerencser & Weaver, 1958; Lichstein & Soule, 1944) [3, 4]. ასევე, იყენებენ იმუნოლოგიურ სადიაგნოზო რეაგენტების შემადგენლობაში. გააჩნია ძლიერ გამოხატული ჰიპოტენზიური მოქმედება აზოტის (II) ოქსიდის (NO) გენერირების გზით. მედიცინაში 1954 წელს ჩატარდა კაზუსური კლინიკური კვლევა ნატრიუმის აზიდის ჰიპოტენზიური ეფექტის შესასწავლად, თუმცა ნეიროტოქსიკურობის გამო არ იქნა აპრობირებული (Black et al. 1954) [5], ვინაიდან შეუქცევლად იწვევს მიტოქონდრიული ციტოქრომ ოქსიდაზას ინჰიბიციას და ცერებრულ ანოქსიას [6, 7]. ლეტალურად ითვლება ნატრიუმის აზიდის დოზა 0.7–2 გ (10 მგ/კგ), რომლის ზემოქმედება იწვევს სიკვდილს ადამიანის ორგანიზმში მოხვედრის შემთხვევაში 15-30 წუთში, ხოლო პერორალურად ნაკლები დოზით მიღება (0.004–2 მგ/კგ) ადამიანის ჯანმრთელობისთვის საზიანოა და სხვადასხვანაირი სიმპტომებით ვლინდება, ქრონიკულად მცირე დოზით ზემოქმედება იწვევს დემენციას [8].

ბიოლოგიურ ექსპერიმენტებში წარმოადგენს უნივერსალურ ბაქტერიციდულ სტანდარტულ საშუალებას [9]. ასევე, რეკომენდებულია, როგორც ძლიერი ნეიროტოქსინი ინ ვივო კვლევებში ნეიროპროტექციული საშუალებების ფარმაკოლოგიური სკრინინგისთვის (Megyeri et al. 2008, Smith et al, 1991 ) [10, 11].

ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის მწვავე შემთხვევები განეკუთვნება სასამართლო სამედიცინო ექსპერტიზის შესწავლის სფეროს (Gordon et al. 1999, Łopaciński et al 2007, Klein-Schwartz et al 1989, Arduino, 2000) [12, 13, 14, 15], ხოლო, ქრონიკული ზემოქმედება, რომელიც ფიქსირდება საწარმოო პრაქტიკაში და იწვევს პროფესიულ დაავადებებს, ოკუპაციური მედიცინისთვის წარმოადგენს ინტერესს (Trout et al. 1996) [16].

სოფლის მეურნეობაში ნატრიუმის აზიდი ერთადერთი შხამი არ არის, რომელიც ფართოდ მოიხმარება. აშშ-ში 2000 წლიდან დაიწყო ნატრიუმის აზიდის დანერგვა სოფლის მეურნეობაში, როგორც პესტიციდის, ჰერბიციდის, და ინსექტიციდის სახით (Rodrigo Kabana, 2000, 2001, Cabrera et al, 2011) [17,18].

ნატრიუმის აზიდი იხმარება, როგორც მშვიდობიანი მიზნით, ასევე სამხედრო დანიშნულებითაც. როგორც აზოტის შემცველი ნივთიერება, რომელსაც გააჩნია ფეთქებადი თვისებები. იყენებენ ავტომობილების უსაფრთხოების ავტომატურად გასაბერი ბალიშების და ავიალაინერების საევაკუაციო დასაშვების (evacuation slide) დეტონატორებში.

XX საუკუნის 70-იან წლებში Shimano-ს მიერ (1972) [19] პირველად გამოიყენეს ავტომობილების უსაფრთხოების ბალიშები, ხოლო 2004 წლისთვის ნატრიუმის აზიდის წარმოებამ უკვე 250000 ტონას მიაღწია [20] და წარმოების ზრდის ტენდენცია სულ უფრო პროგრესირებს. 1000 კილოგრამი ნატრიუმის აზიდი უზრუნველყოფს დაახლოებით 15 000 ავტომობილს, თუმცა შემდეგ წლებში გაიზარდა გამოყენებული დეტონატორების რაოდენობა გვერდითი კარების აირ-ბალიშების ხარჯზე, რომლებშიც გაცილებით მეტია ნატრიუმის აზიდი საჭესთან შედარებით. 130 გრამი ნატრიუმის აზიდი წარმოქმნის 67 ლიტრ აზოტის აირს. ამით, უამრავი ადამიანის სიცოცხლე იქნა გადარჩენილი ავტოავარიების დროს 80-იანი წლების შემდგომ [21, 22, 23, 24, 25]. თუმცა ადვილად ხელმისაწვდომია მიტოვებულ ავტოსადგომებზე, სადაც ყველაზე პესიმისტური პროგნოზით შეიძლება მისი ამოღება ავტომანქანის აირ-ბალიშების სადეტონაციო კარტრიჯებიდან. ასევე, ნატრიუმის აზიდი გამოიყენება ცეცხლის ჩასაქრობ სისტემებში 2007 წლიდან (Richardson & Bennett, 2007; Richardson & Goetz, 2009, 2012, 2013) [26, 27].

ნატრიუმის აზიდი, როგორც ფეთქებადი ნივთიერება გამოიყენება ტყვიის აზიდის წარმოებაში და სხვადასხვა ლეგალურ ან არალეგალურ ასაფეთქებელ მოწყობილობებში, როგორც სამშენებლო-საკონსტრუქციო დანიშნულებით, ასევე მაღაროებში და სამხედრო მიზნებით (Rameev, 2012) [28].

მეცნიერების ერთ ჯგუფს მიაჩნია, რომ არსებობს ნატრიუმის აზიდის გარემოში თავისუფლად მოხვედრის საშიშროება, რაც დიდ საფრთხეს წარმოადგენს, ვინაიდან, ავარიულ ავტომობილებში, კერძოდ, უსაფრთხოების ბალიშებში, ნატრიუმის აზიდი საკმაოდ დიდი რაოდენობითაა (Betterton, 2010, Hitt, 2007) [29, 30]. ამას ადასტურებს 2015 წლის მაისში კომპანია ტაკადას (TACADA) მიერ უკან გამოთხოვილი 18 მილიონი ავტომობილების რეკორდული ციფრი გასაბერი ბალიშების წარმოებაში დაშვებული დეფექტების გამო, რამაც 5 ადამიანის სიკვდილი გამოიწვია და არაერთი დაშავდა [31, 32].

ამასთანავე, ფიქრობენ, რომ შესასწავლია გარემოში მოხვედრილი ნატრიუმის აზიდის ზემოქმედების მასშტაბები გარემოსა და ადამიანის ჯანმრთელობაზე, ამავე დროს, საკმაოდ რთულია მისი დეტექცია არსებული მეთოდებით. რადგან, ეს ნივთიერება წყალში ხსნადი და საკმაოდ რეაქტიულია, ძალიან იოლად გარადაიქმნება აზოტწყალბადმჟავად (HN3), რომელიც სწრაფად აორთქლებად, ფეთქებად და უკიდურესად ტოქსიკურ აირებს წარმოქმნის. ამგვარად, გარდა ძლიერი მომწამლავი თვისებებისა, ნატრიუმის აზიდის და თანმხლები აზოტწყალბადმჟავას აფეთქების უნარი ასევე მნიშვნელოვანი რისკის ფაქტორია და უსაფრთხოების განსაკუთრებულ ზომების გატარებას საჭიროებს.

ამ მხრივ, ჯანმრთელობის გადაუდებელი დახმარების ორგანიზაციებისთვის გასათვალისწინებელია გარკვეული ასპექტები. კერძოდ,



მაშველების ინფორმირება და ტრენინგი ნატრიუმის აზიდის უსაფრთხოების ზომების დაცვის შესახებ.

მსოფლიო სავაჭრო ორგანიზაციის განსაზღვრებით, მაღალი წარმოების ქიმიკატების (High Production Volume Chemicals (HPV) ნუსხაში შეტანილია 5,235 ნივთიერება, რომლების პროდუქცია და იმპორტი წლიურად 1,000 ტონაზე მეტი რაოდენობით ხდება (McKeen, 2010) [33]. ნატრიუმის აზიდის ფიგურირებს ამ ნუსხაში. ხოლო, 2009 წელს გამოცემულ საქართველოს ქიმიური პროფილის გზამკვლევაში (Todua, 2009) [34] ნატრიუმის აზიდი შეტანილი არ არის საქართველოში არსებულ სახიფათო ქიმიური ნივთიერებების ჩამონათვალში, რაც შემდგომ გამოცემებში ჩვენი რეკომენდაციით შეტანილი უნდა იქნას, ვინაიდან, საქართველოში რეგისტრირებულ ავტომობილებში ყველასათვის შეიძლება იყოს ხელმისაწვდომი ნატრიუმის აზიდი. გარდა ამისა, ავარიულ ვითარებაში არსებობს წყალში და გარემოში მოხვედრის საშიშროება, ისევე, როგორც რისკს წარმოადგენს მაშველებისთვის. როგორც წესი, გვერდით კარებებში დატანებულ უსაფრთხოების ბალიშებში უფრო მეტი ნატრიუმის აზიდია მოთავსებული ვიდრე საჭეში, ასე, რომ გვერდითი კარის გაჭრისას შესაძლოა მოხდეს მისი გაფრქვევა და ამას მოყვებს ადამიანების მოწამლვა (Watson, 2010, Weiss, 1996) [35]. პირველ რიგში, საჭიროა ამ რისკის შესახებ გაფრთხილებული იყვნენ მაშველები, ამავე დროს, უნდა იცოდნენ უსაფრთხოების ზომების შესახებ და მოწამლვისას შეძლონ დახმარების აღმოჩენა.

როგორც მსოფლიო სამედიცინო გამოცდილება გვიჩვენებს და შესაბამისი ლიტერატურული წყაროებიდან აშკარაა, რომ მოწამლვის შემთხვევაში დიალიზი ერთადერთი სამკურნალო საშუალებაა. ჩვენი რეკომენდაციით მოხდება აღნიშნული ინფორმაციის გადაუდებელი მედიცინის სასწავლო ცენტრის კურიკულუმში შეტანა.

გარდა ამისა, ქრონიკული ინტოქსიკაციისა და პროფესიული დაავადებების პრევენციისთვის საწარმოო პრაქტიკაში შესწავლის ინტერესს წარმოადგენს ანტიოქსიდანტები, კერძოდ, თავისუფალი რადიკალების ინაქტივაციის უნარის მქონე საშუალებები. ჩვენ ამ მიზნით ვიკვლევთ ჰიდრატირებულ C60-ფულერენის ნატრიუმის აზიდთან ურთიერთქმედების მექანიზმს და ასევე, მის ნეიროპროტექციულ ზემოქმედებას.

კვლევის მიზანი: ჩვენი კვლევის მიზანია ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპიის თანამედროვე ინივაციური მაღალ-ტექნოლოგიური ქიმიურ-ანალიზური მეთოდის გამოყენებით ნატრიუმის აზიდის შესწავლა, როგორც პირდაპირი, ასევე დერივატიზაციის მეთოდით. ანტიოქსიდანტის, ფულერენის, ნატრიუმის აზიდთან ურთიერთქმედების შესწავლა. ქრონიკული ინტოქსიკაციის პრევენციის მიზნით ფულერენის ნეიროპროტექციული თვისებების კვლევა და საწარმო პროფესიული დაავადებების პროფილაქტიკისთვის პრაქტიკული რეკომენდაცია.

კვლევის ამოცანაა, შევისწავლოთ და დავამკვიდროთ უფრო მაღალი სიზუსტის თანამედროვე ქიმიურ-ანალიზური მეთოდი, კერძოდ, ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპია, რაც საშუალებას იძლევა უფრო მეტი სანდოობით მოხდეს ნატრიუმის აზიდის შემცველობის შეფასება საკვებში, მედიკამენტებში, ბიოლოგიურ სითხეებში სასამართლო მედიცინის პრაქტიკაში, ისევე, როგორც ფარმაცევტული წარმოების პროცესში ხარისხის კონტროლისთვის წამლებში მინარევების შესასწავლად. ასევე, წყლის დამუშავების პროცესში და დრენირებულ წყალშიც, მაგალითად, დიალიზის პროცედურების დროს. ასევე, მნიშვნელოვანია, საწარმოო უსაფრთხოებისთვის ნატრიუმის აზიდის დაბალი დოზით მოწამლვის რისკის თავიდან ასაცილებლად. ამისთვის, შევისწავლეთ ანტიოქსიდანტის ჰიდრატირებული ფულერენის მოქმედების მექანიზმი და მისი

ნეიროპროტექციული თვისებები, რომელიც რეკომენდებულია, როგორც საკვების დანამატი ზოგიერთ ქვეყანაში (IPACOM, უკრაინის ჯანდაცვის სამინისტროს დასკვნა #05.03.02-04/95179, 2010). [36]

მეცნიერული სიახლე: კვლევა ეხება ინოვაციური და მაღალ-ტექნოლოგიური მეთოდის ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპიის გამოყენებით ნატრიუმის აზიდის შესწავლას როგორც პირდაპირ, ასევე, დერივატიზაციის მეთოდით. ასევე, ნატრიუმის აზიდის ანტიოქსიდანტ ფულერენთან ურთიერთქმედების მექანიზმის შესწავლას.

ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპიის მეთოდის გამოყენება ორგანული და არაორგანული აზიდების და მისი დერივატიზაციის პროდუქტების შესასწავლად წარმოადგენს უახლეს და მაღალ-ტექნოლოგიურ მეთოდს, რომელსაც მრავალი უპირატესობა გააჩნია სხვა ანალიზურ მეთოდებთან შედარებით, კერძოდ, ახასიათებს მაღალი სპეციფიურობა, რაც თითქმის აბსოლუტურს უტოლდება. ასევე, დაუყოვნებლად ანალიზის ჩატარების შესაძლებლობა ამ მეთოდის დიდი უპირატესობას წარმოადგენს. სინჯს არ სჭირდება სპეციალური მომზადება, ანალიზი პირდაპირ ტარდება ნებისმიერ ნივთიერებაზე, მათ შორის ბიოლოგიურ სითხეებზეც. ნატრიუმის აზიდის დეტექციისთვის რიგ შემთხვევებში იყენებენ დერივატიზაციის მეთოდს და დღემდე ხელმისაწვდომი ქიმიურ-ანალიზური მეთოდების საშუალებით ისაზღვრებოდა ნატრიუმის აზიდის შემცველობა, რომელიც შეადგენს 100 ppm (მემილიონედი წილი) ანუ 0.01% (Vacha et al, 1989, Kruszyna et al, 1998, Swarin et al, 1982, Lambert et al, 1995) [37, 38, 39, 40], ხოლო უახლესი მონაცემებით კი, რომელიც დამყარებულია აზიდ-ალკინის ციკლირების რეაქციაზე, შესაძლებელი გახდა 21 ppb (0.021ppm) დოზის განსაზღვრა, (Wang, 2011), [41]

რაც არსებული მეთოდის მოდიფიკაციის და ბმრ-სპექტროსკოპიით განსაზღვრის საშუალებას იძლევა.

გამოყენების რეკომენდებული სფეროები: ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპიის ინოვაციური მეთოდის გამოყენება ფარმაციაში ქიმიურ-ანალიზური მონიტორინგისთვის; სასამართლო-სამედიცინო ექსპერტიზაში მოწამლვის შემთხვევების სადიაგნოზოდ; საკვების და სასმელის უსაფრთხოებაში; გარემოს და წყლის მონიტორინგში; საწარმოში აზიდის კონტროლის და მისი შემცველობის მონიტორინგისთვის და პროფესიული დაავადებების თავიდან ასაცილებლად (პროფილაქტიკის მიზნით); სამოქალაქო სფეროში უსაფრთხოებისთვის ასაფეთქებლების დეტექციისთვის აეროპორტებში და მასობრივი თავშეყრის ადგილებში.

ჩვენს მიერ შემოთავაზებული ქიმიურ ანალიზური მეთოდის ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპიის გამოყენების სფერო არის სამოქალაქო კვლევები და ეხება საერთო უსაფრთხოების საკითხებს, ისეთებს, როგორებიცაა, წყლის რესურსების, გარემოს და წარმოების უსაფრთხოება. ასევე, სასამართლო-სამედიცინო ექსპერტიზაში რაოდენობრივი და თვისობრივი ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიის მეთოდის რეკომენდება საქართველოში, ვინაიდან, მოწამლვის შემთხვევაში ეს მეთოდი უფრო სწრაფია ქსოვილების და ორგანიზმის სითხეების შესასწავლად ნატრიუმის აზიდის შემცველობაზე; ფარმაცევტულ პრაქტიკაში მინარევების არსებობის დასადგენად და წამლების წარმოებაში ქიმიურ რეაქციების სრული მონიტორინგისთვის; ასევე, სასმელის და საკვების უსაფრთხოების ანალიზისთვის, ვინაიდან, ნატრიუმის აზიდს იყენებენ ფერმენტაციის ინჰიბიტორად ღვინის წარმოებაში (OIV, 1962, 2014) [42], ასევე, ბაქტერიციდულად, პროდუქტის შენახვის ვადის გასახანგრძლივებლად, რეფერენს სტანდარტად ანალიზის

ჩასატარებლად, მაგალითად, რძეში. მთელ რიგ ქვეყნებში, მათ შორის ევროპაში რძის პროდუქტებში დადგენილი სტანდარტებით ანალიზის ჩატარებისას აუცილებელი მოთხოვნაა ნატრიუმის აზიდის დამატება ტესტირებისას რეფერენს სტანდარტად [43, 44, 45, 46, 47].

დაცვაზე გამოსატანი დებულებები:

ნატრიუმის აზიდის და მისი დერივატიზაციის პროდუქტების ანალიზის შედეგები პროტონული და აზოტის ბმრ-სპექტროსკოპიით. ასევე, ნატრიუმის აზიდის და ანტიოქსიდანტის ჰიდრატირებული ფულერენის (C60) ურთიერთქმედების შესწავლა სხვადასხვა ექსპერიმენტულ პირობებში.

## გამოქვეყნებული შრომების სია:

1. T. Chachibaia, M. Pastor. The State-Of-The-Art chemical analytical method for detection of sodium azide by  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy. *J. Nano Studies*, 2015, 11: 8-15.
2. T. Chachibaia, M. Pastor.  $^{14}\text{N}$  NMR Spectroscopy study of binding interaction between sodium azide and hydrated Fullerene. *In Proceedings of the MOL2NET*, 5–15 December 2015; Sciforum Electronic Conference Series, Vol. 1, 2015 , b010; doi:10.3390/MOL2NET-1-b010. IF: 2,86
3. T. Chachibaia. Model of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic analysis of azide containing organic molecules. *J. Nano Studies*, 2013, 8:191-200.  
[http://www.nanostudies.org/pdf/regular/8\\_191\\_200.pdf](http://www.nanostudies.org/pdf/regular/8_191_200.pdf)
4. V. Nedzvetsky, G. Andrievsky, T. Chachibaia, A. Tykhomyrov. Differences in Antioxidative-Protective Efficacy of Hydrated C60 Fullerene Nanostructures in Liver and Brain of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes, in the “*J. of Diabetes & Metabolism*”, 2012, 3:8. <http://owndoc.com/pdf/c60-rat-libido.pdf>. Impact factor: 1.77

## ნაშრომის აპრობაცია

1. 03.09.2015 - Detection of Sodium Azide by 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy and binding to Fullerene C60. Institute of Experimental Pharmacology & Toxicology, Department of Biochemical Pharmacology, Slovak Academy of Sciences. Bratislava.
2. 12.14.2015 – Validation and verification of experiments in CIETEC- Central European Institute of Technology, Brno, Josef Dadok National NMR Centre.
3. 2014 და 2011 წლების შემოდგომის სემესტრები - კოლოქვიუმები. თსუ მედიცინის ფაკულტეტი.
4. 02.21.2013 - Interpretation of NMR spectroscopy results of triazole and azide containing dendrimers. CIQUS. University of Santiago de Compostela, Spain.
5. 04.25.2013 - Facile derivatization of azide ions using click chemistry for their sensitive detection with LC-MS. CIQUS. University of Santiago de Compostela, Spain.
6. 01.17.2013 - Synthesis of Triazole containing dendrimers by thermal Azide-Alkene Cycloaddition 'click' reaction. CIQUS, University of Santiago de Compostela, Spain
7. 11.08.2012 - Development of dendrimers as scaffold for contrast agents, safety and efficacy studies. CIQUS, University of Santiago de Compostela, Spain
8. 10.18.2012 - Antioxidative protective effect of Hydrated C60 Fullerene in experimental streptozotocin-induced diabetes. CIQUS, University of Santiago de Compostela, Spain

## ლიტერატურის მიმოხილვა

### ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპია

ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპია (ბმრ-სპექტროსკოპია) წარმოადგენს კვლევის თანამედროვე მაღალ-ტექნოლოგიურ ქიმიურ-ანალიზურ მეთოდს, რომლითაც ხდება მაგნიტური თვისების მქონე ატომური ბირთვების დეტექცია შესასწავლ ნიმუშში, მისი მოთავსებით მძლავრ გარე მაგნიტურ ველში და დამყარებულია შესასწავლი ბირთვის უნარზე მოახდინოს რადიო-სიხშირის გამოსხივების აბსორბცია და რეემისია.

ბმრ-სპექტროსკოპიის ტექნიკა დაფუძნებულია მაგნიტური ველის მოქმედების შედეგად ატომის ბირთვის დევიაციის უნარზე.

მედიცინაში გამოიყენება ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული ვიზუალიზაციისთვის, ხოლო, ქიმიაში, ბიოქიმიაში, მასალების წარმოებაში და ფარმაკო-ქიმიაში სამეცნიერო კვლევებისთვის კი ბმრ-სპექტროსკოპია, ასევე, ნაერთების სტრუქტურული შემადგენლობის თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზისთვის, კერძოდ, თვისობრივი ანალიზი უცნობი ნაერთის იდენტიფიკაციისთვის, ხოლო, რაოდენობრივი, კი იმის დასადგენად, თუ რამდენად სუფთაა ნაერთი.

ბირთვული მაგნიტური რეზონანსის გამოყენება ორგანულ ქიმიაში L.M. Jackman-მა დაიწყო XX საუკუნის 50-იან წლებში. [48]

მაქსიმალურად სრული წარმოდგენა რომ შექმნილიყო ბირთვული მაგნიტური რეზონანსის მნიშვნელობის შესახებ პროფესორმა Charles D. Schaeffer Jr.-მა ჩაატარა ბიბლიომეტრიული კვლევა. მის მიერ შექმნილია მონაცემთა ბაზა, რომელიც მუდმივად განახლებადია და წარმოადგენს ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ბიბლიოგრაფიულ რესურსს ბირთვული მაგნიტური რეზონანსის შესახებ ინფორმაციის საძიებო სისტემას. სრული ბიბლიოგრაფია,



პუბლიკაციების და ლიტერატურის სია განთავსებულია და ხელმისაწვდომია ვებ-გვერდზე, რაც შეადგენს 500 გვერდს 2014 წლის იანვრის მონაცემებით [49].

ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული (ბმრ) სპექტროსკოპია წამოადგენს უნივერსალურ ქიმიურ-ანალიზურ მეთოდს, რომლითაც შესაძლებელია მოლეკულური ნაერთების ნიმუშის, როგორც, თვისობრივი, ასევე, რაოდენობრივი მახასიათებლების განსაზღვრა და შესწავლა.

უფრო ხშირად გამოიყენება თვისობრივი ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიული მეთოდი, ამავე დროს, რაოდენობრივი ბმრ წარმოადგენს უნიკალური შესაძლებლობების მქონე მეტროლოგიურ მეთოდს.

რაოდენობრივი ბმრ-სპექტროსკოპია გამოიყენება სხვადასხვა სფეროში: ბიოლოგია, ქიმია, საკვების ქიმიური ანალიზი, ბიოქიმია, ბიოფიზიკა, მედიცინა, ფარმაცია, ფარმაკოგნოზია, ნუტრიციოლოგია.

ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული ანუ ბმრ-სპექტროსკოპია შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას, როგორც, კომპლექსური ქიმიური ნაერთის ან ნივთიერების იდენტიფიკაციისთვის, ასევე, რაოდენობის განსაზღვრისთვის. ეს მოსახერხებელია საკვლევი ნაერთის შედარების გზით არსებულ რეფერენს სტანდარტებთან, რომელიც წარმოდგენილია ცხრილებით, რომელშიც ნაჩვენებია ცნობილი კონცენტრაციებით სუფთა სახის ნაერთები. [50]

ამჟამად, განსაკუთრებული ყურადღება ეთმობა ე.წ. მეტაბოლომიკების შესწავლას სხვადასხვა ბიოლოგიურ ნიმუშებში, რასაც ეწოდება მიზნობრივი მეტაბოლოური პროფილირება. [51, 52]

ბირთვულ მაგნიტურ-რეზონანსულ (ბმრ) სპექტროსკოპიაში გამოიყენება ატომის ბირთვის მაგნიტური თვისებები იმისთვის, რომ დადგინდეს ნიმუშის შემადგენლობა. ბირთვული მაგნიტური რეზონანსით ისაზღვრება ცალკეული ბირთვების რაოდენობა გარკვეულ მდგომარეობაში

(სივრცული განლაგება). ასევე, იზომება ცალკეული ბირთვის მდგომარეობა ქიმიურ შემადგენლობაში (ქიმიური ანუ მოლეკულური განაწილება). ასეთი განაწილება ქმნის სპექტრს, ოპტიკური სპექტრის ანალოგიით.

ბმრ-სპექტროსკოპიის პრონციპი ტექნიკურად მდგომარეობს იმაში, რომ შესასწავლი ნიმუში დეუტერირებულ გამხსნელში (მაგ. დეუტერიო ქლოროფორმი) ბმრ-ის კაპილარული მილით თავსდება მაგნიტურ ველში. რადიოსიხშირის იმპულსი ტარდება გამოსაკვლევი ნიმუშის ხსნარში იმგვარად, რომ მოხდეს ბირთვის მაგნიტური მომენტების ორიენტირება. მაშინ, როცა ხდება მაგნიტური მომენტების რელაქსაცია, ვლინდება თავისუფალი ინდუქცია. თავისუფალი ინდუქცია ფურიეს გარდაქმნით ბირთვულ მაგნიტურ-რეზონანსულ სპექტრად გარდაიქმნება. ბმრ სპექტრი წარმოადგენს ცალკეული ბირთვების ქიმიურ ცდომილებებს (chemical shift) და ამ ქიმიური ცდომილებების საშუალებით დგინდება ნაერთის სტრუქტურა და შემადგენლობა.

სპექტრი წარმოადგენს მრუდს, რომელიც ასახავს სპეციფიკური ტალღის სიგრძის ან სიხშირის ენერგიას (მაგნიტურ სიგნალს). სიგნალი აისახება ვერტიკალურ ღერძზე, სიხშირე კი ჰორიზონტალურზე.

ბმრ სპექტრზე ვერტიკალური ამპლიტუდა საკმაოდ ზუსტად შეესაბამება ატომების რაოდენობას, რომლებსაც გააჩნიათ გარკვეული სიხშირე. სიხშირე შეესაბამება ქიმიურ გარემოცვას. მაგალითად, წყალბადის ატომი წყლის შემადგენლობაში გამოისახება 4.8 ppm (Hz/MHz), ე.ი. შესაძლებელია დადგინდეს ქიმიური შემადგენლობა X ღერძის მიხედვით და რაოდენობა Y ღერძის ამპლიტუდის მიხედვით. ამგვარად, ბმრ-სპექტროსკოპია უზრუნველყოფს რაოდენობრივ და თვისობრივ ქიმიურ ანალიზს.

## მაგნიტური რეზონანსის პრინციპი

ყველა ის ტექნიკური საშუალება, რომელიც მაგნიტური რეზონანსის პრინციპებზეა დამყარებული, როგორებიცაა, სპექტროსკოპია, ტომოგრაფია, რელაქსომეტრია, დაფუძნებულია ოთხ ძირითად მოვლენაზე: [53]

1) მრავალი ნივთიერების ატომბირთვს მუდმივი მაგნიტური მომენტი გააჩნია, რომელიც მაგნიტურ ველში მოთავსებისას მის გასწვრივ ორიენტირდება. თუმცა, თერმული ფლუქტუაციის გამო, ორიენტაციის ანუ პოლარიზაციის სრულად თანხვედრა არ ხდება. ამის გარდა, ზოგი ტიპის ნუკლიდები ორიენტირდება ველის პარალელურად, მაშინ, როცა, ზოგიერთი, საპირისპიროდ. ანტი-პარალელურად.

ყველა ნუკლიდის მაგნიტური მომენტები სუმირდება მაკროსკოპულ ვექტორულ ჯამად, რომელსაც ეწოდება ბირთვული მაგნეტიზაცია.

გაწონასწორებულ (დაბალანსებულ) მდგომარეობაში ბირთვული მაგნეტიზაცია განლაგებულია მაგნიტური ველის გასწვრივ და, ვინაიდან, ძალიან მცირეა და სტატისტიკური, ამიტომ, თითქმის შეუძლებელია მისი დეტექცია ფონურ ველში.

2) მაშინ, როცა შესაბამის რადიოსიხშირის იმპულსურ ველში მოვათავსებთ, შეიძლება ბირთვის მაგნეტიზაციის (მაგნიტური ვექტორის) შემობრუნება ნებისმიერი სასურველი კუთხით, და ამგვარად, გადაყვანა გაუწონასწორებელ მდგომარეობაში, რომელშიც უკვე აღარ იმყოფება გარე მაგნიტური ველის გასწვრივ. ამ მოვლენას ეწოდება, აგზნება. აგზნების იმპულსი, როგორც წესი, ძალიან ძლიერია (0.1-10 kW) თუმცა, ხანმოკლე (დაახლოებით 1-100 მიკროწამი).

3) აგზნებული ბირთვული მაგნეტიზაციის ვექტორის კომპონენტი, რომელიც მაგნიტური ველის გარდისგარდმოა, განიცდის როტაციას ანუ ბრუნავს ამ ველის გარშემო ისეთი სიხშირით ( $f$ ), რომელიც პროპორციულია

ველის სიმძლავრის (B), და გამოიხატება ფორმულით  $f = \gamma B$ , სადაც პროპორციულობის კონსტანტა (მუდმივი)  $\gamma$  დამახასიათებელია ცალკეული ნუკლიდისთვის. ამ სიხშირეს უწოდებენ Larmor-ის სიხშირეს. (ამიტომ, მაგნიტური რეზონანსი არის რადიოსიხშირის ტექნიკა).

ამ კონტექსტში ორი ფაქტია გასათვალისწინებელი:

ა) იმისთვის, რომ აღმზნები იმპულსი იყოს ეფექტური, უნდა შეესაბამებოდეს ან ძალიან უახლოვდებოდეს Larmor-ის სიხშირეს (რეზონანსის პირობები). შესაბამისად, მას შეუძლია მხოლოდ ალაგზნოს, მაგალითად,  $^1\text{H}$  ან  $^{13}\text{C}$  ნუკლიდები, მაგრამ ორივე ერთად ერთდროულად კი არასდროს.

ბ) ბირთვის მაგნეტიზაციის შესასწავლი კომპონენტი, მიუხედავად იმისა, რომ ძალიან მცირეა, ადვილია მისი დეტექცია, იმიტომ, რომ ბრუნავს და, შესაბამისად, შეუძლია მოახდინოს რადიოსიხშირის ინდუქცია ახლომდებარე მიმღებ ხვიაზე (შესაბამისი ტერმინი ბირთვული ინდუქცია)

4) აგზნების შემდეგ ბირთვის მაგნეტიზაცია გაწონასწორებულ მდგომარეობას უბრუნდება. ამ პროცესს ეწოდება რელაქსაცია. რელაქსაციის მრუდი საკმაოდ რთული შეიძლება იყოს. ეს მარტივი და იდეალური მოვლენა ხალიათდება ორი მომენტით:

T1, ექსპონენციური მაჩვენებელი, რომლითაც მაგნეტიზაციის გრძივი კომპონენტი უბრუნდება მის წონასწორობის მდგომარეობას;

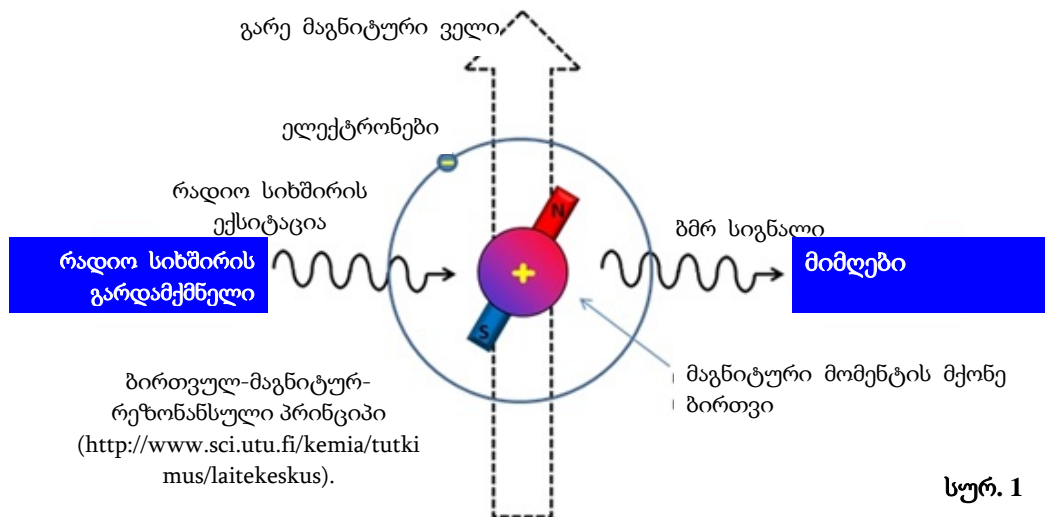
T2, ექსპონენციური მაჩვენებელი, მაგნეტიზაციის განივი კომპონენტი, როცა მისი სიმძლავრე მცირდება ნულამდე.

რელაქსაციის ორი მომენტი (პერიოდი, დრო) ექვემდებარება და აკმაყოფილებს პირობებს  $T2 \leq T1$ , რიცხობრივი მაჩვენებელი დამახასიათებელია შესასწავლი სუბსტანციისთვის და მისი თერმოდინამიკური მდგომარეობისთვის, რაც შეესაბამება რამდენიმე მიკროწამიდან დაწყებული

რამდენიმე დღემდე. ეს ნიშნავს, რომ აღზნების შემდეგ ხშირად მოსდევს შედარებით ხანგრძლივი პერიოდი, რომლის დროსაც მიმღები ხვია იღებს მიღევად (გარდამავალ) საპასუხო სიგნალს, რომელსაც ეწოდება თავისუფალი ინდუქციის მიღევა ანუ FID.

არსებობს განსხვავება ყველა ინდივიდუალური ნუკლიდის მიერ მიღებულ მაგნიტურ ველებს შორის. ამ ვარიაციულობებს ეწოდება ქიმიური ცდომილება (chemical shift) და წარმოადგენს ბმრ-სპექტროსკოპიის საფუძველს და იზომება მემილიონედ ერთეულებში (ppm) რეფერენს-სტანდარტის სიხშირესთან მიმართებაში.

რეფერენსული სიხშირე დამოკიდებულია ხელსაწყოს მაგნიტურ ველზე და შესასწავლი ქიმიური ელემენტის სახეობაზე. ჩვეულებრივ, გამოისახება MHz სიხშირით. საერთოდ, ელემენტის ქიმიური ცდომილება მხოლოდ რამდენიმე ასეული Hz-ით აჭარბებს რეფერენსის სიხშირეს. ამგვარად, მოსახერხებელია გამოისახოს ppm (Hz/MHz). ppm ისეთი განზომილებაა, რომელიც არ არის დამოკიდებული ბმრ-სპექტროსკოპიის ინსტრუმენტის სახეობაზე და ველის სიმძლავრეზე. მაგალითად, ვსაზღვრავთ მოლეკულის სხვადასხვა ლოკალიზაციის პროტონებს და შესაბამისი ქიმიური ცდომილება განსხვავდება 0.01 ppm-ით. თუ სპექტრომეტრი ოპერირებს 600 MHz-ის ფარგლებში, ეს განსხვავება იოლად ისაზღვრება 6 Hz-ით.



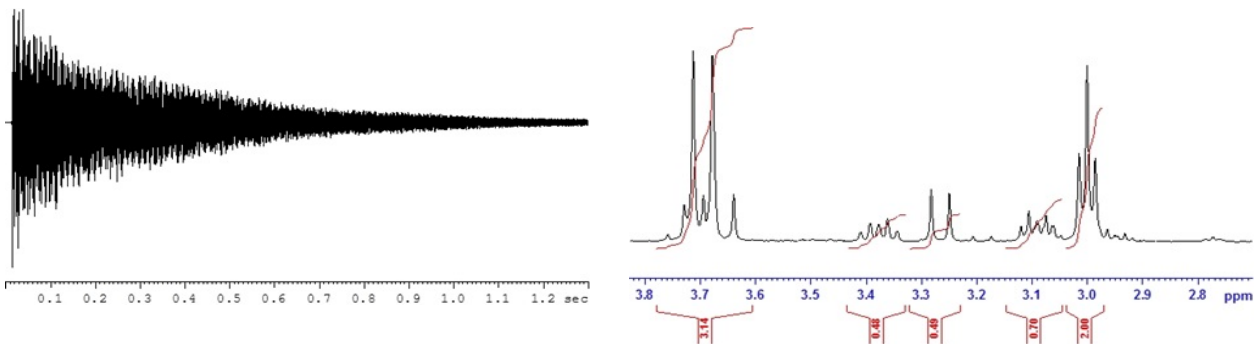
ბმრ-სპექტროსკოპია საზღვრავს ყველაზე მცირე დიაპაზონში 0.0001 ppm-მდე, შედარებისთვის მაგნიტურ რეზონანსული ტომოგრაფია კი 1-10 ppm დიაპაზონში.

რადიო-სიხშირის სიგნალი, რომელიც გამოსხივდება შესასწავლი ბირთვის მიერ ბმრ ექსპერიმენტის დროს, ანუ FID სიგნალი (თავისუფალი ინდუქციის მილევა), რომელიც შეიცავს ინფორმაციას ნიმუშის შესახებ. თანამედროვე ფურიეს ტრანსფორმაციის ბმრ ინსტრუმენტზე ეს სიგნალი მიიღება როგორც დროის ფუნქცია. განსაზღვრული ბმრ სიგნალების გარდაქმნა შესაძლებელია ფურიეს ტრანსფორმაციის (Fourier Transform (FT) საშუალებით, რომელიც მოგვცემს სიხშირეებში გამოსახულ სპექტრებს.

## სურ. 2.

a) სურათზე დროის აბსცისაზე წარმოდგენილია დამახასიათებელი  $^1\text{H}$  NMR (FID სიგნალი). სიგნალი მილევადა, რაც განპირობებულია ბირთვის რელაქსაციის პროცესით, რომელიც მოსდევს რადიო-სიხშირის აღზენებას (ექსიტაციას).

b) სურათზე წარმოდგენილია დამახასიათებელი  $^1\text{H}$  NMR სპექტრი (სიხშირეები წამოდგენილია აბსცისაზე ppm -ში).



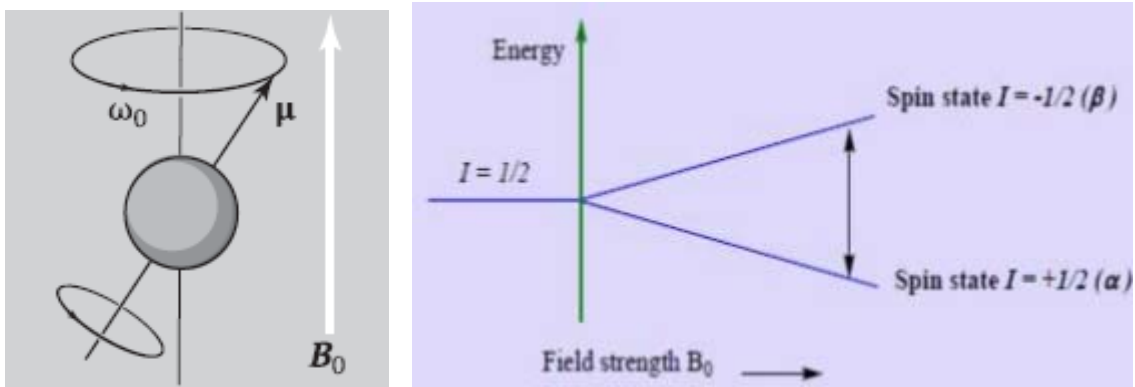
### ბირთვების მაგნიტური თვისებები - სპინი

ბირთვის მაგნეტიზაციისთვის საჭიროა, რომ მას ჰქონდეს "სპინი" (ინგლ. to spin - ბრუნვა). მისი სპინის კვანტური რიცხვი ( $I$ ) არ უნდა იყოს 0-ის ტოლი. ბირთვის სპინის  $I$ -ის მნიშვნელობა დამოკიდებულია მხოლოდ პროტონების და ნეიტრონების რიცხვზე ბირთვში, რაც იმას ნიშნავს, რომ  $I$  არის ნუკლიდის სპეციფიკური მახასიათებელი, როგორც, მაგალითად, მასა და ელექტრული მუხტი.

ქიმიური ელემენტების უმეტესობას გააჩნია მაგნიტური ანუ ბმრ-აქტიური ბირთვის მქონე სულ მცირე ერთი იზოტოპი. ყველა ელემენტს გააჩნია მთელი (მათ შორის ნულოვანი) ან მთელის ნახევარი სპინი.

მაგალითად, ყველაზე გავრცელებულ წყალბადის იზოტოპს  $^1\text{H}$  (ბუნებრივი გავრცელება 99.98%) გააჩნია ბმრ-აქტიური ბირთვი ( $I = 1/2$ ), რაც პროტონული ანუ  $^1\text{H}$  ბმრ სპექტროსკოპიის საფუძველია. ყველა სხვა შემთხვევაში, როცა  $I \neq 1/2$ , და შეესაბამება, მაგალითად,  $I = 1, 3/2, 5/2$  ან  $7/2$ -ს, მაშინ საქმე გვაქვს ე.წ. ელექტრონულ კვადრუპოლურ მომენტთან.

**სურ. 3.** ბირთვი ნულოვანი სპინით მაგნიტურ ველში ბრუნავს მაგნიტური ველის ( $B_0$ ) ღერძის მიმართულებით. მაგრამ, როცა სპინი არა-ნულოვანია, მაშინ ბირთვები განლაგდებიან მაგნიტური ველის გასწვრივ ან საპირისპირო მიმართულებით.



ქიმიასა და ბიოლოგიაში ძალიან მნიშვნელოვანია ნახშირბადის, აზოტის და ჟანგბადის ბირთვები, თუმცა, ყველაზე გავრცელებულ იზოტოპებს,  $^{12}\text{C}$  და  $^{16}\text{O}$ , მაგნიტური მომენტი არ გააჩნიათ, მიუხედავად იმისა, რომ არსებობენ ბმრ-ისთვის გამოსადეგი იზოტოპები, როგორებიცაა  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ , მაგრამ მათი ბუნებრივი გავრცელება ძალიან მცირეა და ამასთანავე, მგრძნობელობა გაცილებით დაბალია პროტონთან შედარებით.

ცხრილში წარმოდგენილია ქიმიური ელემენტების სპინის კვანტური რიცხვის მნიშვნელობები, რაზეც არის დამოკიდებული მათი გამოკვლევის შესაძლებლობები ბმრ-სპექტროსკოპიით.

**ცხრ. 1.** გავრცელებული ნუკლიდების მაგნიტური თვისებები [54].

| Isotope          | Occurrence in nature (%) | spin number I | Magnetic moment $\mu^{[5]}$ | Electric quadrupole moment ( $e \times 10^{-24} \text{ cm}^2$ ) | Operating frequency at 7 T (MHz) | Relative sensitivity |
|------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------------|----------------------|
| $^1\text{H}$     | 99.984                   | 1/2           | 2.79628                     |   | 300.13                           | 1                    |
| $^2\text{H}$     | 0.016                    | 1             | 0.85739                     | $2.8 \times 10^{-3}$  | 46.07                            | 0.0964               |
| $^{10}\text{B}$  | 18.8                     | 3             | 1.8005                      | $7.4 \times 10^{-2}$  | 32.25                            | 0.0199               |
| $^{11}\text{B}$  | 81.2                     | 3/2           | 2.6880                      | $2.6 \times 10^{-2}$  | 96.29                            | 0.165                |
| $^{12}\text{C}$  | 98.9                     | 0             |                             |   |                                  |                      |
| $^{13}\text{C}$  | 1.1                      | 1/2           | 0.70220                     |   | 75.47                            | 0.0159               |
| $^{14}\text{N}$  | 99.64                    | 1             | 0.40358                     | $7.1 \times 10^{-2}$  | 21.68                            | 0.00101              |
| $^{15}\text{N}$  | 0.37                     | 1/2           | -0.28304                    |   | 30.41                            | 0.00104              |
| $^{16}\text{O}$  | 99.76                    | 0             |                             |   |                                  |                      |
| $^{17}\text{O}$  | 0.0317                   | 5/2           | -1.8930                     | $-4.0 \times 10^{-3}$   | 40.69                            | 0.0291               |
| $^{19}\text{F}$  | 100                      | 1/2           | 2.6273                      |   | 282.40                           | 0.834                |
| $^{28}\text{Si}$ | 92.28                    | 0             |                             |   |                                  |                      |
| $^{29}\text{Si}$ | 4.70                     | 1/2           | -0.5548                     |   | 59.63                            | 0.0785               |
| $^{31}\text{P}$  | 100                      | 1/2           | 1.1205                      |   | 121.49                           | 0.0664               |
| $^{35}\text{Cl}$ | 75.4                     | 3/2           | 0.92091                     | $-7.9 \times 10^{-2}$   | 29.41                            | 0.0047               |
| $^{37}\text{Cl}$ | 24.6                     | 3/2           | 0.68330                     | $-6.2 \times 10^{-2}$   | 24.48                            | 0.0027               |

ბმრ-სპექტროსკოპიული ექსპერიმენტისთვის არა მხოლოდ  $^1\text{H}$  და  $^{13}\text{C}$  წარმოადგენენ კვლევის ინტერესს, თუმცა ყველაზე ხშირად სწორედ ეს ორი იზოტოპი გამოიყენება. სხვა ბირთვების დეტექციაც არის შესაძლებელი მათი ბირთვების მაგნიტური თვისებებიდან გამომდინარე, თუმცა უფრო იშვიათად და სიძნელეებთან არის დაკავშირებული, მაგალითად, თუნდაც დაბალი ფარდობითი მგრძნობელობის არსებობის გამო  $^1\text{H}$ -თან შედარებით. გარდა ამისა, ბმრ-სპექტროსკოპიის სხვა



ხელისშემშლელი ფაქტორები შეიძლება იყოს დაბალი შემცველობა, როგორც საკვლევ ნაერთში, ასევე ბუნებრივი იზოტოპის იშვიათი გავრცელება.

ყველაზე მეტად გამოიყენება ხუთი ტიპის ნუკლიდი:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  და  $^{31}\text{P}$ , რომლებიც წარმოადგენენ განსაკუთრებულ ინტერესს ბმრ-ის ექსპერიმენტებისთვის მაღალი მგრძნობელობის და ფართო გავრცელების გამო ორგანულ ნაერთებში;  $^{13}\text{C}$  ძირითადი ელემენტია ყველა ორგანულ ნაერთში, მიუხედავად იმისა, რომ ახასიათებს დაბალი გავრცელება (1.1%) მის ძირითად იზოტოპთან  $^{12}\text{C}$ -თან (98,9 %) შედარებით, რომლის სპინი  $I=0$  ბმრ-ინაქტიურია.

$^{19}\text{F}$  გააჩნია მაღალი ფარდობითი მგრძნობელობა, ხოლო  $^{31}\text{P}$  კი ხშირად გვხვდება ორგანულ ნაერთებში, თუმცა გააჩნია საშუალო ფარდობითი მგრძნობელობა, რის გამოც წარმოადგენენ ინტერესს. რაც შეეხება აზოტის იზოტოპებს  $^{15}\text{N}$  და  $^{14}\text{N}$ , რომლებიც ძირითადი ატომებია ცილების და ნუკლეინის მჟავების შემადგენლობაში და, შესაბამისად, მათ მიმართ ინტერესი დიდია ბმრ-სპექტროსკოპიულ კვლევებში მათ შესასწავლად.

$^{14}\text{N}$  ბუნებრივ იზოტოპს გააჩნია მაგნიტური მომენტი, რომელიც უტოლდება ერთს ( $I=1$ ), და ამავე დროს ხასიათდება ე.წ. ელექტრონული კვადრუპოლური მომენტით, რაც ბმრ ექსპერიმენტებისთვის სირთულეებს ქმნის. ამ მომენტს ახასიათებს ატომურ ბირთვში ელექტრონული მუხტის არასიმეტრიული არასფერული გადანაწილება. მისგან განსხვავებით  $^{15}\text{N}$ -ის სპინი  $I = 1/2$  შეადგენს, რაც ბმრ-სთვის ვარგისია, მაგრამ ბუნებრივი იზოტოპის გავრცელება ძალიან მცირეა (0,37%) და ამიტომ დაბალი მგრძნობელობა გააჩნია.

|                 | სპინური რიცხვი $I$ | ბუნებრივი გავრცელება (%) | სიხშირე, $V_0$ (MHz) ( $^1\text{H}=100$ MHz) | გირომაგნიტური თანაფარდობა | კვადრუპოლური მომენტი $Q(\text{mbarn})$ | მგრძნობელობა მიმდებლობა ( $^1\text{H}=1.0$ ) |
|-----------------|--------------------|--------------------------|--|---------------------------|--|--|
| $^{14}\text{N}$ | 1                  | 99.632                   | 7.226  | 1.934                     | 20.44                                  | $1.0 \times 10^{-3}$                         |
| $^{15}\text{N}$ | 1/2                | 0.368                    | 10.137                                       | -2.713                    | 0                                      | $3.8 \times 10^{-6}$                         |

ცხრ. 2

ამის გამო, ბმრ-სპექტროსკოპიის გამოყენება აქამდე შეზღუდულია აზოტის ორივე იზოტოპისთვის, თუმცა სხვა ალტერნატიული მეთოდები უფრო ხშირად გამოიყენება, როგორებიცაა, პარამაგნიტური რეზონანსი და ბირთვულ-კვადრუპოლური რეზონანსი [55].

**სურ. 4**  $^{14}\text{N}$ -ს გააჩნია სპინი  $I = 1$ , კვადრუპოლური მომენტი და არასფერული ბირთვი. მუხტის განაწილება არის ასიმეტრიული, როგორც სურათზე ჩანს.



ძირითადი შეზღუდვა, რაც ახლავს  $^{14}\text{N}$ -ის ბმრ-სპექტროსკოპიას არის მნიშვნელოვანი კვადრუპოლური ზემოქმედება, რისი შედეგიცაა უკიდურესად ფართო ბმრ-სპექტრი. როგორც თხევად, ასევე მყარ მდგომარეობაში სპექტრის გაფართოვება უკავშირდება მყისიერ კვადრუპოლურ რელაქსაციას, გამონაკლისია იდეალურად სიმეტრიული მოლეკულები [56]. მყარ მდგომარეობაში, მაგალითად, ფხვნილების შესწავლისას, კვადრუპოლური მომენტის სიდიდე განაპირობებს 50-1000Hz-ის სიხშირის მქონე განიერ ბმრ-სპექტრს [57], ამიტომ, შესაძლებელია შესწავლა მაგნიტური ველის გარეშე ე.წ. ბირთვული კვადრუპოლური რეზონანსით [58], რაც წარმატებით გამოიყენება ასაფეთქებლების დეტექციისთვის, როგორც სამხედრო, ასევე, მშვიდობიანი მიზნებისთვის [59].

## ნატრიუმის აზიდის გამოყენება ფარმაციაში და მონიტორინგის მნიშვნელობა ჯანმრთელობის რისკების შესაფასებლად

ბოლო 20 წლის განმავლობაში მოხდა აზიდების აღორძინება ფარმაკო-ქიმიურ წარმოებაში. მედიცინაში და ფარმაცევტულ წარმოებაში, სადაც აზიდი გამოიყენება, როგორც რეაგენტი, მაგალითად, იმუნოლოგიაში, წამლის სუბსტანციებში, ან სინთეზირების პროცესის რომელიმე ეტაპზე, საჭირო ხდება იმის დემონსტრირება, რომ ნატრიუმის აზიდისგან ნაერთი მთლიანად გაწმენდილია, ან ტოქსიკურობა მინიმალურ დასაშვებ დონემდეა დაყვანილი [60]. ეს მაჩვენებელი კი, თავის მხრივ დამოკიდებულია თუ რა დოზით ინიშნება წამალი და, ასევე, მისი მიღების გზებზე. ნატრიუმის აზიდის ტესტირება შეიძლება ჩატარდეს წამლის საბოლოო სუბსტანციაზე, ასევე, საკონტროლო ეტაპზე სინთეზირების პროცესში, მაგალითად, საწყის მასალებზე ან შუალედურ დონეზე [61].

სამეცნიერო ლიტერატურაში აღწერილია მრავალი მეთოდი ნატრიუმის აზიდის შესასწავლად, მაგრამ უმეტესობა მოკლებულია სიზუსტეს არასაკმარისი სპეციფიურობის გამო.

ნარჩენი ნატრიუმის აზიდისგან ნაერთის გასუფთავება მნიშვნელოვანია უსაფრთხო პროფილის ფარმაცევტული წარმოებისთვის. წამლის სუბსტანციაში აზიდის მინარევის გამოკვლევა მნიშვნელოვანია უსაფრთხოების პროფილის შესასწავლად. ამგვარად, მინარევის რაოდენობრივი განსაზღვრა ერთ-ერთი საკონტროლო პარამეტრია.

ნატრიუმის აზიდის დერივატიზაციის მეთოდი გამოიყენება მისი ზუსტი რაოდენობის დასადგენად. შემუშავებულია მეთოდიკა, რომელიც იძლევა საშუალებას განისაზღვროს უმცირესი 20 ppm (0,02 mg/ml) დოზით (Wrazel et al, 2013, Schroder et al, 2007, Berezniński et al, 2001). [62, 63, 64].

Wang-ის და თანაავტორების მიერ 2012 წელს შემუშავებულია ნატრიუმის აზიდის ყველაზე მცირე რაოდენობით 21 ppb = 0,021 ppm დადგენის მეთოდი, დაფუძნებულია აზიდ-ალკინის ციკლირების რეაქციაზე და შესწავლილია მაღალ-წარმადობის თხევადი-ქრომატოგრაფია-მასსპექტრომეტრით (HPLC-MS).

საგულისხმოა, ყოველდღიური დანიშნულების მედიკამენტებში ნარჩენი ნატრიუმის აზიდის შემცველობის შესწავლა. ცნობილია, რომ საწყის ინგრედიენტად სწორედ ეს ქიმიური ნივთიერება გამოიყენება ე.წ. სარტანების შემადგენლობაში, რომლებიც მიეკუთვნება ჰიპოტენზიური მედიკამენტების ჯგუფს და გულის ქრონიკული უკმარისობის სამკურნალოდაც ინიშნება (მაგ., Candesartan, Irbesartan, Losartan, Valsartan), ასევე, გულის შეტევის შემდგომ პერიოდში (Valsartan) და დიაბეტური ნეფროპათიის დროს ჰიპერტენზიასთან ერთად (Losartan, Irbesartan). [65]

როგორც ცნობილია, ჰიპერტენზია ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ავადმყოფობაა, მათ შორის განვითარებულ ქვეყნებშიც, რის გამოც ფარმაცევტული კომპანიების მიერ 1990 წლებიდან დაწყებული ამ კლასის მედიკამენტების წარმოებას ზრდადი ტენდენცია გააჩნია და მიჩნეულია ყველაზე გავრცელებულ მედიკამენტებად (Haase, 2010).

**ცხრ. 3**  
სარტანების  
კომერციული  
დასახელებები  
და  
ორიგინალური  
წამლების  
მწარმოებლები.  
[66]

| Sartan name | Originator           | Biosteric functional groups <sup>1)</sup> | Patented since <sup>55</sup> | Dosage[mg/d] <sup>55</sup> | Sales2006 [USD mn] <sup>7)56</sup> | Drug / Marketed by   |
|-------------|----------------------|---|------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--|
| Candesartan | Takeda               | BPT                                       | 1990                         | 8–16                       | 3864                               | Blopress® / Takeda; Atacand® / AstaZeneca                            |
| Elisartan   | GE Healthcare        | BPT                                       |                              |                            |                                    | 2)   |
| Eprosartan  | GSK                  | BPT                                       | 1989                         | 300–400                    | 119                                | Teveten® / Solvay; Emestar® / Trommsdorff                            |
| Fimasartan  | Boryung Pharm        | BPT                                       | 2001                         |                            |                                    | 2)   |
| Forasartan  | Pfizer               | BPT                                       | 1991                         |                            |                                    | 3)   |
| Irbesartan  | Sanofi               | BPT                                       | 1990                         | 150–300                    | 2336                               | Aprovel® / Sanofi-Aventis; Karvea® / Bristol-Myers Squibb            |
| Losartan    | DuPontMerck          | BPT                                       | 1986                         | 50–100                     | 3163                               | Lorazar® MSD   |
| Miflasartan | Menarini             | BPT                                       | 1991                         |                            |                                    | 3)   |
| Olmesartan  | Daiichi/Sankyo       | BPT                                       | 1991                         | >20 mg                     | 1237                               | Olmetec® / Sankyo; Votum® / Berlin-Chemie Mencord® / Menarini Pharma |
| Pratosartan | Kotobuki             | BPT                                       | 1992                         |                            |                                    | 4)   |
| Valsartan   | Novartis             | BPT                                       | 1990                         | 80–160                     | 4343                               | Diovan® / Novartis; Provas® / Schwarz Pharma; Cordinate® / AWDPharma |
| Tasosartan  | Wyeth                | BPT                                       | 1991                         |                            |                                    | 5)   |
| Telmisartan | Boehringer Ingelheim | BPC                                       | 1991                         | 40–80                      | 1639                               | Micardis® / Boehringer Ingelheim; Kinzalmono® / Bayer                |
| Zolasartan  | SKB                  | PT  | 1992                         |                            |                                    | 6)   |

Organic Azides: Syntheses and Applications

მაშინ, როდესაც, ფარმაცევტული და ბიოტექნოლოგიური კომპანიები მაქსიმალურად იყენებენ თვისობრივი ბმრ-სპექტროსკოპიის შესაძლებლობებს წამლის შემუშავების და განვითარების პროცესებში, ამავე დროს, რაოდენობრივი ანალიზისთვის უფრო მეტად იყენებენ HPLC-MS.

რაოდენობრივი განსაზღვრის მიზნებისთვის ბმრ-სპექტროსკოპია კონკურენციას უწევს კაპილარულ ელექტროფორეზს და HPLC-ს და გარკვეული უპირატესობებიც გააჩნია.

ჩატარებული კვლევების ანალიზის საფუძველზე მთელი რიგი ავტორებისა მიიჩნევენ, რომ რაოდენობრივი ბმრ-სპექტროსკოპია საუკეთესო მეთოდია წამლების შესაფასებლად სიზუსტის უმნიშვნელო 0,5-2.0% ცდომილებით [67, 68, 69]. აქტიური ფარმაცევტული სუბსტანციებისთვის ანალოგიურ მონაცემებს აქვეყნებენ სხვა მკვლევარებიც [70, 71].

ერთ- და ორგანზომილებიან ბმრ-სპექტროსკოპიას და რაოდენობრივ ბმრ-სპექტროსკოპიას გააჩნია წამლების ხარისხის კონტროლის ფართო დიაპაზონი და გამოყენების განუსაზღვრელი პოტენციალი, მიუხედავად ამისა, საერთაშორისო ფარმაცოპეაში სტანდარტად ნაკლებად არის გამოყენებული [72]. რაოდენობრივი ბმრ-სპექტროსკოპია მხოლოდ ზოგიერთი ნაერთისთვის გამოიყენება ბრიტანულ, ასევე ევროპულ (PhEur), [73] და ამერიკის შეერთებული შტატების ფარმაცოპეაში (USP) [74].

ბმრ-სპექტროსკოპია მეტად უნდა იქნას გამოყენებული რაოდენობრივი და ხარისხობრივი კონტროლისთვის აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტანციებში, წამლებში, ასევე, სოფლის მეურნეობაში და საკვებ ინგრედიენტებში. ბმრ-სპექტროსკოპიის ანალიზური მეთოდის დანერგვა რეკომენდებულია, როგორც ერთ-ერთი რეფერენს-სტანდარტული მეთოდი ფარმაციის გარდა ისეთ მნიშვნელოვან სფეროში, როგორცაა, მაგალითად, კვების პროდუქტების და სასმელის მონიტორინგი.

## ნატრიუმის აზიდის ზემოქმედება ადამიანის ჯანმრთელობაზე

ნატრიუმის აზიდით ადამიანის მოწამლვის მრავალი შემთხვევა არის დაფიქსირებული, რაც უკავშირდება მისი გამოყენების არეალის გაფართოვებას. ადამიანის ჯანმრთელობაზე ნატრიუმის აზიდის ზემოქმედება პირველად 1928 წელს აღწერა Kayser-მა [75] და აქტუალობას დღესაც აქ კარგავს (Gaulier et al. 2012, Le Blanc-Louvry et al. 2012, Demircan et al. 2011, Wiergowski et al. 2011). [76, 77, 78, 79]. 2010 წელს აშშ-ში დალასში რამდენიმე ადამიანი ერთდროულად მოიწამლა ლოკალურ რესტორანში. ხუთთვიანი გამოძიების შემდეგ დაადგინა, რომ მოწამლვის მიზეზი იყო ნატრიუმის აზიდი (დაავადებათა კონტროლის ცენტრი, ატლანტა, 2010) [80].

ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის სხვა მრავალი შემთხვევაც არის გამოვლენილი მკვლელობის და თვითმკვლელობის განზრახვით (Tsuge et al, 2001, Hacker, 2004, Okumura et al, 2003). [81, 82, 83] რისკის ჯგუფს მიეკუთვნებიან ლაბორატორიის ტექნიკოსები, რომელთა შემთხვევით მოწამლვის ფაქტები არაერთხელ მომხდარა [84, 85, 86, 87, 88].

საყურადღებოა ის შემთხვევებიც, რომლებიც უკავშირდებოდა დიალიზის პაციენტების ინტოქსიკაციის [89].

ნატრიუმის აზიდს ციანიდის მსგავსი მოქმედება ახასიათებს, მაგრამ არ გააჩნია ანტიდოტი. სასიკვდილო დოზა საკმაოდ მცირეა. ადვილად აღწევს ადამიანის ორგანიზმში, როგორც საჭმლის მომნელებელი სისტემიდან, ასევე სასუნთქი გზებიდან და კანიდან. ამასთანავე, კუჭში მოხვედრისას მჟავა გარემოში სწრაფად გარდაიქმნება აზოტწყალბადმჟავად. გარდა დაზარალებულისა, საშიშია მაშველებისთვისაც, თუ მათ შეხება მოუხდებათ დაზარალებულის კუჭის შიგთავსთან.

ამ ქიმიკატით მოწამლვა იწვევს ანოქსიას და სწრაფ სიკვდილს. ვლინდება შემდეგი სიმპტომები: ტკივილი გულმკერდის არეში, სუნთქვის

გაძნელება, სისუსტე, თავბრუსხვევა, თავის ტკივილი, გულისცემის გახშირება, ღებინება და გულისრევა, დაბალი არტერიული წნევა, შოკი, გონების დაკარგვა, ზოგჯერ კრუნჩხვები, გულის შეტევა. ხოლო, სიკვდილის მიზეზი ხდება გულის გაჩერება.

ნატრიუმის აზიდი უსუნო თეთრი ფერის ფხვნილია, რომელიც ადვილად იხსნება წყალში და სხვა გამხსნელებში. ხსნარში სწრაფად წარმოიქმნება მძაფრი სუნის ტოქსიკური აირი, აზოტწყალბადმჟავა. ამ აირის შესუნთქვის შედეგად ვითარდება მწვავე ინტოქსიკაცია. ასევე სწრაფად იწოვება კუჭიდან და კანიდან. უბრალო შეხებამაც კი შეიძლება გამოიწვიოს მწვავე მოწამლვა.

რუტინული სადიაგნოზო ანალიზები შეიძლება გამოუსადეგარი იყოს, ვინაიდან სიმპტომების შეცნობისთანავე დაუყოვნებელი ზემოქმედებაა საჭირო. ძირითადად მიმართავენ სიმპტომურ მკურნალობას. ინტოქსიკაციისას დაზარალებულ პირებს ესაჭიროებათ ჰემოდიალიზი (Kage, 2000).

ფაქტიურად არ არსებობს ნატრიუმის აზიდის უსაფრთხო დოზა. ნატრიუმის აზიდი მცირე დოზითაც უკიდურესად საშიშია. პერორალური LD50 დოზა ექსპერიმენტულ ვირთაგვებში არის 27მგ/კგ, ხოლო ინტრაპერიტონეული LDLo თაგვებში 3 მგ/კგ (Kruzyna et. al, 1998).

სახიფათო სუბსტანციების მონაცემების ბანკში (HSDB) მითითებულია, რომ 5 მგ-დან 150 მგ-მდე ნატრიუმის აზიდი (1.63  $\mu$ M-დან 47  $\mu$ M-მდე) იწვევს მსუბუქიდან მწვავე სიმპტომების გამოვლინებებს, ხოლო 700 მგ-ის მიღება (0,21 mM) უკვე ფატალურ დოზად ითვლება (ანუ უმცირესი ლეტალური დოზა ადამიანისთვის არის 10-13 მგ/კგ). ზუსტად დადგენილი ლეტალური დოზები არ არსებობს, ბევრად დამოკიდებული პაციენტის მდგომარეობაზეც, თუმცა

დამახასიათებელი სიმპტომების გამოვლენა იწყება ორგანიზმში 80 მგ-ის მოხვედრის შემდეგ.

მიუხედავად იმისა, რომ ნატრიუმის აზიდი იწვევს სისტემურ მოწამლვას, მისი ძირითადი მოქმედება ვლინდება გულ-სისხლძარღვთა სისტემის მხრივ. ქიმიკატის ორგანიზმში მოხვედრა იწვევს პერიფერიული სისხლძარღვების დილატაციას, რასაც მოჰყვება ჰიპოტენზია, ტაქიკარდია, სისუსტე, თავბრუსხვევა და კოლაფსი, გამოხატულია სუნთქვის გამძლეობა, ლებინება, ფაღარათი. ფატალური დოზისას ადამიანი უცბად კარგავს გონებას, ვითარდება მეტაბოლური აციდოზი, ან კომა, რაც იწვევს სიკვდილს. აზიდის ფხვნილის ან ხსნარის გადაყლაპვას ასევე ახლავს იგივე სიმპტომები და წუთების განმავლობაში იწვევს სიკვდილს. ჩასუნთქვა კი იწვევს სასუნთქი გზების და ლორწოვანი გარსის გაღიზიანებას, ყელის ტკივილს, ხველას, სუნთქვის გამძლეობას, ასთმას. (Weiss, 1996) სხვა შესაძლო გზა, საიდანაც ნატრიუმის აზიდი შეიძლება ორგანიზმში მოხვდეს არის კანის საფარველი, რასაც მოსდევს კანის გაღიზიანება, გაწითლება და ტკივილი.

ნატრიუმის აზიდი ციტოქრომ ოქსიდაზას ინჰიბიტორია (მიტოქონდრიული IV რესპირატორული კომპლექსი) და იწვევს ატფ-ის გამოლევას, რაც იწვევს უჯრედის ანოქიას (Bennett et al., 1996). აზიდი აბლოკებს ციტოქრომ ოქსიდაზას და უჯრედული სუნთქვის IV რესპირატორული კომპლექსის დონეზე ელექტრონული ტრანსპორტის ჯაჭვს. აზიდი აინჰიბირებს ციტოქრომ ოქსიდაზას რკინის ელექტრონთან შეკავშირების შედეგად და (Fe<sup>3+</sup>)-ის წარმოქმნით.

აზიდი ამავე მექანიზმით ავლენს ბაქტერიციდულ თვისებებს, რაც გამოიყენება ლაბორატორიულ რეაგენტებში. აზიდი აფერხებს გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების გამრავლებას. ციტოქრომ ოქსიდაზას გარდა, ასევე



იწვევს სხვა მეტალოპროტეინაზების ინჰიბიციასაც, როგორებიცაა, კატალაზა, პეროქსიდაზა, სუპეროქსიდ დისმუტაზა, მათი აქტივობის დათრგუნვით.

იმის გარდა, რომ ნატრიუმის აზიდი გამოიყენება, როგორც ბაქტერიციდი, დეტონატორი და მომწამლავი ნივთიერება, ასევე, მისი წარმატებით გამოყენების ერთ-ერთი სფეროა სოფლის მეურნეობაში, როგორც ჰერბიციდი, ინსექტიციდი, პესტიციდი (პესტიციდების ქიმიური სახელმძღვანელო, 1999). ვინაიდან წყალში ადვილად ხსნადია და ნიადაგის სიღრმეში სწრაფად აღწევს, ამიტომ ბოლომდე არ ხდება მისი ჰიდროლოზი, ასევე, არ ხდება ბაქტერიული დეგრადაცია, რადგან ბაქტერიციდულია, ამიტომ ტოქსიკური ზემოქმედებაც მოსალოდნელია, როგორც გარემოზე, ასევე შინაურ და გარეულ ცხოველებზე, წყლის ფაუნაზე.

ასევე, მნიშვნელოვანია აზიდის გამოყენება ორგანულ სინთეზში. შესაბამისად, საწარმოო რისკი მნიშვნელოვანია, როგორც მომუშავეებისთვის, ასევე, გარემოსთვის. შემთხვევების 65% სწორედ საწარმოში მოწამლვაზე მოდის (Chang and Lamm, 2003). ყველაზე მეტად რისკს ექვემდებარებიან საავტომობილო წარმოების მუშაკები, ნატრიუმის აზიდის ქიმიურ ქარხნებში მომუშავე პერსონალი. მცირე რისკი აქვთ ინდივიდუალურად სარემონტო სამუშაოებში ჩართულ ადამიანებს, ვისაც უხდებათ დაზიანებული მანქანების შეკეთება და აირ-ბალიშების გამოცვლა ან უტილიზაცია. გარდა იმისა, რომ ტოქსიკურია, ასევე საშიშია იმითაც, რომ ადვილად ფეთქებადია, მეტალთან შეხების შედეგად და დარტყმისას.

ქიმიურ წარმოებაში მომუშავე ადამიანების ორგანიზმში აზიდის მოხვედრა შესაძლებელია სასუნთქი გზებიდან მცირედისპერსიული ფხვნილის სახით. უფრო იშვიათად მოსალოდნელია კანის საფარველიდან აბსორბცია. კრიტიკული უარყოფითი ეფექტი ვლინდება ვაზოდილატაციით და ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე ზემოქმედებით.

სხვადასხვა ქვეყნების საწარმო უსაფრთხოების და ჯანმრთელობის დაცვის ადმინისტრაციების კომიტეტების მიერ (აშშ, ევროკავშირი, ავსტრალია, ინგლისი) დადგენილი ნორმების მიხედვით ნატრიუმის აზიდის დასაშვები ზღვარი შეადგენს  $0.3 \text{ მგ/მ}^3$  (NIOSH) და აზოტწყალბადმჟავასთვის კი (HN3)  $0,1 \text{ ppm}$ . ანალიზისთვის იყენებენ ულტრაისფერი დეტექტორით აღჭურვილ იონურ ქრომატოგრაფიას. [90, 91]

90-იან წლებში, როდესაც საგრძნობლად გაიზარდა აზიდის წარმოება ავტომობილების აირბალიშებში გამოყენების ხარჯზე, NIOSH-ის ექსპერტებმა შეისწავლეს მომუშავე ადამიანების ჯანმრთელობა და დაადგინეს საწარმოში ქიმიკატის შემცველობის ზღვრული დასაშვები დონე. [92, 93]. ძირითადი ჩივილები, რასაც მომუშავე პერსონალი აღნიშნავდა იყო თავის ტკივილი, წნევის დაქვეითება და გულის ცემის აჩქარება. მომდევნო წლებში ნატრიუმის აზიდის ნეიროფსიქოტოქსიკურობის შესასწავლად ჩატარებულ კვლევებში (Miljours & Braun, 2003) გამოვლინდა, რომ 5-30 წლის განმავლობაში მომუშავე პერსონალის არტერიული წნევა უფრო დაბალი აღმოჩნდა, როცა საწარმოში აზიდის შემცველობა  $0,3 \text{ მგ/მ}^3$ -ზე მაღალი იყო კონტროლის ჯგუფთან შედარებით ( $125 \text{ მმ.ვწყ.}$  და  $131 \text{ მმ.ვწყ.}$ ) [94]. ავტორების დასკვნებში ასევე მითითებული იქნა, რომ კიდურების ტრემორის ცალკეული შემთხვევები სავარაუდოდ შეიძლება დაკავშირებული იყოს ნატრიუმის აზიდის ზემოქმედებასთან და ამიტომ მიზანშეწონილად მიიჩნიეს რეკომენდება, რომ შემდგომ კვლევებში ამ სიმპტომის გამოვლენასაც მიექცეს სათანადო ყურადღება.

პრევენცია მიჩნეულია საუკეთესო სტრატეგიად ნატრიუმის აზიდის მწვავე და ქრონიკული მოწამლვის თავიდან ასაცილებლად, ასევე, გარემოზე უარყოფითი ზემოქმედების შესამცირებლად. ლაბორატორიული უსაფრთხოებისთვის საჭიროა ქიმიკატის ხელმისაწვდომობის კონტროლი,

სათანადო აღნიშვნების დატანა და ლაბორატორიული უსაფრთხოების ზომების მკაცრად დაცვა. ასევე, პრევენციულ ზომებს მიეკუთვნება ნატრიუმის აზიდის ქიმიური და ფიზიკური თვისებების სწავლება და დაუყოვნებელი სასწრაფო დახმარების აღმოჩენის წესების ცოდნა.

ასევე, მნიშვნელოვანია რისკ-ჯგუფების იდენტიფიკაცია, რომლებსაც მიეკუთვნებიან ლაბორატორიის პერსონალი და მაშველები, ასევე საწარმოში მომუშავეები, როგორც ქიმიურ ქარხნებში, ასევე ფარმაცევტულ წარმოებაში, და ფერმერები. პრევენციული ღონისძიებების ჩატარება სავალდებულოა პროფესიული უსაფრთხოების მიზნით. ასევე, საჭიროა სწრაფი და ზუსტი ანალიზური მეთოდი, როგორც სასამართლო ექსპერტების არსენალში, ასევე გადაუდებელი სამედიცინო დახმარებისთვისაც, რაც ხელს შეუწყობს დაზარალებულისთვის დროულად დახმარების აღმოჩენას.

### **ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის კლინიკური შემთხვევების მიმოხილვა დიალიზის ცენტრში**

თირკმლის ჩანაცვლებითი თერაპიის დამკვიდრებამ სამედიცინო პრაქტიკაში გადატრიალება მოახდინა თირკმლის უკმარისობიანი პაციენტების მკურნალობაში. თირკმლის ჩანაცვლებითი თერაპია შეიძლება გამოყენებული იქნას, როგორც ჰემოდიალიზის სახით ჰოსპიტალში, ასევე, პერიტონიული დიალიზის სახით, რომელიც ამბულატორიულადაც ხორციელდება.

დაავადებათა კონტროლის ცენტრის (აშშ) მიერ გამოქვეყნდა და შეფასდა 1979–1999 წლების პერიოდში დაფიქსირებული ჰემოდიალიზის პაციენტების არა-ინფექციური გენეზის გართულებები, მათ შორის სხვადასხვა მიზეზებს შორის აღწერილია ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის რამდენიმე შემთხვევაც [95].

1988 წლის ნოემბერში 9 პაციენტს ერთდროულად აღენიშნებოდა ჰიპოტენზია და სხვა თანდართული სიმპტომები: მხედველობის დაბინდვა (5/9), თავის ტკივილი (6/9), გულისრევა ან ღებინება (3/9), სინკოპე (2/9), კრუნჩხვები (1/9). არც ერთი პაციენტი არ დაღუპულა. შესწავლის შედეგად სისხლში დადგინდა ნატრიუმის აზიდის არსებობა. სადიაგნოზოდ გამოყენებული იქნა იონური ქრომატოგრაფია. ამასთანავე, აზიდის შემცველობაზე გამოიკვლიეს დიალიზატის ხსნარიც სხვადასხვა ლაბორატორიებში. ქიმიური ანალიზით წყლის ნიმუშებში არ გამოვლინდა ნატრიუმის აზიდის შემცველობა. როგორც ცნობილია, ნატრიუმის აზიდით ჰიპოტენზიური ეფექტი მიიღწევა 0.2 - 4.0 მგ/კგ დოზაზე (Black et al. 1954). ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ აღწერილ სიმპტომებს იწვევს მცირე დოზების ზემოქმედება (Chang & Lamm, 2003).

პაციენტებში სიმპტომების უცარი გამოვლინების მიზეზი გახდა დიალიზის ცენტრში წყლის დამუშავების სისტემაში ჩატარებული ტექნიკური ცვლილებები, მაშინ, როცა გამოიცვალა და დამონტაჟდა ოთხი ახალი ულტრაფილტრი. მწარმოებლის მიერ ულტრაფილტრებში სადებინფექციო ხსნარად გამოყენებული იყო 0.25%-იანი ნატრიუმის აზიდი და 25% გლიცერინი. მწარმოებლის რეკომენდაციით საჭიროა ფილტრის გარეცხვა ინსტალაციამდე, მაგრამ ახალი მოდიფიკაციის ფილტრებზე არ იყო დატანილი აღნიშვნა გაფრთხილების ან ინსტრუქციის სახით, რამაც გამოიწვია შეცდომა და არ მოხდა მათი სწორად გამოყენება.

დიალიზის მომსახურე პერსონალის გაუფრთხილებლობის და შეცდომის მიზეზი იყო ის, რომ ასეთ ულტრაფილტრებს მწარმოებლები ინდუსტრიული მიზნებისთვისაც უშვებენ, კერძოდ, მუნიციპალური წყლის გასუფთავების სისტემებისთვის და, შესაბამისად, სამედიცინო მიზნებისთვის არ აკეთებდნენ მათზე აღნიშვნებს. ამგვარად, ამ სახის

ფილტრებს იყენებენ წინასწარი გაწმენდის ეტაპზე, სადაც წყალში ნარჩენების მაღალი სიმკვრივის ინდექსი ფიქსირდება.

ფილტრების სადებიინფექციოდ სხვა სახის ნივთიერებებიც შეიძლება იყოს გამოყენებული, რომლებიც ასევე ტოქსიკურია, ასე, რომ ყველა სახის ახალი დასაინსტალირებელი ფილტრები ადეკვატურად უნდა გაირეცხოს დიალიზის ფილტრებში გამოყენების წინ [96, 97].

FDA–ს დასკვნით მოწამლვა გამოიწვია არასწორი ექსპლუატაციის პირობებმა, იმის გამო, რომ არ მოხდა წყლის დამუშავების სისტემაში ულტრა-ფილტრებიდან ნატრიუმის აზიდის გაწმენდა. მიზეზი იყო მწარმოებლის დაუდევრობა, ასევე, არაადეკვატური სწავლება და არასაკმარისი მონიტორინგი [98].

### **ნატრიუმის აზიდის განსაზღვრა თირკმლის ჩანაცვლებითი თერაპიის ცენტრში სადიალიზო ფილტრებში და დიალიზატში**

წყლის ბაქტერიული კონტამინაცია დიალიზის გართულების წამყვან მიზეზთაგანია, რაც უკავშირდება ავადობისა და სიკვდილიანობის მაღალ მაჩვენებლებს [99].

დიალიზის წყლის ხარისხი პაციენტისთვის სასიცოცხლო მნიშვნელობისაა. ყოველკვირეულად თირკმლის უკმარისობის მქონე თითოეული პაციენტი იყენებს 300-600 ლიტრ წყალს დიალიზის პროცედურის დროს, რომელიც წინასწარ გადის სპეციალურ დამუშავებას ელექტორლიტებზე, ანტი-ბაქტერიულ დამუშავებას, ულტრაიისფერი დასხივებით დებიინფექციას და ულტრა-ფილტრაციას.

ჰემოდიალიზისთვის წყალი გამოიყენება მუნიციპალური წყლის მომარაგების სისტემიდან [100]. დიალიზისთვის წყლის დამუშავების პროცედურის დროს დექლორირების შემდეგ აუცილებელია ულტრაიისფერი

ირადიაცია, ვინაიდან, დექლორირებულ წყალში ბაქტერიები სწრაფად იწყებენ გამრავლებას. ულტრაიისფერი დასხივების შემდეგ ხდება ბაქტერიების დაშლის პროდუქტების დაგროვება დიალიზატში, რაც, ასევე მნიშვნელოვანი ფაქტორია, რადგან ენდოტოქსინები შეიძლება მოხვდნენ პაციენტის ორგანიზმში, რასაც მოსდევს მდგომარეობის დამძიმება ანთებისთვის დამახასიათებელი კლინიკური სურათით. ამის გამო, წყალი იფილტრება მემბრანული ფილტრებით.

დიალიზის ულტრაფილტრები, რომელსაც ასევე უწოდებენ ხელოვნურ თირკმელს, გამოიყენება ძირითადად ერთჯერადად, ზოგ ქვეყნებში მრავალჯერადად. მათი დეზინფექციის მიზნით იყენებენ სხვადასხვა საშუალებებს, მათ შორის ნატრიუმის აზიდს. XX საუკუნის 90 წლებში დარეგისტრირდა შემთხვევები, როცა დიალიზის ცენტრში რამდენიმე პაციენტი შეცდომის ან პერსონალის დაუდევრობის გამო მოიწამლა ფილტრებში ნარჩენი ნატრიუმის აზიდით. [101, 102]

წყალი, რომელიც დიალიზატის მოსამზადებლად გამოიყენება, გარანტირებული ხარისხის უნდა იყოს დამუშავების, ასევე, შენახვის და განაწილების ყველა ეტაპზე, ტარდება მონიტორინგი, როგორც მიკრობული შემცველობის, ასევე ფიზიკურ-ქიმიური პარამეტრების კონტროლისთვის, რაც სასიცოცხლო მნიშვნელობისაა პაციენტებისთვის [103].

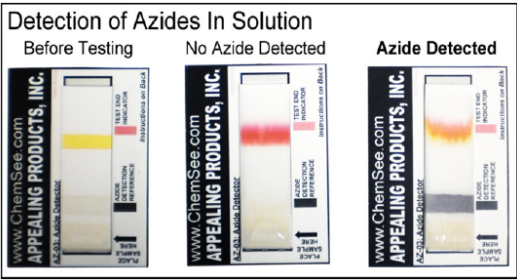
ნატრიუმის აზიდის განსაზღვრა სიმნელეს წარმოადგენს. ყველა არსებული მეთოდი მოკლებულია სიზუსტეს და არ გამოირჩევა მაღალი მგრძობელობით და სპეციფიურობით. მცირე მოლეკულური მასის და რეაქტიულობის გამო ნატრიუმის აზიდის ქიმიური ანალიზი ყოველთვის გართულებულია. ტუტე ლითონების აზიდებს შორის ნატრიუმის აზიდი წყალში კარგად ხსნადია და წარმოქმნის ასევე უკიდურესად ტოქსიკურ აზოტწყალბადმჟავას.

სამეცნიერო ლიტერატურაში მოწოდებულია რამდენიმე მეთოდი გარემოს, საწარმოო და სასამართლო მედიცინაში გამოსაყენებლად, თუმცა არსებობს მოთხოვნილება, რომ ხელმისაწვდომი გახდეს უფრო ზუსტი მეთოდი ნაკლები კონცენტრაციების დასადგენად.

ჩვენ შევიმუშავეთ ანტიბაქტერიული ქიმიური ნივთიერების, ნატრიუმის აზიდის, შეფასების და განსაზღვრის მაღალი მგრძობელობის და სპეციფიურობის  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის ქიმიურ-ანალიზური მეთოდი წყლის დამუშავების სისტემაში და გამოყენებულ წყალში უწყვეტი მონიტორინგისთვის.

ამ მეთოდით შესაძლებელია მუნიციპალურ წყალში ნატრიუმის აზიდის რაოდენობრივად და თვისობრივად განსაზღვრა მეტი სიზუსტით, როგორც, წყლის დამუშავების პროცესში და ასევე, უკვე გამოყენებულ დრენირებულ წყალშიც. მაგალითად, ფარმაცევტულ წარმოებაში, რაც ასევე მნიშვნელოვანია, დაბალი დოზით ინტოქსიკაციის რისკის არსებობის გათვალისწინებით. საჭიროების შემთხვევაში ნატრიუმის აზიდის და თანმხლები აზოტწყალბადმჟავას დეაქტივაცია ხდება მათი შემცველობის დადგენისას ნარჩენ წყალში.

ხელმისაწვდომი მეთოდების საშუალებით ისაზღვრება ნატრიუმის აზიდი, მაგალითად, კომერციული კოლორიმეტრიული მეთოდით (ChemSee/Appealing Products Inc.). ისინი გამოიყენება ძირითადად ბიოლოგიურ სითხეებში და ფარმაცევტულ ხსნარებში (AZD-N2; AZD-P2). ამ მეთოდის მგრძობელობა ნეიტრალურ და მჟავა (pH 5-8) პირობებში არის 50 ppm ტესტ სტანდარტის მიხედვით; ხოლო, ტუტე პირობებში (pH 8-14) კი 100 ppm. ასევე, დიდი



რაოდენობის აზიდების შემცველობის განსაზღვრისთვის წყალში და საკვებში გამოიყენება კიტ-ნაკრებები KT-06 და KT-06R.

ეს მეთოდი მისაღებია პრაქტიკული მიზნების მისაღწევად, როცა სწრაფად და რუტინულად არის საჭირო ნატრიუმის აზიდის შემცველობის შემოწმება, მაგალითად, ლაბორატორიაში საუტილიზაციო სითხეში.

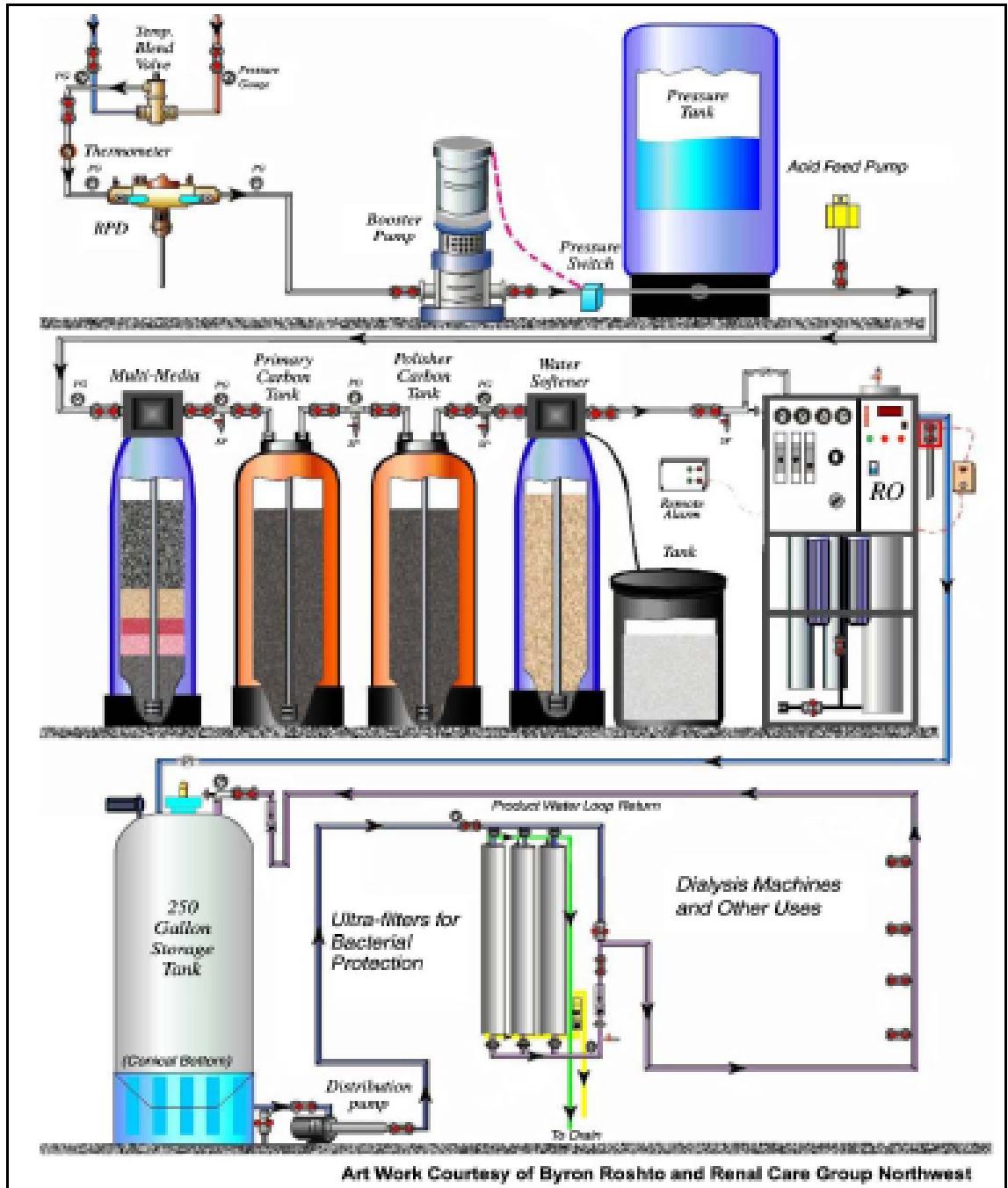
ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით კი შესაძლებელია ნატრიუმის აზიდის განსაზღვრა  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტროსკოპიის გამოყენებით, რაც უპირატესობას წარმოადგენს სხვა მეთოდებთან შედარებით. აქამდე არ ხდებოდა  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტროსკოპიის გამოყენება რუტინულად, არ ჩატარებულა კვლევები ამ მიმართულებით. ვინაიდან, ცნობილია, რომ  $^{14}\text{N}$  არ არის ბმრ-მგრძობიარე. აქამდე, მხოლოდ კვადრუპოლურ-რეზონანსულ სპექტროსკოპიას იყენებდნენ აზოტის შემცველი მოლეკულების შესასწავლად. ხოლო, ჩვენს კვლევაში გამოვიყენეთ აზიდის მოლეკულის უნიკალური თავისებურება, როცა სიმეტრიულ გარემოცვაში ხდება აზოტის ატომების სპექტრების გამოჩენა, მიუხედავად კვადრუპოლური ბირთვის არსებობისა.

ჩვენი კვლევის შედეგად დავამკვიდრებთ ნატრიუმის აზიდის დეტექციის ინოვაციურ მეთოდს  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტროსკოპიით, როგორც მუნიციპალურ, ასევე ფარმაცევტული ქიმიური წარმოების გამდინარე წყალში შესასწავლად. მომავალში შესაძლებელია ამ მეთოდის გამოყენება სხვადასხვა სფეროში, საკვებში, ბიოლოგიურ სითხეებში, წამლის სუბსტანციებში შესასწავლად.

ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი გასათვალისწინებელი ფაქტორია, რომ არ არსებობს ანტიდოტი, ამიტომ, ნატრიუმის აზიდით მწვავე მოწამლვის შემთხვევაში სიმპტომური მკურნალობის ერთადერთ საშუალებად რჩება დიალიზი და ჰეპოფილტრაცია.



რეკომენდაციას ვუწევთ ჩვენს მიერ შესწავლილ და შემუშავებულ ნატრიუმის აზიდის დადგენის რაოდენობრივ და თვისობრივ მეთოდს  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტროსკოპიით. ამ მეთოდით შესაძლებელია წყლის მონიტორინგის უზრუნველყოფა დიალიზის დროს და ქიმიურად დამუშავებულ წყალში, ასევე რეფერენს სტანდარტად გამოყენება ფარმაკო-ქიმიაში, საკვების და სასმელის უსაფრთხოების პროფილის დასადგენად.



სქემა 1. დიალიზატის მოსამზადებელი ფილტრების სისტემა.

## მასალა და მეთოდები

ბმრ-სპექტროსკოპიის ექსპერიმენტული კვლევები დაიგეგმა და განხორციელდა 2012 წლის სექტემბრიდან 2014 წლის დეკემბრის ჩათვლით სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტში, ფარმაციის ფაკულტეტის, ანალიზური ქიმიის ნუტრიციოლოგიის და ბრომატოლოგიის დეპარტამენტში (საკვების უსაფრთხოების და ტოქსიკოლოგიური კვლევის ლაბორატორიაში).

ბმრ-სპექტროსკოპიის აპარატურა მდებარეობს ინოვაციის და ტექნოლოგიების ტრანსფერის ცენტრში (CACTUS), ორგანული ქიმიის ფაკულტეტის სპეციალურად აღჭურვილ ლაბორატორიაში, ასევე ბიოლოგიური ქიმიის ცენტრში (CIQUS), სადაც ჩატარდა კვლევები. ბმრ-სპექტროსკოპიის მონაცემების დამუშავებისთვის ვიყენებთ სპეციალურ კომპიუტერულ პროგრამას MNova, რომელიც შემუშავდა სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტში და წარმატებით დაინერგა მსოფლიოს მრავალ ცენტრში (MESTRE Labs მიერ <http://mestrelab.com/software>).

უნივერსიტეტის ბირთვულ მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიის ლაბორატორიები (<http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/index.html>) ოპტიმალურად არის აღჭურვილი კვლევებისთვის და უზრუნველყო ჩვენს მიერ დაგეგმილი პროექტის განხორციელება შემდეგი აპარატურის გამოვიყენებით:

- სამი Varian Inova ბმრ- სპექტრომეტრი - 400 MHz, 500 MHz და 750 MHz (CACTUS, ორგანული ქიმიის ფაკულტეტი და CIQUS);

- ორი Bruker DPX - 250 MHz და 500 MHz (CACTUS და ორგანული ქიმიის ფაკულტეტი);

- ორი Varian Mercury 300 MHz ბმრ- სპექტრომეტრი.

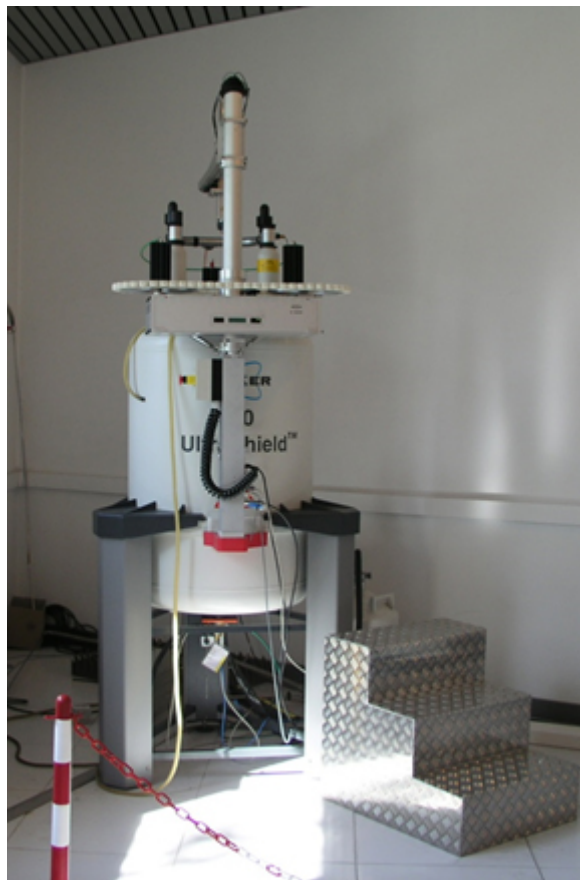
ბმრ-სპექტრომეტრები სანტიაგო დე კომპოსტელას უნივერსიტეტში



Varian Inova 750 (CACTUS)

HCN ( $^1\text{H}$  /  $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ ) – ნიმუშების ზონდირება X, Y, Z გრადიენტები

[http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/modules/equipamento/equipamento\\_0008.html](http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/modules/equipamento/equipamento_0008.html)



Bruker DRX-500 (CACTUS)

$^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (სტანდარტული 5 მმ-ის მილაკი) გრადიენტი Z.

[http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/modules/equipamento/equipamento\\_0007.html](http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/modules/equipamento/equipamento_0007.html)

სხვა სპექტრომეტრები:

- Varian Inova 500 (CIQUS)
- Varian Mercury 300 (CIQUS)
- Varian Mercury 300 + robot (CACTUS)
- Varian Inova 400 (Faculty of Chemistry)
- Bruker DPX 250 (Faculty of Chemistry)

## საანალოზო ხსნარის მომზადება კალიბრაციისთვის

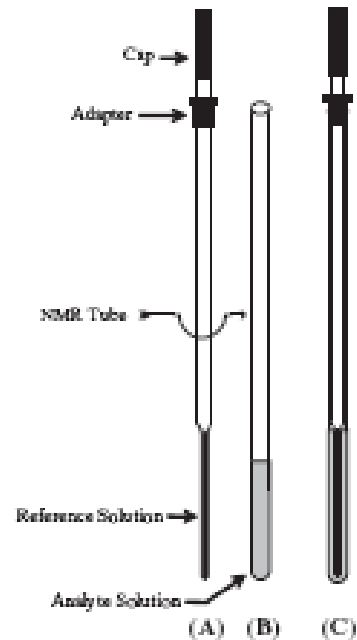
მომზადდა ნატრიუმის აზიდის (Sigma Aldrich) 100 mM კონცენტრაციის ხსნარი. ხსნარის მოსამზადებლად იქნა გამოყენებულ დეუტერიუმის ოქსიდი ე.წ. “მძიმე წყალი” - D<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich) და miliQ დისტილირებული წყალი. რეფერენს სტანდარტად 100%-იანი კონცენტრაციის ნიტრომეთანის (CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>) ხსნარი (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

a) თანაღერძულ შიდა მილაკში ვათავსებთ 600 მკლ 100%-იან ნიტრომეთანის (CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>) ხსნარს რეფერენს-სტანდარტის მოსამზადებლად.

b) ნატრიუმის აზიდის (NaN<sub>3</sub>) 5 სხვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუში 100mM, 50mM, 25mM, 10mM, 4mM მომზადდა 9:1 თანაფარდობის H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O ხსნარში. თითოეული ხსნარის 0,5 მლ მოთავსებულ იქნა სპეციალურ ბმრ-ის 5 მმ-ის მილაკში.

c) ბმრ-სპექტროსკოპიის ანალიზისთვის გამზადებული სისტემა.

გამოყენებული იქნა პროტონული (<sup>1</sup>H), აზოტის ორივე იზოტოპის <sup>14</sup>N- და <sup>15</sup>N- ბმრ სპექტროსკოპიები.



სურ. 5

## რეფერენს სტანდარტის ხსნარის მომზადება

ბმრ სპექტრის რეფერირებისთვის გამოიყენება სხვადასხვა მეთოდი, მათ შორის შიდა და გარე რეფერირება [104, 105]. პირველის დროს რეფერენს ნაერთი ემატება გამოსაკვლევ საანალოზო ნიმუშს, ხოლო, როცა ორ ცალკე-ცალკე მილაკში თავსდება რეფერენს სტანდარტი და საანალოზო ნიმუში, ამ მეთოდს ეწოდება გარე რეფერირება. ამ უკანასკნელის დროს, ორივე მილაკი ერთად თავსდება და ორივე სპექტრი აღირიცხება ერთდროულად.

$^{14}\text{N}$  და  $^{15}\text{N}$  ბმრ-ისთვის რამდენიმე რეფერენს ნაერთი გამოიყენება, მათ შორის ყველაზე ხშირად ნიტრომეთანის ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) ხსნარი და თხევადი ამიაკი ( $\text{NH}_3$ ) [106]. Harris და თანაავტორები (2001) [107, 108, 109] რეკომენდაციას უწევენ ნიტრომეთანს, რომელიც უპირატესად ქიმიური კვლევების დროს გამოიყენებოდა, მაშინ, როდესაც, Markley და თანაავტორები [110, 111, 112] უპირატესობას ანიჭებენ თხევად ამიაკს, რადგან ტრადიციულად გამოიყენებოდა ბიოქიმიური კვლევების დროს.

### **ფიზიკურ-ქიმიური ფაქტორები, რომლებიც ზემოქმედებენ რაოდენობრივი ბმრ-ის ანალიზის შედეგებზე**

#### **- ბმრ-ის კაპილარული მილის დიამეტრი და სიზუსტე**

როდესაც საჭირო ხდება დიდი რაოდენობით ნიმუშების ანალიზი და შედარება, ბმრ-ის კაპილარული მილების დიამეტრში განსხვავებაც კი განაპირობებს რაოდენობრივი ბმრ-ის შედეგების ცდომილებებს და უზუსტობებს [113,114]. ამიტომ, საჭიროა, რომ გამოყენებულ იქნას ძალიან ზუსტი დიამეტრის მქონე ბმრ-ის მილი. შემენისას საჭიროა მწარმოებლის სპეციფიკაციის გაცნობა და გათვალისწინება. ხოლო, როცა თანაღერძული კაპილარული მილი გამოიყენება გარე რეფერენს სტანდარტით შესავსებად, მაშინ, იგივე კაპილარი უნდა იქნას გამოყენებული მთელი კვლევის განმავლობაში, რათა დარწმუნებული ვიყოთ შედეგების სიზუსტეში.

#### **- ნიმუშის pH**

ნიმუშის pH-ს გარკვეულ როლს ასრულებს რაოდენობრივი ანალიზისთვის. ამ პარამეტრის ცვალებადობამ შეიძლება გამოიწვიოს შესასწავლი სიგნალის ქიმიური ცდომილების (chemical shift) დევიაცია, რასაც

შეიძლება მოჰყვეს სიგნალების გადაფარვა სპექტრში და რელაქსაციის დროის ცვლილებები [115, 116, 117, 118].

**- ხსნარის იონური ძალა**

ხსნარის იონური ძალა (ე.ი. ნიმუშის კონცენტრაცია) ასევე ზემოქმედებს T1 რელაქსაციის დროის ცვლილებებზე და სიგნალის დევიაციაზე, რაც თავის მხრივ ბმრ-ის რაოდენობრივ ანალიზს აუარესებს. მაღალი კონცენტრაცია აუარესებს ნიმუშის შესწავლის პროცესს [119].

**- რეფერენს სტანდარტის და საანალიზო ნიმუშის კონცენტრაციები**

რეფერენს სტანდარტის და საანალიზო ნიმუშის კონცენტრაციები ერთმანეთს უნდა შეესაბამებოდეს [120]. მაშინ, როდესაც კონცენტრაციებში განსხვავება ძალიან მნიშვნელოვანია, ეს გამოიწვევს ზედმეტად მაღალი ინტენსივობის დამახინჯებულ სიგნალს, ან პირიქით, დაბალი კონცენტრაციის შემთხვევაში, სიგნალის ხმაურთან თანაფარდობის (S/N) დაბალ მაჩვენებელს.

**- ხსნადობა**

საანალიზო ნიმუში მთლიანად უნდა იხსნებოდეს გამხსნელში და არ უნდა წარმოქმნიდეს სუსპენზიას და პრეციპიტატებს. ასე, რომ საანალიზო ხსნარის მომზადებამდე, მისი ხსნადობა უნდა შემოწმდეს და ითვლება ზომიერად (1 გ 100 მლ-ში), კარგად (1 გ 30 მლ-ში), თავისუფლად (1 გ 10 მლ-ში) ან ძალიან კარგად ხსნადად (1 გ 1 მლ-ში).

ფიქსირებული მოცულობის გამხსნელში საანალიზო ნიმუშის რაოდენობა უნდა გამისაზღვროს მისი ხსნადობის მიხედვით.

ჩვენს კვლევაში კალიბრაციისთვის ვიყენებდით ნატრიუმის აზიდის 5 სხვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუშს: 100mM, 50mM, 25mM, 10mM, 4mM H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) ხსნარში, ასევე ექსპერიმენტის ერთ სერიაში ჰიდრატირებულ ფულერენთან ურთიერთქმედების შესასწავლად გამოვიყენეთ 50-დან 500 mM

აზიდის ხსნარი. მოვამზადეთ მაქსიმალური კონცენტრაციის 1 მლ 1M ნატრიუმის აზიდის ხსნარი და მოვახდინეთ ტიტრაცია 500 mM-მდე.

ნატრიუმის აზიდი ხასიათდება, როგორც კარგად ხსნად რეაგენტად (>10000 მგ/ლ). [121]

ნატრიუმის აზიდის ხსნადობა წყალში შეესაბამება 415 გ/კგ-ზე, წყლის სიმკვრივის მიხედვით 20°C-ზე, იგივეა, რაც 414 გ/ლ-ზე. ხოლო, 10°C-ზე 401.5 გ/ლ-ზე და 17°C-ზე 416.5 გ/ლ-ზე. (წყლის სიმკვრივის მიხედვით 10°C და 17°C 0.9997021 გ/სმ<sup>3</sup> და 0.9987769 გ/სმ<sup>3</sup>). [122, 123, 124]

#### - ტემპერატურა

ტემპერატურა ასევე მნიშვნელოვანი გასათვალისწინებელი ფაქტორია, რომელიც აისახება რაოდენობრივი ანალიზის შედეგებზე. მთელი ექსპერიმენტის განმავლობაში უნდა იქნას შენარჩუნებული მუდმივი ტემპერატურა, მაშინაც კი, როცა ვახდენთ გარე რეფერენს სტანდარტის კალიბრაციას. [125, 126, 127]

#### - ქიმიური ურთიერთქმედება

რეფერენს სტანდარტი და საანალიზო ნიმუში ინერტული უნდა იყოს და ქიმიურად არ ურთიერთქმედებდნენ ერთმანეთთან. ჩვენს შემთხვევაში ვიყენებთ გარე რეფერენს სტანდარტს, რომელიც მოთავსებულია ბმრ-ის თანადერძულ კაპილარულ მილაკში.

### **რეფერირების ტექნიკური გამოყენება ბმრ-ის სპექტროსკოპული ანალიზის დროს**

რაოდენობრივი ბმრ-ის ანალიზისთვის საჭიროა გამოყენებულ იქნას რეფერენს ნაერთი საანალიზო ხსნარის კონცენტრაციის გამოთვლისთვის.

იდეალური რეფერენს ნაერთი უნდა აკმაყოფილებდეს შემდეგ მოთხოვნებს: უნდა იყოს ქიმიურად ინერტული, გააჩნდეს სისუფთავის



მაღალი კოეფიციენტი, სტაბილურობა, არ იყოს აორთქლებადი და ჰიგროსკოპული, თავისუფლად უნდა იხსნებოდეს ბმრ-ის რუტინულ გამხსნელებში.

ჩვენი კვლევისთვის ვიყენებთ 100%-იან ნიტრომეთანის ხსნარს ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) კალიბრაციის სტანდარტის შემუშავების დროს, ზოგი რეკომენდაციით, იყენებენ 90%-იან ნიტრომეთანის ხსნარს დეუტერირებულ ქლოროფორმში ( $\text{CDCl}_3$ ), რაც არ იქნა გამოყენებული ჩვენ შემთხვევაში ქლოროფორმის აორთქლებადობის გამო.

რეფერენს სიგნალი უნდა დაფიქსირდეს გაცალკევებულად. რეფერენს ნაერთის რელაქსაციის დრო ასევე უნდა შეესატყვისებოდეს საანალიზო ხსნარისას, იმისთვის, რომ თავი ავარიდოთ ექსპერიმენტის დროის გახანგრძლივებას, რაც არ არის სასურველი.

როგორც სქემატური სურათიდან ჩანს, შესაფასებელ საანალიზო ნიმუშში გარე რეფერენს სტანდარტის შერევის თავიდან ასაცილებლად გამოიყენება თანადერძული კაპილარული მილაკი, რომელიც შევსებულია წინასწარ შერჩეული რეფერენს ნაერთით, ჩვენ შემთხვევაში 100%-იანი ნიტრომეთანის ხსნარით და თავსდება ბმრ-ის მილში, რომელშიც მოთავსებულია გამოსაკვლევი საანალიზო ნიმუში. ორივე ხსნარის სიმაღლის სვეტი ერთნაირი უნდა იყოს. რეფერენს სტანდარტის კონცენტრაცია არ გამოიყენება პირდაპირ რაოდენობრივი გაანგარიშებისთვის. რეფერენს ხსნარის ეფექტური კონცენტრაციის კალიბრაცია ხდება მირჩილული ან მჭიდროდ დახურული კაპილარის მოთავსებით ბმრ-ის მილში, რომელიც შეიცავს პირველად სტანდარტულ ხსნარს (ჩვენს შემთხვევაში ნატრიუმის აზიდის 100mM ხსნარი) და რაოდენობრივი ბმრ-სპექტრი რეგისტრირდება.

ამგვარად, სტანდარტიზაციის შემდეგ, რეფერენს-კაპილარი ბმრ მილიდან უნდა ამოვიღოთ, გარედან გაირეცხოს, გაშრეს და მოთავსდეს

გასაანალიზებელი ნიმუშის ბმრ მილში და კალკულაცია მოხდეს ანალიზური ნიმუშების რაოდენობრივი გაანგარიშებისთვის. ერთი და იგივე კაპილარი შეიძლება გამოყენებულ იქნას მრავალ შესასწავლ ნიმუშში.

დაახლოებით 30%-ით შემცირებული სიგნალის ხმაურთან თანაფარდობა (S/N) აღირიცხა სტანდარტული Wilmad® (Sigma Aldrich) თანაღერძული კაპილარის გამოყენებისას, რომლის გარეთა დიამეტრი 1,8 მმ-ია და თავსდება 5 მმ-ის დიამეტრის ბმრ მილში. ასეთი შემცირება განპირობებულია კაპილარის დიამეტრით, ასე, რომ, უნდა იქნას გამოყენებული ძალიან თხელკედლიანი კაპილარი, რომელიც იკავებს ყველაზე ნაკლებ მოცულობას ბმრ-ის მილში. გარე რეფერენს სტანდარტის მეთოდი უზრუნველყოფს მეტ სანდოობას, ვიდრე შიდა რეფერენს სტანდარტის გამოყენება.

### **სტანდარტის დამატების მეთოდი**

სტანდარტის დამატების მეთოდის დროს გამოიყენება სტანდარტული ნაერთი (მაგ. საანალიზო ნაერთი სუფთა ფორმით, იმის მაგივრად, რომ გამოვიყენოთ არასპეციფიური შიდა ან გარე რეფერენს სტანდარტი).

სტანდარტის დამატების მეთოდი ნიშნავს ორი ან მეტი ნივთიერების დამატებას სტანდარტული ხსნარის ერთი და იგივე მოცულობის განსაზღვრული რაოდენობის ნიმუშში. თითოეული ხსნარი შემდეგ განზავდება და ფიქსირებულ მოცულობამდე დაიყვანება გაზომვამდე.

როცა ნიმუშის რაოდენობა შეზღუდულია, სტანდარტის დამატება შეიძლება მოხდეს სტანდარტის თანმიმდევრული მიმატებით ერთი განსაზღვრული რაოდენობის საანალიზო ნიმუშზე. გაანგარიშება ხდება საწყის საანალიზო ნიმუშზე და, ასევე, ყოველი სტანდარტული ხსნარის დამატების შემდეგ. მრუდი იგება პიკური ფართის გამოყენებით და

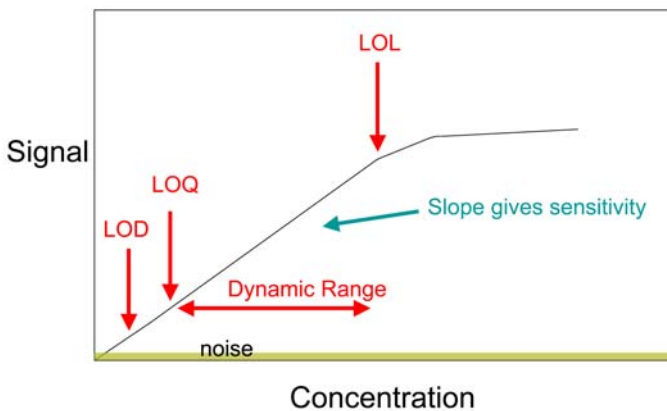
საანალიზო ნიმუშზე დამატებული სტანდარტის კონცენტრაციის მიხედვით [128].

ბმრ-ის შესაბამისი სპექტრების ინტეგრალური ფართის აღრიცხვა ხდება განზავებების სერიების ჩატარების შემდეგ. საანალიზო ნიმუშების მონაცემები ჩაიწერება იმავე ექსპერიმენტული პარამეტრების გამოყენებით და კალიბრაციის მრუდების ინტეგრალების გამოითვლა მოხდა სხვადასხვა კონცენტრაციების შესაბამისად. კალიბრაციის მრუდის, ანუ სტანდარტის დამატების მრუდის მიხედვით შეიძლება კონცენტრაციების გამოთვლა შესაბამისი რეფერენსის მიხედვით. ჩვენ შემთხვევაში ვიყენებდით წინასწარ ცნობილ კონცენტრაციებს.

### კალიბრაციის მრუდის მეთოდი

კალიბრაციის მრუდის მეთოდით ისაზღვრება უცნობ ნაერთებში კონცენტრაცია სტანდარტულ ნიმუშთან შედარების გზით. ზოგადად, გამოთვლებისთვის იყენებენ უმცირეს კვადრატთა წრფივი რეგრესიის მეთოდს [129].

ჩვენი ამოცანაა  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიით ნატრიუმის აზიდის უმცირესი კონცენტრაციის დადგენა. როცა საანალიზო ნიმუში ძალიან დაბალი კონცენტრაციისაა, ბმრ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის სიზუსტეზე და სანდოობაზე ზემოქმედებს დინამიურობის დიაპაზონი.



**სურ. 6.** სურათზე გამოსახულ კალიბრაციის მრუდზე ნაჩვენებია დეტექციის ზღვარი (LOD), რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარი (LOQ), დინამიურობის დიაპაზონი და წრფივი სწორახაზოვნების ზღვარი (LOL). [130]

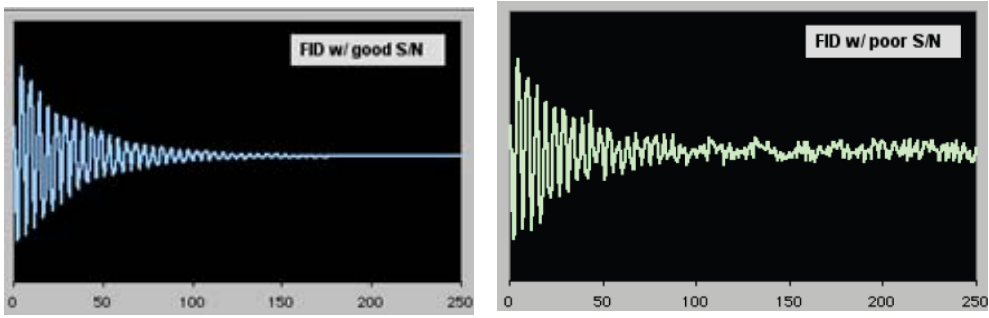
დეტექციის ზღვარი დამოკიდებულია სხვადასხვა ფაქტორებზე, მათ შორის მნიშვნელოვანია სიგნალის ხმაურთან თანაფარდობა (S/N). დეტექციის ზღვრად ექსპერიმენტში მიჩნეულია ის კონცენტრაცია, რომელიც შეიძლება დადგინდეს მისაღები სანდოობით და სიზუსტით განსაზღვრულ ექსპერიმენტულ პირობებში. რაოდენობრივი ბმრ-სპექტროსკოპიის დროს, ექსპერიმენტული პარამეტრები ყოველთვის უნდა გასწორდეს ისეთნაირად, რომ სიგნალის ხმაურთან (S/N) სასურველი თანაფარდობა მიღწეულ იქნას ნებისმიერი შესასწავლი ნაერთის დეტექციისთვის და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის.

დეტექციის ზღვარი (LOD) და რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარი (LOQ), ასევე, დამოკიდებულია მაგნიტური ველის სიმძლავრეზე, კერძოდ, მაღალი მაგნიტური ველის სპექტრომეტრები საშუალებას იძლევიან საგრძნობლად შეამცირონ დეტექციის ზღვარი (LOD) და რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარი (LOQ).

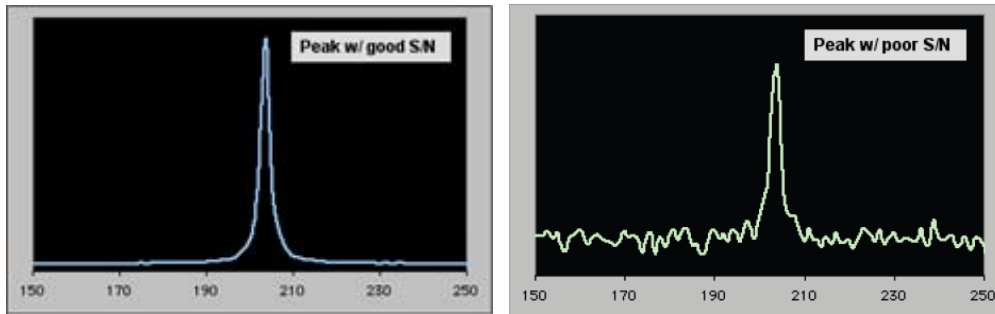
### ბმრ სკანირებების რაოდენობა

ფურიეს ტრანსფორმაციით (FT) ხდება ბმრ-ის სიხშირეების მრუდების სპექტრებად გარდაქმნა, რომელშიც ყოველი კომპონენტი წარმოდგენილია პიკის სახით. ბმრ სიგნალის მიღების მაჩვენებელია ხმაურის შემცირება (სიგნალის-ხმაურთან თანაფარდობა S/N).

**სურ. 7** სურათზე ჩანს სკანირებების რაოდენობის 1-დან 100-მდე გაზრდის ეფექტი თავისუფალი ინდუქციის მილევის (FID) სიგნალის მიღებაზე. (<http://www-usr.rider.edu>)



სურ. 8 სიგნალის-ხმაურთან თანაფარდობის (S/N) განსხვავება ასევე აისახება მიღებულ სპექტრზე. (<http://www-usr.rider.edu>)



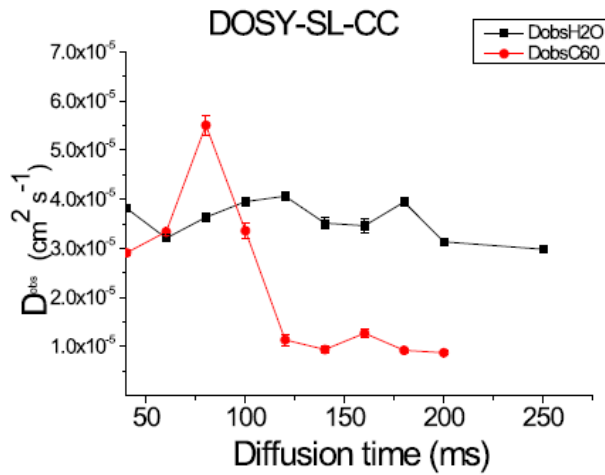
სიგნალის-ხმაურთან თანაფარდობის (S/N) გაზრდა არ ხდება არითმეტიკული პროგრესიის მიხედვით, არამედ, სიგნალი მატულობს  $N^{1/2}$ , სადაც N სკანირების რაოდენობაა.

ვინაიდან, ექსპერიმენტის ხანგრძლივობა დამოკიდებულია სკანირებების რაოდენობაზე, ამიტომ დრო მნიშვნელოვანი გასათვალისწინებელი ფაქტორია. მაგალითად, პროტონული ექსპერიმენტის ანუ  $^1\text{H}$  ბმრ სპექტროსკოპიის დროს S/N გაორმაგების მიზნით 16-დან (<2 წუთი) 64-მდე (5 წთ) სკანირების გაზრდა სავსებით მისაღებია და ადვილად მისაღწევი, მაშინ როცა, სტანდარტული  $^{13}\text{C}$  ექსპერიმენტის დროს საჭიროა 1024 სკანირება (პულსის დაყოვნების 5 წმ-იანი ინტერვალით), რაც 1,5-დან 6 სთ-მდე დროს მოითხოვს.

სკანირებების რაოდენობა ერთ-ერთი ძირითადი ექსპერიმენტული პარამეტრია, რომელიც ყველაზე ხშირად იცვლება. გამოსაკვლევი ნიმუშის კონცენტრაციის მიხედვით შეიძლება საჭირო გახდეს სტანდარტულზე მეტი სკანირებების რაოდენობა. ის ნუკლიდები, რომლების ბუნებრივი გავრცელება მცირეა ( $^{13}\text{C}$  - 1.1%,  $^{15}\text{N}$  - 0.37%,  $^{29}\text{Si}$  - 4.7%), საჭიროებენ ბევრად მეტ ექსპერიმენტულ დროს იმათთან შედარებით, რომლებიც უფრო გავრცელებულია ( $^1\text{H}$  - 99.99%,  $^{31}\text{P}$  და  $^{19}\text{F}$  - 100%) ერთნაირი კონცენტრაციის შემთხვევაში.

### ჰიდრატირებული ფულერენის დიფუზიის კოეფიციენტის განსაზღვრა

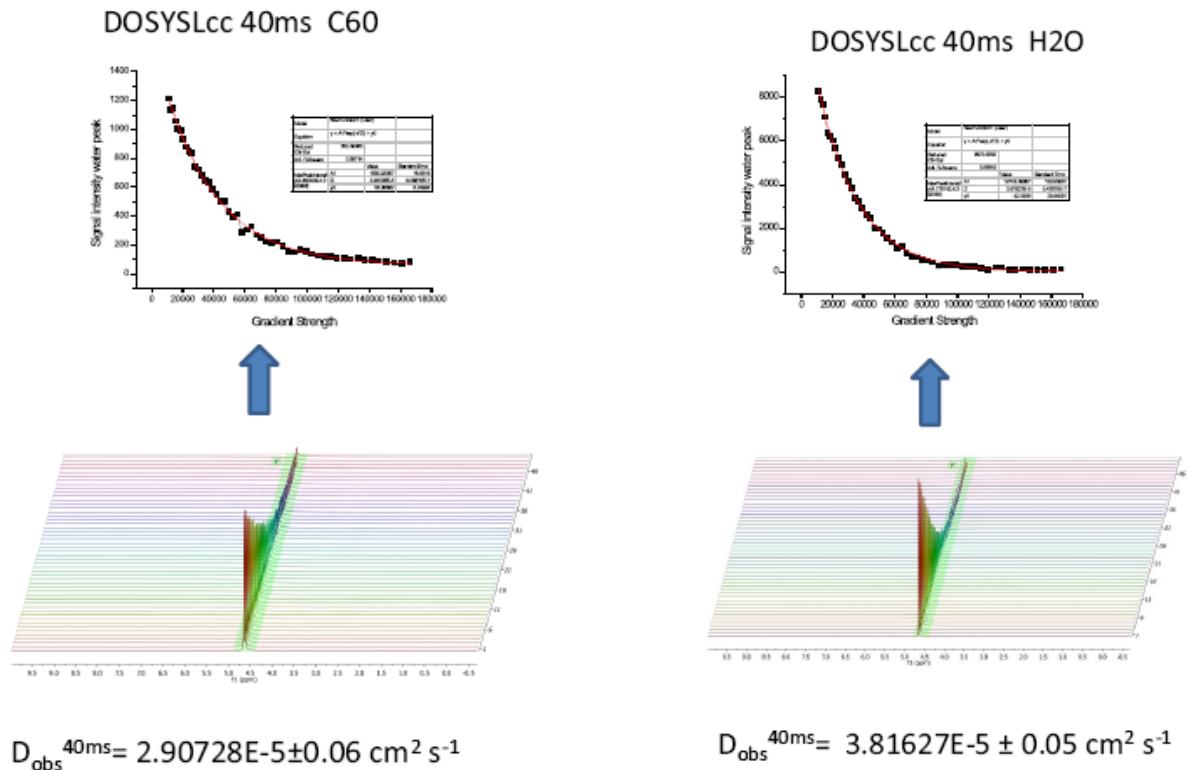
ჰიდრატირებული ფულერენის (C60) და წყლის (H2O) დიფუზიის კოეფიციენტების შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურაზე. (1 მგ/ლ კონცენტრაციის ფულერენის ხსნარი, IPACOM, ხარკოვი უკრაინა). (საკუთარი კვლევის შედეგები, მონაცემები 08/11/2013. CACTUS, USC, ესპანეთი).



სურ. 9.

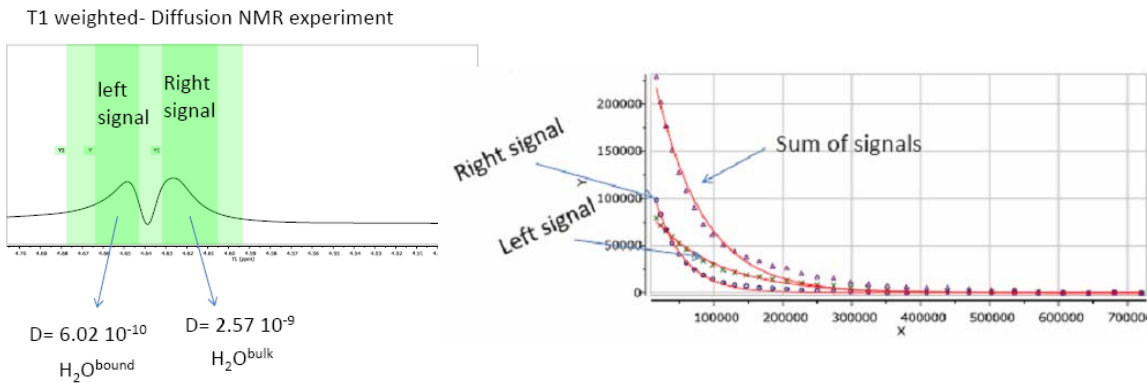
სურ. 10.

DOSY-SL-CC განმეორებითი ექსპერიმენტები დიფუზიის სხვადასხვა დროის მიხედვით: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 და 250 მწმ-ზე (144 მგ/ლ კონცენტრაციის ფულერენის ხსნარი. საკუთარი მონაცემები 05/05/2014. CACTUS, USC)



გამოყენებული იყო სხვადასხვა კონცენტრაციის ჰიდრატირებული ფულერენის ხსნარი: 144 მგ/ლ, 14,4 მგ/ლ, 1 მგ/ლ (IPACOM, ხარკოვი, უკრაინა). ყველა შემთხვევაში შედეგები იყო ერთმანეთის იდენტური და არ განსხვავდებოდა წყლის დიფუზიის კოეფიციენტისგან.

**სურ. 11.** დიფუზიის კოეფიციენტები განსაზღვრულია თავისუფალი და შეკავშირებული წყლის მოლეკულებისთვის. 144 მგ/ლ კონცენტრაციის ფულერენის ხსნარი C60/H<sub>2</sub>O. (საკუთარი მონაცემები 05/05/2014. CACTUS, USC)



ჩვენ განვსაზღვრეთ ჰიდრატაციის კოეფიციენტი წყლის მოლეკულების ორი ტიპისთვის, თავისუფალი და ფულერენტან შეკავშირებული. შეკავშირებულ წყალს უნდა ჰქონდეს უფრო მეტი დაყოვნების დრო ფულერენის ზედაპირზე. ჩვენ ვიკვლევდით პროტონული (<sup>1</sup>H) ბმრ-სპექტროსკოპიით. ნახშირბადის დეტექცია ამ კონცენტრაციაზე ვერ მოხერხდა ნიმუშში <sup>13</sup>C იზოტოპის სუსტი მგრძნობელობის გამო .

2013 წელს ჩატარებულ წინასწარი კვლევების დასასრულებლად და წყალთან შეკავშირებული ბმრ-ის სიგნალის იზოლაციისთვის გამოვიყენეთ DOSY-T1 ფილტრირების ექსპერიმენტი. ტესტირების შედეგად ექსპერიმენტი კარგ შედეგებს იძლევა, მხოლოდ შეზღუდვას წარმოადგენს ის ფაქტი, რომ ფილტრის სიმძლავრე არ არის საკმარისი, რომ სრულად მოაშოროს შეუკავშირებელი წყლის მოლეკულების მაღალი ფრაქცია 144 მგ/ლ ფულერენის ხსნარში.

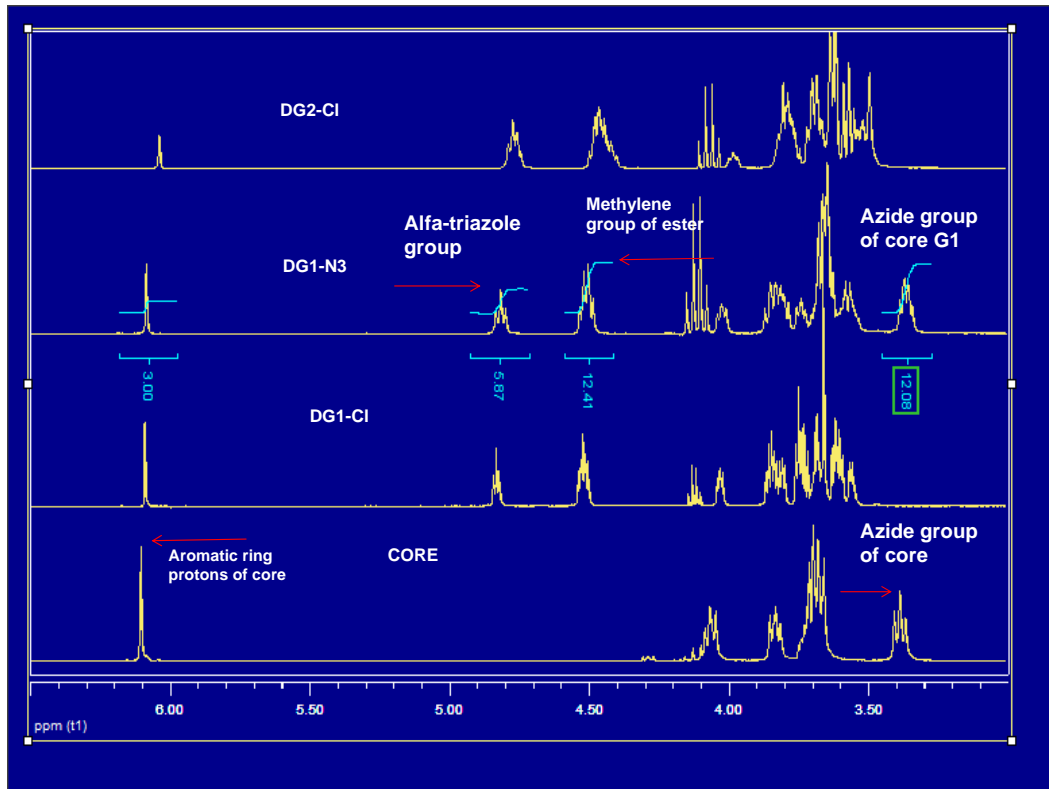
## შედეგები

### პროტონული ( $^1\text{H}$ ) ბმრ-სპექტროსკოპით აზიდების შესწავლა, დერივატიზაციის რეაქციის შედეგები

აზიდების დერივატიზაციით ალკინებთან ციკლირების რეაქციის შედეგად მიიღება ტრიაზოლის შემცველი ნაერთი.

#### სურ. 12.

აზიდ-ალკინის ციკლირების რეაქციის ეტაპები, (საკუთარი მასალა. 2012, CIQUS, USC)



პროტონული ბმრ-სპექტროსკოპით შესაძლებელია დადგინდეს რეაქციის მიმდინარეობის სისრულე და საჭიროების შემთხვევაში მოხდეს ოპტიმიზაცია. სურათზე წარმოდგენილია სინთეზირების პროცესში ოთხი თანმიმდევრული აზიდ-ალკინის ციკლირების შედეგად პოლიმერიზაციის



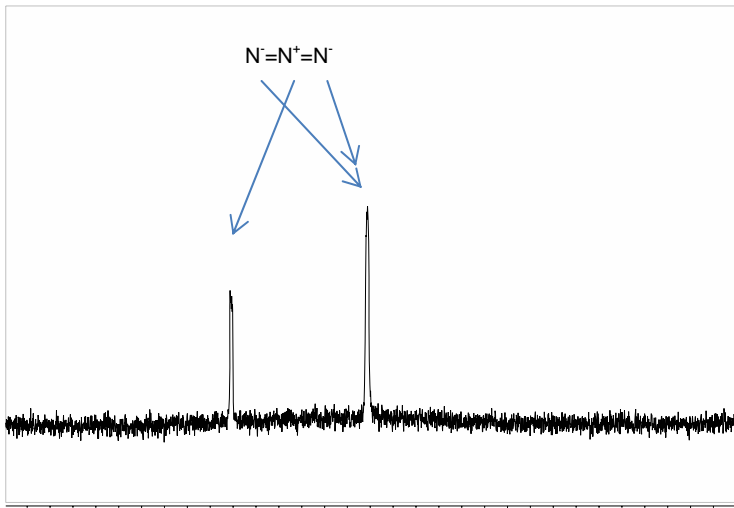
რეაქცია. ტერმინალური აზიდების ჩანაცვლების შედეგად ყოველ მომდევნო ეტაპზე იზრდება აზოტის ატომებთან მიერთებული პროტონების რაოდენობა გეომეტრიული პროგრესიით, რასაც ვხედავთ დიაგრამაზე. იქ, სადაც არის მინიშნებული სამი პროტონი, ნიშნავს, რომ წარმოდგენილია ერთი ტერმინალური აზიდის მოლეკულით, შემდეგ როცხვი ორმაგდება და ხდება შესაბამისად 6-ის ტოლი, და იქ, სადაც 3 ტერმინალური აზიდის მოლეკულაა, პროტონების რაოდენობა შეესაბამება 12-ს. (დიაგრამის მე-3 მწკრივი). მანამ, სანამ სასურველ შედეგს მივაღწევდით, მოვახდინეთ ოპტიმიზაცია, რაც გულისხმობდა ტემპერატურის ცვლილებას, კატალიზატორის მაგივრად მიკროტალღოვანი ირადიაციის ინტენსივობის და რეაქციისთვის საჭირო სხვა ფიზიკურ-ქიმიური პარამეტრების ცვალებადობას. (იხ. წარმოდგენილი დანართის სახით).

**ნატრიუმის აზიდის ( $\text{NaN}_3$ ) დეტექცია  $^{14}\text{N}$ -ბმრ სპექტროსკოპიით და  
რაოდენობრივი განსაზღვრა**

გამოვიკვლიეთ ნატრიუმის აზიდის 100 mM ხსნარი, როგორც ერთ განზომილებიანი (1D)  $^{14}\text{N}$ -ბმრ სპექტროსკოპიით, ასევე  $^{15}\text{N}$ -ბმრ და პროტონული ( $^1\text{H}$ ) ბმრ-სპექტროსკოპიით.

1D  $^{14}\text{N}$ -ბმრ სპექტროსკოპიით ექსპერიმენტის 0.5 წთ-ზე აზოტის ატომების პიკები დაფიქსირდა ქიმიური ცდომის  $\sim 200$  ppm-ზე და  $\sim 50$  ppm-ზე (სურ. 13), პირველი პიკი ნატრიუმის აზიდის მოლეკულის აზოტის ორი ატომის პიკების თანხვედრას შეესაბამება და ორჯერ აღემატება ერთი აზოტის შესაბამის პიკს.

$\text{NaN}_3$  კონცენტრაცია 100 mM  
 $^{14}\text{N}$  ბმრ -სპექტრი



30 წამზე 64 სკანირება  
DRX-500, 300 K USC, CACTUS. 19/11/2013

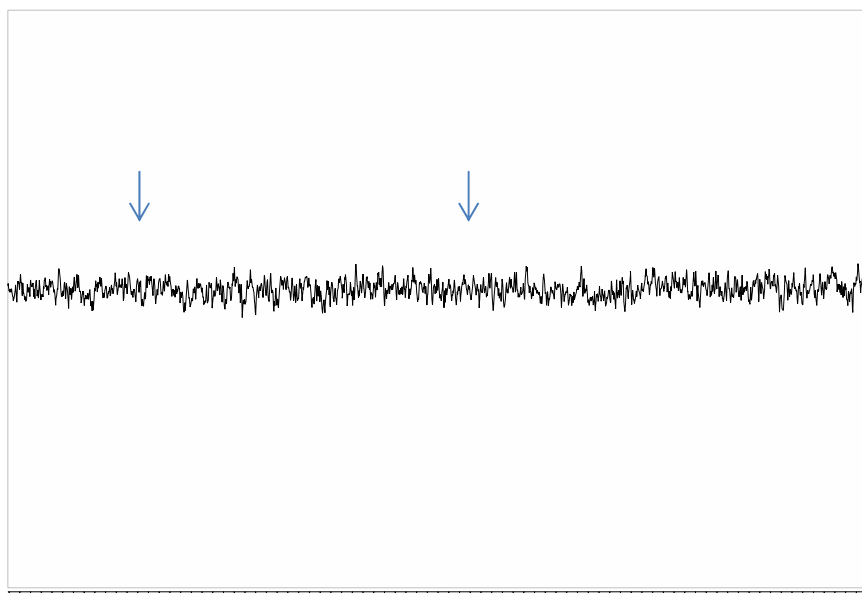
**სურ. 13**

ერთგანზომილებიანი (1D)  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტრი 100 mM  $\text{NaN}_3$   $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  ხსნარში. სპექტრი მივიღეთ 30 წმ-ში 64 სკანირების შემდეგ. სპექტრომეტრი Bruker Avance I NMR 11.7 T - 300 K.

(საკუთარი კვლევის შედეგები და მონაცემები 19/11/2013. CACTUS, USC, ესპანეთი).

ნატრიუმის აზიდის  $^{15}\text{N}$  ბმრ სპექტრი  
NaN<sub>3</sub> კონცენტრაცია 100 mM

მოსალოდნელი აზოტის ატომების სიგნალები 250 და 100 ppm არ აღირიცხება დაბალი S/N გამო (ექსპერიმენტის ხანგრძლივობა 60 წუთი)



DRX-500, 300 K USC, CACTUS. 19/11/2013  
საკუთარი მასალა და მონაცემები

**სურ. 14.**

$^{15}\text{N}$ -ბმრ სპექტროსკოპიით არ გამოჩნდა სიგნალი მოსალოდნელი ქიმიური ცდომილების ადგილას ექსპერიმენტის 60 წუთის განმავლობაში.

მიზეზი, რის გამოც  $^{15}\text{N}$ -ბმრ-სპექტროსკოპიაზე ნატრიუმის აზიდის მოსალოდნელი პიკები არ გამოჩნდა აიხსნება იმით, რომ ექსპერიმენტის ხანგრძლივობა იყო უფრო მეტი ვიდრე  $^{14}\text{N}$  ბმრ-თვის, რაც ენერგოწამებიაწარმოებული ექსპერიმენტებისთვის, მაშინ, როდესაც  $^{14}\text{N}$ -ბმრ სპექტროსკოპიით უკვე 30 წმ-ზე მოხდა პიკების დაფიქსირება (სურ.13) და ამიტომ ვერ მივიღეთ სპექტრი (სურ.14).  $^{15}\text{N}$ -ბმრ-სპექტრზე აზოტის პიკები იმიტომ არ ჩანს, რომ

ისინი არიან მოქცეული ხმაურის სიგნალის ქვემოთ (სიგნალის ხმაურთან თანაფარდობა, S/N).

იმისთვის, რომ ისინი გამოჩნდეს, საჭიროა უფრო ხანგრძლივი დრო, რაც ნიშნავს უფრო მეტი რაოდენობის სკანირების სერიების ჩატარებას და უნდა გაიზარდოს S/N თანაფარდობა, ან ალტერნატიულად, გავზარდოთ ნატრიუმის აზიდის კონცენტრაცია ნიმუშში და მივიღოთ უფრო მაღალი პიკი, რომელიც სპექტრზე გამოჩნდება.

ჩვენს მიერ გამოსაკვლევი ნატრიუმის აზიდის კონცენტრაციისთვის, სავარაუდოდ, დასჭირდებოდა 12 საათი ან უფრო მეტი დრო, რომ მიგვეღო S/N სიგნალის დონეზე მაღალი  $^{15}\text{N}$ -ის პიკები.

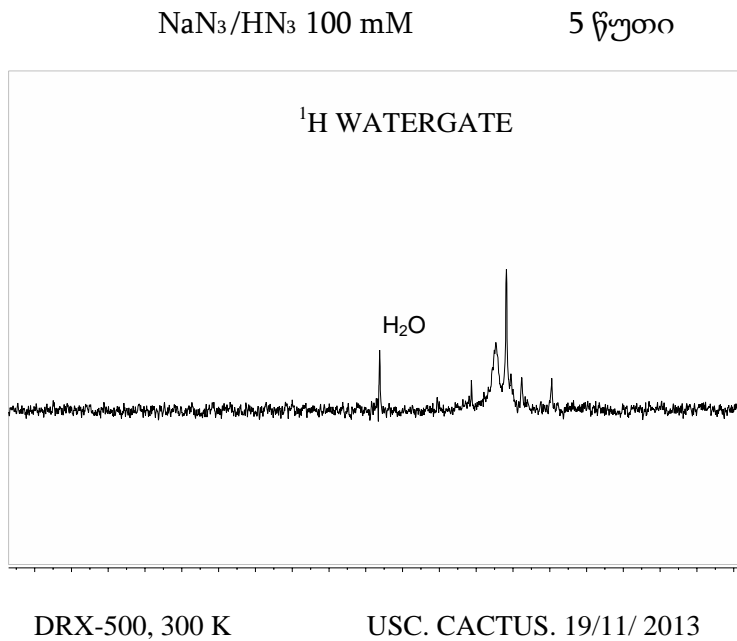
რაც უფრო მეტია სკანირების რაოდენობა, მით უფრო მაღალია სიგნალის ხმაურთან თანაფარდობა (S/N). თუმცა, გასათვალისწინებელია, რომ S/N გაუმჯობესდება სკანირების რაოდენობის კვადრატული ფესვის უკუპროპორციულად.  $(S/N)_n = \sqrt{n}(S/N)$ .

S/N თანაფარდობის გაორმაგდება მიიღწევა 64 სკანირების გამოყენების შედეგად 16-ის ნაცვლად, ხოლო 128 სკანირება 64-ის ნაცვლად გამოიწვევს იმავე პარამეტრის მხოლოდ 1,41-ჯერ გაუმჯობესებას.

როცა კონცენტრაცია ძალიან მცირეა, სკანირებების რაოდენობა იზრდება, რომ მივაღწიოთ მისაღებ S/N თანაფარდობას. თანამედროვე ბმრ-სპექტრომეტრებში, მგრძნობელობა ასევე დამოკიდებულია ნიმუშის ტიპზე, მაგ. ბირთვის სპეციფიკურ სინჯზე.

პროტონულ ( $^1\text{H}$ ) ბმრ-სპექტროსკოპიაზე დაფიქსირდა პიკები, რომლებიც მიანიშნებს  $\text{HN}_3$ -ის არსებობაზე ხსნარში, რაც ტიპურია  $\text{NaN}_3$ -ის ხსნარისთვის, რაც ჩვენს შემთხვევაშიც დადასტურდა (სურ.15).

**სურ. 15.** პროტონული ბმრ-სპექტროსკოპია <sup>1</sup>H WATERGATE. (საკუთარი მასალა)



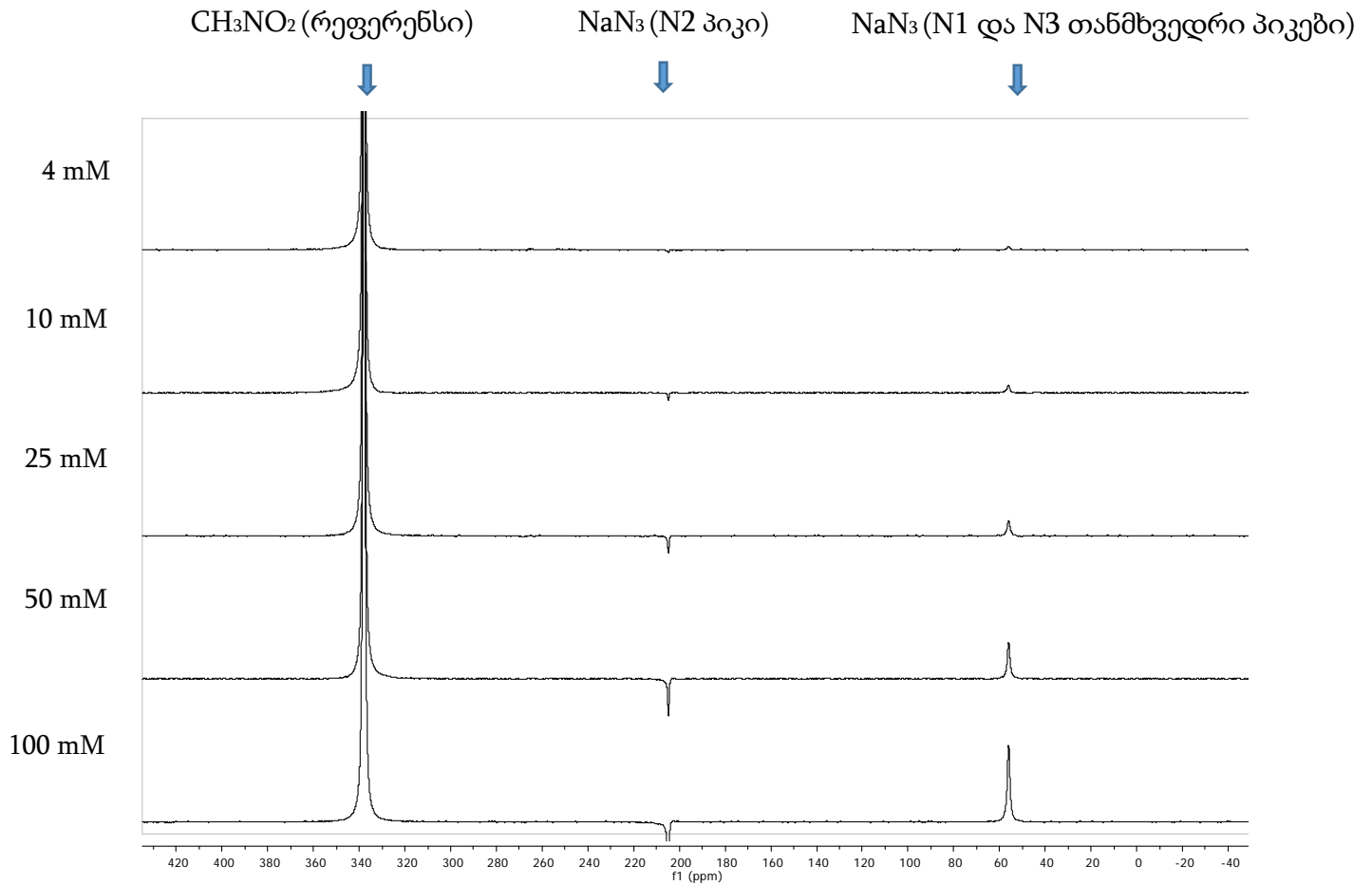
<sup>14</sup>N-ბმრ სპექტროსკოპიით დავადგინეთ ხუთი სხვადასხვა კონცენტრაციის ნატრიუმის აზიდის ხსნარში (100mM, 50mM, 25mM, 10mM, 4mM) უმცირესი კონცენტრაცია, რომლის დეტექციაც შესაძლებელია. გამოვიყენეთ უმცირესი კვადრატების წრფივი რეგრესიის მეთოდი და მიღებული კალიბრაციის მრუდის მიხედვით შევისწავლეთ უცნობი კონცენტრაციის სატესტო ნიმუში.

**ცხრ. 4** ცხრილში მოცემულია ჩვენს ექსპერიმენტში გამოყენებული კონცენტრაციები და შესაბამისი მოსალოდნელი პიკების სიმაღლეები.

| განზავება | კონცენტრაცია               | მგრძნობელობა<br>ბმრ-სპექტრის პიკის<br>სიმაღლე |
|-----------|----------------------------|---|
| 1         | 100 mM (NaN <sub>3</sub> ) | 1/2 <sup>0</sup> =1                           |
| 1/2       | 50 mM (NaN <sub>3</sub> )  | 1/2 <sup>2</sup> =1/4                         |
| 1/4       | 25 mM (NaN <sub>3</sub> )  | 1/2 <sup>4</sup> =1/16                        |

## ნატრიუმის აზიდის კალიბრაციის შედეგები

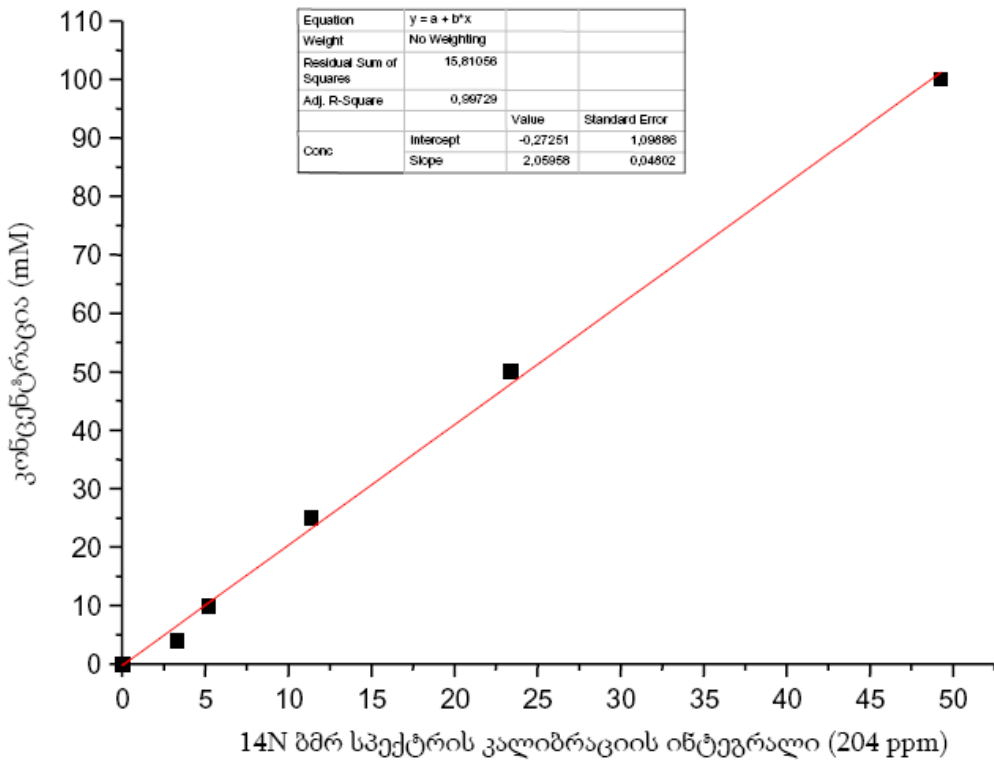
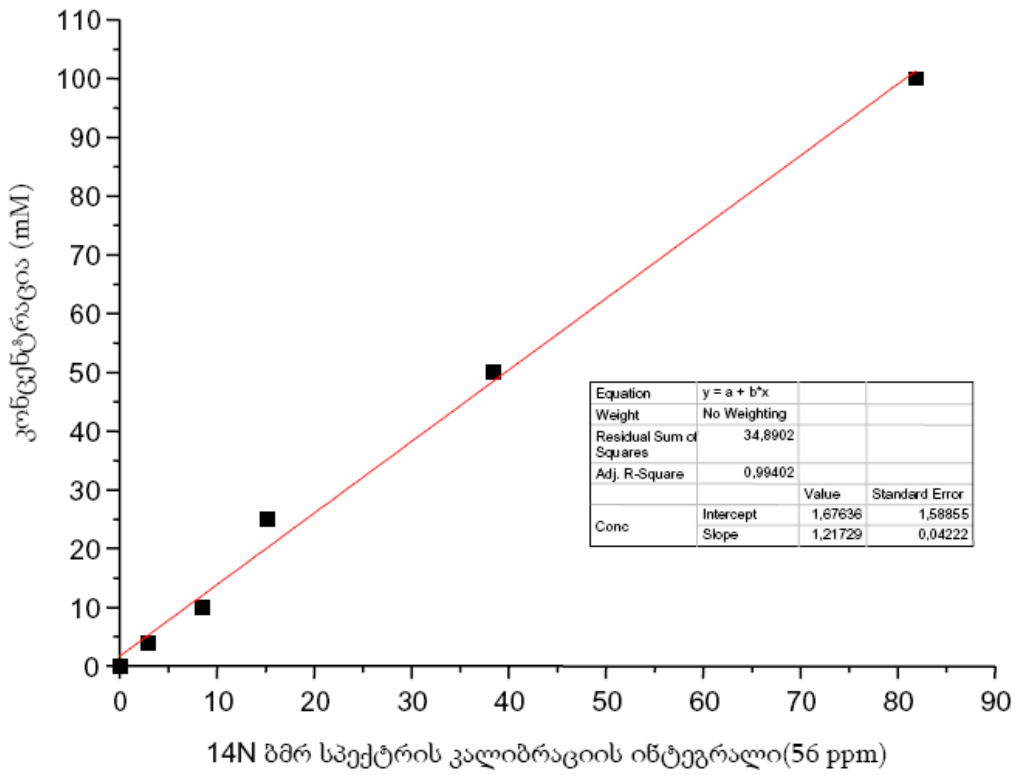
რეფერენს სტანდარტის ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) აზოტის ატომისა და ნატრიუმის აზიდის სამი აზოტის ატომის (N1, N2, N3) პიკები.



სურ. 16.

(საკუთარი კვლევის შედეგები და მონაცემები, ნოემბერი. 2014, CACTUS, USC, ესპანეთი).

ცხრ. 5. NaN3 სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარების კალიბრაციის მრუდები აზოტის პიკებისთვის (N2) 56 ppm და (N1 და N3)204 ppm.

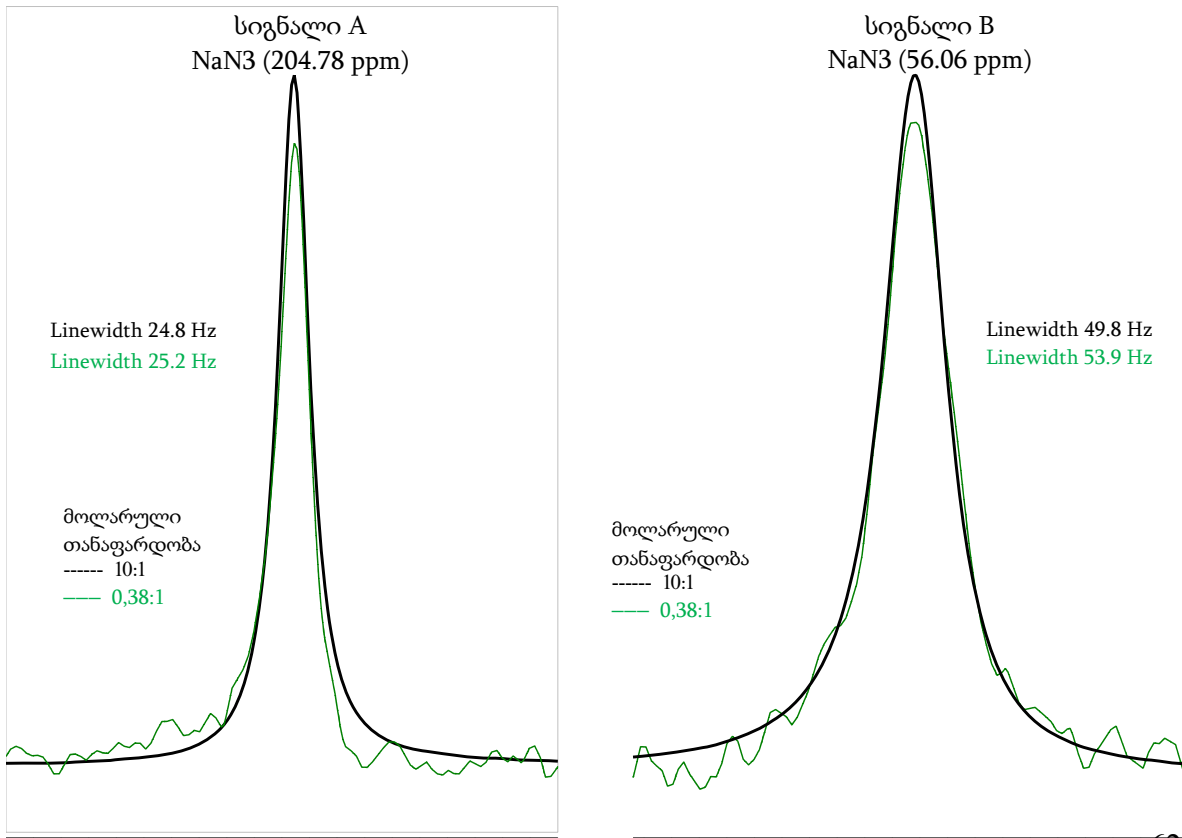


## ნატრიუმის აზიდის (NaN<sub>3</sub>) ჰიდრატირებულ ფულერენთან (C60) ურთიერთქმედების შესწავლა <sup>14</sup>N ბმრ სპექტროსკოპიით

ჩვენს კვლევაში გამოვიყენეთ ნატრიუმის აზიდის სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარი, რომელსაც ტიტრაციის წესით ვუმატებდით ჰიდრატირებული ფულერენის 50 mM ხსნარს (144 მგ/ლ) (IPAC, ხარკოვი, უკრაინა). ჩავატარეთ ექსპერიმენტების ორი სერია. ნატრიუმის აზიდის ორი სხვადასხვა კონცენტრაციისას, 1 M და 10 M, კლებადი და ზრდადი კონცენტრაციების ტიტრაციის შედეგად, შესაბამისად, NaN<sub>3</sub>:C60-ის თანაფარდობა პირველ შემთხვევაში იყო <10:1, ხოლო, მეორე შემთხვევაში >10:1, მაქსიმალური კონცენტრაციის (10M) NaN<sub>3</sub>:C60 თანაფარდობით 100:1-ზე.

**სურ. 17.** ორი სპექტრის შეფარდება.

NaN<sub>3</sub>:C60 (<= 10 :1) დაბალი მოლარული თანაფარდობისას არ დაფიქსირდა <sup>14</sup>N-ის ქიმიური ცდომის (chemical shift) და არც განივკვეთის (linewidth) რაიმე ცვლილება NaN<sub>3</sub>-ის ორივე პიკისთვის.

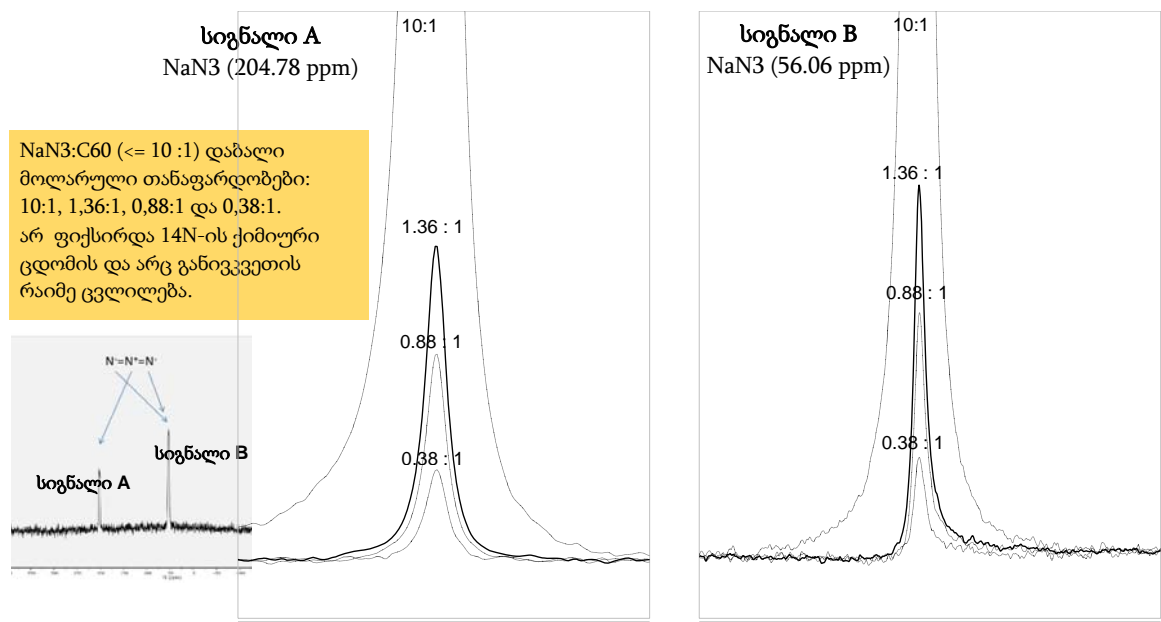




ექსპერიმენტების პირველ სერიაში გამოვიყენეთ სტანდარტის ე.ი. C60 დამატების ტიტრაციის მეთოდი. შესაბამისად,  $\text{NaN}_3:\text{C60}$ -ის თანაფარდობები იყო 10:1, 1,36:1, 0,88:1 და 0,38:1. (სურ. 12).

**სურ. 18.**

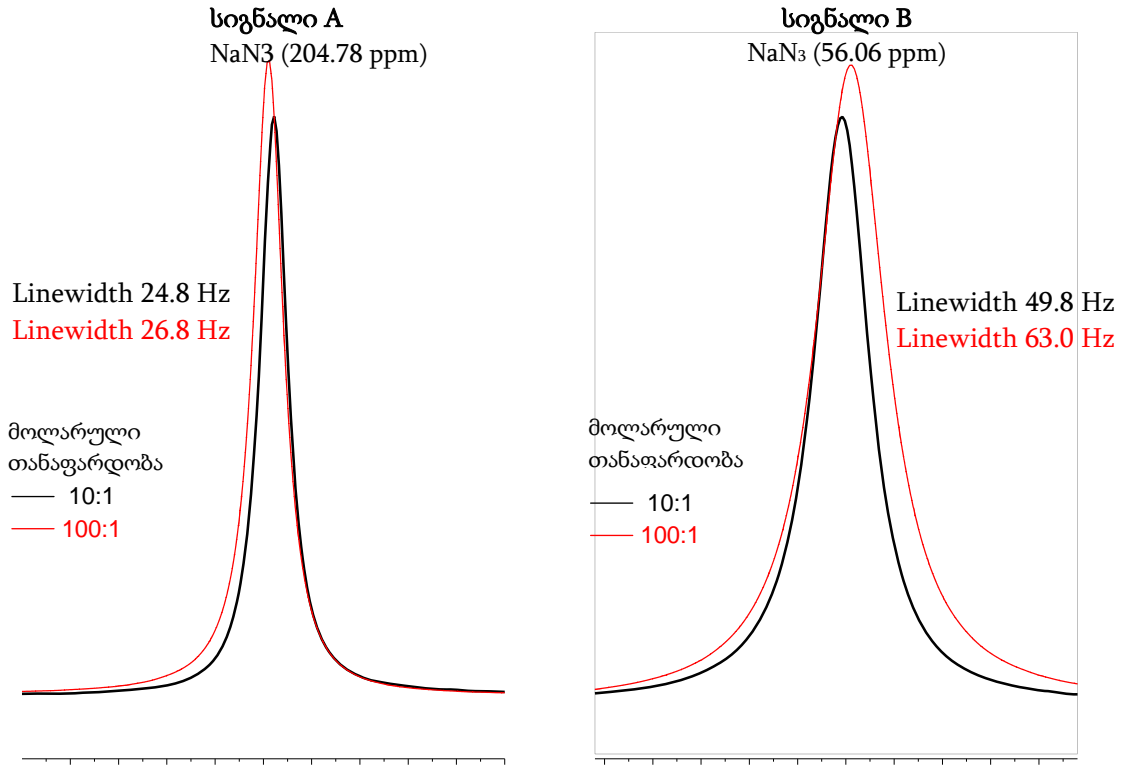
$^{14}\text{N}$  NMR სპექტრები, ფულერენის C60 ტიტრაცია ნატრიუმის აზიდის ხსნარში. ოთხი სპექტრის შეფარდება დაბალი მოლარული თანაფარდობები  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  ( $\leq 10:1$ )



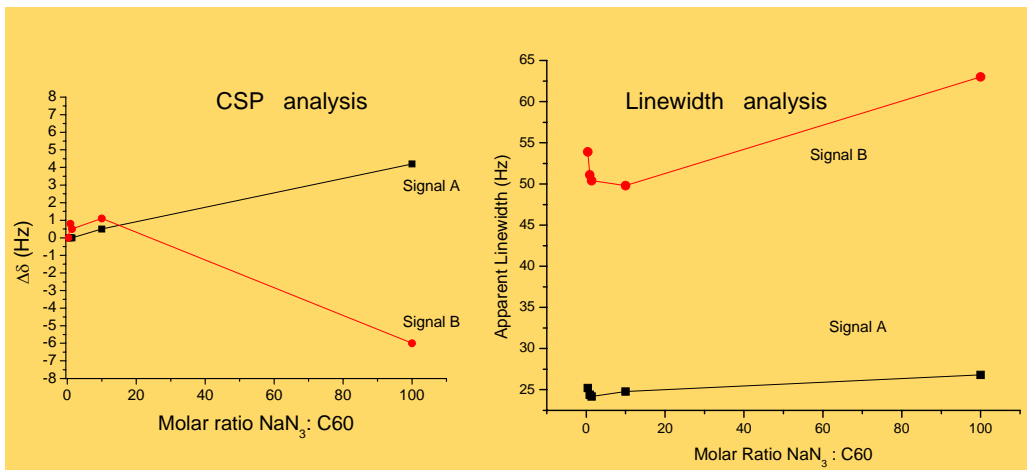
ცვლილებას დავაკვირდით  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  შესასწავლ ნიმუშში, რომლის მოლარული თანაფარდობა იყო 100:1, რაც გამოიხატა აზოტის პიკის გადახრით და, შესაბამისად, სპექტრის გაფართოებით სხვა ნიმუშებთან შედარებით, რომლებიც შევისწავლეთ ტიტრაციის წინა სერიაში.

აღნიშნული ცვლილებები მივიჩნიეთ ურთიერთკავშირის არსებობის მაჩვენებელად  $\text{NaN}_3$  და C60-ს შორის.

**სურ. 19.** ორი სპექტრის შეფარდება. NaN<sub>3</sub>:C60 (> 10 :1) მაღალი მოლარული თანაფარდობისას 100:1 ფიქსირდა <sup>14</sup>N-ის ქიმიური ცდომის და განივკვეთის გარკვეული ცვლილებები NaN<sub>3</sub> ორივე პიკისთვის.



**სურ. 20.** ქიმიური ცდომის პერტურბაცია (CSP) და განივკვეთის (Linewidth) ანალიზი <sup>14</sup>N-ის პიკებისთვის NaN<sub>3</sub>:C60-ის სხვადასხვა მოლარული თანაფარდობების დროს.



იმისთვის, რომ დაგვედასტურებინა რომ  $^{14}\text{N}$  სპექტრზე ქიმიური ცდომის გაფართოება გამოწვეულია ურთიერთქმედების არსებობით  $\text{NaN}_3$  და  $\text{C60}$ -ს შორის, დავგეგმეთ საკონტროლო ექსპერიმენტი, რომლის დროსაც შევისწავლეთ ცალკე მაღალი (10 M) კონცენტრაციის  $\text{NaN}_3$  ხსნარი  $\text{C60}$ -ის გარეშე.

სავარაუდოდ, მოსალოდნელი იყო ორი გამოსავალი: თუ  $^{14}\text{N}$ -ის პიკის ცდომა არ დაფიქსირდებოდა, მაშინ ეს მიგვანიშნებდა, რომ ექსპერიმენტის დროს მიღებული სპექტრის გაფართოების მიზეზი არის  $\text{C60}$ -თან ურთიერთქმედების არსებობა, ხოლო, თუ აღწერილი ცდომა კვლავ დაფიქსირდებოდა  $\text{NaN}_3$  (10 M) ხსნარში, მაშინ ეს სავარაუდოდ გამოწვეული იქნებოდა აზიდის მაღალი კონცენტრაციით და არა  $\text{C60}$ -თან ურთიერთქმედებით.

საკონტროლო ნიმუშის, 10M კონცენტრაციის სუფთა  $\text{NaN}_3$ -ის ანალიზით მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ქიმიური ცდომის ცვლილებები და სპექტრის გაფართოება განპირობებულია ურთიერთქმედების არსებობით  $\text{NaN}_3:\text{C60}$ -ის 100:1-ზე მოლარული თანაფარდობისას.

ეს შედეგები შეიძლება ინტერპრეტირდეს, როგორც ურთიერთქმედების არსებობა  $\text{NaN}_3$  და  $\text{C60}$ -ის მოლეკულებს შორის. როგორც სპექტრზე ჩანს,  $\text{NaN}_3$ -ის ორი პიკიდან, ერთ-ერთი, რომელიც 56 ppm-ზეა (ანუ 2 განაპირა აზოტის ატომის შესაბამისი) უფრო მეტად განიცდის ზემოქმედებას.

$\text{C60}$  და  $\text{NaN}_3$ -ს შორის ურთიერთქმედების მექანიზმი დინამიურია. ამ ბმის ხასიათი არც კოვალენტურია და არც ქიმიური.

დინამიურობა ნიშნავს, რომ ისინი ერთმანეთის მიმართ გადადიან შეკავშირებულიდან თავისუფალ მდგომარეობაზე, რაც ფიქსირდება დროის სხვადასხვა მონაკვეთში. ეს წონასწორობა ასე შეიძლება წარმოვიდგინოთ მარტივი სქემით:

|            |        |                           |
|------------|--------|---------------------------|
| N3 + C60   | <====> | N3:C60                    |
| თავისუფალი | და     | შეკავშირებული მდგომარეობა |

ისარი მიმანიშნებელია, რომ თანაფარდობა იცვლება ორივე მიმართულებით დროის მონაკვეთში. ჩვენს ექსპერიმენტში დროის მომენტი განისაზღვრება <100 მიკროწამით ორივე მიმართულებით მოძრაობისთვის. დროის ეპიზოდში, როცა ორი მოლეკულა შეკავშირებულია, მათი ატომები დაახლოვებულია ერთმანეთთან და შედეგად, მათი ელექტრონული ღრუბელი იწვევს უმნიშვნელო გარე მაგნიტური ველის ეკრანირება/დეეკრანირებას, რაც აისახება ორი მოლეკულიდან ერთ-ერთის ან ორივეს ბირთვზე. ასე, რომ აზიდის მოლეკულის აზოტის სამი ატომის <sup>14</sup>N ბმრ სპექტრების პიკები ოდნავ განსხვავებულ მაგნიტურ ველში რეზონირებენ C60-ის არსებობისას იმასთან შედარებით, როცა NaN3 არ განიცდის C60-ის ზემოქმედებას, რაც შესაბამისად, აისახება ქიმიური ცდომის სპექტრის განსხვავებაზე.

ჩვენ ჩავატარეთ ტიტრაცია C60-ის ჰიდრატირებული ხსნარით და დავაკვირდით <sup>14</sup>N-ის ქიმიური ცდომის ცვლილებას. ის ფაქტი, რომ ცვლილებები დაფიქსირდა C60-ის დამატების შედეგად, იმის დამადასტურებელია, რომ ეს ორი მოლეკულა ურთიერთქმედებს და უკავშირდება ერთმანეთს დინამიური ბმის შედეგად.

C60-ის ზემოქმედება აზიდის მოლეკულის ქიმიურ ცდომაზე არ ხასიათდება კონცენტრაციასთან წრფივი დამოკიდებულებით. ამ ორ მოლეკულას შორის ურთიერთქმედება კვადრატულპროპორციულ კავშირია მათ კონცენტრაციასთან, რაც მიღებული შედეგების ახსნის შესაძლებლობას იძლევა.

მთელი რიგი კვლევებისა მიემდგვნა ტოქსიკური ანიონებისგან წყლის გასუფთავების მეთოდების შემუშავებას, ისევე, როგორც, გამდინარე წყლის ფილტრაციისთვის რევერსიული ოსმოსური ფილტრების და ნანოფილტრების

გაუმჯობესებას და წარმატებით გამოყენებას. (Velizarov et al, 2004 [131]). ნანოფილტრების მემბრანის ზედაპირის მოდიფიკაციის სხვადასხვა მეთოდები აღწერილია მიმოხილვაში Liu და თანაავტორების მიერ (2011). Chae და თანაავტ. მიერ (2009) [132] შემუშავდა კერამიკული ნანოფილტრების დაფარვის მეთოდი ჰიდრატირებული ფულერენის ხსნარში ღრმა იმერსიით. გარდა კერამიკული ნანოფილტრების ზედაპირული დაფარვისა, ასევე, გამოიყენება ფულერენის შემცველი ნახშირბადის ფილტრებიც.

ჩვენს კვლევაში პირველად შევისწავლეთ ნატრიუმის აზიდსა და ფულერენს შორის ურთიერთქმედება, რომელიც არ არის დამყარებული ქიმიურ რეაქციაზე ამ ორ ნივთიერებას შორის.  $^{14}\text{N}$  ბმრ სპექტროსკოპიით მიღებული შედეგების საფუძველზე შესაძლებელი გახდა შესასწავლი ნატრიუმის აზიდის მოლეკულის სამი არაექვივალენტური აზოტის მოლეკულის რეზონანსული სიგნალის დეტექცია. აზიდები წარმოადგენენ დიპოლს და ავლენენ ამბიფილურობას, რაც ნიშნავს, რომ მათ შეუძლიათ, როგორც ელექტოფილებთან, ასევე, ნუკლეოფილებთან ურთიერთქმედება ერთდროულად [133].

ფულერენის (C60) მოლეკულა შეიცავს 30 ორმაგ ბმებს 6- და 5- წევრიან რგოლებში. ორ ნახშირბადის ატომს შორის მანძილი ხშირად ისაზღვრება და გათვალისწინებულია იმისთვის, რომ წინასწარ გაითვალოს ფულერენის მოლეკულის რეგიოსელექციურობა. [6,6] ბმა უმოკლესია, რაც მაღალი ელექტრონული სიმკვრივის შედეგია, შესაბამისად, [5,6] ბმა, როგორც წესი, უფრო გრძელია. ნაკლები მანძილი C-C შორის გაზრდილი რეაქტიულობის განმაპირობებელი ფაქტორია, რაც ხელს უწყობს დიპოლთან მათ ურთიერთქმედებას [134]. ფულერენის [6,6] ბმების რეაქციები ნუკლეოფილურია, რაც განაპირობებს და შესაძლებელს ხდის არაქიმიური კავშირის დამყარებას C60-სა და  $\text{NaN}_3$ -ს შორის.

## შედეგების განხილვა

ნატრიუმის აზიდი ინდუსტრიულ წარმოებაში დიდი რაოდენობით გამოიყენება, როგორც წამლების, ასევე, სხვადასხვა ქიმიური ნაერთების სინთეზირებისთვის.

განსაკუთრებულ ყურადღებას მოითხოვს ჯანმრთელობის და გარემოს დაცვის რისკების შეფასება და ამასთან დაკავშირებული უსაფრთხოების საკითხები. კერძოდ, გარემოში აქტიური ფარმაცევტული ინგრედიენტების მოხვედრა ინდუსტრიული ნარჩენების სახით, ასევე, საწარმოო პროფესიული უსაფრთხოება. საწარმოო ნარჩენების გარდა, ჩამდინარე წყლებში შესაძლებელია ნატრიუმის აზიდის მოხვედრა სოფლის მეურნეობაში მისი გამოყენების შედეგად, როგორც ეფექტური პესტიციდის, ჰერბიციდის და ინსექტიციდის სახით.

წამლების და აქტიური ფარმაცევტული ინგრედიენტების ანალიზისთვის მნიშვნელოვანია ახალი მეთოდების დანერგვა, ვინაიდან, მათი უსაფრთხოება და ტოქსიკურობა არ არის ბოლომდე შესწავლილი.

მიუხედავად იმისა, რომ რაოდენობრივი და თვისობრივი ბმრ-სპექტროსკოპიის გამოყენებას დიდი ხნის ისტორია აქვს, ბევრ ქვეყანაში არ არსებობს რეგულაციები ბმრ-სპექტროსკოპიის რეფერენს სტანდარტად გამოყენების შესახებ ფარმაციაში (Holzgrabe, 2005, 2010).

ამიტომ, ჩვენი კვლევის მიზანია ვაჩვენოთ ბმრ-სპექტროსკოპიის, როგორც მაღალი სიზუსტის და სანდოობის ქიმიურ-ანალიზური მეთოდის უპირატესობები, რომელიც შეიძლება გამოყენებული იქნას, როგორც ფარმაკოლოგიაში, ასევე საკვების და წყლის უსაფრთხოებაში.

ნატრიუმის აზიდის რაოდენობრივი და თვისობრივი მახასიათებლების შესწავლას დიდი ხნის ისტორია აქვს, რაზეც მეტყველებს არსებული

სამეცნიერო პულიკაციები, რომლებსაც მნიშვნელობა დღესაც არ დაუკარგავთ, მიუხედავად ამისა, ახალი მეთოდების ძიება კვლავაც აქტუალურია. ნატრიუმის აზიდის მცირე მოლეკულური მასა და მაღალი რეაქტიულობის უნარი ქმნის პრობლემებს ანალიზური მეთოდების სიზუსტისთვის. თითქმის ყველა მეთოდი მოკლებულია სპეციფიურობას და მგრძობელობას, შესაბამისად, დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ახალი მეთოდების მოძიებას და დამკვიდრებას, რომელიც იქნება უფრო სარწმუნო და ზუსტი.

აღწერილი მეთოდებიდან ზოგი უკვე ისტორიული მნიშვნელობისაა და სამეცნიერო ღირებულებას აღარ წარმოადგენს, როგორებიცაა, ოქსიდიმეტრია (Feigl & Chargrav, 1928) [135], არგენტომეტრია (Moeller, 1946), [136] გაზომეტრია (Copeman, 1927) [137].

ამავე დროს, ანალიზურ ქიმიასში და ტოქსიკოლოგიაში ნატრიუმის აზიდის თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის გამოიყენება მრავალი თანამედროვე მეთოდი, მათ შორის, კოლორიმეტრიული [138], სპექტროფოტომეტრიული [139, 140, 141, 142, 143] პოტენციომეტრია [144, 145], ინფრაწითელი სპექტროსკოპია [146, 147, 148, 149, 150] ასევე, ფლუოროსცენტული მეთოდი [151, 152].

მეთოდებს შორის, რომელიც ბოლო წლებში გამოიყენება, ყველაზე გავრცელებულია გაზის ქრომატოგრაფია-მასის სპექტრომეტრია (GC-MS) აღჭურვილი აზოტ-ფოსფორის დეტექტორით [153, 154, 155, 156, 157, 158, 159], მაღალი წარმადობის სითხური ქრომატოგრაფია-მასის სპექტრომეტრია (HPLC-MS) [160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167], იონური ქრომატოგრაფია [168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175], კაპილარული ელექტროფორეზი [176, 177].

მიუხედავად მეთოდების სიმრავლისა, ჯერ კიდევ გადაუჭრელ პრობლემად რჩება ნატრიუმის აზიდის მინიმალური რაოდენობის ზუსტი დადგენა და თვისობრივი ანალიზი.

ერთ-ერთ მიმართულებად ითვლება ნატრიუმის აზიდის რეაქციაზე დაფუძნებული დერივატიზაციის მეთოდი. [178] შემუშავებულია მოსახერხებელი, სწრაფი, იოლი და ამავე დროს ზუსტი თანამედროვე მეთოდები ნატრიუმის აზიდის რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის, როგორცაა, აზიდ-ალკინის ციკლირების რეაქცია. ამ მეთოდით შესაძლებელია 21 ppb ნატრიუმის აზიდის დეტექცია სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით. ამ მეთოდით განსაზღვრული აზიდის კონცენტრაცია ამჟამად მიჩნეულია ქვედა ზღვრად ყველა არსებულს შორის. [179, 180]

ჩვენს მიერ შემუშავდა აზიდ-ალკინის ციკლირების მოდიფიცირებული მოდელი და შევისწავლეთ პროტონული ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიული მეთოდით ნივთიერების სინთეზის ყველა ეტაპზე. მეთოდი შეიძლება გამოყენებულ იქნას ნარჩენი ნატრიუმის აზიდის შესამოწმებლად წამლის სუბსტანციაში და სინთეზირების შუალედურ ეტაპზე, ვინაიდან, წარმოებული რეაქციის შედეგად შეიძლება წამალში იყოს დარჩენილი იმ საწყისი ნივთიერებების ნაშთი, რომლიდანაც ის სინთეზირდა, ამიტომ, ბმრ-სპექტროსკოპიით შეიძლება მოხდეს მონიტორინგი. კერძოდ, როგორც ნარჩენი ნატრიუმის აზიდის ( $\text{NaN}_3$ ), ასევე, მაგალითად, არასრულად სინთეზირებული ტრიაზოლის მოლეკულის. ამის შედეგად, შეიძლება სინთეზირების პირობების ოპტიმიზაცია, მაგალითად, ტემპერატურის, წნევის, გამხსნელის, კატალიზატორის და ა.შ.

ამ მეთოდის უპირატესობა იმაში მდგომარეობს, რომ ნაერთში არსებული ყველა ნივთიერება პირდაპირ ისაზღვრება და არ ხდება სპექტრების გადაფარვა, ამგვარად, გამორიცხავს ცრუ დადებითი პასუხის ალბათობას. ერთადერთი შეზღუდვაა ფასი და შედარებით ნაკლები მგრძნობელობა.



გარდა ამისა, შესაძლებელია ნატრიუმის აზიდის პირდაპირი გზით განსაზღვრა, რაც ხშირად მოკლებულია სიზუსტეს და გაძნელებულია, როგორც თვისობრივი, ასევე, რაოდენობრივი დეტექცია.

ჩვენ პირველებმა შევიმუშავეთ ინოვაციური მეთოდი ნატრიუმის აზიდის შესასწავლად  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიით და კალიბრაციის მეთოდი რაოდენობრივი დეტექციისთვის, რომელიც ადრე არასდროს გამოუყენებიათ.

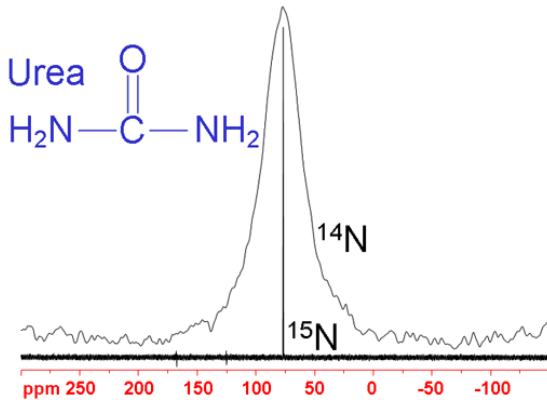
აზოტის ორი იზოტოპიდან  $^{14}\text{N}$  ბევრად მეტია, ვიდრე  $^{15}\text{N}$ . ბუნებრივი გავრცელება  $^{14}\text{N}$  არის 99.63% და  $^{15}\text{N}$ -სთვის 0.37%. ამიტომ, ზოგიერთი მოლეკულისთვის  $^{14}\text{N}$ -ის მაღალი ბუნებრივი გავრცელება დადებითად კორელირებს საგრძნობლად მაღალ მგრძნობელობასთან ვიდრე  $^{15}\text{N}$  ბმრ-ის შემთხვევაში.

თუმცა, ასეთი უპირატესობა ყოველთვის არ ამართლებს  $^{14}\text{N}$ -თვის, ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ხელისშემშლელი ფაქტორია  $^{14}\text{N}$ -ის კვადრუპოლური ბირთვის არსებობა (სპინი  $I=1$ ), მაშინ როდესაც  $^{15}\text{N}$ -ს აქვს სპინი  $I=1/2$ .

$^{14}\text{N}$  კვადრუპოლური ბირთვისთვის ბმრ-ის მგრძნობელობაზე გავლენას ახდენს ბირთვისთვის დამახასიათებელი რელაქსაციის სიჩქარე ( $R_2$ ), რაც აფერხებს პიკის გამოჩენას, რომელიც ზოგადად გენერირდება ბმრ სპექტრზე, რადგან პიკის სიმაღლე და სიგანე დამოკიდებულია  $R_2$ -ზე.

ბმრ-ს თეორიის თანახმად, მოსალოდნელია, რომ, როცა  $^{14}\text{N}$  ბირთვი ასიმეტრიულ მოლეკულურ გარემოცვაშია, ფიქსირდება რელაქსაციის სიჩქარის ( $R_2$ ) მაღალი მაჩვენებელი, ეს იწვევს პიკის სიმაღლის შემცირებას და განივკვეთის მომატებას, რაც ძალიან აქვეითებს ბმრ-ის მგრძნობელობას. სრულიად საპირისპირო ვითარებაა  $^{14}\text{N}$  ბირთვისთვის სიმეტრიულ მოლეკულურ გარემოცვაში.

$^{15}\text{N}$ -ს ახასიათებს მახვილი პიკი სპექტრზე, მაგრამ ძალიან დაბალი მგრძობელობა აქვს.  $^{14}\text{N}$  გააჩნია საშუალო მგრძობელობის ბირთვი, მაგრამ სიგნალები საგრძობლად ფართოა კვადრუპოლური ურთიერთქმედების გამო, იმდენად, რომ ფაქტიურად ვერ ხერხდება დაფიქსირება მაღალი გარჩევადობის ბმრ-სპექტროსკოპზეც.



**სურ. 21**

შარდოვანას  $^{14}\text{N}$  და  $^{15}\text{N}$  სპექტრების შედარება.  $^{14}\text{N}$  სიგნალი უკიდურესად ფართოა ვინაიდან კვადრუპოლურია.

(Bruker Almanac)

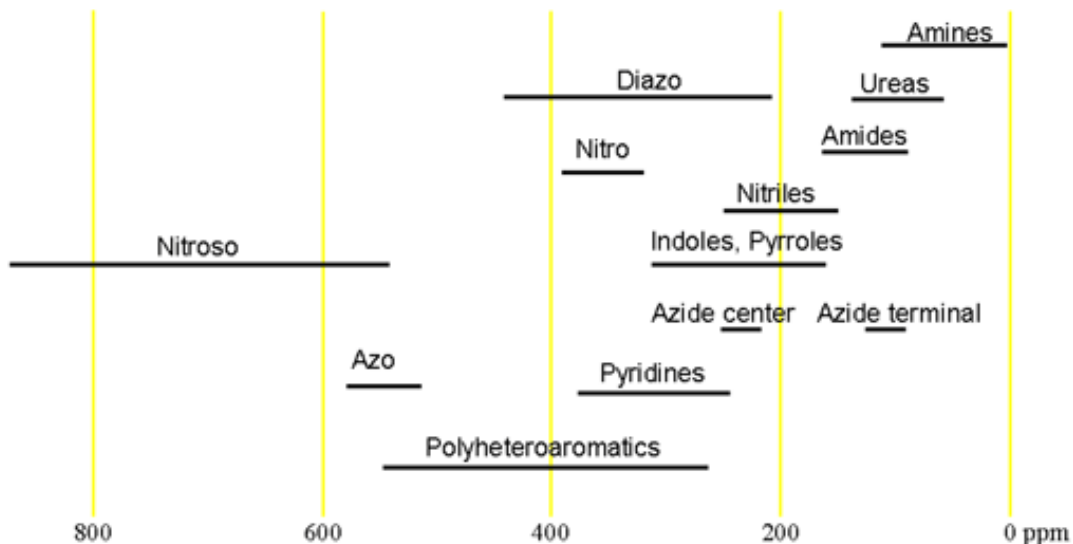
აზოტის ბმრ სპექტრის ანალიზისას ვადარებთ გამოსაკვლევ ნიმუშის ქიმიურ ცდომას (სურ. 21) არსებულ ცხრილში მოცემულ სტანდარტებს. ყველა ტიპის სიგნალს აქვს დამახასიათებელი ქიმიური ცდომა, რომელიც შესადარებლად გამოიყენება.

ქიმიური ცდომის დიაპაზონი ერთნაირია აზოტის ორივე იზოტოპისთვის. IUPAC (2001) [181] რეკომენდაციას უწევს 90% ნიტრომეთანს ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) ქლოროფორმში ( $\text{CDCl}_3$ ), როგორც ქიმიური ცდომის სტანდარტს ორივე ნუკლიდისთვის ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). თუმცა, ხშირად პრაქტიკულად გამოიყენება თხევადი ამიაკი ( $\text{NH}_3$ ) და IUPAC (1998) [182] რეკომენდაციას უწევს, როგორც ამორჩევით  $^{15}\text{N}$ -სთვის.

IUPAC -ის მიერ მოწოდებული ნიტრომეთანის ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) სტანდარტებზე გადასაყვანად  $^{15}\text{N}$ -სთვის არის 380.5 ppm და  $^{14}\text{N}$ -სთვის - 381.6 ppm.

## სურ. 22

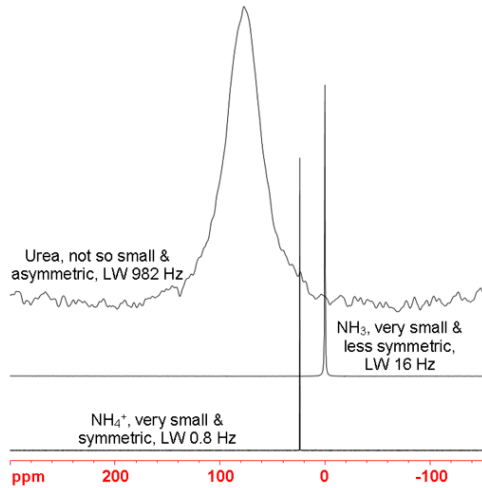
ქიმიური ცდომის სკალა სხვადასხვა მოლეკულების აზოტის ატომებისთვის ქიმიური გარემოცვის მიხედვით (*Bruker Almanac*)



ერთგანზომილებიანი 1D  $^{14}\text{N}$  -ბმრ სპექტროსკოპია ბევრად ნაკლებად მგრძნობიარეა, ვიდრე პროტონული ( $^1\text{H}$ ), თუმცა აქვს ბევრად ფართო ქიმიური ცდომის დიაპაზონი. მისი სიგნალი გაფართოვებულია კვადრუპოლური ზემოქმედების შედეგად. რაც უფრო დიდია მოლეკულა და რაც უფრო მეტად ასიმეტრიულია აზოტის ატომის გარემოცვა, მით უფრო ფართოა სიგნალი. ასე, რომ მცირე და ძალიან სიმეტრიულ ამონიუმის იონს ( $\text{NH}_4^+$ ) აქვს საკმაოდ მახვილი პიკი 1 ჰერცზე ნაკლები განივკვეთით\* (line-width). თხევადი ამიაკი ( $\text{NH}_3$ ) ნაკლებად სიმეტრიულია და განივკვეთი მეტი აქვს - 16 Hz (ოთახის ტემპერატურაზე 400 MHz სპექტრომეტრზე). შარდოვანა უფრო დიდი მოლეკულაა და ასიმეტრიული, შესაბამისად სპექტრის სიგანე დაახლოებით 1 KHz-ია. ხოლო ის მოლეკულები, რომლებიც საგრძნობლად დიდებია, ვიდრე შარდოვანა, წარმოქმნიან საკმაოდ ფართო სიგნალებს მაღალი სიხშირის

\* განივკვეთი, რეფერენს სტანდარტის სპექტრის სიგანე რეფერენს ნაერთის პიკის სიმაღლის ნახევარზე ოთახის ტემპერატურაზე (სპექტრომეტრის სიმძლავრე 400MHz)

სპექტრომეტრზე. მიუხედავად ამისა, აზოტს გააჩნია ქიმიური ცდომის დიდი დიაპაზონი და წარმატებით შეიძლება გამოყენება აზოტის შემცველი მოლეკულების თუნდაც ძალიან მცირე ზომის შემთხვევაში.



სურ. 23

$^{14}\text{N}$  სპექტრების სიგნალების განიკვეთების შედარება. რაც უფრო დიდი და ნაკლებად სიმეტრიულია მოლეკულა, სიგნალიც უფრო ფართოა.

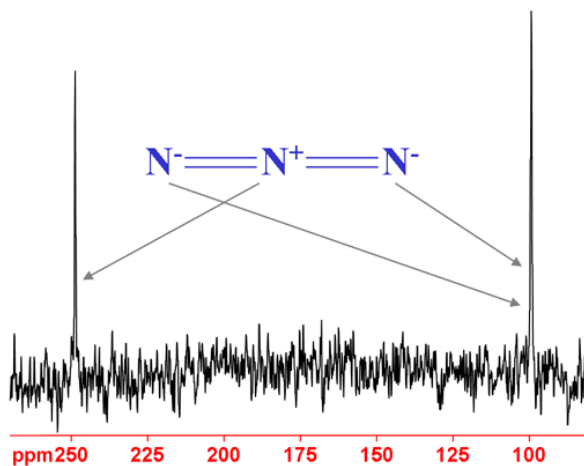
წარმოდგენილ სპექტრებზე გამოყენებულია რეფერირებისთვის თხევადი ამიაკი 25°C  $^{14}\text{N}$ - სთვის.

[<http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/row2/n.html>].

ერთგანზომილებიანი 1D  $^{15}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპია ბევრად ნაკლებად მგრძნობიარეა, ვიდრე პროტონული ( $^1\text{H}$ ) და ნახშირბადი 13 ( $^{13}\text{C}$ ).

ნატრიუმის აზიდის ანალიზისას ცენტრალურ აზოტის ატომს აქვს ტერმინალური ორ აზოტისგან განსხვავებული ქიმიური ცდომის სპექტრი.

სურ. 24.  $^{15}\text{N}$  ბმრ-სპექტრი,  $\text{NaN}_3$  კონცენტრაცია - 1M.



სპექტრის მისაღებად საჭიროა მაღალი კონცენტრაცია (1M) ან ნიმუშის გამდიდრება  $^{15}\text{N}$ -ით, რაც ძალიან ძვირი ჯდება და შეუძლებელს ხდის რუტინულ გამოყენებას.

გამოყენებულია ნებართვით:

Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem  
<http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/row2/n.html#n14properties>

ჩვენი კვლევის მეცნიერულ სიახლეს წარმოადგენს  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის გამოყენებით ნატრიუმის აზიდის დეტექცია, მინიმალური კონცენტრაციის განსაზღვრა, კალიბრაციის მრუდის ინტეგრალის უმცირესი კვადრატების წრფივი რეგრესიის შესაბამისად სხვადასხვა კონცენტრაციის ნატრიუმის აზიდის რაოდენობის დადგენის შესაძლებლობა.

იმის გათვალისწინებით, რომ ჩვენს მიერ ნატრიუმის აზიდზე ჩატარებული  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის შედეგად მივალწიეთ სიგნალის დიდ დისპერსიას და კარგ მგრძნობელობას, შეგვიძლია ეს მეთოდი ვურჩიოთ აზიდის დეტექციისთვის და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის სხვადასხვა პირობებში, როგორც წყალში, ასევე ნიადაგში, საკვებში, სასმელში, ბიოლოგიურ სითხეებში, როგორცაა, შარდი, სისხლი და სხვა. ამ შემთხვევებში შესასწავლია როგორ გავლენას მოახდენს ლიოფილიზაციის მეთოდი აზიდის დეტექციის სიზუსტეზე.

მეთოდოლოგია შემუშავებულია ჩვენს მიერ და დაფუძნებულია ერთგანზომილებიანი 1D  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტრის უმცირესი შემცველობის განსაზღვრაზე და ადრე არსებულ ანალიზურ მეთოდებთან შედარებით გააჩნია მთელი რიგი უპირატესობებისა.

მეთოდს გააჩნია გამოყენებითი მნიშვნელობა სხვადასხვა სფეროში, როგორცაა, მედიცინა, ფარმაკო-ქიმია, ტოქსიკოლოგია, რაც გზას გაუხსნის ნეიროდეგენერაციული ავადმყოფობების და სხვა სახის კვლევებს.

**ტექნოლოგიის ტრანსფერის მიზნით მიზანშეწონილად მიგვაჩნია:**

1. მაღალი მგრძობელობის და სპეციფიურობის ქიმიურ-ანალიზური მეთოდის  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის დანერგვა ნატრიუმის აზიდის დეტექციისთვის.
2. ნატრიუმის აზიდის მონიტორინგი ქიმიური დამუშავების შედეგად გამდინარე წყალში, როგორც, მუნიციპალურ წყლის გამწმენდ ნაგებობებში, ასევე, ფარმაცოლოგიური წარმოების გამდინარე წყლებში.
3. მონიტორინგისთვის ჩვენს მიერ მოწოდებული მეთოდის დამკვიდრება მესამე დამოუკიდებელი და მიუკერძოებელი მხარის მიერ წყლის ხარისხის კონტროლის ჩასატარებლად რისკის მნიშვნელობის გათვალისწინებით.



არსებობს პორტატული ბმრ სპექტრომეტრები, რომლების შეძენა და გამოყენება შესაძლებელია საავადმყოფოებსა და ლაბორატორიებში.



4. ვინაიდან არ არსებობს რაიმე სპეციფიკური მკურნალობა ნატრიუმის აზიდის მოქმედების საწინააღმდეგოდ, საუკეთესო სტრატეგიას წარმოადგენს ინტოქსიკაციის თავიდან აცილება პირველად რისკის ჯგუფის პოპულაციების იდენტიფიკაციით და პრევენციული ზომების იმპლემენტაცია. ასეთებია, ისინი, ვინც მუშაობენ ლაბორატორიებში და იყენებენ ნატრიუმის აზიდს, ან ის ადამიანები, ვინც პირველადი სამედიცინო დახმარების აღმოჩენისას არიან ინტოქსიკაციის მაღალი რისკის ქვეშ, მაგ. მედპერსონალი და მამშველები. [183, 184]

#### **სავარაუდო საბოლოო მომხმარებლები:**

- 1) მაღალი სამედიცინო ტექნოლოგიების კლინიკა თბილისში წარმოადგენს საუნივერსიტეტო სასწავლო ბაზას და გააჩნია საგანგებო სიტუაციებზე სამედიცინო რეაგირების და მართვის სასწავლო ცენტრი, სადაც სასწრაფო სამედიცინო დახმარების ექიმები გადიან სპეციალიზაციის კურსს გადაუდებელ მედიცინაში. პროგრამა მოიცავს თეორიულ და კლინიკურ სწავლებას.
  - საგანგებო სიტუაციებზე სამედიცინო რეაგირების და მართვის სასწავლო ცენტრის სასწავლო პროგრამაში შეტანილი იქნება ნატრიუმის აზიდის რისკი და საფრთხეები, ინფორმაცია მოსალოდნელი საშიშროების შესახებ ავარიული ავტომობილების დეტანატორების კარტრიჯებიდან და უსაფრთხოების ბალიშების დაზიანების შემთხვევებში.
  - შემუშავდება მეთოდური რეკომენდაციები ნატრიუმის აზიდის რისკსა და საფრთხეებზე და პრევენციის პროცედურებზე;

- ნატრიუმის აზიდით მოწამლვის დიაგნოზის დადგენა და სასწრაფო გადაუდებელი დახმარების სახეები ინტოქსიკაციის დროს; მკურნალობა და მართვა, გამოყენებული მეთოდების აღწერა:
- 2) ფარმაკო-ქიმიური საწარმოები, მუნიციპალური წყლის დამუშავების სისტემები, დიალიზის ცენტრები;
- 3) საკვების უსაფრთხოების ანალიზის და ტესტირების ლაბორატორიები.
- 4) პორტატიული NMR სპექტროსკოპების გამოყენების დანერგვა ღვინის ფერმენტაციის ინჰიბიციის შესასწავლად.



## მიღებული შედეგების შეჯამება

1) ბმრ-სპექტროსკოპიით შევისწავლეთ ნატრიუმის აზიდის შემცველობა  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპული ანალიზით და დავადგინეთ მინიმალური კონცენტრაცია, რომლის დეტექციის საშუალებასაც იძლევა აღნიშნული მეთოდი (LOD). ასევე, შევიმუშავეთ კალიბრაციის მრუდის მეთოდი, რომელმაც მოგვცა სასურველი წრფივი რეგრესიის ინტეგრალი, რის საფუძველზეც შესაძლებელი გახდა მეთოდის გამოყენების დანერგვა ნატრიუმის აზიდის უცნობი კონცენტრაციის შესასწავლად (LQD).

2) პროტონული ( $^1\text{H}$ ) ბმრ-სპექტროსკოპიით შევისწავლეთ ნატრიუმის აზიდი დერივატიზაციის არაპირდაპირი მეთოდით. მეთოდი საშუალებას იძლევა ნატრიუმის აზიდის, როგორც საწყისი ნივთიერების გამოყენებით სინთეზირებულ ნაერთში ვაკონტროლოთ რეაქციის მიმდინარეობის სისრულე, მინარევების არსებობა, შევადარეთ კომპიუტერულად გენერირებული სპექტრი რეალურ პირობებში ჩატარებული რეაქციის სპექტრებს, რაც საშუალებას იძლევა არასრული რეაქციის დროს მოხდეს პირობების ოპტიმიზაცია და სასურველი საბოლოო შედეგების მაქსიმალურად მიღწევა.

3) იმის გათვალისწინებით, თუ რა რისკს წარმოადგენს ნატრიუმის აზიდი ჯანმრთელობისთვის და გარემოსთვის, შევისწავლეთ ანტიოქსიდანტის, ჰიდრატირებული ფულერენის (C60) ზემოქმედება აზიდზე  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიით, რის შედეგადაც დავადგინეთ ამ ორ მოლეკულას შორის ურთიერთქმედების არსებობა.

## დასკვნები

- 1) პირველად ჩვენს მიერ იქნა შემუშავებული  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის ქიმიურ-ანალიზური მეთოდის გამოყენების შესაძლებლობა ნატრიუმის აზიდის თვისობრივი დეტექციისთვის და რაოდენობრივი შესწავლისთვის.
- 2)  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიით დავადგინეთ ჰიდრატირებული ფულერენის და ნატრიუმის აზიდის მოლეკულებს შორის ურთიერთქმედების არსებობა.

## რეკომენდაციები

- 1)  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპიის რეფერენს-სტანდარტად გამოყენება, როგორც ფარმაციაში, ასევე აქტიური ფარმაცევტული სუბსტანციების შემადგენლობაში აზიდების შესასწავლად.
- 2) მომავალში  $^{14}\text{N}$  ბმრ-სპექტროსკოპია შეიძლება დაინერგოს სასამართლო სამედიცინო ექსპერტიზაში, როგორც ზუსტი და სარწმუნო მეთოდი ნატრიუმის აზიდით მწვავე მოწამლვის შემთხვევაში, რომლის გამოიყენება შეიძლება ბიოლოგიური სითხეების ანალიზისთვის.
- 3) სასურველია, დაინერგოს საკვები პროდუქტების და სასმელის უსაფრთხოებაში, ვინაიდან ნატრიუმის აზიდს უმატებენ ბაქტერიული ზრდის ინჰიბიციისთვის ღვინოში; 2014 წელს ღვინის საერთაშორისო ორგანიზაციის (OIV) მიერ გამოცემულ კომპენდიუმში რეკომენდებულია ნატრიუმის აზიდის განსაზღვრა. მომავალში შესაძლებელია, ნაშრომში აღწერილი მეთოდის პრეზენტაცია და რეკომენდება ამავე მიზნით.

- 4) მეთოდი უნდა იქნას გამოყენებული წყალის უსაფრთხოებაში, ვინაიდან ნატრიუმის აზიდი გამოიყენება მუნიციპალური წყლის დამუშავების პროცესში დეზინფექციისთვის, ასევე, სოფლის მეურნეობაში პესტიციდის, ჰერბიციდის და ინსექტიციდის სახით და ამ გზით შეიძლება მოხვდეს გამდინარე წყალში. სასურველია ფარმაცევტული წარმოების მიერ გარემოში ჩაღვრილი წყალის მონიტორინგი.
- 5) სამოქალაქო უსაფრთხოების სფეროში უნდა მოხდეს მაშველების ინფორმირება ნატრიუმის აზიდის შესაძლო რისკებზე და უსაფრთხოების ზომების სწავლება, პროფესიულ სახელმძღვანელოში რეკომენდაციების შეტანა და დანერგვა.
- 6) საქართველოს ქიმიური პროფილის გზამკვლევის მომდევნო გამოცემაში ნატრიუმის აზიდი შეტანილი უნდა იქნას ჩვენს ქვეყანაში არსებულ სახიფათო ქიმიური ნივთიერებების ჩამონათვალში.
- 7) საავადმყოფოებში პერიოდულად შემოწმდეს დიალიზატში ნატრიუმის აზიდის შემცველობა, მართალია, გამოიყენება კოლორიმეტრიული ექსპრეს-ტესტი, პერიოდულად მოწმდება მულიციპალური წყლის ხარისხი, ვინაიდან თირკმლის ჩანაცვლებით თერაპიაზე მყოფი პაციენტები საჭიროებენ კვირაში 400-600 ლიტრ წყალს. ასე, რომ მუნიციპალური წყლის ხარისხიანობას უნდა მიექცეს დიდი ყურადღება. ახალი ანალიზური მეთოდის დანერგვა, როგორცაა, ბმრ-სპექტროსკოპია, გააუმჯობესებს პაციენტების ცხოვრების ხარისხს.
- 8) ანტიოქსიდანტების, ჰიდრატირებული ფულერენის (C60), როგორც პროფილაქტიკური საშუალების რეკომენდაცია საწარმოში მომუშავეებისთვის პროფესიული დაავადებების პრევენციის მიზნით ნატრიუმის აზიდით ქრონიკული ინტოქსიკაციის დროს. ჩვენი კვლევის ექსპერიმენტულ მოდელში დადგინდა, რომ ფულერენს გააჩნია

ნეიროპროტექციული თვისებები და, ვინაიდან, უკვე დამტკიცებულია საკვების დანამატად (IPACOM, უკრაინის ჯანდაცვის სამინისტორს დასკვნა #05.03.02-04/95179, 2010), რაც საშუალებას იძლევა რეკომენდაცია გავუწიოთ საწარმოო პრაქტიკაში ნატრიუმის აზიდის ქრინიკული ინტოქსიკაციის თავიდან ასაცილებლად მომუშავე პერსონალისთვის, როგორც ნეიროპროტექციულ საშუალებას.

- 9) მომავალში სასურველია აზიდით ქრონიკული ინტოქსიკაციის ექსპერიმენტულ მოდელში ჩატარდეს ცერებრალური მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის ინ ვივო ბირთვული მაგნიტურ-რეზონანსული კვლევა.

## გამოყენებული ლიტერატურა:

---

- 1 J. Collman. Naturally Dangerous: Surprising Facts about Food, Health and the Environment. University Science Books, 2001, 135-140.
- 2 S. Chang, S. Lamm. Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. *Int J Toxicol*, 2003, 22(3), 175-186.
- 3 V. Gerencser, R. Weaver. A New Technique for the Use of Sodium Azide (Hydrazoic Acid) as an Inhibitive Agent. *Appl Microbiol*. 1959, 7(2), 113–115.
- 4 H. Lichstein, M. Soule. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. The Action of Sodium Azide on Microbic Growth. *J Bacteriol*, 1944, 47(3), 221-230.
- 5 M. Black, B. Zweifach, F. Speer. Comparison of Hypotensive Action of Sodium azide in Normotensive and Hypertensive Patients. *Exp Biol Med*. 1954, 85, 11.
- 6 M. Bennett, G. Mlady, Y. Kwon, M. Gregory. Chronic In Vivo Sodium Azide Infusion Induces Selective and Stable Inhibition of Cytochrome c Oxidase. *J. Neurochem*, 2002, 66(6), 2606-2611,
- 7 J. Berndt, N. Callaway, F. Gonzalez-Lima. Effects of Chronic Sodium Azide on Brain and Muscle Cytochrome Oxidase Activity: A Potential Model to Investigate Environmental Contributions to Neurodegenerative Diseases. *J Toxicol Environ Health*. 2001, 63(1), 67-77.
- 8 A. Kleinhofs, W. Owais, R. Nilan. Azide. *J. Mutation Res*. 1978, 55, 165-195.
- 9 C. Winter, M. Kerros, M. Weinbauer. Effects of Sodium Azide on the Abundance of Prokaryotes and Viruses in Marine Samples. *PLoS ONE*. 2012, 7(5):e37597. doi:10.1371/journal.pone.0037597
- 10 K. Megyeri, M. Albert, H. Kompagne, L. G. Hársing jr., I. Gacsályi, Gy. Lévyay. A new treatment regime for sodium azide to evoke experimental Alzheimer's disease for pharmacological screening. *Proceedings of Measuring Behavior*, 2008, Maastricht, Netherlands.

- 
- 11 R. Smith, C. Louis, R. Kruszyna, H. Kruszyna. Acute neurotoxicity of sodium azide and nitric oxide. *Fundam Appl Toxicol.* 1991, 17(1), 120–127.
- 12 S. Gordon, J. Drachman, L. Bland, M. Reid, M. Favero, W. Jarvis. Epidemic hypotension in a dialysis center caused by sodium azide. *J. Kidney International.* 1990, 1(37), 110-115.
- 13 B. Łopaciński, Z. Kołacinski, R Winnicka. Sodium azide-clinical course of the poisoning and treatment. *Przegl Lek.* 2007, 64(4-5), 326-30.
- 14 W. Klein-Schwartz, R. Gorman, G. Oderda, B. Massaro, T. Kurt, J. Garriott. Three fatal sodium azide poisonings. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.* 1989, 4(3), 219-27.
- 15 M. Arduino. CDC investigations of noninfectious outbreaks of adverse events in hemodialysis facilities, 1979-1999, *SEMIN DIAL,* 2000, 13(2), 86-91
- 16 D. Trout, E. Esswein, T. Hales, K. Brown, G. Solomon, M. Miller. Exposures and health effects: an evaluation of workers at a sodium azide production plant. *Am J Ind Med.* 1996, 30(3), 343-50.
- 17 J. Cabrera, D.Wang, S. Schneider, B. Hanson, Effect of Methyl Bromide Alternatives on Plant Parasitic Nematodes and Grape Yield under Vineyard Replant Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture,* 2011, 62(1), 42-48.
- 18 a) R. Rodríguez-Kábana. An azide method and composition for controlling deleterious organisms. 2001, US Patent # PCT/US01/31669.
- b) R. Rodríguez-Kábana, and D.G. Robertson. Nematicidal and herbicidal properties of potassium azide. *Nematopica,* 2000, 30, 146.
- c) R. Rodríguez-Kábana. Pre-plant applications of sodium azide for control of nematodes and weeds in eggplant production. In: *Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions.* 2001, San Diego, 6-1.
- d) R. Rodríguez-Kábana. Efficacy of aqueous formulations of sodium azide with amineprotein stabilizers for control of nematodes and weeds in tomato production. In:

---

Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions. 2001, San Diego, 7-1.

e) R. Rodríguez-Kábana, H. Abdelhaq. Sodium azide for control of root-knot nematodes and weeds in green pepper and tomato production in the Souss valley. In: Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions. 2001, San Diego, 8-1.

19 A. Shimano, S. Maki, K. Ohyama, H. Ochiyama, Motor vehicle safety device, US Patent # 3650542.

20 H. Horst, H. Scharff. Hydrazoic Acid and Azides in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, doi:10.1002/14356007.a13\_193

21 W. Bell. Chemistry of Air Bags. J. Chem. 1990, 67 (1), 61.

22 H. Cutler, E. Spector. Air bags and automobile recycling, Chemtech, 1993, 23, 54-55.

<sup>23</sup> A. Madlung. The Chemistry Behind the Air Bag: High Tech in First-Year Chemistry. () J. Chem. Ed., 1996, 73 (4), 347-348.

24 Insurance Institute for Highway Safety. Airbag Statistics. 7 Oct. 1998. <<http://www.hwysafety.org/airbags/airbag.htm>>.

25 H. Crane. The Air Bag: An Exercise in Newton's Laws. The Physics Teacher, 1985, 23, 576-578.

26 A. Richardson, J. Bennett. Sodium azide based suppression of fires. 2007, US20080135266 .

27 a) A. Richardson, G. Goetz. System and method for sodium azide based suppression of fires, 2009, US8413732.

b) A. Richardson, G. Goetz. System and method for sodium azide based suppression of fires, 2013, US20130333902.

c) A. Richardson, G. Goetz. System and method for sodium azide based suppression of fires, 2012, US20130180739.

- 
- 28 B. Rameev, G. Mozzhukhin, B. Aktas. Magnetic Resonance Detection of Explosives and Illicit Materials. *Appl Magn Reson*. 2012, 43, 463–467.
- 29 M. Hitt. Automobile airbags hazards, in *Clinical Environmental Health and Toxic*, ed. J. Sullivan, G. Krieger. 2nd ed. Lippincott Williams, 2001, 36, 489-494.
- 30 a) E. Betterton. Environmental fate of sodium azide derived from automobile airbags. *Critical Rev. Environ. Sci. & Technol.*, 2003, 33, 423-458.
- b) E. Betterton, J. Lowry, R. Ingamells, B. Venner. Kinetics and mechanism of the reaction of sodium azide with hypochlorite in aqueous solution. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 716.
- c) E. Betterton, D. Craig. Kinetics and mechanism of the reaction of azide with ozone in aqueous solution. *J. Air & Waste Manag. Assoc.*, 1999, 49, 1347.
- 31 <http://money.cnn.com/2015/05/19/news/companies/takata-recall> (access on June, 22, 2015)
- 32 D. Francis, S. Warren, K. Warner, W. Harris, M. Copass, E. Bulger. Sodium azide-associated laryngospasm after air bag deployment. *J Emerg Med*. 2010, 39(3):e113-5. doi: 10.1016/j.jemermed.2007.10.030. Epub 2008 Apr 1.
- 33 S. McKeen (Ed.). *High Production Volume (HPV) Chemicals*. 2010, Paris, OECD (Environ. Direct.).
- 34 L. Todua (Ed). *Chemical Profile of Georgia*. 2009, UNITAR. SAICM. Tbilisi.
- 35 J. Weiss, Reactive airway dysfunction syndrome due to sodium azide inhalation. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1996, 68(6), 469-471.
- 36 <http://ipacom.com/images/Articles/c60water1.pdf> accessed Dec 11. 2014.
- 37 J. Vacha, M. Tkaczykova, M. Rejholcova. Determination of sodium azide in the presence of proteins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 1989, 488, 506–508



- 
- 38 R. Kruszyna, R. Smith, H. Kruszyna. Determining sodium azide concentration in blood by ion chromatography. *J. Forensic Sci.* 1998, 43, 200–202.
- 39 S. Swaring, R. Waldo. Liquid chromatographic determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative. *J. Liq. Chromatogr.*, 1982, 5, 597.
- 40 W. Lambert, M. Piette, C. Van Peteghem, A. De Leenheer. Application of high-performance liquid chromatography to a fatality involving azide. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19, 261–264
- 41 L. Wang, C. Dai, W. Chen, S. L. Wan, B. Wang. Facile derivatization of azide ions using click chemistry for their sensitive detection with LC-MS. *Chem. Commun.* 2011, 47, 10377-10379.
- 42 Detection of preservatives and fermentation inhibitors – sodium azide. *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts*. Paris, International Organisation of Vine and Wine (OIV). 2014, 2, 356-360.
- 43 M. Llopis, M. Marugon, R. Althaus and M. Pons. Effect of storage and preservation of milk samples on the response of microbial inhibitor tests. *J. of Dairy Research*. 2013, 80(4):475-484. doi:10.1017/S0022029913000423.
- 44 N. Pintic-Pukec, Z. Barac, A. Dakic, D. Strucic, D. Blazek. Determination of the freezing point in cow milk samples, *Mljekarstvo*, 2011, 61 (4), 336-340.
- 45 J. Moon, K. Jang, S. Jung, Y. Joo, J. Kim. Development of stabilized somatic cell standard solutions for calibration of electronic instruments analyzing bovine raw milk. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 2012, 36 (3), 114-120.
- 46 R. Seskena, L. Jankevica. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk samples. *Acta Universitatis Latviensis Biology*, 2007, 723, 171–180.
- 47 D. Barbano, K. Wojciechowski, J. Lynch. Effect of preservatives on the accuracy of mid-infrared milk component testing. *J. Dairy Sci.* 2010, 93, 6000–6011. doi: 10.3168/jds.2010-3601.

- 
- 48 L. Jackman. Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon Press Ltd., London, 1959.
- 49 <http://www.wiredchemist.com/nmr/bibliography> accessed 01/01/2014
- 50 J. Phillips, J. Leary. A Qualitative-Quantitative <sup>1</sup>H-NMR Experiment for the Instrumental Analysis Laboratory Journal of Chemical Education. 1986, 63(6), 545.
- 51 D. Wishart. Quantitative metabolomics using NMR. Trends in Analytical Chemistry. 2008, 27(3), 228-237.
- 52 S. Bharti, R. Roy. Metabolite Identification in NMR-based Metabolomics. Current Metabolomics, 2014, 2, 163-173.
- 53 S. Sykora. One-Page MR Prime. The magnetic resonance phenomenon. Stan's Library, Ed.S.Sykora, 2006, DOI: 10.3247/SL1Nmr06.004
- 54 CRC Handbook of Chemistry and Physics 65<sup>th</sup> Ed. 1984, ISBN 0-8493-0465-2
- 55 L. O'Dell. Direct detection of nitrogen-14 in solid-state NMR spectroscopy. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2011, 59 (4), 295–318.
- 56 J. Mason. Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, 5<sup>th</sup> Eds.:D. M. Grant, R. K. Harris, Wiley, Chichester, 1996, 3222 –3251.
- 57 R. Siegel, J. Trebosc, J. Amoureux, Z. Gan. 3D <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C–<sup>14</sup>N correlation solid-state NMR spectrum. J. of Magnetic Resonance, 2008, 193, 321–325.
- 58 S. Cavadini, S. Antonijevic, A. Lupulescu, G.Bodenhausen. Indirect Detection of Nitrogen-14 in Solid-State NMR Spectroscopy. ChemPhysChem 2007, 8, 1363–1374. DOI: 10.1002/cphc.200700049
- 59 B. Rameev, G. Mozzhukhin, B.Aktas. Magnetic Resonance Detection of Explosives and Illicit Materials. Applied Magnetic Resonance, 2012, 43, 463–467. DOI 10.1007/s00723-012-0423-9
- 60 A. Swafford Jr., I. Bratz, J. Knudson, P. Rogers, J. Timmerman, J. Tune, G. Dick. C-reactive protein does not relax vascular smooth muscle: effects mediated by sodium azide

---

in commercially available preparations, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 288(4), 1786–1795.

61 N. Subramanian, V. Babu, R. Jeevan, G. Radhakrishnan. Matrix Elimination Ion Chromatography Method for Trace Level Azide Determination in Irbesartan Drug. *J. of Chromatographic Science*, 2009, 47, 529-533

62 P.Wrezel, M.Lutz Jr, I. Likhovorik, J.Cao, Assay for Parts-Per-Million Levels of Azide in Drug Substances. *J. LC-GC Europe*. 2013, 26(4), 204-210.

63 T. Schroder, M. Gartner, T.Grab, S.Bräse. A new azide staining reagent based on "click chemistry" *Org. and Biomol. Chem*. 2007, 5(17), 2767-2769

64 Y. Bereznitski, R. LoBrutto, N. Grinberg. Trace analysis of sodium azide in an organic matrix, *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2001, 24(14), 2111-2120 DOI:10.1081/JLC-100104895

65 C. Yao, Z. Xuebao, L.Ban. Determination of azide in Sartan by ion chromatography. *J. Zhejiang Univ*. 2008, Sci. Ed. 35 (3), 305-307, 310

66 J. Haase. Large - scale Preparation and Usage of Azides in “Organic Azides: Syntheses and Applications”, Ed. S.Bräse and K. Banert. John Wiley & Sons, 2010, 2, 30-51.

67 J. Turczan, T. Medwick. Qualitative and Quantitative Analysis of Amygdalin Using NMR Spectroscopy. *Anal Lett*. 1977, 10:581–90

68 U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer, B.Waibel. Quantitative NMR spectroscopy-applications in drug analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2005, 38, 806.

69 S. Bharti, R.Roy. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 35, 5-26. doi:10.1016/j.trac.2012.02.007

70 F. Malz, H. Jancke. Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal*. 2005, 10, 38(5), 813-23.

- 
- 71 U. Holzgrabe, M. Malet-Martino. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification - the NMR approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2011, 55(4), 679-87. doi: 10.1016/j.jpba.2010.12.017.
- 72 U. Holzgrabe. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2010, 57(2), 229-40. doi: 10.1016/j.pnmrs.2010.05.001
- 73 European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> ed., European Department for the Quality of Medicines, Strasbourg, France, 2009. [www.pheur.eu](http://www.pheur.eu).
- 74 United States Pharmacopoeia (USP) 32, the United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, USA, 2009.
- 75 E. Kayser. Über natriumazid. *Z. Angew. Chem.* 1928, 41-49.
- 76 J. Gaulier, L. Pouche, F. Lamballais, E. Saussereau, A. Tracqui et al. Intoxications par l'azide de sodium : à propos de 2 cas Sodium azide intoxications: About two cases, *Annales de Toxicologie Analytique*, 2012, 24(1), 17.
- 77 I. Le Blanc-Louvry, P. Laburthe-Tolra, V. Massol, F. Papin, J. Goullé, G. Lachatre, J. Gaulier, B. Proust. Suicidal sodium azide intoxication: An analytical challenge based on rare case. *Forensic Sci Int.* 2012, 10, 221(1-3):e17-20. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.04.006.
- 78 M. Wiergowski, K. Galer-Tatarowicz, M. Krzyzanowski, Z. Jankowski, J. Sein Anand. Suicidal intoxication with sodium azide - a case report. *Przegl Lek.* 2012, 69(8), 568-571.
- 79 A. Demircan, M. Ozsarac, M. Karamercan, N. Dogan. Following Accidental Low Dose Sodium Azide Ingestion - Case Report, *JAEM.* 2011, 10, 41-42, doi:10.4170/jaem.2009.55264
- 80 Sodium azide poisoning at a restaurant – Dallas County, Texas, 2010. *CDC Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).* 2012, 61(25), 457-460.
- 81 T. Okumura, N. Ninomiya, M. Ohta. The chemical disaster response system in Japan. *Prehosp Disast Med.* 2003, 18(3), 189–192.

- 
- 82 E. Klug, V. Schneider. Suicide with Natrium Azide. *Z Rechtsmed.* 1987, 98, 129–132.
- 83 E. Emmet, J. Ricking. Fatal self-administration of sodium azide. *Ann Intern Med.* 1975, 83, 224–226
- 84 S. Richardson, C. Giles, C. Swan. Two cases of sodium azide poisoning by accidental ingestion of Isoton. *J Clin Pathol.* 1975, 28, 350–351
- 85 T. Albertson, S. Reed, A. Siefkin. A case of fatal sodium azide ingestion. *Clin Toxicol.* 1986, 24, 339–351.
- 86 R. Roberts, A. Simmons, D. Barret. Accidental exposures to sodium azide. *Am J Clin Pathol,* 1974, 61, 879–880.
- 87 J. Howard, K. Skogerboe, G. Case, V. Raisys, E. Lacsina, Death following accidental sodium azide ingestion. *J. Forensic Toxicology.* 1990, 35, 193-196.
- 88 O. Edmonds, M. Bourne. Sodium azide poisoning in five laboratory technicians. *Br J Ind Med.* 1982, 39, 308–309
- 89 FDA Drug Bulletin: Sodium Azide Contamination of Hemodialysis Water Supplies. United States Public Health Service, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, 1989, 19.
- 90 Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for sodium azide. European Commission, 2009.
- 91 ACGIH, Sodium Azide In: ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices, 2004. Cincinnati, OH, 2001.
- 92 H. Rippen, S. Lamm, P. Nicoll, L. Cummings, G. Howarth, D. Thayer. Occupational health data as a basis for process engineering changes: development of safe work environment in the sodium azide industry. *Int Arch Occup Env Health.* 1996, 68, 459-468.

- 
- 93 D. Trout, E. Esswein, T. Hales, K. Brown, G. Solomon, M. Miller. Exposures and health effects: an evaluation of workers at a sodium azide production plant. *American Journal of Industrial Medicine*, 1996, 30, 343-350.
- 94 S. Miljours, C. Braun. A neuropsychotoxicological assessment of workers in a sodium azide production plant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2003, 76, 225-232.
- 95 M. Arduino. CDC Investigations of Noninfectious Outbreaks of Adverse Events in Hemodialysis Facilities, 1979–1999. *Seminars in Dialysis*, 2000, 13, 86–91. doi: 10.1046/j.1525-139x.2000.00025.x
- 96 FDA: Sodium Azide Contamination of Hemodialysis Water Supplies. Rockville, MD: Public Health Service, March 15, 1989
- <sup>97</sup> M. Alter, M. Favero, J. Miller, L. Bland. Reuse of hemodialyzers: Results of nationwide surveillance for adverse effects. *JAMA*. 1988, 260, 2073–2076.
- 98 FDA safety alert: sodium azide contamination of hemodialysis water supplies. *ANNA J*, 1989, 16(41), 273.
- 99 S. Ahmad. Essentials of water treatment in hemodialysis, *Hemodialysis International*. 2005, 9, 127–134.
- 100 H. Brady, C. Wilcox. *Therapy in Nephrology & Hypertension*, 3rd ed. 2008 Saunders, Elsevier.
- 101 S. Gordon, J. Drachman, L.Bland, et al. Epidemic hypotension in a dialysis center caused by sodium azide. *Kidney Int*. 1990, 37, 110–115.
- 102 M. J. Arduino. CDC Investigations of Noninfectious Outbreaks of Adverse Events in Hemodialysis Facilities, 1979–1999. *Seminars in Dialysis*, 2000, 13, 86–91. doi: 10.1046/j.1525-139x.2000.00025.x
- 103 M. Arvanitidou, S. Spaia, P. Tsoubaris, C. Katsinas, N.Askepidis, P. Pagidis, D.Kanetidis, M. Pazarloglou, G.Bersos, P.Digenis, V. Katsouyannopoulos, G.Vayonas.

---

Chemical Quality of Hemodialysis Water in Greece: A Multicenter Study. *Dialysis & transplantation*, 1999, 29(9), 519-525.

104 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger. NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts. IUPAC Recommendations 2001. *Solid State Nucl Magn Reson*, 2002, 22(4), 458-483.

105 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger. NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts. IUPAC recommendations 2001. *Pure and Applied Chemistry*, 2001, 73(11), 1795-1818.

106 P. Bertani, J. Raya, B. Bechinger. <sup>15</sup>N chemical shift referencing in solid state NMR. *Solid State Nucl Magn Reson*. 2014, 61-62:15-8. doi: 10.1016/j.ssnmr.2014.03.003.

107 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, R. Hoffman, K. Zilm. Further conventions for NMR shielding and chemical shifts IUPAC recommendations 2008. *Solid State Nucl Magn Reson*, 2008, 33(3), 41-56.

108 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, R. Hoffman, K. Zilm. Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC Recommendations 2008). *Magn Reson Chem*, 2008, 46(6), 582-98.

109 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, R. Hoffman, K. Zilm. Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC recommendations 2008). *Pure and Applied Chemistry*, 2008, 80(1), 59-84.

110 J. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. Hilbers, R. Kaptein, B. Sykes, P. Wright, K. Wuthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids--IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 1998, 256(1), 1-15.

111 J. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. Hilbers, R. Kaptein, B. Sykes, P. Wright, K. Wuthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of

---

Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J Biomol NMR*, 1998, 12(1), 1-23.

112 J. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. Hilbers, R. Kaptein, B. Sykes, P. Wright, K. Wuthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J Mol Biol*, 1998, 280(5), 933-52.

113 I. Burton, M. Quilliam, J. Walter. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal. Chem.* 2005, 77(10), 3123-3131.

114 G. Wider, L. Dreier, J. Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *J. American Chemical Society*. 2006, 128, 8, 2571-2576. DOI: 10.1021/ja055336t

115 U. Holzgrabe, G. Hagele. pH-dependent NMR measurements, in: U. Holzgrabe, B. Diehl, I. Wawer (Eds.), *NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, 61–76.

116 T. Tynkkynen, M. Tiainen, P. Soininen, R. Laatikainen. From proton nuclear magnetic resonance spectra to pH. Assessment of  $^1\text{H}$  NMR pH indicator compound set for deuterium oxide solutions. *Anal. Chim. Acta.* 2009, 648(1), 105-12. doi: 10.1016/j.aca.2009.06.047.

117 Z. Szakács, G. Hagele. Accurate determination of low pK values by  $^1\text{H}$  NMR titration. *Talanta.* 2004, 62, 819–825.

118 Z. Szakács, M. Kraszni, B. Noszál. Determination of Microscopic Acid-Base Parameters from NMR-pH Titrations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2004, 378(6), 1428-1448.

119 T. Kishimoto, K. Viswanathan, T. Ganguly, S. Elankumaran, S. Smith. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358(23), 2457–2467.



- 
- 120 S. Michaleas, E. Antoniadou-Vyza. A new approach to quantitative NMR: Fluoroquinolones analysis by evaluating the chemical shift displacements *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 42(4), 405–410. DOI 10.1016/j.jpba.2006.04.016
- 121 F. Krebs, Determination of the Biological Harmful Effects of Substances Endangering Water Quality with the Assimilation-Depletion Test (A-D Test). *Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen.* 1991, 35, 5/6, 161-70
- 122 CRC Handbook of physicochemical data 2008/09
- 123 M. O'Neill, (Ed.) Sodium azide, *The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*; 14th edition, 2006, 1478-9.
- <sup>124</sup> WSSA, The Weed Science Society of America. “Sodium azide” in the *Herbicide Handbook*, 5th ed. 1983, 438-41.
- 125 T. Beyer, B. Diehl, G. Randel, E. Humpfer, H. Schäfer, M. Spraul, C. Schollmayer, U. Holzgrabe, J. Quality assessment of unfractionated heparin using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 13–19.
- 126 H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7512–7515.
- 127 G. Zheng, W. Price. Solvent signal suppression in NMR. *Prog.Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2010, 56, 267–288.
- 128 M. Bader. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.* 1980, 57, 10, 703. DOI: 10.1021/ed057p703.
- 129 D. Skoog, F. Holler, T. Nieman. *Principles of Instrumental Analysis*, 6<sup>th</sup> edition. Saunders College Publishing, Philadelphia, PA, USA. 2006.
- 130 ASTM: Static Calibration of Electronic Transducer-Based Pressure Measurement Systems. Example of calibration curve for instrumentation. <<http://www.astm.org/Standards/D5720.htm>>
- 131 S. Velizarov, J. Crespo, M. Reis. *Reviews in Environ Sci & Bio/Technol.* 2004, 3, 361-380. DOI:10.1007/s11157-004-4627-9.

- 
- 132 S. Chae, E. Hotze, M. Wiesner. Possible applications of fullerene nanomaterials in water treatment and reuse, *Nanotechnology Applications for Clean Water*. William Andrew Publishing, New York, USA. 2009. ISBN: 9780815515784.
- 133 D. Adam. The synthesis and characterisation of halogen and nitro phenyl azide derivatives as highly energetic materials. Dissertation, LMU München, 2001.
- 134 S. Oliveras. Theoretical studies of the exohedral reactivity of fullerene compounds. Thesis. University of Girona, 2009, 78-79. <http://www.tdx.cat/TDX-0421110-125909>.
- 135 a) F. Feigl, E. Chargav. Spot tests in Inorganic Analysis. *Anal. Chem.*, 1928, 74, 369.
- b) F. Feigl, E. Chargav. Spot tests in Inorganic Analysis. 6<sup>th</sup> Edition. Elsevier, 2012.
- 136 T. Moeller. Inorganic nitrosyl compounds. I. Cationic and anionic compounds. *J. Chem. Educ.* 1946, 23, 441-444.
- 137 D. A. Copeman. Determination of azides. *J. S. Afr. Chem. Inst.* 1927, 10, 18-22.
- 138 S. Punna, M. Finn. A convenient colorimetric test for aliphatic azides, *Synlett*. 2004, 1, 99-100.
- 139 K. Tsuge, M. Kataoka, Y. Seto. Rapid determination of cyanide and azide in beverages by microdiffusion spectrophotometric method. *J. Anal. Toxicol.* 2001, 25, 228-236.
- 140 A. Anton, J. Dodd, A. Harvey. Spectrophotometric determination of azide with ferric perchlorate. *Anal. Chem.* 1960, 32, 1209–1210.
- 141 V. Christova-Bagdassarian, M. Atanasova. Spectrophotometric Determination of Sodium Azide in Workplace Air. *J. Chem Tech. Metallurgy*, 2007, 42(3), 311-314.
- 142 E. Terpinski. Spectrophotometric determination of sodium azide. *Analyst*. 1985, 110, 1403-1405.
- 143 Y. Ito, M. Toyoda, T. Kanamori, M. Iwaida. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 1976, 17, 386–391.

- 
- 144 S. Hassan, A. Kelany, S. Al-Mehrezi. Novel polymeric membrane sensors based on Mn(III) porphyrin and Co(II) phthalocyanine ionophores for batch and flow injection determination of azide *Electroanalysis*, 2008, 20, 438-443.
- 145 A. Singh, U. Singh, V. Aggarwal, S. Mehtab. Azide-selective sensor based on tripodal iron complex for direct azide determination in aqueous samples, *Anal Bioanal Chem.* 2008, 391(6), 2299-308. doi: 10.1007/s00216-008-2129-2.
- 146 R. Fraser. Sodium azide as an internal standard for quantitative infrared analysis. *Anal. Chem.* 1959, 31, 1602–1603.
- 147 J. Murtagh, D. Frimannsson, D. O’Shea. Azide Conjugatable and pH Responsive Near-Infrared Fluorescent Imaging Probes, *Organic Letters*. 2009, 11(23), 5386-5389. DOI: 10.1021/ol902140v
- 148 S. Yoshikawa, W. Caughey. Infrared Evidence of Azide Binding to Iron, Copper, and Non-metal Sites in Heart Cytochrome c Oxidase, *J. Biol. Chem.* 1992, 267(14), 9757-9766.
- 149 J. Owrutsky, M. Pomfret, D. Barton, D. Kidwel. FTIR Spectroscopy of Azide and Cyanate Ion Pairs in AOT Reverse Micelles, *J. Chem. Phys.* 2008, 129(2), 024513-10. DOI: 10.1063/1.2952522.
- 150 J. Borek, F. Perakis, F. Klasi, S. Garrett-Roe, P. Hamm. Azide–water intermolecular coupling measured by two–color two-dimensional infrared spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 2012, 136, 224503 ; <http://dx.doi.org/10.1063/1.4726407>
- 151 K. Dhara, U. C. Sahana, A. Dan, S. Sarkar, M. Manassero, P. Chattopadhyay. A new water–soluble copper(II) complex as a selective fluorescent sensor for azide ion. *Chem. Commun.* 2010, 46(10), 1754–1756.
- 152 A. Sahana, B. Banerjee, S. Guha, S. Lohar, A. Chattopadhyay, S. Mukhopadhyay, D. Das. Highly selective organic fluorescent probe for azide ion: formation of a ‘‘molecular ring’’. *Analyst*. 2012, 137, 1544-1546.

- 
- 153 M. Kikuchi, M. Sato, T. Ito, M. Honda. Application of a new analytical method using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the azide ion to human blood and urine samples of an actual case. *J. Chromatogr.* 2001, B 752: 149–157.
- 154 R. Meatherall, W. Palatnick. Convenient headspace gas chromatographic determination of azide in blood and plasma. *J Anal Toxicol.* 2009, 33(8), 525-531.
- 155 J. Zehner, R. Simonaitis. Gas chromatographic determination of hydrazoic acid. *J. Chromatogr.* 1976, Sci. 14: 493–494
- 156 E. Kubaszewski, Z. Kurzawa, M. Lozynski. Determination of microgram amounts of azide by gas chromatography, *Anal. chim. acta.* 1987, 196, 267-270 .
- 157 E. Foerster, D. Hatchet, J.Garriott. A rapid comprehensive screening procedure for basic drugs in blood or tissues by gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1978, 2, 50–55.
- 158 A. Miki, M. Nishikawa, H. Tsuchihashi. Simultaneous GCMS determination of azide, cyanide and thiocyanate via phase transfer-catalyzed pentafluorobenzoylation. *J. Health Sci.* 2000, 46, 81–88
- 159 S. Kage, K. Kudo, N. Ikeda. Determination of azide in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal.Toxicol.* 2000, 24, 429–432.
- 160 M. Nakazato, K. Saito, Y. Kikuchi, K. Fujinuma, T. Nishima. Determination of Sodium Azide in Wine by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Hygiene and safety science.* 1986, 27(5), 507-511
- 161 R. Battaglia, J. Mitiska. Specific detection and determination of azide in wine. *Z. Lebensm. Unters Forsch,* 1986, 182, 501-502.
- 162 B.Luckas, Z.Fresenius. HPLC-Methode zur Bestimmung von Azid in Wein. *Anal. Chim.* 1986, 323(4), 375–376
- 163 S. Swaring, R.Waldo. Liquid chromatographic determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative. *J. Liq. Chromatogr.* 1982, 5, 597–604.

- 
- 164 J. Vacha, M. Tkaczykova, and M. Rejholcova. Determination of sodium azide in the presence of proteins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1989, 488, 506-508
- 165 M.Gennaro, C. Abrigo, E. Marengo, A. Liberatori. A selective determination of azide by ion-interaction reversed-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 2715-2730
- 166 W. Lambert, M. Piette, C. Van Peteghem, A. de Leenheer. Application of high-performance liquid chromatography to a fatality involving azide. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19, 261-264
- 167 P. Marquet, S. Clement, H. Lotfi, M.F. Dreyfuss, J. Debord, D. Dumont, G. Lachatre. Analytical findings in a suicide involving sodium azide. *J. Anal. Toxicol.* 1996, 20, 134-138
- 168 N. Subramanain, V. Babu, R. Jeevan, G. Radhakrishnan. Matrix elimination ion chromatography method for trace azide determination in irbesartan drug. *J. Chromatogr. Sci.* 2009, 47(7), 529–533
- 169 K. Vinkovic, V. Drevenkar. Ion chromatography of azide in pharmaceutical protein samples with high chloride concentration using suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr.* 2007, B 864: 102–108
- 170 O. Masataka, K. Yoshimi, and I. Shunsuke. Determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 2004, A 1045: 247–252
- 171 H. Oshima, E. Ueno, I. Saito, H. Matsumo. Determination of sodium azide in beverages by ion chromatography. *J. AOAC INTERNATIONAL.* 2000, 83(6), 1410-14.
- 172 R. Kruszyna, R. Smith, H. Kruszyna. Determining sodium azide concentration in blood by ion chromatography. *J. Forensic Sci.* 1998, 43, 200-202
- 173 P. Annable, L. Sly. Azide determination in protein samples by ion chromatography. *J. Chromatogr.* 1991, 546, 325-334

- 
- 174 H. Mackie, S. Speciale, L. Throop, T. Yang. Ion chromatographic determination of the azide ion in a prealbumin fraction from human serum. *J. Chromatogr.* 1982, 242, 177–180.
- 175 C. Yao, Z. Xuebao, L. Ban. Determination of azide in Sartan by ion chromatography. *J. Zhejiang Univ. Sci. Ed.* 2008, 35 (3), 305-307, 310
- 176 M. Ohashi, Y. Kitada, S. Imai. Determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative by capillary electrophoresis. *J. Chromatography* 2004, 1045, 247–252.
- 177 G. Hortin, S. Dey, M. Hall, C. Robinson. Detection of azide in forensic samples by capillary electrophoresis. *J. Forensic Sci.* 1999, 44, 1310–1313
- 178 P. Wrezel, M. Lutz Jr, I. Likhovorik, J. Cao. Assay for Parts-Per-Million Levels of Azide in Drug Substances. *J. LC-GC Europe.* 2013, 26(4), 204-210.
- 179 L. Wang, C. Dai, W. Chen, S. L. Wan, B. Wang. Facile derivatization of azide ions using click chemistry for their sensitive detection with LC-MS. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 10377-10379.
- 180 T. Schroder, M. Gartner, T. Grab, S. Brase. A new azide staining reagent based on "click chemistry" *Org. and Biomol. Chem.* 2007, 5(17), 2767-2769.
- 181 R. Harris, E. Becker, S. de Menezes, R. Goodfellow, P. Grenager. NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts, *Pure Appl. Chem.* 2001, 73(11), 1795–1818
- 182 J. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. Hilbebers, R. Kaptein. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids, *Pure & Appl. Chem.* 1998, 70(1), 117-142
- 183 A. Demircan, M. Ozsarac, M. Karamercan, N. Dogan. Following Accidental Low Dose Sodium Azide Ingestion - Case Report. *JAEM.* 2011, 10, 41-2.
- 184 Y. Hirose, H. Kinoshita, T. Tanaka, K. Hata, Y. Yamazaki, T. Honda. Secondary poisoning in a healthcare worker resulting from reaction between a toxic agent and gastric acid. *J Jap Assoc Acute Med.* 2000, 11, 528.

**MOL2NET, International Conference on Multidisciplinary Sciences**

5–15 December 2015

Subscribe to Conference News

Subscribe to Conference Series News

## Sections

All Contributions

00. Editorial from the Chairman

A. Research in Inorganic, Analytical, Physical, and Organic Chemistry

B. Medicinal Chemistry, Pharmacology, Biotechnology, and Drug Discovery

C. Soft Matter Physics, Polymers, Materials, and Nanosciences

D. Clinical Medical Sciences, Biomedical Engineering, and Medical Informatics

E. Statistics, Artificial Intelligence, Data Science, Complex Networks Analysis

F. Scientific Software

## Conference Menu

Call for Papers

Organizers

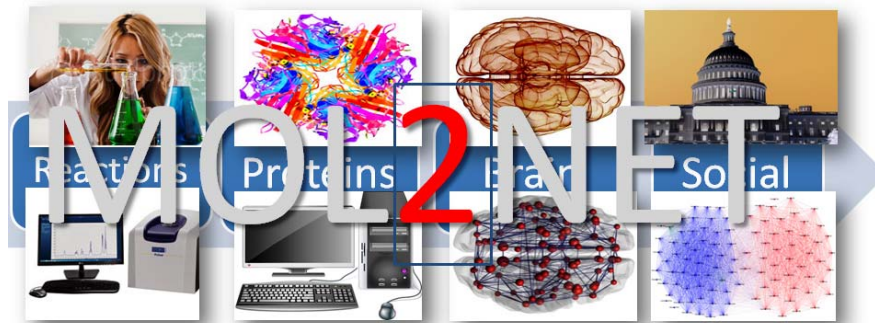
Sponsors

Full List of Presentations

Conference Discussions

Sister Conferences

Other Editions in This Series

[Home](#) » [MOL2NET-1](#)**MOL2NET, International Conference on Multidisciplinary Sciences****Welcome to the MOL2NET International Conference, 5–15 December 2015, Online**

The full title of this conference is MOL2NET, the 1st International Conference on Multidisciplinary Sciences. MOL2NET (the conference's running title) will be held from 5-15 December 2015 on the SciForum platform. This running title is inspired by the possibility of multidisciplinary collaborations in science between experimentalists and theoretical scientists; represented disciplines will encompass the molecular and biomedical sciences, social networks analysis, and beyond. More specifically, this conference aims to promote scientific synergies between groups of experimental molecular and bio-medical scientists. Relevant fields include chemistry, pharmacology, cancer research, proteomics, the neurosciences, the nanosciences, and epidemiology. Moreover, the conference welcomes computational and social sciences experts from different areas, such as computational chemistry, bioinformatics, social networks analysis, big data predictive analytics, biostatistics, *etc.*

The conference per se is the result of the synergy between the Department of Organic Chemistry, University of Basque Country (UPV/EHU), and IKERBASQUE, Basque Foundation for Sciences, with the Faculty of Informatics, University of Coruña (UDC). Accepted papers will be published in the proceedings of the conference, and selected papers will be considered for publication in the journal International Journal of Molecular Sciences (IJMS), ISSN 1422-0067, JCR Impact Factor 2014 IF = 2.86. This is an open access publication journal of MDPI in the field of Molecular and Biomedical Sciences (<http://www.mdpi.com/journal/ijms>). The link to the call for papers of this special issue is: [http://www.mdpi.com/journal/ijms/special\\_issues/QSAR\\_QSPR\\_Chemistry](http://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/QSAR_QSPR_Chemistry). In addition, promotional videos in different languages and additional materials of related topics are expected to be released in the YouTube channel of MOL2NET <http://bit.do/mol2net>, in MOL2NET's Twitter account [@mol2net](https://twitter.com/mol2net), and in the Facebook group of the conference <https://www.facebook.com/groups/chembioinfo.networks/>, which has +8000 followers at this moment. We also invite all colleagues to share the conference website through social media. Some of the main topics of interest are explained in the section details.

Sincerely yours,

*Conference Chairman***Prof. Humberto González-Díaz**Ikerbasque Senior Professor, [humberto.gonzalezdiaz@ehu.es](mailto:humberto.gonzalezdiaz@ehu.es)

(1) Department of Organic Chemistry II, University of Basque Country / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 48940, Leioa, Sarriena w/n, Bizkaia.

(2) Ikerbasque - Basque Foundation for Science, 48011, Bilbao, Bizkaia, web: <http://www.ikerbasque.net/humberto.gonzalez>

Researchgate: [http://www.researchgate.net/profile/Humbert\\_Gonzalez-Diaz](http://www.researchgate.net/profile/Humbert_Gonzalez-Diaz)

Prof. González-Díaz H. holds a position as Senior Ikerbasque Research Professor at the Department of Organic Chemistry II, University of the Basque Country UPV/EHU, Bizkaia Campus. This position is a research chair endowed by Ikerbasque, Basque Foundation for Science of the Basque Government / Eusko Jaurlaritz. Prof. González-Díaz H. obtained a PhD in Organic Chemistry in 2005 from the University of Santiago de Compostela (USC), and was supervised by Profs. E. Uriarte and L. Santana. He also received a Lic. degree in Pharmaceutical Sciences from the Central University of Las Villas (UCLV), where he was supervised by Prof. E. Estrada. Prof. González-Díaz H. is a Senior Research Professor with a Hirsch Index H > 50 (Google Scholar), >150 publications, >10 PhD theses supervised, >10 software developed, and 2 patents in nanoscience and neuroscience. He is also the Europe Editor of the journal *Curr Top Med Chem* and guest editor of several special issues. He has served as a pro bono consulting reviewer of research project proposals for various public agencies, including the US National Foundation for Science (FSA), the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), and the German Federal Ministry of Education & Research (BMBF), *etc.*

Prof. González-Díaz H.'s research interests encompass multidisciplinary studies in chemoinformatics, networks, and data science. Specific interests include, but are not limited to, the application of network sciences and data analysis tools to the study of structure-property relationships in molecular structures, biological networks and complex systems in cheminformatics, bioinformatics, systems biology, neurosciences, nanosciences, omics, ecology, and epidemiology.

Sponsors



## <sup>14</sup>N NMR Spectroscopy Study of Binding Interaction between Sodium Azide and Hydrated Fullerene

Tamar Chachibaia<sup>1,2,\*</sup> and Manuel Martin Pastor<sup>3</sup>

1. Department of Analytical Chemistry, Food Science and Nutrition, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Spain
  2. Department of Public Health and Epidemiology, Faculty of Medicine, Tbilisi State University, Georgia
  3. Magnetic Resonance Unit, CACTUS, University of Santiago de Compostela, Spain
- \* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: [nanogeorgia@gmail.com](mailto:nanogeorgia@gmail.com).

Received: 1 November 2015 / Accepted: 4 November 2015 / Published: 4 December 2015

**Abstract:** The presence of human pharmaceutical compounds in surface waters is an emerging issue in environmental science. Low levels of many active pharmaceutical ingredients are detected in the aquatic environment as a result of pharmaco-chemical industrial waste spill-offs in draining water. In the manufacturing of pharmaceutical drug substances azides are used as reagents or when they are generated somehow in the synthesis, it may be necessary to demonstrate that these impurities are sufficiently removed to levels below an appropriate safety threshold. Sodium azide is an example of an azide for which the environmental exposure limits have been reasonably well characterized. The treatment of waste and industrial water can be conducted by removing dissolved materials and ions in water using membrane separation technology with ultra- and nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO) membranes. To achieve better effluent water quality, tertiary treatment with activated carbon adsorption is used. To analyze the risk of pharmaceuticals in the environment, a proposed validated methodology by NMR spectroscopy will support the evaluation of the eco-toxicological hazards during the early development process of pharmaceuticals.

**Keywords:** sodium azide; fullerene; <sup>14</sup>N NMR spectroscopy; nanofiltration.

### 1. Introduction

The presence of pharmaceutical active compounds (PhACs) in the surface, drinking, and wastewaters is an emerging issue in environmental science. [1,2,3,4,5,6,7,8,9]. Low levels of many pharmaceutical active compounds are detected in the aquatic environment as a result of pharmaco-chemical industrial waste spill-off in draining water. It may be necessary to demonstrate that these impurities are sufficiently removed to levels below an appropriate safety threshold.

Sodium azide is an example of an azide for which the environmental exposure limits have been reasonably well characterized.

In the manufacturing of pharmaceutical drug substances azides are used in the synthesis, or they are generated as intermediate substance. Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) is widely used as starting molecule in the synthesis of Sartans, for the treatment of hypertension since the 1990s [10]. Some of these products have reached a market volume of several 100 t/a with an upward trend and are therefore considered as blockbusters.



Besides Sartant it is used in the synthesis other pharmaceuticals, such as Alfentanil (analgesic), Azosemid (diuretic), (anti-inflammatory) Broperamol and others.

There are required regulations for the analysis of pharmaceutical wastewater treatment and removal using membrane bioreactors (MBR). The waters treatment can be conducted by removing dissolved materials and ions in water using membrane separation technology with ultra- and nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO) membranes. [11]

To achieve better effluent water quality, tertiary treatment with activated carbon adsorption is used [12]. Activated carbon filters, which may contain fullerene retains extremely effective by mechanical filtration effect [13,14,15,16]. In 2009 by Chae and coworkers was developed technology of membrane coating by hydrated fullerene for improvement of filtration properties of membranes.

To analyze the risk of pharmaceuticals in the environment, proposed validated methodology by NMR spectroscopy will support the evaluation of the eco-toxicological hazards of PhACs during the early development process - the questions brought forward by many academic and regulatory scientists.

#### **Aim:**

Aim was to study deviation of signals of sodium azide obtained by  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy under influence of hydrated fullerene to examine binding properties of sodium azide with hydrated fullerene. In current study we propose innovative method for detection of sodium azide by  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy.

#### **Background:**

Detection and inactivation of sodium azide in the environment is global issue, due to its widespread use in many spheres of human activity, in pharmaco-chemical industry in the synthesis of pharmaceuticals, as well pesticides, direct use in agricultural sphere, as herbicide, pesticide and insecticide, wine fermentation inhibitor, in automotive industry in the content of detonators of airbags and bactericidal agent for inhibition of germ growth.

The Organization for Economic Co-operation and Development (OCDE) [17] has included sodium azide in the list of 5,235 High Production Volume Chemicals (HPV) with a production or import greater than 1,000 tons per year (McKeen, 2010).

Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) has inhibitory effect on heme-containing mitochondrial respiratory chain enzyme Cytochrome C Oxidase, which is cause of CNS anoxia and hypoxia in case of acute intoxication, while in case of chronic exposure to its lower doses long-term outcome is dementia.

Against  $\text{NaN}_3$  not exists any antidote, and thus the only method of treatment remains hemodialysis affected patients. In case of chronic intoxication prevention is possible by administration of antioxidants to workers.

For prevention of sodium azide impact is important to decrease the risk of exposure, as from occupation workplace atmosphere and also from the environment.

The environmentalist and atmospheric scientists are concerned about the safety of the use of sodium azide. Despite the widespread opinion of proponents of sodium azide use in water and soil, arguing that this chemical undergoes rapid hydrolysis and degradation (Rodríguez-Kábana & Robertson, 2000, 2001). [18], their opponents (Betterton, 1999, 2003, 2010).[19] claimed that this is not exactly what it can be anticipated, since they discovered water and soil samples containing residual amounts of sodium azide.

One of the most important issues is control of runoff waters and adequate membrane filtration barrier setup.

For industrial wastewater, as well municipal and hospital dialysis centers water treatment systems are using modern membrane filtration technologies.

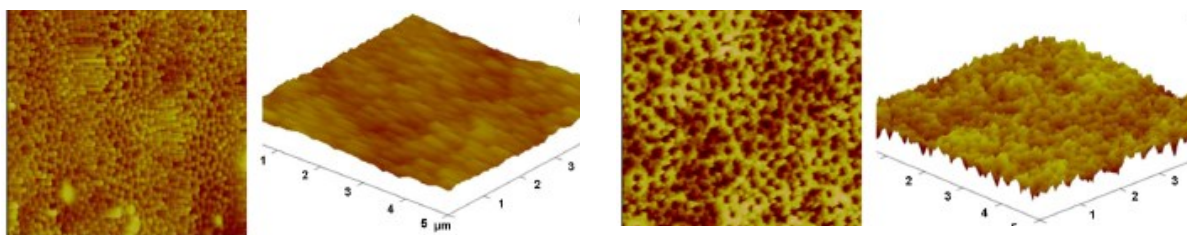
Physicochemical modifications of membrane materials have been tried to improve performance of membrane processes for a long time. Numerous studies dealing with the surface modification of membranes have achieved by coating or grafting a functional group on the prepared membrane surface. [20].

In addition to the conventional ways of surface modification, researchers are focusing on

the application of nanomaterials to modify the membrane properties thanks to recent developments of nanotechnologies. Among others, fullerene (C60) is the potential candidate expected to show an improved performance when used to modify the membrane properties. [21, 22, 23] Chae et al. (2009) examined the modification of ceramic microfiltration membranes coated by fullerene solution dip-coat-evaporation procedure. [24]. The dip coating procedure consisted of an initial immersion of membrane into solution for 2 seconds, drip-draining of excess solvent, followed by solvent

evaporation under vacuum for several days. The surface concentration of C60 on the membranes was varied by repeating the dip-coating procedure anywhere from one to nine times. The final concentration of C60 on the membrane was determined by measuring the change in membrane weight. The surface morphology of the membrane coated with various amounts of C60 was investigated using a scanning probe microscope (SPM). The C60 nanoparticles used in this study were not chemically bound to the membrane surface.

**Fig. 1.** Surface morphology of the ceramic membranes: (left) anodisc 200 nm with C60 0.030mg cm<sup>-2</sup> and (right) anodisc 200 nm with C60 0.058mg cm<sup>-2</sup> (Source: doi:10.1016/j.memsci.2008.12.023. Courtesy Chae et al. 2009).



## **2. Materials and methods:**

We studied binding properties between sodium azide and hydrated fullerene, without adding any catalyst, heating or microwave irradiation, under conventional conditions, to see if any interaction may occur to recommend in water filtration and pharmaceutical waste-water treatment applications, e.g. in different phases of filtration, as in membranes and carbon filters enriched by fullerenes.

The experimental part of this project is performed in the Magnetic Resonance Unit at the Center of Technology Innovation and Transfer (CACTUS) of the University of Santiago de Compostela. Experiments were conducted during 2012-2014 and obtained results analyzed.

University of Santiago de Compostela (USC) is equipped with NMR spectroscopy and propriety technology of MESTRE Labs, which is the software used worldwide.

The Magnetic Resonance Unit at the University of Santiago de Compostela provides the optimum research instrumentation required for this part of the project. The NMR facility provides three state-of-the-art high magnetic field NMR spectrometers of 500 MHz and 750 MHz.

## **Experimental**

### **C60HyFn production, characterization and preparation of C60FWS**

For C60FWS preparation (C60HyFn water solution), C60 fullerene samples with purity of more than 99.5% (MER Corporation, Tuscon, AZ, USA) have been used. C60FWS was produced without using of any solubilizers or chemical modification [25].

C60HyFn concentration of  $8.88 \times 10^{-4}$  M was used as stock solution for preparing C60FWS prior the experiment. This method is based on transferring of fullerene from organic solution into the aqueous phase with the help of ultrasonic treatment. To obtain C60FWS is possible with C60 concentration up to  $5.5 \times 10^{-3}$  M (~4 mg/ml).

### **Titration:**

We performed <sup>14</sup>N NMR spectroscopy of pure sodium azide water solution and obtained satisfactory results with visualization of two peaks corresponding to three atoms of nitrogen with chemical shifts corresponding to 204.78 ppm and 56.06 ppm.[26]

We added hydrated fullerene 50 mM solution (144 mg/l) (IPAC, Ukraine, Kharkov) to sodium azide water solution with titration.

In our study we performed two series of experiments, with different concentrations of sodium azide. First, with molar concentration of 1M, and second, with 10M solution.

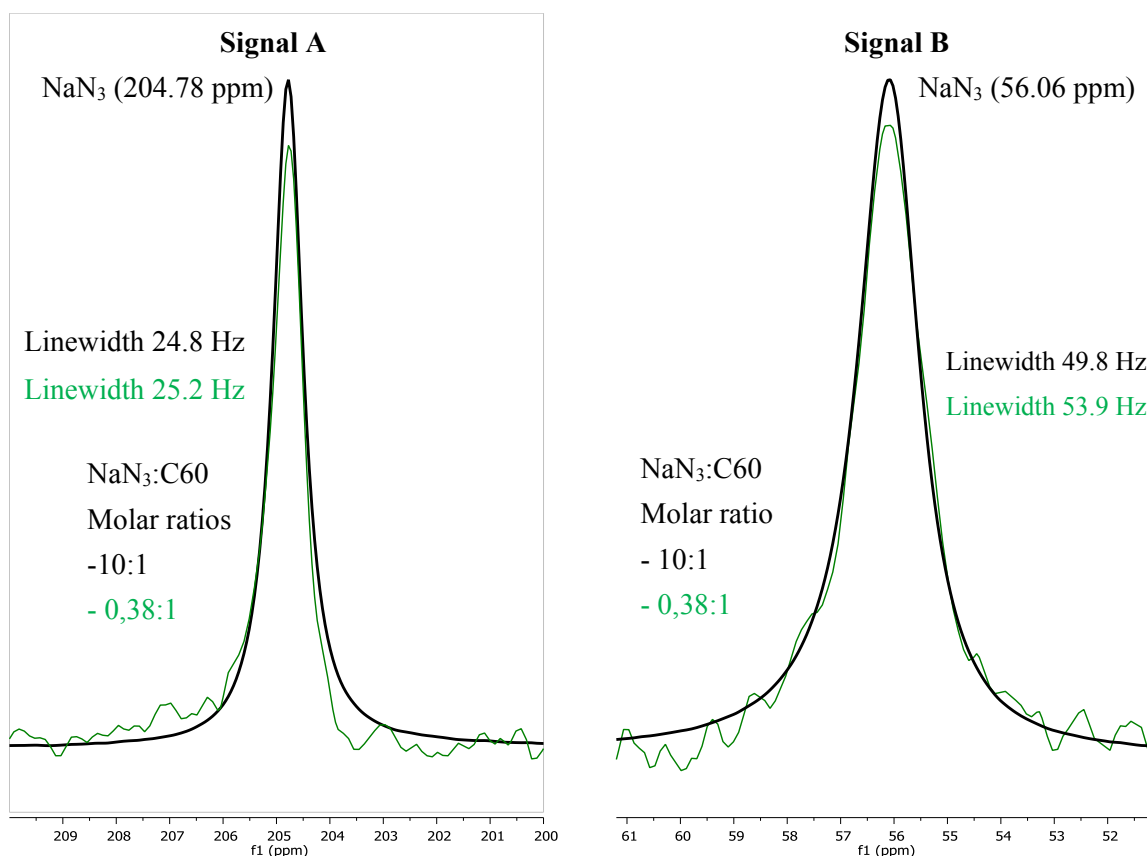
We performed titration by fullerene water solution with decreasing concentrations. Thus, ratios of  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  were  $<10:1$  in the first set of experiment. In the first series of experiment we used standard addition method of titration. Standard is hydrated fullerene C60 and with decreasing the ratios of  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  which were subsequently 10:1, 1,36:1, 0,88:1 and 0,38:1.

In the second set of experiments we used higher concentration of sodium azide 10M with ratio of  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  which was equal to 100:1.

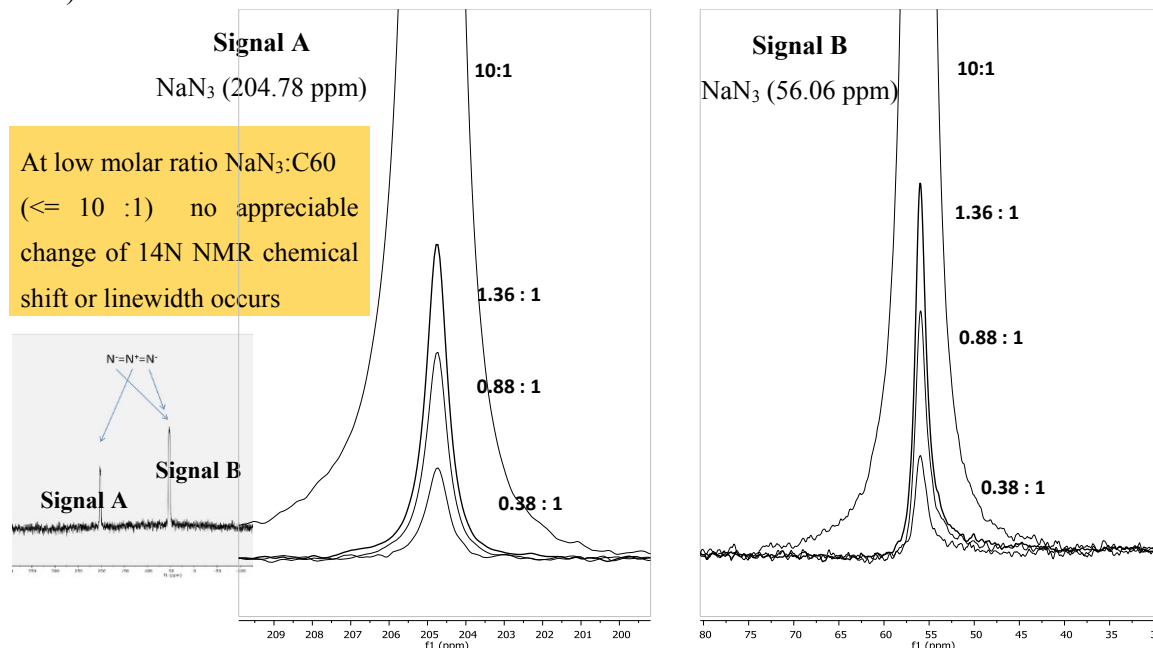
### 3. Results

The sample prepared at molar ratio  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  100:1 show a small change in the peak position and so does a change in the linewidth respect to the other samples explored in the titration study. Those changes could be indicative of a weak binding interaction between  $\text{NaN}_3$  and C60. At high molar ratio  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  100:1. The  $^{14}\text{N}$  peaks of sodium azide have observable CSPs and changes in Linewidth. The two effects are stronger for the two external nitrogens of sodium azide (signal B) than for the central nitrogen (signal A). The mentioned effects could indicate a weak binding interaction between  $\text{NaN}_3$  and C60.

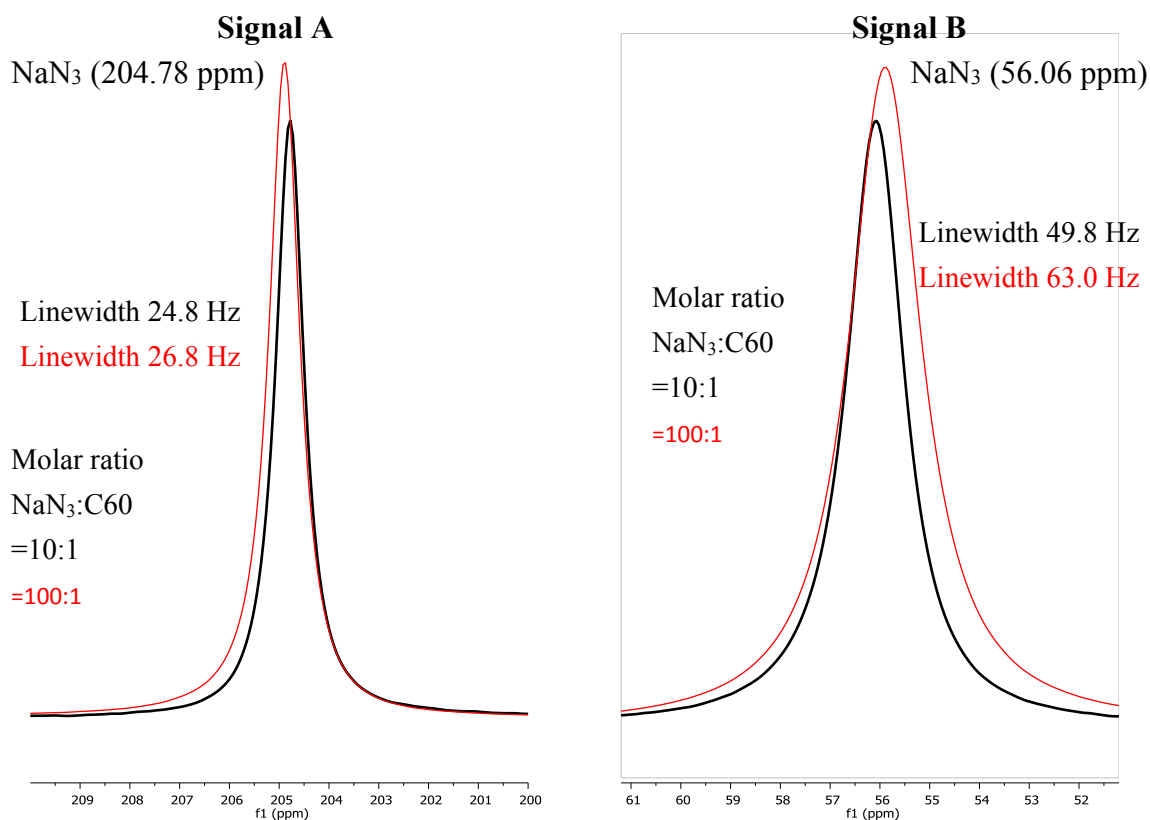
**Fig. 1**  $^{14}\text{N}$  NMR titration study. C60 fullerene added to  $\text{NaN}_3$  water solution. Superimposition of two spectra of sodium azide: black line is corresponding to pure sodium azide water solution and green to sodium azide titrated with fullerene water solution at lowering concentrations. At low molar ratio  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  ( $\leq 10:1$ ) no appreciable change of  $^{14}\text{N}$  chemical shift or linewidth occurs for two peaks of  $\text{NaN}_3$  (Signals A and B).

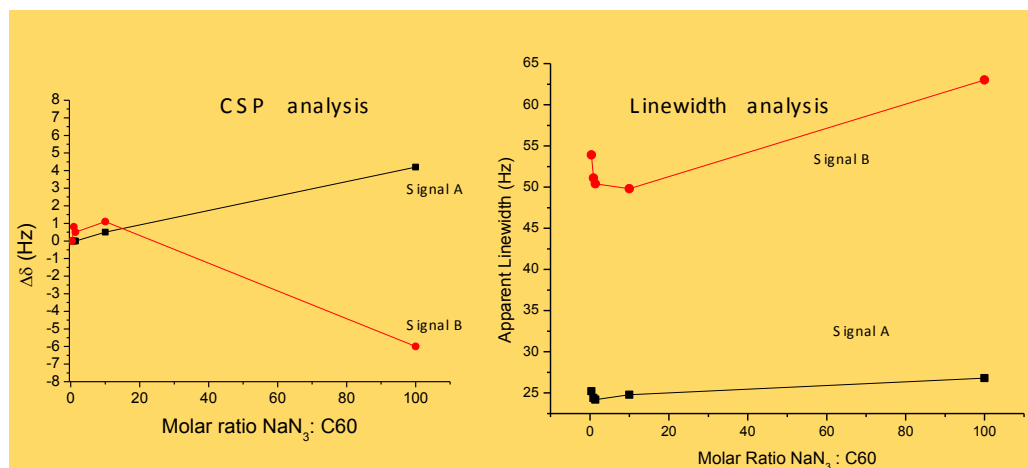


**Figure 2.**  $^{14}\text{N}$  NMR superimposition of four different spectra at low molar ratios of  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  ( $\leq 10:1$ ).



**Figure 3.** Superimposition of two spectra at high ratio of  $\text{NaN}_3:\text{C60}$  ( $>10:1$ ), particularly 100:1. There are some subtle changes of  $^{14}\text{N}$  chemical shift and linewidth of both  $\text{NaN}_3$  peaks.



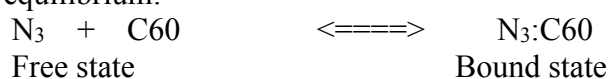
**Figure 4.** Chemical Shift Perturbations (CSP) and Linewidth study of  $^{14}\text{N}$  peaks of  $\text{NaN}_3$  at several molar ratios.

To confirm obtained results it is required extra experiment measuring the  $^{14}\text{N}$  spectrum of a sample containing only sodium azide in water at the same concentration of 10 M without C60 to discard a false positive. There were anticipated two possible outcomes of this experiment: if the changes mentioned above does not occur in this sample, then they must be due to C60, and therefore the weak-binding is confirmed, but if the changes mentioned above do occur also in this sample, then there is likely an effect of the high concentration of  $\text{NaN}_3$  in the sample, but we cannot say that we have detected a weak-binding between C60 and  $\text{NaN}_3$ .

The results obtained with the control sample of pure  $\text{NaN}_3$  at 10 M demonstrated that there are changes in the chemical shift position and line-broadening related to the molar ratio 100:1 of  $\text{NaN}_3$ :C60 in the sample. These results can be interpreted as binding interaction occurring between  $\text{NaN}_3$  and C60 molecules, from the two  $^{14}\text{N}$  peaks of  $\text{NaN}_3$ , the one that is more affected is the one that resonates at approximately 56 ppm.

#### **Discussion:**

Some solutes, such as C60 can have a dynamic interaction of binding with other solutes, such as  $\text{NaN}_3$ . They are exchanging during time between a bound state when the two molecules are packed together and unbound state in which the two molecules are independent. Chemically this is represented by equilibrium:



The double arrow indicates that the equilibrium moves in both direction during time, in our case the timescale of this reaction is likely below <100 ms for moving in both directions.

In the instant that the two molecules are bound their atoms are packed together and as consequence their electron clouds introduce a slight shielded/de-shielded of the external magnetic field that is felt by the nuclei of any of the two molecules. Thus, the  $^{14}\text{N}$  NMR peaks of  $\text{N}_3$  molecule feels on average a slightly different magnetic field when C60 is present and therefore resonate at a slightly different chemical shift than when C60 is not present. We made a titration with C60 and followed the changes of chemical shifts of  $^{14}\text{N}$ . The fact that changes are observed by addition of C60 demonstrates that the two molecules interact and bind together dynamically.

The influence of C60 in the chemical shifts of  $\text{NaN}_3$  is not linear with the concentration, i.e. the two molecules interact one to one proportion as indicated above, it has a quadratic dependence with the concentration.

#### **4. Conclusion:**

The results demonstrate that there are changes in the chemical shift position and line-broadening related to the molar ratio  $\text{NaN}_3$ :C60 in the sample (100:1). One of two peaks of  $^{14}\text{N}$ , which resonates at 56 ppm and corresponds to two external nitrogen atoms of  $\text{NaN}_3$  is more affected by influence of hydrated fullerene C60. These results can be interpreted as binding interaction occurring between  $\text{NaN}_3$  and C60 molecules.



### Acknowledgments

The authors express gratefulness for financial support company Chemanteck (Galicia) and its founders Raquel Sendón García, Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós.

Special acknowledgments to Prof. Dr.: Perfecto Paseiro Losada for scientific advising and Miguel Angel Lago Crespo for technical assistance, University of Santiago de Compostela.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- 1 Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal Chem* 2003, 22, 685–696.
- 2 Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, E.M. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States: II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 2008, 402, 201-216.
- 3 Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface and in wastewater. *Environ Sci Technol* 1999, 33, 2529–2535.
- 4 Heberer, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicol Lett* 2002, 131, 5–17.
- 5 Ternes, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 1998, 32, 3245–3260.
- 6 Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R. acidic drugs in the Occurrence of neutral and acidic drugs in effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem* 2003, 22, 2872–2880
- 7 Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ Sci Technol* 2006, 40, 357–363.
- 8 Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., McArdell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater. *Water Res* 2005, 39:3139–3152
- 9 Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.E, McArdell, C.S., Molnar, E., Siegrist, H., Suter, M.F. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia* 2003, 57, 485–491
- 10 Haase, J., Large - scale Preparation and Usage of Azides in book “Organic Azides: Syntheses and Applications”, Ed. S.Bräse and K. Banert. John Wiley & Sons, USA, 2010. ISBN: 978-0-470-51998-1, Ch 2, 30-51
- 11 Roh, J., Bartels, C., Wilf, M. Use of Dendrimers to Enhance Selective Separation of Nanofiltration and Reverse Osmosis Membranes. Desalination and Water Purification Research and Development Report # 140. 2009.  
[www.usbr.gov/pmts/water/publications/reports.html](http://www.usbr.gov/pmts/water/publications/reports.html)
- 12 Jones, O., Voulvoulis, N., Lester, J. Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35, 401–427.
- 13 Buseck, P., S. Tsipursky, R. Hettich. Fullerenes from the Geological Environment. *Science* 1992, 257(5067), 215-7. (DOI:10.1126/science.257.5067.215).
- 14 Krasnovyd, S.V., Konchits, A.A., Shanina, B.D., Valakh, M.Y., Yanchuk, I.B., Yukhymchuk, V.O., Skoryk, M.A. Local structure and paramagnetic properties of the nanostructured carbonaceous material shungite. *Nanoscale Research Letters* 2015, 10, 78. doi.org/10.1186/s11671-015-0767-9
- 15 Buseck, P.R. Geological fullerenes: review and analysis. *Earth and Planetary Science Letters*. 2002, 203, 781–792. doi: 10.1016/S0012-821X(02)00819-1.

- 16 Augustyniak-Jabłokow, M.A., Yablokov, Y.V., Andrzejewski, B., Kempirski, W., Łos, S., Tadzysak, K. et al. EPR and magnetism of the nanostructured natural carbonaceous material shungite. *Phys Chem Minerals*. 2010, 37, 237–47. doi: 10.1007/s00269-009-0328-9.
- 17 McKeen, S. (Ed). High Production Volume (HPV) Chemicals. The Organization for Economic Cooperation and Development. Environment Directorate. Paris. 2010.
- 18 a) Rodríguez-Kábana, R. and Robertson, D.G. Nematicidal and herbicidal properties of potassium azide. *Nematropica*, 2000, 30,146.
- b) Rodríguez-Kábana, R. Pre-plant applications of sodium azide for control of nematodes and weeds in eggplant production. Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Nov. 5-9, 2001, San Diego, CA. 6-1.
- c) Rodríguez-Kábana, R. Efficacy of aqueous formulations of sodium azide with amine-protein stabilizers for control of nematodes and weeds in tomato production. Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Nov. 5-9, 2001, San Diego, CA. 7-1.
- e) Rodríguez-Kábana, R. and Abdelhaq, H. Sodium azide for control of root-knot nematodes and weeds in green pepper and tomato production in the Souss valley. Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, Nov. 5-9, 2001, San Diego, CA. p 8 -1.
- 19 a) Betterton, E. A. Environmental Fate of Sodium Azide Derived from Automobile Airbags. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2003, 33, 423-458.
- b) Betterton, E. A., Lowry, J., Ingamells, R., Venner, B. Kinetics and mechanism of the reaction of sodium azide with hypochlorite in aqueous solution. *J. Hazardous Materials* 2010, 182, 716–722.
- c) Betterton, E.A. & Craig, D. Kinetics and Mechanism of the Reaction of Azide with Ozone in Aqueous Solution. *J. Air & Waste Management Association* 1999, 49(11), 1347-1354.
- 20 Park, H., Chang, I., Lee K. (Ed.). Membranes and Module Modification. Principles of Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. CRC press Taylor & Francis Group, New York. 2015, 281-282.
- 21 Jassby, D., Chae, S.R., Hendren, Z., Wiesner, M. R. Membrane filtration of fullerene nanoparticle suspensions: Effects of derivatization, pressure and electrolyte concentration. *J. of Colloid and Interface Science*, 2010, 346(2), 296-302.
- 22 Chae, S. R., Therezien, M., Budarz, J. F., Wessel, L., Lin, S., Xiao, Y. and Wiesner M. R. Comparison of the photosensitivity and bacterial toxicity of spherical and tubular fullerenes of variables aggregate size. *J. of Nanoparticle Research*, 2011, 13, 5121-5127.
- 23 Chae, S.R., Hotze, E.M., Wiesner, M. R. Possible applications of fullerene nanomaterials in water treatment and reuse, Nanotechnology Applications for Clean Water. William Andrew Publishing, New York, USA 2009 (ISBN: 9780815515784).
- 24 Chae, S. R., Wang, S., Hendren, Z., Wiesner, M. R., Watanabe, Y., Gunsch, C. K. Effects of fullerene nanoparticles on Escherichia coli K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control. *J. of Membrane Science*, 2009, 329, 68-74. doi:10.1016/j.memsci.2008.12.023
- 25 a) Andrievsky, G.V., Kosevich, M.V., Vovk, O.M., Shelkovsky, V.S., Vashchenko, L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J Chem Soc Chem Commun* 1995,1281-1282.
- b) Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Karyakina, E.L., Mchedlov-Petrosyan, N.O. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C60 by electron microscopy. *Chem Phys Lett* 1999, 300: 392-396.
- c) Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Bordyuh, A.B., Dovbeshko, G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C60 fullerene with help of FTIR reflectance and UV-VIS spectroscopy. *Chem Phys Lett* 2002, 364, 8-17.

d) Avdeev, M.V., Khokhryakov, A.A., Tropin, T.V., Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K. et al. Structural features of molecular-colloidal solutions of C60 fullerenes in water by small-angle neutron scattering. *Langmuir* 2004, 20, 4363-4368.

26 Chachibaia, T. & Pastor, M. The State-Of-The-Art chemical analytical method for detection of sodium azide by <sup>14</sup>N NMR spectroscopy. *J. Nano Studies* 2015, 11: 8-15.

© 2015 by **Tamar Chachibaia and Manuel Martin Pastor**; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions defined by MDPI AG, the publisher of the Sciforum.net platform. Sciforum papers authors the copyright to their scholarly works. Hence, by submitting a paper to this conference, you retain the copyright, but you grant MDPI AG the non-exclusive and un-revocable license right to publish this paper online on the Sciforum.net platform. This means authors can easily submit paper to any scientific journal at a later stage and transfer the copyright to its publisher (if required by that publisher). (<http://sciforum.net/about> ).



THE STATE-OF-THE-ART CHEMICAL ANALYTICAL METHOD FOR  
DETECTION OF SODIUM AZIDE BY  $^{14}\text{N}$  NMR SPECTROSCOPY

T. Chachibaia <sup>1,2</sup>, M. M. Pastor <sup>3</sup>

<sup>1</sup> University of Santiago de Compostela  
Faculty of Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry, Food Science & Nutrition  
Santiago de Compostela, Spain  
nanogeorgia@gmail.com

<sup>2</sup> I. Javakhishvili Tbilisi State University  
Faculty of Medicine  
Department of Public Health & Epidemiology  
Tbilisi, Georgia

<sup>3</sup> University of Santiago de Compostela  
Center of Technology Innovation & Transfer (CACTUS)  
Magnetic Resonance Unit  
Santiago de Compostela, Spain

Accepted August 19, 2015

### Abstract

Sodium azide is acute poison similar to cyanide. Due to its attractive chemical and physical properties it is widely used in many spheres including automotive industry, medicine, pharmaco-chemistry, agriculture and even everyday life. Detection of sodium azide becomes more demanding nowadays than several decades ago. We propose to use of  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy to detect and quantify sodium azide in aqueous solutions and extrapolate calibration results for real time detection of unknown concentrations. The results of this methodology relying in measurement of 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectra at the lowest concentration of sodium azide aqueous solutions.

### Introduction

Sodium azide is acute poison similar to cyanide. Sodium azide is in the group of alkali metal azides, it is water soluble and currently used in many applications, from industry to everyday life.

The Organization for Economic Co-operation and Development (OCDE) has included sodium azide in the list of 5,235 High Production Volume Chemicals (HPV) with a production or import greater than 1,000 tons per year [1].

One particular important area of use of sodium azide is in the agricultural sector. Sodium azide is among the great variety of chemicals which are frequently used as fermentation inhibition in wine production.

Since 2000s sodium azide started to be used as pesticide, herbicide and insecticide [2]. In one study during eight year period usage of sodium azide in soil reached the impressive value of 336 kg / ha [3].

In 2014, International Organization of Vine and Wine (OIV) released the revised “Compendium of International Methods of Analysis” for the detection of preservatives and fermentation inhibitors. They proposed two methods of detection sodium azide which are HPLC and colorimetric method. This methods are relative obsolete despite the fact that it was modified in 2006, based on originally developed works Swaring & Waldo [4] and Battaglia & Mitiska [5]. The colorimetric method proposed is also very obsolete and neither specific nor sensitive. While, in recent years was discovered possibility of reaction based detection of sodium azide at small quantities as 21 ppb [6].

In parallel, concern was raised by environmentalist and atmospheric scientists about the safety of the use of sodium azide. Despite the widespread opinion of sodium azide proponents for its use in water and soil, arguing that this chemical undergoes rapid hydrolysis and degradation (Rodrigues–Kabana et al.) [7 – 10], their opponents (Betterton et al.) [11 – 13] claimed that it is not exactly what it can be anticipated, since they discovered water and soil samples containing residual amounts of sodium azide.

In the recommendations for disposal of sodium azide in industry or workplace, the standard method for its neutralization is manifold dissolution in water and release in sewage by the Royal Society of Chemistry [14], at the same time, American Azide Corporation strictly require a chemical reaction for the inactivation of wastes of sodium azide before draining [15].

In this context, it is clear that the detection of sodium azide becomes more demanding nowadays than several decades ago.

We propose to use of  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy to detect and quantify sodium azide in aqueous solutions and extrapolate calibration results for real time detection of unknown concentrations. The results of this methodology relying in measurement of 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectra at the lowest concentration of sodium azide aqueous solutions.

### **Aims and objective**

The aim of the study is to apply  $^{14}\text{N}$  NMR spectroscopy to detect  $^{14}\text{N}$  spectra of the sodium azide at several concentrations to determine minimum detection limit.

We followed to fulfill the following objectives:

- 1) We studied the detection limit of  $\text{NaN}_3$  with  $^{14}\text{N}$  NMR. The minimum concentration of  $\text{NaN}_3$  that can be measured with  $^{14}\text{N}$  NMR in the spectrometer in a standardized and reasonable amount of time.
- 2) We determined the concentration of any unknown sample of  $\text{NaN}_3$  prepared under analogue conditions in water, as far as it is equal or greater than the  $^{14}\text{N}$  NMR detection limit of  $\text{NaN}_3$ .
- 3) The next is to perform calibration of  $\text{NaN}_3$  samples with dilution experiments and calculate calibration curve for  $^{14}\text{N}$  NMR sensitivity for detection of sodium azide of unknown concentration.

To estimate the minimum detectable concentration of sodium-azide, we need to prepare a sample with known concentration. To acquire the spectrum under some standardized conditions (in particular the total measurement time) and repeat the spectrum 5 or more times diluting the sample.

Then we extrapolated the calibration curve of NMR sensitivity (signal-over-noise ratio S/N) with the respect to  $\text{NaN}_3$  concentration to determine the minimum required concentration, which is detectable in the spectrometer.

### **Materials and Methods**

The experimental part of this project is performed in the Magnetic Resonance Unit at the Center of Technology Innovation and Transfer (CACTUS) of the University of Santiago de Compostela. Experiments were conducted during 2012–2014 and obtained results analyzed.

University of Santiago de Compostela (USC) is equipped with NMR spectroscopy and propriety technology of MESTRE Labs, which is the software used worldwide.

The Magnetic Resonance Unit at the University of Santiago de Compostela, provides the optimum research instrumentation required for this part of the project. The NMR facility provides three state-of-the-art high magnetic field NMR spectrometers of 500 and 750 MHz.

### **Experimental**

Sodium azide and deuterated water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) were obtained from Sigma-Aldrich. Azide standards were prepared using sodium azide in  $\text{D}_2\text{O}$ , in which target concentrations were set relative to free azide concentration. Test samples were prepared at descending target concentration in  $\text{D}_2\text{O}$ . Stock sample of 100 mM concentration solution of sodium azide 0.5 ml was transferred into an NMR tube. The sample NMR tube is placed into a magnetic field. A radio frequency pulse is then sent through the sample solution in order to orient the magnetic moments of the nuclei in the solution. As the magnetic moments relax, they exhibit free induction decay (FID). The free induction decay is Fourier transformed into a NMR spectrum. The NMR spectrum displays chemical shifts for the individual nuclei of nitrogen; and from these chemical shifts, the structure of the compound was determined.

### **Standard and test sample preparation**

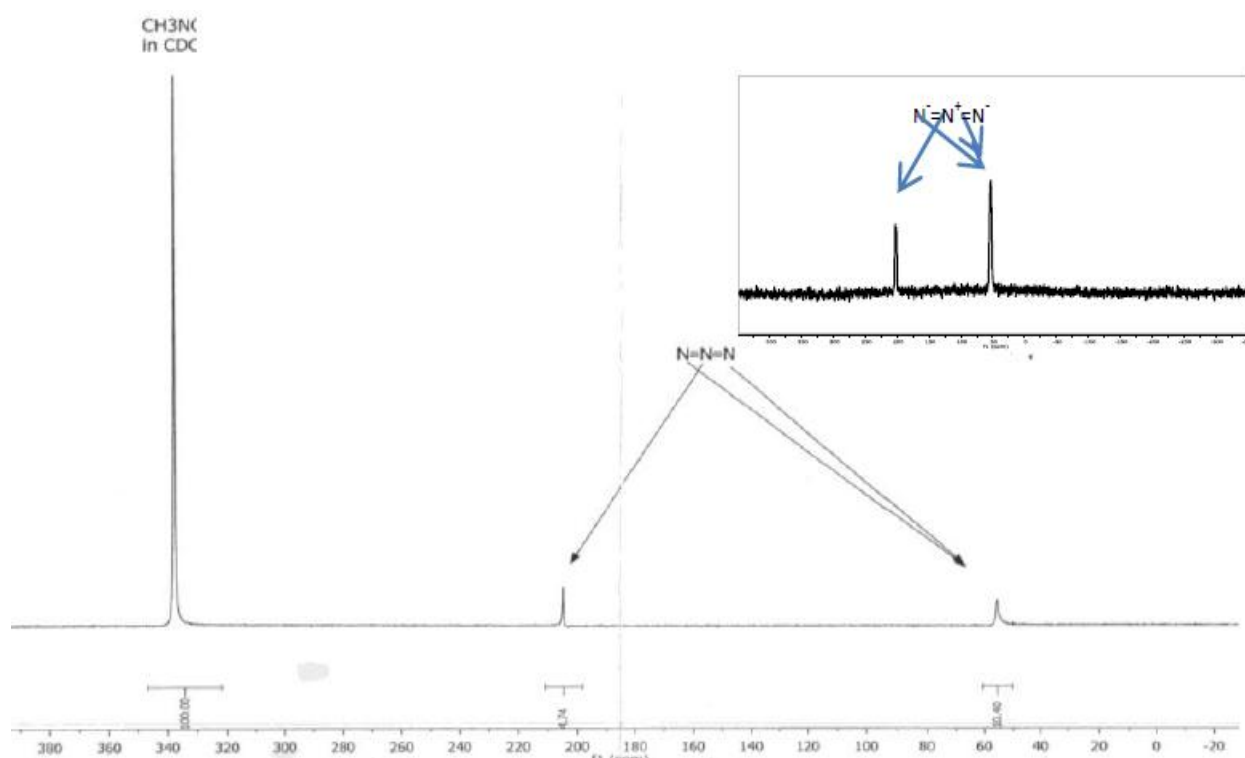
- 1) Preparation of reference standard sample with a compound, which  $^{14}\text{N}$  NMR signal is used as the reference of concentration. This sample is important because it allows measuring the unknown concentration of  $\text{NaN}_3$  in any sample that we prepare in the future.
- 3) Reference compound: 100 %  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  total volume of 700 microliters.

Reference compound 100 % Nitromethane ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) 600 microliters was placed in a standard NMR tube and the remaining 100 microliters in a special capillary. The capillary with the reference compound is inserted inside of standard NMR tube. We prepared the initial sample of  $\text{NaN}_3$  in solution in a "narrow wall" NMR tube.

The starting concentration of  $\text{NaN}_3$  is 100 mM in this sample. Then the capillary is inserted with the reference sample inside this standard NMR tube. We measure the  $^{14}\text{N}$  spectrum of the sample by 4 or 5 dilutions of the original  $\text{NaN}_3$  concentration using dilution 5 times.

### Results:

A preliminary test was carried out in our lab for the measurement of the 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectrum of sodium azide in water solution. The spectrum was obtained with very good quality in only 30 s of measurement time. The sample 100 mM gave the expected three peaks in  $^{14}\text{N}$  NMR (two peaks for  $\text{NaN}_3$  and one peak for  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ). The assignment of the peaks of the 1D  $^{14}\text{N}$  spectrum of sodium azide in water is provided in **Figure 1**.



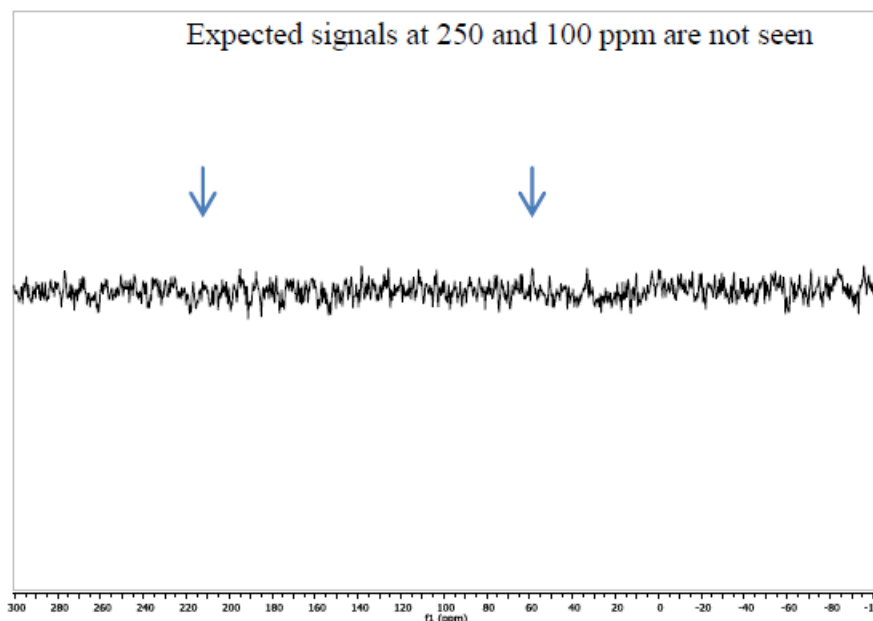
**Figure 1.**  $^{14}\text{N}$  NMR spectrum of 100 %  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  and 100 mM Sodium azide ( $\text{NaN}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ).

The chemical shifts obtained are in excellent concordance with those described for this molecule in the NMR spectral databases, and also in concordance with those expected for its structure. The 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectrum of sodium azide shows just two peaks corresponding to the two types of nitrogen atoms of this molecule. The two external nitrogen atoms resonate at  $\sim 50$  ppm, and the central nitrogen atom at  $\sim 200$  ppm. As expected, the former peak has double intensity than the later one since it corresponds to two nitrogen atoms.

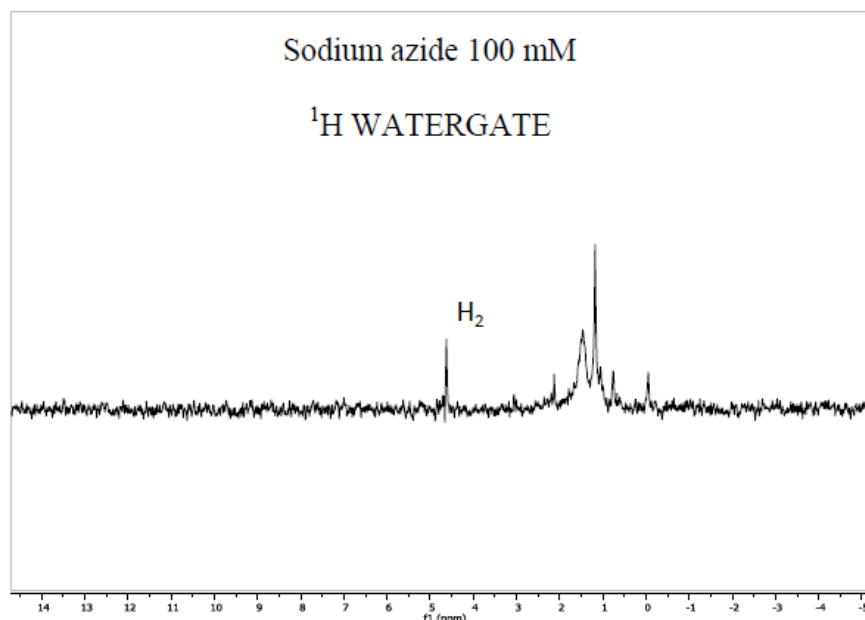
The  $^{14}\text{N}$  chemical shifts resonances are spread out in an extremely broad range that covers 900 ppm. Such dispersion is favorable for our purposes of detecting sodium azide in mixtures, since it reduces the chances of accidental signal overlapping with the  $^{14}\text{N}$  signals of other nitrogenated compounds. As the  $^{14}\text{N}$ -spectrum of sodium azide has two peaks, and the

same happens with its  $^{15}\text{N}$ -spectrum. In both cases the peaks are easily to interpret; the less intense one correspond to the central N atom, and the double intense one corresponds to the two external nitrogen atoms.

1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectrum of sodium azide 100 mM in  $\text{H}_2\text{O}$  obtained at 300 K in a Bruker Avance I NMR 11.7 T spectrometer. The spectrum was obtained in 30 s with 64 scans. The assignment of the peaks to the azide molecule and  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  are shown of the **Figure 2** (Magnetic Resonant Unit, CACTUS, University of Santiago de Compostela).



**Figure 2.**  $^{15}\text{N}$  NMR spectra of 100 mM sodium azide.



**Figure 3.** Proton  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of  $\text{NaN}_3$ .

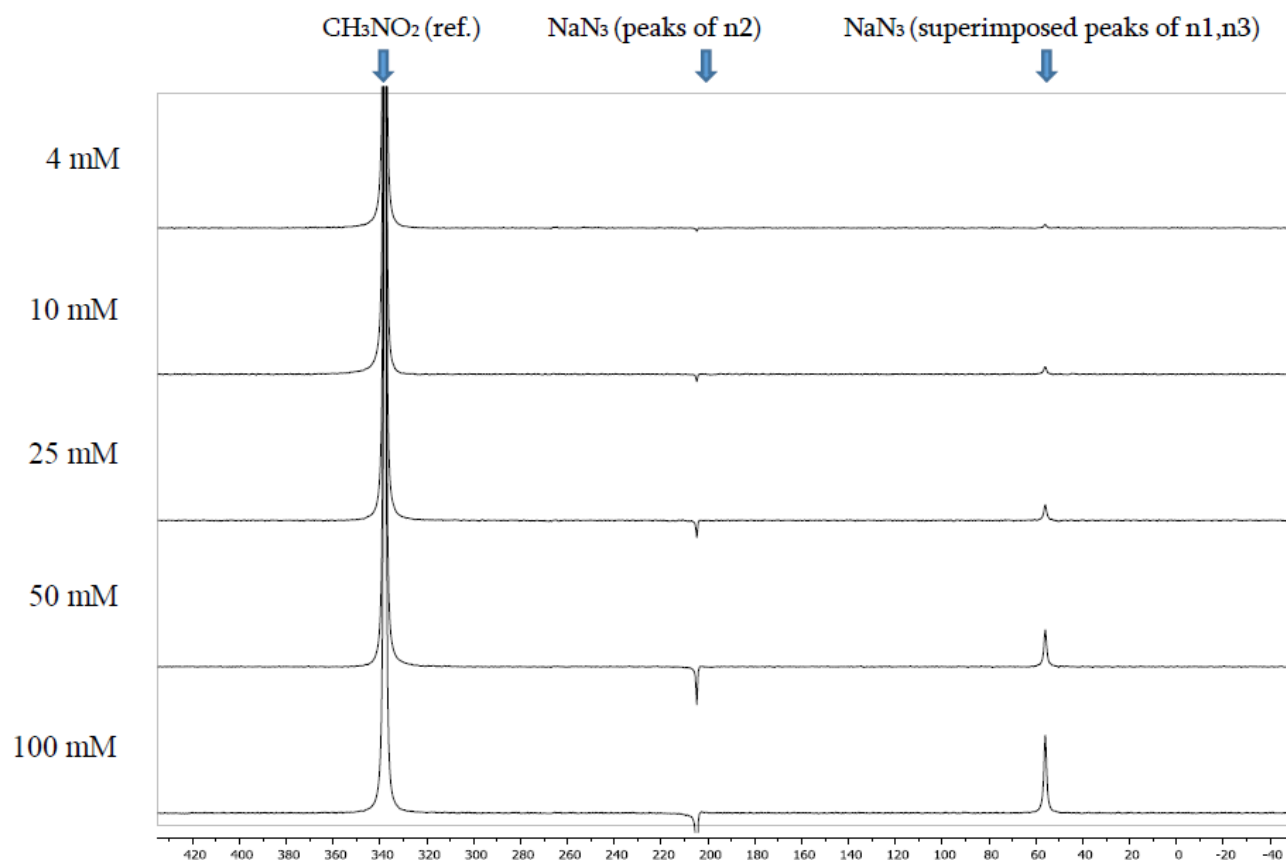
The  $^{15}\text{N}$  peaks of sodium azide are not visible because they are below the noise level (S/N). To observe them, it is sure that a longer measurement time is needed; it means to use many more scans to average the noise to a lower level, or alternatively, to increase the

concentration of sodium azide in the sample so as to get a higher amount of signal per scan. With that sample of sodium azide, it would probably require at least 12 hours of measurement time (or even more) to make the expected  $^{15}\text{N}$  peaks appear over the noise level.

The  $^{14}\text{N}$ -spectrum of  $\text{NaN}_3$  is highly sensitive, much better than the equivalent experiments with  $^{15}\text{N}$  in the same molecule. The measurement of the 1D  $^1\text{H}$  NMR spectrum of sodium azide solutions in water is not practical. Depending of pH, protonated forms of sodium azide could be formed and in principle detected with proton NMR, however those forms do not lead to distinguishable peaks in the  $^1\text{H}$  spectrum because they overlap with the strong water solvent peak due to their undergoing fast exchange equilibrium with the water. (**Figure 3**).

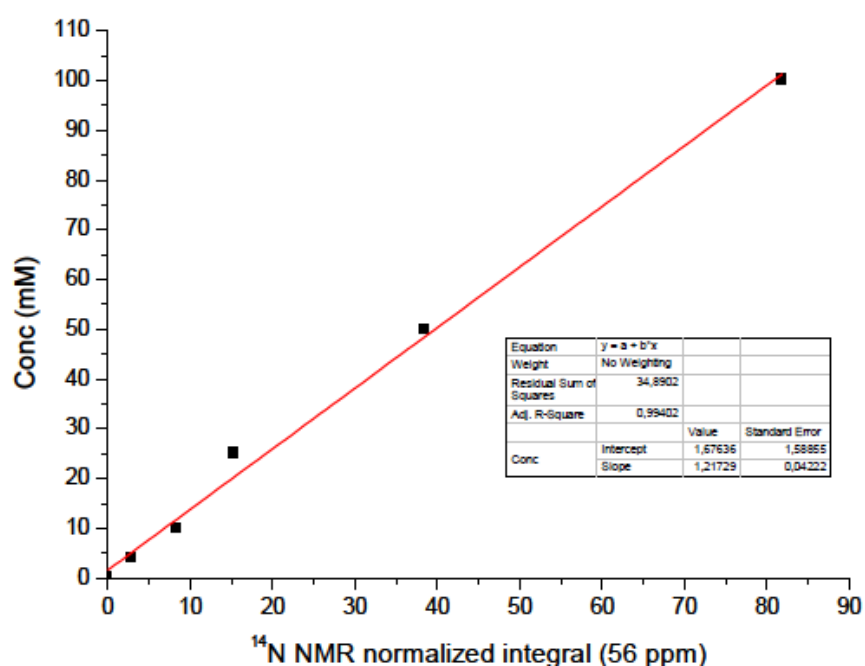
Under the conditions of measurement, the  $^{14}\text{N}$  spectrum of sodium azide had a considerably much better sensitivity than the alternative  $^{15}\text{N}$  NMR. Although the concentration of sodium azide in this test sample was considerably high (100 mM), it would be possible to adjust the experimental conditions for the detection of lower concentrations of sodium azide (e.g. 1 mM) within still a reasonable NMR measurement time (e.g. from 30 min. to a few hours). For the next sample we diluted the 100 mM sample by a factor of 4 (concentration of 25 mM of  $\text{NaN}_3$ ) and repeat the spectrum.

To estimate the minimum detectable concentration of the water solution of sodium-azide we need to prepare a sample with known concentrations. To acquire the spectrum under some standardized conditions (in particular the total measurement time) and repeat the spectrum 4 or 5 times diluting the sample. We obtained  $^{14}\text{N}$  NMR spectra of 5 different concentrations of  $\text{NaN}_3$  water solution, reducing the concentration by factor of 2 each time (**Figure 4**).  $^{14}\text{N}$  peaks are observed at 4 mM. Calibration curve was calculated using least squares linear regression method. As an external reference standard was used nitromethane 100 %.

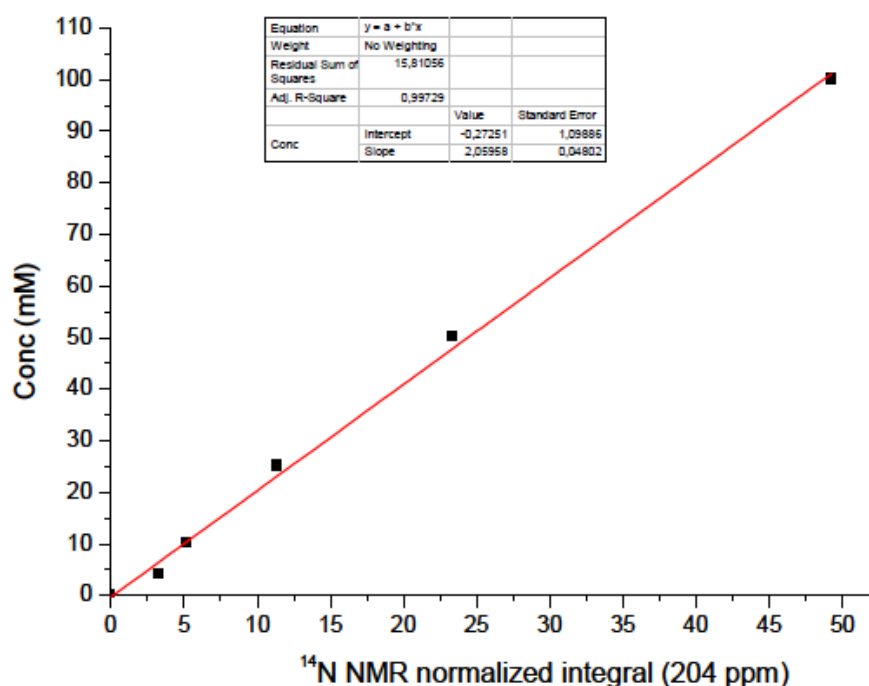


**Figure 4.**  $^{14}\text{N}$  NMR spectra of different concentrations of  $\text{NaN}_3$  water solution.

Calibration curve allows using this method for calculation even lower concentration of  $\text{NaN}_3$  indirectly. Particularly, we propose to lyophilize analyte sample by following protocol:  $^{14}\text{N}$  NMR can be measured with lower concentrations by following standard protocol. As the amount of sodium azide in the sample is only 0.5 mL for NMR assay, we recommend concentrating the analyte sample by liophilization of the water, to get a higher effective concentration of sodium azide for the NMR measurement.



(a)



(b)

Figure 5. Calibration curves (a) and (b).

Liophilization requires freezing under high vacuum a given amount of the analyte sample. The water will sublime during the liophilization process while the organic molecules and likely sodium azide will remain in the residual frozen solid. After liophilization to resuspend the residual solid in water, and then perform the  $^{14}\text{N}$  NMR analysis at 25 °C. For testing of proposed method of liophilization for detection of sodium azide is needed preparation of the sample at a known concentration and measurement by  $^{14}\text{N}$  NMR. We evaporate 5 ml of analyte solution and then resuspend up to 0.5 ml we will be able to detect 0.4 mM concentration of  $\text{NaN}_3$  in solution using obtained by us calibration curve standard (Figure 5) greater by factor of 10 compared to LOD obtained in our experiment.

## Discussion

Liquid Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is nowadays a well-established, widespread and recognized analytical technique for the identification and quantification of molecules in a mixture. The technique is available in many recognized centers of research and development excellence. Despite the relative insensitivity of NMR compared to other analytical techniques such as Mass Spectrometry (MS), it has the unique capacity of being sensitive to the finest and subtle details of the structure of each molecule in the sample. In particular, the NMR spectrum is sensitive both to the three-dimensional structure of a molecule in solution and to the topology of each one of its covalent bonds.

Moreover, NMR is amenable for detection and quantitative analysis of specific molecules in a mixture without requiring any previous step of separation.

NMR sample preparation is simple and only requires a volume of 0.5 mL. It is also very versatile regarding the type of solvents and temperature that can be chosen. The NMR sample is studied directly under the relevant experimental conditions (e.g. in water solvent, at room temperature, etc.).

The only caution specific for the preparation of NMR samples containing relative concentrated solutions of sodium azide in water, is to handle them with care in a chemical hood and immediately seal the NMR tube after preparation since it changes rapidly to a toxic gas with a pungent (sharp) odor.

A better alternative to detect sodium azide with NMR is to rely in other nuclei such as  $^{14}\text{N}$  NMR or  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. From these two isotopes,  $^{14}\text{N}$  is the most abundant in nature (the natural abundance of  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  is 99.63 and 0.37 %, respectively) and in favorable case molecules, the higher natural abundance of  $^{14}\text{N}$  positively correlates with a remarkable higher experimental sensitivity in NMR than  $^{15}\text{N}$ .

Nevertheless, such favorable situation of  $^{14}\text{N}$  is not always the case; one aspect to consider is that  $^{14}\text{N}$  is a quadrupolar nucleus (spin  $I = 1$ ) while  $^{15}\text{N}$  has spin  $1/2$ .

The NMR sensitivity of quadrupolar nuclei is strongly affected not only by its isotopic abundance, but also by its characteristic transversal relaxation rate ( $R_2$ ). The relaxation rate  $R_2$  affects the appearance of the peak that is generated in the NMR spectrum (peak height and broadening depend on  $R_2$ ).

According to NMR theory, the expected trend is that  $^{14}\text{N}$  nucleus placed in an asymmetric (molecular) environment usually experiences a very efficient transversal relaxation



rate (a high value of  $R_2$ ), leading to a reduction of the peak height and enhanced line-broadening that severely degrades its NMR sensitivity. The situation is the opposite for  $^{14}\text{N}$  nuclei in symmetric (molecular) environments.

### Conclusions:

Considering together the large signal dispersion of  $^{14}\text{N}$  NMR resonances and the good sensitivity obtained in our preliminary  $^{14}\text{N}$  NMR study of sodium azide in water solution, we propose to use of  $^{14}\text{N}$  NMR spectra to detect and quantify sodium azide in real case samples e.g., contaminated water or soil extracts, wine, milk, biological fluids, e.g. urine and blood.

The methodology relying in measurement of 1D  $^{14}\text{N}$  NMR spectra at the lowest concentration compared to methods described previously with other analytical techniques.

The method has significance to apply in the fields of medicine, pharmaco-chemistry, toxicology, which should open the way for the various possible applications, including neurodegenerative disorders and ageing.

### References

1. Ed. S. McKeen. High Production Volume (HPV) Chemicals. 2010, Paris, OECD (Environ. Direct.).
2. R. Rodríguez-Kábana. An azide method and composition for controlling deleterious organisms. 2001, US Patent # PCT/US01/31669.
3. J. A. Cabrera, D. Wang, S. M. Schneider, B. D. Hanson. Effect of methyl bromide alternatives on plant parasitic nematodes and grape yield under vineyard replant conditions. *Am. J. Enology & Viticulture*, 2011, 62, 42.
4. S. J. Swaring, R. S. Waldo. Liquid chromatographic determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative. *J. Liq. Chromatogr.*, 1982. 5, 597.
5. R. Battaglia, J. Mitiska. Specific detection and determination of azide in wine. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, 1986, 182, 501.
6. L. Wang, C. Dai, W. Chen, S. L. Wan, B. Wang. Facile derivatization of azide ions using click chemistry for their sensitive detection with LC-MS. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 10377.
7. R. Rodríguez-Kábana, D. G. Robertson. Nematicidal and herbicidal properties of potassium azide. *Nematropica*, 2000, 30, 146.
8. R. Rodríguez-Kábana. Pre-plant applications of sodium azide for control of nematodes and weeds in eggplant production. In: *Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions*. 2001, San Diego, 6-1.
9. R. Rodríguez-Kábana. Efficacy of aqueous formulations of sodium azide with amine-protein stabilizers for control of nematodes and weeds in tomato production. In: *Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions*. 2001, San Diego, 7-1.
10. R. Rodríguez-Kábana, H. Abdelhaq. Sodium azide for control of root-knot nematodes and weeds in green pepper and tomato production in the Souss valley. In: *Proc. Ann. Int. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives & Emissions Reductions*. 2001, San Diego, 8-1.

11. E. A. Betterton. Environmental fate of sodium azide derived from automobile airbags. *Critical Rev. Environ. Sci. & Technol.*, 2003, 33, 423.
12. E. A. Betterton, J. Lowry, R. Ingamells, B. Venner. Kinetics and mechanism of the reaction of sodium azide with hypochlorite in aqueous solution. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 716.
13. E. A. Betterton, D. Craig. Kinetics and mechanism of the reaction of azide with ozone in aqueous solution. *J. Air & Waste Manag. Assoc.*, 1999, 49, 1347.
14. Ed. L. Bretherick. *Hazards in the Chemical Laboratory*. 1986, London, Roy. Soc. Chem., 491.
15. American Azide Corporation MSDS. Sodium Azide. 9.19.2003.

## **<sup>1</sup>H-NMR SPECTROSCOPY METHOD FOR DETECTION OF ORGANIC AZIDES AND TRIAZOLES OBTAINED BY AZIDE-ALKYNE CYCLOADDITION CLICK REACTION**

**T. Chachibaia**

University of Santiago de Compostela, Spain

### **Introduction**

Nanotechnology provides powerful instrumentation tools to solve application-based goals in pharmaco-chemistry, enabling visualization and manipulation at molecular and atomic levels. Structures of more and more protein targets become available through X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and bioinformatics methods.

Newly invented pharmacologically active moieties require chemical modification to become drug-like enough to be tested biologically or clinically. One or more of these steps may involve computer-aided drug design.

In this study use softwares ChemDraw and Mnova, as methods of computational simulation for chemical structure prediction, synthesis and analysis. ChemDraw provides tools for design of molecule and predict its chemical and physical characteristics. ChemDraw is useful for creation of molecules and reactions for generation of associated properties, systematic names and spectra. ChemDraw includes versions for more detailed numerical analysis.

MNova is the software for the processing of NMR spectra of molecular structure. Mnova provides automatic detection and characterization of <sup>1</sup>H – NMR spectral peaks with the applicable molecular structure. Mnova is NMR prediction and analytical software developed by Mestrelab, Mestrelab Research (University of Santiago de Compostela, Spain), which provides an NMR spectrum from molecular structures, providing virtual NMR prediction desktop tools and methods.

In this study is described the NMR spectroscopic analytical model of organic azides and products of cycloaddition reaction with the formation of 1,2,3-triazole molecule.

### **Why's and how's of "click" chemistry**

The first step in drug design is finding of the appropriate chemical structure for the exact target cells, receptors, or particular molecules.

Chemical transformations of small molecules have served as a rich source of "click" reactions for the development of new polymerization processes. The fields of pharmaceutical,

---

materials, and polymer sciences, as well biotechnology industries, enthusiastically embraced the concept of click chemistry, as a versatile tool for introducing structural control [1]. Ideally, these efforts will offer molecular-level control during the preparation of nanostructured materials.

Concept of “click” chemistry was first introduced by the Nobel scientist K. Barry Sharpless, Hawker, Fokin and coworkers in 2001 [2]. Nature served as a source for inspiration of the concept idea. By joining small units together “click” chemistry simplifies compound synthesis and is assessed in chemistry domain as “everything is as easy as a click” [3, 4] for designing small modular components and has the potential to become a powerful polymerization technique [5].

Applications are increasingly found in all aspects of drug discovery making each reaction faster, efficient and reliable. In his breakthrough review published in 2001 Sharpless and coworkers defined click chemistry as reactions that are high yielding, wide in scope, create only byproducts that can be removed without chromatography, are stereospecific, simple to perform, and can be conducted in easily removable or benign solvents.

Among the multiple reactions that could be named “click” the prime example is the copper-catalyzed Huisgen’s 1,3-dipolar cycloaddition of azides and terminal alkynes (CuAAC) [3, 6, 7], which became classic in contemporary chemistry, and has been widely employed to synthesize or modify various polymers and dendrimers [8].

Fundamental and mechanistic aspects are fully described in the several recent reviews of the use of Cu-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) for the synthesis of dendritic, branched, linear and cyclic co-polymers [9-13]. Materials, polymer and dendrimer sciences were also approached in publications [14], as well the area of drug discovery, bioconjugations, peptidomimetics, chemical ligations, etc [15].

Important aspect of the success of this reaction pertaining to materials science and biotechnology is that the starting materials, azides and terminal alkynes, are exceptionally stable and can be introduced in a wide range of macromolecules.

Variety of the starting monosubstituted alkynes and organic azides are commercially available, or even can be easily be synthesized with a wide range of functional groups.

Cycloaddition reaction selectively gives 1,2,3-triazoles. Several reviews have previously developed applications of the triazole chemistry in many areas [16-19]. The copper(I)-catalyzed 1,2,3-triazole formation from azides and terminal acetylenes is a particularly powerful linking reaction, due to its high degree of dependability, complete specificity, and the bio-compatibility of the reactants. The triazole products are more than just passive linkers; they readily associate with biological targets, through hydrogen bonding and dipole interactions [6].

In spite of the undisputable success of the concept of click chemistry within just a few years, there are still some limitations associated with the concept. Exogenous metals can have mild to severe cytotoxic effects and can thus disturb the delicate metabolic balance of the systems being studied [2]. However, copper is believed to be cytotoxic and demonstrated side effects associated with excessive copper intake include hepatitis, Alzheimer's disease and neurological disorders [20, 21].

For click reactions to be used in contact with living systems, the copper catalyst must be completely removed or alternatives must be employed.

Remarkable progresses have been made in recent years in the exploration of metal-mediated, as well metal-free click polymerization systems and in the syntheses of linear and hyperbranched polytriazoles with regioregular molecular structures and advanced functional properties [22].

A non-catalytic variation of the 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition was also utilized with interesting applications in the biochemical area, because of the removal of copper toxicity [23, 24].

A subclass of click reactions which components are inert to the surrounding biological milieu is termed bioorthogonal [25]. This goes one step beyond the typical definition of a click reaction because of the added complications of biocompatibility.

A group of these bioorthogonal reactions that are cycloadditions lacking exogenous metal catalysts, the so-called Cu-free click reactions are another aspect of practical application of click chemistry.

Azides are also often associated with potential toxic side effects, as may bear a very real explosive potential [19]. But the appearance of  $\text{NaN}_3$  and organic azides in azide-alkyne cycloaddition reactions was the first step to overcome pre-existing azidophobia. In organic chemistry azides are precursors to amines while participating in the "click reaction", which is generally quite reliable.

Sodium azide is very toxic, similar to sodium cyanide. The use of additional metals as well as halogenated solvents such as dichloromethane in the presence of the sodium azide must be avoided. Dealing with organic azides "Smith's rules" must be followed to keep compound non-explosive: (i) the number of nitrogen atoms ( $NN$ ) must not exceed that of carbon ( $NC$ ), and (ii)  $(NC + NO) / NN \geq 3$  [26]. Similarly, the "rule of six" indicates that six carbons (or other atoms of about the same size) per azide provides sufficient dilution to render an organic azide relatively safe.

Some azides are valuable as bioorthogonal chemical reporters [27], and can be carried out in an aqueous environment at physiological temperatures, and also have high efficiency.

In addition, azides for surface decoration of polymer are favorable as they are pluripotent reactants, which eagerly establish hydrogen bonds, also bind to polysaccharides, amino groups and

---

other molecules. Thus, polymeric nanoparticles decorated with the azides-functionalized surface corona opens up the possibility to address challenges in targeted drug delivery [28].

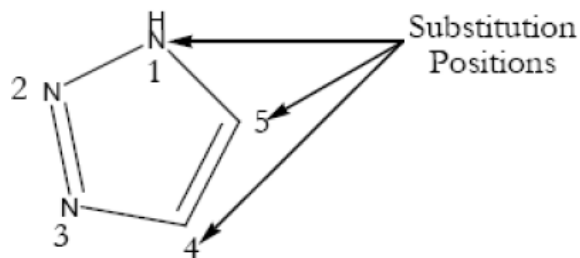
Regardless existing limitations and challenges, click polymerization has promising opportunities and directions to serve as a versatile tool for the construction of new macromolecules with well-defined structures and multifaceted functionalities.

The benefits of the click reaction, namely high yields and biocompatibility, enable the very efficient application of this cycloaddition reaction to the synthesis of molecular architectures for their general application in living systems.

### Triazoles in medical applications

Triazole compounds containing three nitrogen atoms in the five-membered aromatic azole ring are readily able to bind with a variety of enzymes and receptors in biological system via diverse non-covalent interactions, and thus display versatile biological activities (**Figure 1**).

The development of 1,2,3-triazoles for drug discovery and industrial use has been shown to be very promising [29]. The uses for triazoles have been found in various areas and are continuously growing. The applications of these triazoles are increasingly found in all aspects of drug discovery. These triazole products are more than just passive linkers; they readily associate with biological targets, through hydrogen bonding and dipole interaction [6]. Derivatives of 1,2,3-triazole have been found to have anti-HIV [30], anti-allergenic [31], antimicrobial, cytostatic, virostatic, anti-inflammatory [32] and anti-bacterial [33], but also fungicidal and herbicidal activities [34, 35]. Triazoles are also being studied for the treatment of obesity [36] and osteoarthritis [37]. They have xenobiotic metabolizing enzyme Cytochrome P450 aromatasa inhibitory effect, thus widely used as anti-estrogen in cancer treatment and for relevant applications [38].



**Figure 1.**

The increased interest in the 1,2,3-triazole is due to it being non-toxic, benign and stable. Triazoles are particularly interesting for medicinal use because they are more likely to be water soluble than normal aromatic compounds, and are stable in biological systems [39].

This allows for the applications of 1,2,3-triazoles to grow exponentially due to their reliability, tolerance to a wide variety of functional groups, regiospecificity and the readily available starting materials. Through this, 1,2,3-triazoles are very attractive to use and apply in many fields.

Historically there have been many creative methods devised to synthesize 1,2,3-triazoles ranging from complex, step-by-step processes of structural transformation, to the simple cycloaddition of an azide and an alkyne.

The synthesis for the 5-membered triazole ring is accomplished through a synthetic approach known as “click chemistry”. The syntheses of a variety of 1,2,3-triazoles have been carried out via a new “green” synthetic method which involves the absence of solvent and catalyst, and is carried out using a microwave irradiation [40]. This synthetic method provides a fast and efficient technique to obtain various types of triazoles in good to excellent yields.

#### **General concepts of azide–alkyne cycloaddition reaction with triazole ring formation**

The products of the click reaction is 1,2,3-triazole, which is a desired target as provides additional functionality, such as hydrogen bonding and coordination prospects. 1,2,3-triazole finds use in research as a building block for more complex chemical compounds, including pharmaceutical drugs.

The perspectives of the foreseeable future in the research and development of triazole-based compounds are also sought rational designs of more active and less toxic triazole medicinal drugs [41, 42].

Specifically, click chemistry has been applied to address dendrimer synthetic concerns. Dendrimer synthesis will dramatically improve as additional clean, efficient reactions are developed to create non-immunogenetic, biofunctional scaffolds [18, 38, 43-46].

Another issue concerns the generation of surface-modification of dendrimers with a high density of outer azide–alkyne moieties, which subsequently are reacted with the appropriate functional groups, capable of attaching a large number of these moieties into the outer shell of the respective dendrimer [6, 32, 47-51].

Triazole containing dendrimers can be generated by convergent or divergent methods, using the azide-alkyne click reaction as internal bond for the synthesis. This can lead to hyperbranched

---

polymers either in one step or via sequential reaction [52-56]. CuAAC reaction has been widely employed to synthesize or modify various dendrimers [38, 57-59].

The whole dendrimer structure may be assembled via the azide-alkyne click reaction, using appropriately functionalized dendrons [1, 2, 6, 7, 43, 60].

A large variety of different dendrimers, such as triazole-containing dendrimers in each generation have been prepared, where the buildup of the central structure has been achieved by linking azide-alkynes [20, 61, 62]. Two monomers (Cl and alkyne) are reacted with an azide in the first step, and in the second step Cl is replaced by an azide using sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ). The generations are grown by repeating both steps up to higher generations. They are coupled to a certain core to afford the corresponding dendrimers.

### **Materials and methods**

ChemDraw was used for selection of starting molecules for the synthesis of core to demonstrate synthetic strategy for dendrimers linked by the 1,2,3-triazole units containing in each generation of corresponding generation. Click cycloaddition performed between the azide and alkyne selected from the virtual library to obtain 1,2,3-triazole ring in each generation, then subsequent generations obtained similarly. Each new generation of dendrimers has corona decorated with azide group, which is reacted with alkyne group.

Initially the core was synthesized to start polymerization reaction by azide alkyne cycloaddition assisted by microwave irradiation instead of Cu (I) catalyzed. Polymerization is held in two sets, by applying growth and activation reactions. First, by putting together two compounds: alkyne (acetylene) containing compound and terminal organic azide containing core as backbone molecule. After successful termination of this reaction, on the next step, is performed substitution of terminal chloride by azide group adding sodium azide. Cycloaddition reaction is resulted in formation of the internal triazole ring and terminal azide groups which are increased in number with every subsequent generation. Presence of terminal azide molecules provides platform for the continuous polymerization reaction by azide-alkyne cycloaddition. Obtained model system of dendrimer contains terminal azide molecules and internal triazole ring for further analysis to track synthesis pathway.

At the  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy is possible to analyze terminal azide by counting protons. In case of non-complete reaction, proton content will be altered, which provides analytical tool for the follow-up strategies of chemical synthesis.



MNova software is used for the processing of NMR spectra of molecular structure.  $^1\text{H}$  NMR spectra of the azide and triazole of compound has been calculated by means of MestReC software.

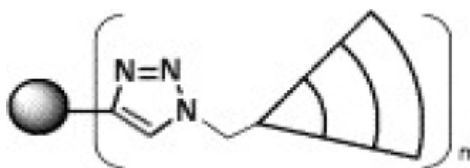


Figure 2.

### Results and discussion

In the **Figure 2** is presented the schematic demonstration of the model of dendrimer containing the core and 1,2,3-triazole group in each generation and terminal azides, while  $N$  is the generation number.

1,2,3-triazole group is a surprisingly stable structure compared to other organic compounds with three adjacent nitrogen atoms. Cleavage is possible at the site of methylene group of ester by means of protease, or influence of pH, or due to photo-sensibility of this locus.

The dendrimer core obtained by cycloaddition reaction contains three azide molecules on the surface corona which is corresponding to six protons of hydrogen molecules (**Figure 3**). Obtained 1st generation of dendrimer contains 6 molecules of azide, which is corresponding to 12 protons. On the spectra are detected 12 protons of the ester from methylene group and 6 protons of triazole ring. In every subsequent generation is doubled amount of protons corresponding to organic azide, thus 2nd generation contains 24 protons corresponding to 12 azide molecules; 36 protons of ester and 18 of triazole ring. In the 3rd generation are 48 protons corresponding to 24 molecules of azide; 96 protons of ester and 42 of triazole ring. This prediction spectrum could be compared with the real time NMR analysis of the reaction.

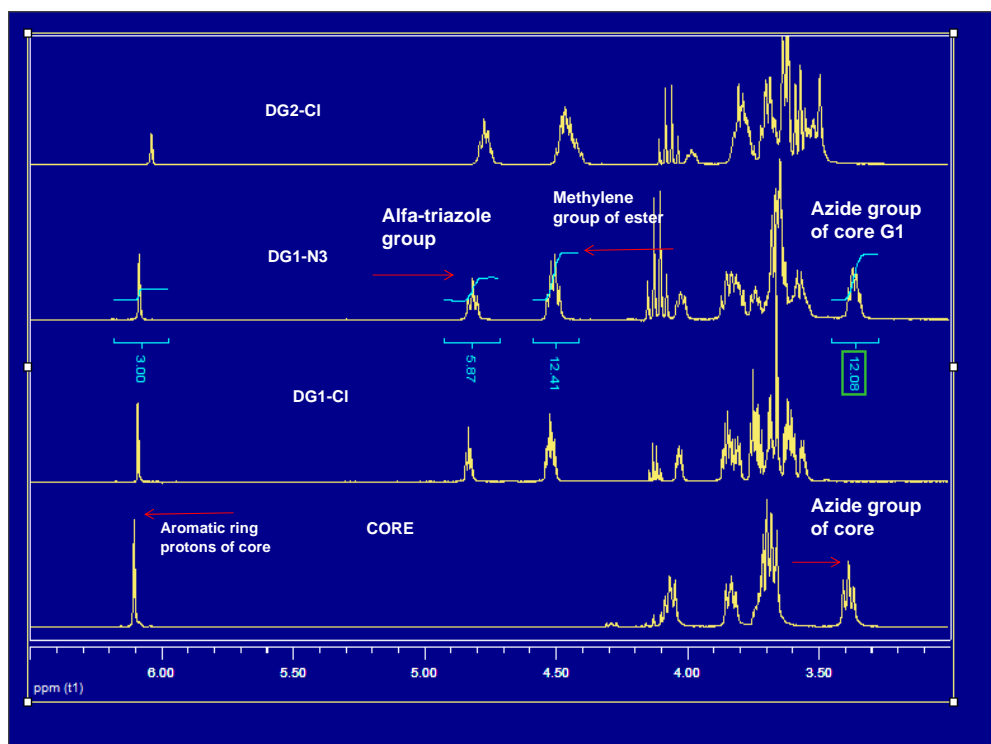


Figure 3.

---

NMR prediction model is dedicated to compare real time results of the synthesized dendrimers to ensure that reaction is complete and to follow-up reactions with upper generations. This feedback control helps to avoid synthetic pitfalls and to control the efficacy of chemical reaction on every stem of synthesis.

Based on data obtained, the optimized structural parameters can well reproduce and they are the bases for thereafter discussion.

### **NMR spectra results**

The experimental and theoretical values for  $^1\text{H}$  NMR are calculated, and structural parameters of the compound are given in Fig.3

The theoretical  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of compound have been compared with the experimental data.

The experimental  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the compound is investigated and it can be seen that total number of protons are in agreement with the integration values presented in this spectrum. (Fig.3)

According to these results, the calculated chemical shifts and coupling constants are in compliance with the experimental findings.

The experimental and the theoretical investigation of the title compound have been performed successfully by using NMR. It is shown that the results of  $^1\text{H}$  NMR spectrum are in agreement with all the experimental findings. NMR spectroscopy provides valuable tool to track synthesis pathway of terminal azide and triazole containing molecules.

### **Conclusion**

A variety of experimental methods and techniques have been used for structural characterization of the practical and theoretical importance of organic azides.

As a part of our ongoing studies on terminal azides and triazoles, we consider the NMR characterization of model system as analytical tool to track synthesis pathway of organic azides.

Azide and triazole molecule containing compound has been synthesized and characterized by NMR. Predicted spectroscopy model have been assigned and compared with experimental NMR spectra and they support each other for analyzing synthesis pathway of azide and triazole compound.

The theoretical  $^1\text{H}$  NMR spectra of terminal azide molecules have been calculated by using MestReC Software. Spectral analysis results show that the predicted parameters can well reproduce the structure of compound.

Comparison between the experimental and the theoretical results indicates that this method is able to provide satisfactory results for prediction of NMR properties.

## References

1. J. Lahann. *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*. 2009, John Wiley & Sons, Ltd.
2. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 11, 2004-2021.
3. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 14, 2596-2599.
4. R. Lucas, R. Zerrouki, P. Krausz. And if everything was as easy as a "click". Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition between terminal alkynes and azides. *L'actualité Chim.*, 2009, 335, 1, 5-9.
5. R. A. Evans. The rise of azide-alkyne 1,3-Dipolar 'click' cycloaddition and its application to polymer science and surface modification. *Australian J. Chem.*, 2007, 60, 6, 384-395.
6. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 9, 3057-3064.
7. American Peptide Society (Eds. M. Lebl, R. A. Houghten). 2001, San Diego: Kluwer Acad. Publ., 263-264.
8. P. Wu, M. Malkoch, J. Hunt. Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *Chem. Commun.*, 2005, 41, 46, 5775-5777.
9. D. Fournier, R. Hoogenboom, U. Schubert. Clicking polymers: A straightforward approach to novel macromolecular architectures. *Chem. Soc. Rev.*, 2007, 36, 9, 1369-1380.
10. H. Nandivada, X. W. Jiang, J. Lahann. Click chemistry: Versatility and control in the hands of materials scientists. *Adv. Mater.*, 2007, 19, 17, 2197-2208.
11. J. F. Lutz. 1,3-dipolar cycloadditions of azides and alkynes: A universal ligation tool in polymer and materials science. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 7, 1018-1025.
12. W. H. Binder, C. Kluger. Azide / alkyne-'click' reactions: Applications in material science and organic synthesis. *Curr. Org. Chem.*, 2006, 10, 14, 1791-1815.
13. J. E. Hein, V. V. Fokin. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: New reactivity of copper (I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 4, 1302-1315.
14. W. H. Binder, R. Sachsenhofer, "Click" chemistry in polymer and materials science. *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, 28, 1, 15-54.

- 
15. C. Hartmuth, H. C. Kolb, K. B. Sharpless. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today*, 2003, 8, 24, 1128-1137.
  16. V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. Maarseveen. CuI-catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 1, 51-68.
  17. A. Dondoni. Triazole: The Keystone in glycosylated molecular architectures constructed by a click reaction. *Chem. Asian J.*, 2007, 2, 6, 700-708.
  18. G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.*, 2007, 28, 2, 278-308.
  19. M. Meldal, C. W. Tornøe. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.*, 2008, 108, 8, 2952-3015.
  20. Gaetke L. M. and Chow C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients *Toxicology*, 2003, 189, 147–163.
  21. T. Wang, Z. J. Guo. Copper in medicine: Homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2006, 13, 5, 525-537.
  22. A. Qin, J. Lam, B. Tang. Click polymerization: Progresses, challenges, and opportunities. *Macromol.*, 2010, 43, 21, 8693-8702.
  23. N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 5, 15046-15047.
  24. J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 43, 11486-11493.
  25. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 38, 6974-6998.
  26. S. Braese, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann. Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 33, 5188-5240.
  27. M. D. Best. Click chemistry and bioorthogonal reactions: Unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochem.*, 2009, 48, 28, 6571-6584.
  28. S. Zhang, K. Chan. R. Prud’homme, A. Link. Synthesis and evaluation of clickable block copolymers for targeted nanoparticle drug delivery. *Mol. Pharmaceutics*, 2012, 9, 2, 2228-2236.

29. C. H. Zhou, Y. Wang. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 2, 239-280.
30. R. Alvarez, S. Velazquez, A. San-Felix, S. Aquaro, E. de Clercq, C. F. Perno, A. Karlsson, J. Balzarini, M. J. Camarasa. 4- or 5-monosubstituted and 4,5-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of the anti-HIV-1 lead compound. *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 24, 4185-4194.
31. D. R. Buckle, C. Rockell, H. Smith, B. A. Spicer. Studies on 1,2,3-triazoles with combined H1-antihistamine and mast cell stabilizing properties. *J. Med. Chem.*, 1986, 29, 11, 2262-2267.
32. A. R. Katritzky, A. J. Boulton. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 16. 1974, New York: Academic Press Inc., 34.
33. M. J. Genin, D. A. Allwine, D. J. Anderson, M. R. Barbachyn, D. E. Emmert, S. A. Garmon, D. R. Graber, K. C. Grega, J. B. Hester, D. K. Hutchinson, J. Morris, R. J. Reischer, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi. Substituent effects on the antibacterial activity of nitrogen-carbon-linked (azolylphenyl) oxazolidinones with expanded activity against the fastidious gram-negative organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 5, 953-970.
34. U. Gisi, H. Sierotzki, A. Cook, A. McCaffery. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.*, 2002, 58, 9, 859-867.
35. M. B. Klix, J.-A. Verreet, M. Beyer. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protec.*, 2007, 26, 4, 683-690.
36. L. L. Brockunier, E. R. Parmee, H. O. Ok, M. R. Candelore, M. A. Cascieri, L. F. Colwell, L. Deng, W. P. Feeney, M. J. Forrest, G. J. Hom, D. E. MacIntyre, L. Tota, M. J. Wyvratt, M. H. Fisher, A. E. Weber. Human beta 3-adrenergic receptor agonists containing 1,2,3-triazole-substituted benzenesulfonamides. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2000, 10, 18, 2111-2114.
37. J. S. Tullis, J. C. van Rens, M. G. Natchus, M. P. Clark, B. De, L. C. Hsieh, M. J. Janusz. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 10, 1665-1668.
38. M. J. Balunas, B. Su, S. Riswan, H. H. Fong, R. W. Brueggemeier, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn. Isolation and characterization of aromatase inhibitors from *brassaiopsis glomerulata* (araliaceae). *Phytochem. Lett.* 2009, 19, 2, 1, 29-33.

- 
39. N. Kaval, D. Ermolat'ev, P. Appukkuttan, W. Dehaen, C. O. Kappe, E. van der Eycken. The application of "click chemistry" for the Decoration of 2(1H)-pyrazinone scaffold: □ Generation of templates. *J. Comb. Chem.*, 2005, 7, 3, 490-502.
  40. K. Savin, M. Robertson, D. Gernert, S. Green, E. Hembre, J. Bishop. A study of the synthesis of triazoles using microwave irradiation. *Mol. Diversity*, 2003, 7, 2-4, 171-174.
  41. C. H. Zhou, Y. Wang. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 2, 239-280.
  42. S. Svenson, D. Tomalia. Dendrimers in biomedical applications – Reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, 57, 15, 2106-2129.
  43. P. Antoni, D. Nystrom, C. J. Hawker. A chemoselective approach for the accelerated synthesis of well-defined dendritic architectures. *Chem. Commun.*, 2007, 43, 22, 2249-2251.
  44. C. N. Urbani, C. A. Bell, D. E. Lonsdale. Reactive alkyne and azide solid supports to increase purity of novel polymeric stars and dendrimers via the click reaction. *Macromol.*, 2007, 40, 19, 7056-7059.
  45. R. K. o' Reilly, M. J. Joralemon, C. J. Hawker. Synthesis and applications of click-functionalized dendrimers as crosslinkers for nanoparticle delivery agents. *PMSE Preprint*, 2005, 46, 1, 92-93.
  46. R. Vestberg, M. Malkoch, M. Kade. Role of architecture and molecular weight in the formation of tailor-made ultrathin multilayers using dendritic macromolecules and click chemistry. *J. Polymer Sci. A*, 2007, 45, 14, 2835-2846.
  47. E. Fernandez–Megia, J. Correa, I. Rodriguez–Meizoso, R. Riguera. A click approach to unprotected glycodendrimers. *Macromol.*, 2006, 39, 6, 2113-2120.
  48. E. Fernandez–Megia, J. Correa, R. Riguera. Clickable PEG-dendritic block copolymers. *Biomacromol.*, 2006, 7, 11, 3104-3111.
  49. R. K. o' Reilly, M. J. Joralemon, C. J. Hawker. Preparation of orthogonally functionalized core click cross-linked nanoparticles. *New J. Chem.*, 2007, 31, 5, 718-724.49.
  50. M. Malkoch, K. Schleicher, E. Drockenmuller. Structurally diverse dendritic libraries: A highly efficient functionalization approach using click chemistry. *Macromol.*, 2005, 38, 9, 3663-3678.
  51. D. mc Nerny, D. Mullen, I. Majoros, M. Holl, J. Baker Jr. Dendrimer synthesis and functionalization by click chemistry for biomedical applications. In: *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science* (Ed. J. Lahann). 2009, John Wiley & Sons, Ltd.
  52. P. Vogt, S. R. Gondi, B. S. Sumerlin. Hyperbranched polymers via RAFT copolymerization of an acryloyl trithiocarbonate. *Australian J. Chem.*, 2007, 60, 6, 396-399.

53. J. Scheel, H. Komber, B. I. Voit. Novel hyperbranched poly([1,2,3]-triazole)s derived from AB<sub>2</sub> monomers by a 1,3-dipolar cycloaddition. *Macromol. Rapid Commun.*, 2004, 25, 12, 1175-1180.
54. M. Smet, K. Metten, W. Dehaen. Synthesis of new AB<sub>2</sub> monomers for polymerization to hyperbranched polymers by 1,3-dipolar cycloaddition. *Coll. Czech Chem. Commun.*, 2004, 69, 5, 1097-1108.
55. D. E. Bergbreiter, B. S. Chance. Click-based covalent layer-by-layer assembly on polyethylene using water-soluble polymeric reagents. *Macromol.*, 2007, 40, 15, 5337-5343.
56. G. W. Goodall, W. Hayes. Advances in cycloaddition polymerizations. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 3, 280-312.
57. M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, J. B. Matson. Dendrimers clicked together divergently. *Macromol.*, 2005, 38, 13, 5436-5443.
58. M. J. Joralemon, A. K. Nugent, J. B. Matson. Clicking together dendritic macromolecular divergently. *PMS E Preprint*, 2004, 91, 195.
59. Q. Liu, P. Zhao, Y. Chen. Divergent synthesis of dendrimer-like macromolecules through a combination of atom transfer radical polymerization and click reaction. *J. Polymer Sci. A*, 2007, 45, 15, 3330-3341.
60. W. H. Binder, R. Sachsenhofer. Click chemistry in polymer and material science: An update. *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, 29, 12-13, 952-981.
61. J. W. Lee, B. K. Kim, H. J. Kim, S. Ch. Han, W. S. Shin, S.-H. Jin. Convergent synthesis of symmetrical and unsymmetrical PAMAM dendrimers. *Macromol.*, 2006, 39, 6, 2418-2422.
62. C. J. Hawker, K. L. Wooley. The convergence of synthetic organic and polymer chemistries. *Science*, 2005, 309, 5738, 1200-1205.

### General methods and materials

Solvents and reagents for synthesis were obtained from Sigma-Aldrich. Thin layer chromatography (TLC) was run on Sorbtech W/UV254 plates (0.25 mm thick), and visualized under UV-light. Flash chromatography was performed using Fluka silica gel 60 (mesh size 0.040-0.063 mm). <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz NMR spectrometer as the internal reference.

### Synthesis

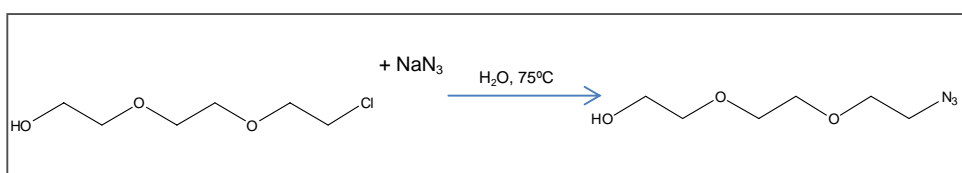
Core was synthesized following literature procedures. At the beginning an organic azide compound is prepared from the sodium azide and triethylene glycol monochlorohydrin (Sigma Aldrich). Then is held tosylation reaction by adding tosyl chloride. Final step is adding benzene-1,3, 5-triol.

T1 - 1st step

17-Sept-2012

1 compound

2 compound



| compounds        | Mw (g/mol) | g     | (Eqv) Mol      | ml |
|------------------|------------|-------|----------------|----|
| 1                | 168,62     | 20    | (1eqv) 0,1186  |    |
| NaN <sub>3</sub> | 65,01      | 15,42 | (2 eqv) 0,2372 |    |
| 2                | 175,19     | 20,78 |                |    |
| H <sub>2</sub> O |            |       |                | 58 |

I - Preparation of 2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol solution (3) according to procedure described in literature from the Triethylene glycol monochlorohydrin (Sigma Aldrich) or 2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxy]ethanol (2) Cl(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH or C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>.

Compound (2) (20 g, 0.1186 mol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (58 mL) in a round-bottom flask provided with a NaOH drying tube.

Then, NaN<sub>3</sub> (15,42 g, 0,2372 mol) was added and the reaction mixture was heated at 75°C while stirring for 48 h.

Upon completion of the reaction, the mixture was cooled down to room temperature. H<sub>2</sub>O was evaporated under reduced pressure (20 mm Hg) in a rotary evaporator (bath temperature: 40 °C), and condensed over NaOH pellets (1 g) to trap any HN<sub>3</sub> potentially produced. Additionally, the system was provided with a NaOH tower between the rotary evaporator and the vacuum pump to avoid accumulation of heavy metal azides on metal components.

The resulting residue was suspended in Et<sub>2</sub>O (0,5 L) and filtered through a sintered funnel (porosity 5). The filtrate was evaporated to afford 3.

Colorless liquid 2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol is obtained 20,6559g (yield = 99,4%).

Reference: S.Amaral et al. Org. lett. vol.13 .17 2011



T2 - 2nd step

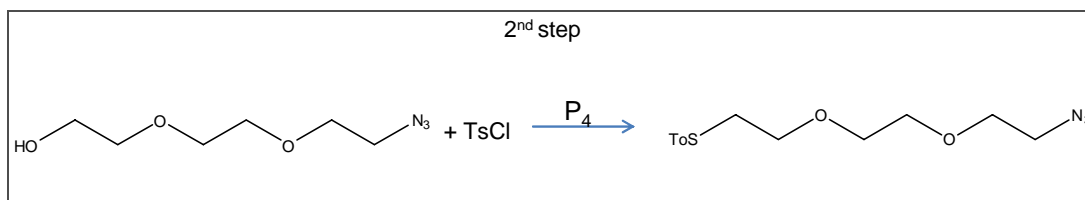
01 Oct 2012

tosylation reaction

Complex tosyl azide organic molecule obtained

1 compound

2 compound



| compounds                       | Mw (g/mol) | g       | (Eqv) Mol   | ml    |
|---------------------------------|------------|---------|-------------|-------|
| 1                               | 175,19     | 20,6559 | (1) 0,1179  |       |
| TsCl                            | 190,65     | 29,39   | (1,3) 0,154 |       |
| Py                              | 79,10      | 18,76   | (2) 0,2372  | 19,12 |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 329,37     | 38,835  |             | 100   |

## II Preparation of 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-p-toluenesulfonate

2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol (20,6559 g, 0,1179mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL).

Pyridine (19,12 mL, 0,2372 mmol) was added, and the mixture was cooled to 0 °C.

Then, TsCl (29,39 g, 0,154 mmol) was added in portions over a 20 min period, and the resulting solution was allowed to warm to room temperature.

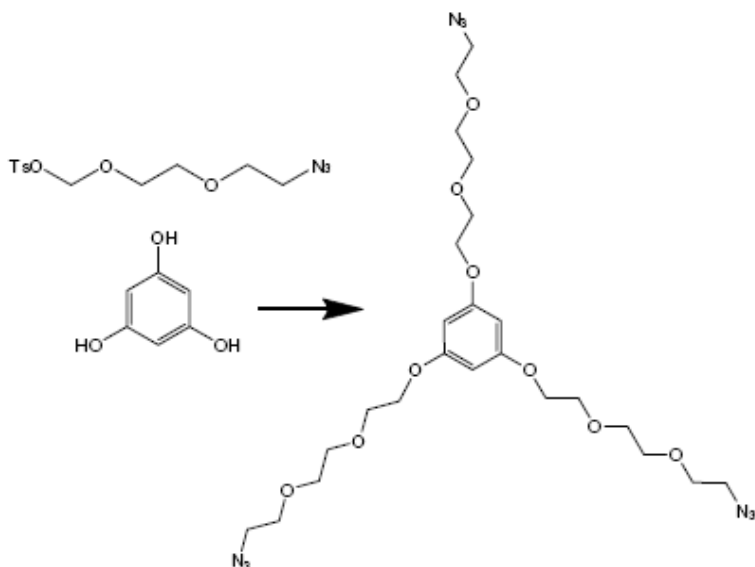
After 12 h of stirring, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> (15 mL) and washed with aqueous HCl (200 mL, 3%) and brine-sodium chloride (200 mL).

The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated to give a crude product that was purified by silica gel chromatography (EtOAc/hexanes, 1:2.5) to afford 6 a colorless oil 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-p-toluenesulfonate (27,392 g; yield 71%).

Reference: F. Megia et al. Macromolecules, vol 39, 6, 2006

## Synthesis of the core of the dendrimer

The core 3 is prepared from (1) and benzene-1,3, 5-triol (2).



| compound                       | Mw (g/mol) | g     | (Eqv) Mol        | ml                 |
|--------------------------------|------------|-------|------------------|--------------------|
| 1                              | 329,37     | 4,3 g | (1) 13,068       |                    |
| DMF                            |            |       |                  | 32,67 ml<br>(0,4M) |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 138,21     | 5,47  | (10) 39,6 mmol   |                    |
| EterCr18                       | 264,32     | 0,105 | (0,1) 0,396 mmol | 100                |
| 2                              | 126,11     | 0,5   | (1) 3,96 mmol    |                    |
| 3                              | 597,29     | 7,798 |                  |                    |

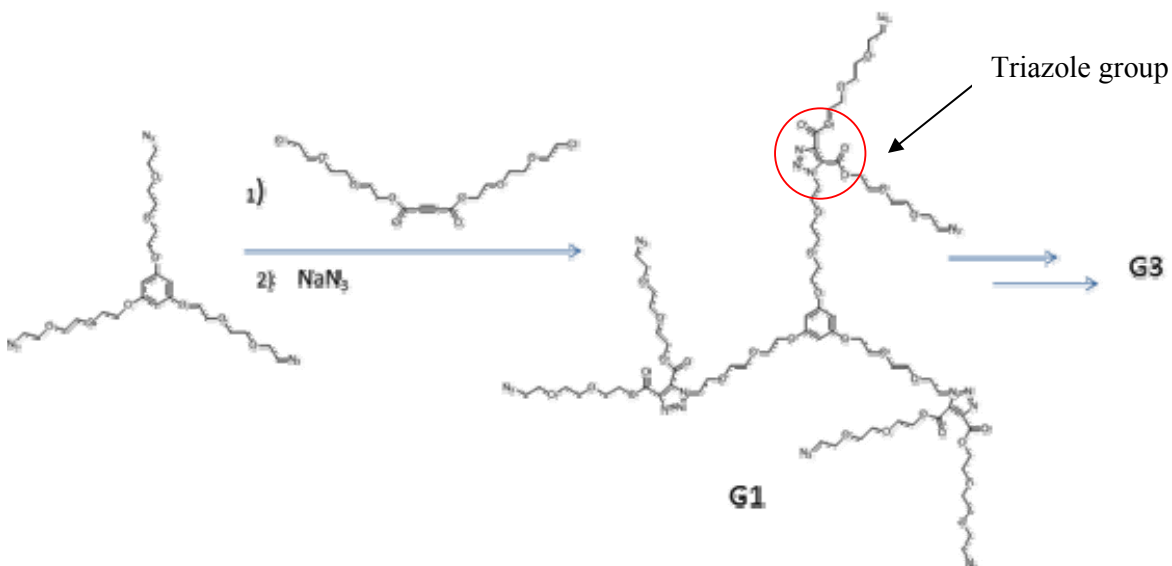
A mixture of (1) (4,3 g; 13,068 mmol), benzene-1,3, 5-triol (2) (0,5 g; 126,11 g/mol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,47 g; 39,6 mmol) in DMF (32,67 ml, 0,4 M) was heated at 100°C for 48 hours at 5:30pm of 2012-10-08.

It was allowed to reach room temperature (rt) and was partitioned between EtOAc (300 ml) and H<sub>2</sub>O (300 ml).

The aqueous phase was extracted with EtOAc (2x200 ml). The combined organic phase was washed with brine (200 ml) and then was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated to give a crude product, that was purified to ISCO (chromatograph) to afford compound (3) as a colorless oil 1,764 g (75% yield).

Azide-Alkyne Cycloaddition reaction provides formation of Triazole group between core and repeated unit in this way forming first generation (G1) of dendrimer.

- To obtain the dendrimer of generation 1 (G1) by thermal Azide-Alkyne cycloaddition (TAAC) consisting of two reactions, the 1<sup>st</sup> is the growth reaction, the 2<sup>nd</sup> is activation reaction.
- Growth reaction is performed by adding the repeated unit (RU) containing internal (or sometimes terminal) alkyne group to the core. Equivalent amount of solvent ethyl acetate is added and undergoing microwave exposure during 5 minutes under the temperature control in limit of 100 grad Celsius and power 300.
- After this is followed activation reaction by performing substitution of terminal chloride by azide group by adding sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ).
- The dendrimers of Generation 2 (G2) and Generation 3 (G3) are prepared using the same method as in case of G1.
- In these reactions we use heating in microwave instead of the Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), thus providing more safe, non-toxic, fast and greener synthesis of new chemical compound.



## Differences in Antioxidant/Protective Efficacy of Hydrated C<sub>60</sub> Fullerene Nanostructures in Liver and Brain of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes

Victor Nedzvetsky<sup>1</sup>, Grigoriy Andrievsky<sup>2</sup>, Tamar Chachibaia<sup>3</sup> and Artem Tykhomyrov<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics and Biochemistry, Dniepropetrovsk National University, Dniepropetrovsk, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Physiologically Active Compounds (IPAC) LLC, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>High Technology Medical Center, University Clinic, Tbilisi, Georgia

<sup>4</sup>Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Kyiv, Ukraine

### Abstract

**Background:** Diabetes mellitus causes damage to many vital organs, including brain and liver, mostly due to excessive free radical generation and development of oxidative stress. Some water-soluble forms of C<sub>60</sub> fullerene and their hydrated nanostructures are proposed for prevention as well as treatment of various pathological conditions caused by oxidative stress.

**Aim of the study:** Assessment and comparison of antioxidant effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>-HyFn) in brain and liver of rats with experimental streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemia and evaluation of possible neuroprotective capacity of C<sub>60</sub>-HyFn acting as potent agent to suppress reactive astrogliosis.

**Materials and methods:** To induce hyperglycemia, male Wistar rats received single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ in a dose of 45 mg/kg body weight (b.w). Thirty five rats were divided into 5 groups (7 animals per group): Group I (control, saline-injected rats); Group II (STZ-diabetic rats); Group III (rats injected with C<sub>60</sub>-HyFn in a dose of 0.3 mg/kg b.w-C<sub>60</sub>-HyFn control); Group IV (rats received single i.p. injection of C<sub>60</sub>-HyFn in the same dose one week prior to STZ injection – prophylactic regime); Group V (rats received single i.p. injection of C<sub>60</sub>-HyFn in the same dose one week after development of stable hyperglycemia–therapeutic regime). The following parameters were assessed in the groups of control and experimental animals: blood glucose concentration, levels of end-products of lipid peroxidation (LPO) and carbonylated proteins as markers of protein oxidative modifications (POM) in liver and brain tissues. Levels of astrogliosis in various sections of rat brain were monitored as additional parameter of C<sub>60</sub>-HyFn neuroprotection. Immunohistochemical and immunohistochemical determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) as sensitive marker of astrocyte response were applied to evaluate intensity of astrocyte reactivity.

**Results:** STZ induced consistent hyperglycemia accompanied by extended oxidative damage of lipids and proteins in rats' central nervous system (CNS) and liver. Beneficial effects of C<sub>60</sub>-HyFn on oxidative status in liver of rats with hyperglycemia were observed in both regimes of administration. However, C<sub>60</sub>-HyFn markedly reduced abnormally high levels of macromolecule oxidation in diabetic brain tissues only when used in therapeutic regime. In addition, diabetic rats were characterized by significant elevation of GFAP levels due to increase of astrocyte reactivity in brain cortex and hippocampus. C<sub>60</sub>-HyFn treatment restored GFAP levels near to normal supposedly by lowering of astrogliosis caused by hyperglycemia. Though, C<sub>60</sub>-HyFn, serving as high-performance antioxidant and alleviating harmful side-effects of diabetes such as oxidative stress, does not affect the blood glucose levels in diabetic rats and therefore not remove the prime cause of metabolic disturbance.

**Conclusion:** Nanostructures of hydrated C<sub>60</sub> fullerene have been shown to exert beneficial effects in brain and liver of rats with STZ-induced diabetes mainly through the diminution of oxidative stress and can be applied for prevention and treatment of diabetic complications such as liver injury and neuropathy.

**Keywords:** Hydrated C<sub>60</sub> fullerene; Streptozotocin (STZ)-induced diabetes; Oxidative stress; Liver; Brain; Astrogliosis; Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

### Introduction

Oxidative stress accompanies development of numerous complications of diabetes mellitus [1]. Hyperglycemia induces redox reaction disturbances, which is resulted in alterations in nerves, as well as neuronal degeneration, leading, on one hand, to dysfunction of peripheral nerve conductivity, and, on the other hand, neuronal damage in central nervous system (CNS), which may contribute to behavioral impairments and memory disturbances [2,3]. Liver is also affected due to free radical injuring action, and resulted fatty changes in the liver is another contributing factor in constellation of signs of metabolic syndrome in diabetes [4]. It is well known that normal liver function is essential to sustain CNS health. Altered metabolism products accumulated due to hepatocyte dysfunction may cause disturbances in brain and contribute to CNS damage. It is important to note that

liver failure induced by various factors causes significant changes to supporting neurons cells called astrocytes [5]. Astrocytes are the most abundant cell type presented in the CNS. They provide metabolic and trophic support to neural cells, maintain the blood-brain barrier

**\*Corresponding author:** Artem Tykhomyrov, Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), 9 Leontovicha str, Kyiv, 01601, Ukraine, Tel: + 380507552855; E-mail: [artfullerene@gmail.com](mailto:artfullerene@gmail.com)

**Received** July 10, 2012; **Accepted** September 11, 2012; **Published** September 17, 2012

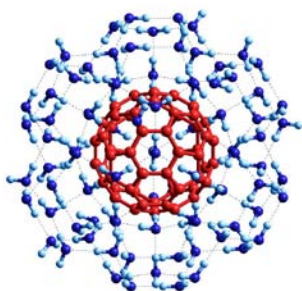
**Citation:** Nedzvetsky V, Andrievsky G, Chachibaia T, Tykhomyrov A (2012) Differences in Antioxidant/Protective Efficacy of Hydrated C<sub>60</sub> Fullerene Nanostructures in Liver and Brain of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. J Diabetes Metab 3: 215. doi:[10.4172/2155-6156.1000215](http://dx.doi.org/10.4172/2155-6156.1000215)

**Copyright:** © 2012 Nedzvetsky V, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

(BBB), modulate synaptic activity, and protect neurons against injury [6]. Several studies show that astrocytes are affected during diabetes [7,8]. The glial cells may exhibit the earliest and potent cellular reaction within the CNS in response to various damaging factors, well known phenomenon of so called reactive gliosis. Reactive astroglial cells are characterized by hypertrophy, hyperplasia and intense fibrillogenesis [9]. A key indicator of glial reactivity is an increased synthesis of glial fibrillary acidic protein (GFAP), an intermediate filament protein of astrocytic cytoskeleton [10,11]. This sensitive biomarker of neuronal injury is a parameter for standard neurotoxicity assessment [12,13]. It has been earlier demonstrated that in uncontrolled hyperglycemia during diabetes, chronic reactive gliosis exacerbates diabetic neuropathy [14,15]. The positive correlation between GFAP levels and excessive generation of reactive oxygen species (ROS) has been clearly documented [7]. The last fact makes possible to utilize GFAP as an additional parameter for evaluation of CNS injury extent, as well to assess efficacy of beneficial effect of potential neuroprotective agent tested in our experiment.

Therapeutic strategy and approaches to the pathogenesis of diabetic neuropathy and liver injury is focused on elimination of causes of cell damage, particularly oxidative stress, which has been demonstrated to play a central role [16,17]. In our study, we support the general understanding that deleterious effects induced by hyperglycemia in rats would be alleviated by means of the antioxidant treatment. Due to marked antioxidant activity, C<sub>60</sub> fullerene, the third natural allotropic form of carbon, and some of its water-soluble chemical derivatives have recently gained considerable attention as promising candidates for many biomedical applications, in particular, at neurodegenerative states as well as at liver failure [18-20]. In this regard, hydrated chemically non-modified C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>HyFn) possesses all necessary characteristics for the treatment of free radical-induced alterations [21,22], including some diabetic complications [23]. In 1995, Andrievsky et al. developed method of C<sub>60</sub>HyFn water solution (C<sub>60</sub>FWS) production [24]. Such solutions of C<sub>60</sub>HyFn contain single hydrated C<sub>60</sub> fullerene molecules as well as their labile nanoclusters (secondary associates). C<sub>60</sub>HyFn chemically is characterized as highly hydrophilic and highly stable donor-acceptor complexes of C<sub>60</sub> associated with molecules of water [25-27] (Figure 1). A great deal of information is accumulated concerning tissue-protective effects of C<sub>60</sub>HyFn including its neuroprotective, anticancer, anti-inflammatory, antiatherogenic action, mainly based on the powerful antioxidative capacity of C<sub>60</sub>HyFn, which is displayed even at its super-small concentrations and doses [22,28].

The present study was aimed to examine and compare the potential



**Figure 1:** Nanostructure of Hydrated C<sub>60</sub> Fullerene – stable supramolecular complex C<sub>60</sub> (red) with water molecules (blue) having unique physical-chemical and biological properties (<http://www.ipacom.com/index.php/en/publications-about-c60hyfn/92>).

protective effects of C<sub>60</sub>HyFn against oxidative stress in the CNS and liver tissues in diabetic rats. As additional parameter of C<sub>60</sub>HyFn neuroprotection, the levels of astrogliosis in different brain sections of rats have been monitored. The model of streptozotocin (STZ) diabetes that is thought to be the most appropriate animal model to study the etiology, prevention and treatment of diabetic complications, particularly diabetic neuropathy, was chosen [29,30]. To check whether C<sub>60</sub>HyFn acts as effective protective agent against diabetes-induced oxidative stress, the following parameters were studied in control and experimental animals: i) blood glucose concentration; ii) levels of products of lipid peroxidation (LPO); iii) levels of carbonylated proteins as products of protein oxidative modifications (POM); iv) GFAP levels, and v) astrocyte reactivity in various brain sections.

## Materials and Methods

### C<sub>60</sub>hyfn production, characterization and preparation of C<sub>60</sub>FWS

For C<sub>60</sub>FWS preparation (C<sub>60</sub>HyFn water solution), C<sub>60</sub> fullerene samples with purity of more than 99.5% (MER Corporation, Tuscon, AZ, USA) have been used. C<sub>60</sub>FWS was produced without using of any solubilizers or chemical modification. This method is based on transferring of fullerene from organic solution into the aqueous phase with the help of ultrasonic treatment. Having been modified and optimized the method of C<sub>60</sub>FWS preparation, now it is possible to obtain such solutions with C<sub>60</sub> concentration up to 5.5×10<sup>-3</sup> M (~4 mg/ml). Depending on C<sub>60</sub> concentration, C<sub>60</sub>FWS contains both single C<sub>60</sub>HyFn (C<sub>60</sub>@{H<sub>2</sub>O}<sub>n</sub>, where n=22-24) and their labile nanoclusters (secondary associates) with the size of 3-36 nm [24-26]. Preparation of C<sub>60</sub>HyFn with concentration of 8.88×10<sup>-4</sup> M was used as stock solution for preparing C<sub>60</sub>FWS prior the experiment.

### Animals, experimental design and induction of diabetes

Male Wistar rats, 35 individuals in total, aged 12-15 weeks and weighing 150-200 g, were used in this study. During the whole experimental period, the animals were kept in standard laboratory conditions (room temperature (22 ± 3°C), constant humidity, 12/12 h light/dark cycle, water and food were given *ad libitum*). The experimental protocols were reviewed and approved by the Regional Committee for the Ethical Use of Animals (Dnepropetrovsk, Ukraine).

After 1 week of acclimatization to laboratory conditions the rats were randomly divided into 5 groups, each containing 7 animals as follows:

- Group I: intact control (saline);
- Group II: STZ-diabetes;
- Group III: C<sub>60</sub>HyFn control;
- Group IV: C<sub>60</sub>HyFn before STZ (prophylactic regime);
- Group V: C<sub>60</sub>HyFn after STZ (therapeutic regime).

At the onset of the study, blood samples were collected from the tail vein of each rat for the measurements of blood glucose levels by means of glucose-oxidase kit ("Reagent", Dnepropetrovsk, Ukraine). Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of buffered solution (0.1 M citrate, pH 4.5) of streptozotocin (STZ) purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) in a dose of 45 mg/kg body weight. The animals were considered diabetic if blood glucose values were > 10 mM at 72 h after STZ administration. C<sub>60</sub>HyFn dissolved in sterilized and apyrogenic 0.9% NaCl was administered i.p. in a dose of 0.3 mg/kg



b.w. 1 week before STZ injection or 1 week after development of stable hyperglycemia. The control group (intact animals) received saline i.p. (0.5 ml per animal). One group was treated only with C<sub>60</sub>HyFn (0.3 mg/kg i.p.). All rats were then euthanized after 3 weeks since STZ injection; trunk blood was collected for glucose measurements, brain tissues were removed and cerebral cortex, hippocampus and cerebellum were dissected and taken for biochemical and immunochemical studies.

### Measurements of LPO and POM levels

Contents of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl bonds for evaluation of lipid peroxidation (LPO) levels and extent of protein oxidation modifications (POM) respectively in brain tissues of control and experimental animals were determined as described elsewhere [21] with minor modifications. Briefly, samples of whole brain tissues were homogenized in 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 ml of homogenates were taken and total protein fraction was separated from homogenates by precipitation with trichloroacetic acid (TCA) and further centrifugation for 15 min at 5000 g. The amount of LPO products was measured in the supernatants spectrophotometrically at  $\lambda=532$  nm using the thiobarbituric test and taking molar extinction coefficient  $\epsilon_{532}=1.56 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. For estimation of POM levels, intensity of protein carbonyl formation was assessed in protein pellets left after preceding centrifugation of tissue homogenates processed with TCA. 1 ml of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine in 2 M HCl was added to the pellets. Having been mixed and intensively stirred, the reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C and then centrifuged for 15 min at 5000 g. The pellets were rinsed triply with 1 ml ethanol/ethylacetate mixture (1:1 v/v). Washed pellets were resuspended and dissolved in 6M urea. Non-solubilized material was separated by centrifugation for 15 min at 5000 g. The content of protein carbonyl bonds was estimated in supernatants spectrophotometrically at  $\lambda=370$  nm taking molar extinction coefficient  $\epsilon_{370}=2.2 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### Protein sample collection

Fresh sections of brain tissues were homogenized (10% w/v) in 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and proteinase inhibitors (10  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The homogenates were centrifuged at 30 000 g for 1 h at 4°C. The supernatants contained soluble brain proteins; the pellets were abundant with water non-soluble fibrillary brain proteins. The pellets were resuspended in the same buffer additionally containing 4 M urea for solubilization of cytoskeletal proteins and then the samples were incubated during 12 h at 4°C. The homogenates were centrifuged in the same regime and the supernatants were collected, aliquoted and stored at 20°C. Protein in the samples was measured by the Bradford protein assay [31] using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### Western blotting

Samples and standard protein markers were subjected to polyacrylamide gradient gel (7÷17%) electrophoresis in the presence of 0.1% sodium dodecylsulphate (SDS) as described previously [32]. Proteins separated were transferred to nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell Inc., USA). Nonspecific binding was blocked by incubation with 3% BSA solution. The blots were incubated with primary rabbit antibodies against GFAP (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) at 1:2000 dilution. After overnight incubation (4°C), the blots were rinsed with Triton X-100-containing buffered saline (NaPBS+0.05% Triton X-100). Then blots were incubated for 1 h with a secondary antibody, a goat anti-rabbit Ig G peroxidase conjugate (Sigma Aldrich,

USA), at room temperature. Blots were visualized using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate [33]. The relative immunostaining intensity of bands on Western blots, which is proportional to antigen (GFAP) content, was quantified in arbitrary units by scanning blots and further calculating by computerized software program (LabWorks 4.0; UVP Inc., UK).

### Immunohistochemical assay

Brain fragments were fixed in 10% neutral buffered formalin for 12-24 h. After fixation, the tissue blocks were embedded in paraffin, then cut in a microtome to the desired thickness (approximately 5 microns) and affixed onto the slide. Tissue sections were mounted on positively charged or APES (amino-propyl-tri-ethoxy-silane) coated slides. Once mounted, the slides were accurately dried by leaving slides at room temperature overnight. For deparaffinization, slides were placed in a rack, and the following washes were performed: xylene (2×3 min), xylene 1:1 with 100% ethanol (3 min), 100% ethanol (2×3 min), 95% ethanol (3 min), 70% ethanol (3 min), 50% ethanol (3 min), and finally slides were rinsed in running cold tap water. Heat-induced antigen retrieval was carried out in Tris/EDTA buffer (pH 9.0) using a pressure cooker. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Tris buffer saline (TBS) for 15 min. After that, slides were washed 2×5 min in TBS plus 0.025% Triton X-100 with gentle agitation and then incubated in blocking solution (TBS with 3% BSA) for 2 h at room temperature. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody anti-GFAP 1/500 diluted in TBS. On the second day, slices were washed with TBS-Triton (3×5 min) and incubated (1 h at room temperature) with 1/300 diluted secondary antibody (peroxidase-conjugate anti-rabbit Ig G). After a rinse with TBS-Triton (3×5 min), antibody binding sites were revealed by DAB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS (pH 7.2) for 10 min then, after final rinse with TBS, counterstained with hematoxylin to visualize cell nuclei. Finally, sections were mounted on slides and covered with Eukitt balsam before image analysis. The tissue sections were examined using an upright optical microscope (Leika DM 2000, Leika Microsystems AG, Germany) coupled with a color camera.

### Statistical analysis

All data is expressed as Means  $\pm$  SEM. Significance of differences between groups was evaluated using two-way analysis of variances (ANOVA). When ANOVA showed a significant effect on the group on any of dependent variables, the Tukey-Kramer test was used for post hoc multiple comparisons. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Administration of C<sub>60</sub>HyFn does not affect glucose levels

Diabetes inductions was attempted in 23 male Wistar rats, of which 21 demonstrated consistent blood glucose levels greater than 10 mM and were included in the diabetes groups (7 individuals per group). One animal died of renal failure and one failed to become hyperglycemic. Animals were fed *ad libitum* and no dietary modification was used. Age-matched male rats served as intact or C<sub>60</sub>HyFn controls. All animals survived the entire experimental protocol.

The results of glucose measurements in animals, performed prior STZ injection and at the end of the study are presented in table 1. At the onset of the experiment, all rats had equivalent blood glucose levels. At the end of the experiment, glucose concentrations were significantly elevated in the blood of the STZ-treated rats (group II). Administration

| Treatment  | Blood Glucose, mM   |                   |
|--|---------------------|-------------------|
|  | Onset of Experiment | End of Experiment |
| Group I (untreated control)                                | 5.7 ± 0.31          | 5.9 ± 0.42        |
| Group II (STZ)   | 5.8 ± 0.32          | 14.6 ± 2.40 *     |
| Group III (C <sub>60</sub> -HyFn control)                  | 5.6 ± 0.30          | 5.5 ± 0.19        |
| Group IV (C <sub>60</sub> -HyFn prophylactic regime + STZ) | 5.3 ± 0.42          | 13.8 ± 1.70 *     |
| Group V (STZ + C <sub>60</sub> -HyFn therapeutic regime)   | 6.1 ± 0.53          | 15.1 ± 2.21 *     |

\*P<0.05 vs. intact control (Group I)

**Table 1:** Blood glucose levels in control and experimental rats at the onset and at the end of the experiment (n=7).

of C<sub>60</sub>-HyFn alone (group III) did not change this parameter at the conclusion of the study. However, high glucose levels in STZ-injected animals were not altered by C<sub>60</sub>-HyFn used in prophylactic or therapeutic regimes (groups IV and V respectively). Therefore, it is important to note that C<sub>60</sub>-HyFn treatment did not affect the glucose level in diabetic rats, and consequently did not eliminate the origin of metabolic disturbance, probably due to absence of protective effects on insulin-produced pancreatic cells damaged by STZ.

### C<sub>60</sub>-HyFn decreases levels of oxidative stress markers in rats with STZ-induced diabetes

Analysis of brain and liver tissues of rats with hyperglycemia showed elevation of oxidative stress indices including TBARS levels as LPO marker and protein carbonyl content as marker of protein oxidation compared to non-diabetic animals. As shown in table 2, the susceptibility of diabetic tissues to oxidative stress appeared to be various, with the most prominent deleterious changes in liver compared with brain. In both organs studied, injection of C<sub>60</sub>-HyFn (group III) did not affect the levels of oxidation markers indicating that pristine fullerene is unlikely to exhibit pro-oxidant capacities *in vivo*. Abnormally high levels of LPO and POM in STZ-affected liver tissues were significantly restored regardless of the regime of antioxidant administration, i.e. preventively or therapeutically. In contrast, C<sub>60</sub>-HyFn had different effectiveness in defending of biological macromolecules against oxidative injury in diabetic brains, depending on the mode of administration. C<sub>60</sub>-HyFn therapeutic treatment reduced TBARS and protein carbonyl content to control levels (Group V), while pre-diabetes C<sub>60</sub>-HyFn injection had no statistically significant influence on levels of oxidative stress markers in brain tissues.

### C<sub>60</sub>-HyFn counteracts reactive gliosis (astrocytosis) in brain of rats with experimental diabetes

Immunochemical studies used GFAP monospecific antibody to examine glial reactivity in various brain regions of STZ-induced diabetic rats and determine whether C<sub>60</sub>-HyFn exerts neuroprotective activity at hyperglycemia. Western blot analysis demonstrated statistically significant higher expression of GFAP 49 polypeptide, as well as products of its degradation, in the cortex and hippocampus of STZ-diabetic rats in comparison with the intact control group (Figures 2A and 2B). In contrast, a slight but non-significant elevation of GFAP content was observed in cerebellum of diabetic rats (Figure 2C). C<sub>60</sub>-HyFn only (group III) did not change GFAP content in any brain section taken for study compared with intact control. The beneficial effects of the C<sub>60</sub>-HyFn prophylaxis and therapy on diabetes-induced GFAP overexpression were found in cortex and hippocampus, which are manifested by down-regulation of this astroglial protein marker as well as its degradation products at both regimes of administration (Figures 2A and 2B).

These results indicate hydrated C<sub>60</sub> fullerene to display pronounced protective activity against diabetes-induced alterations in CNS, attenuating oxidative stress and alleviating astrocyte reactivity in STZ-diabetic rat brain. Though, C<sub>60</sub>-HyFn may be beneficial as symptomatic drug at diabetic neuropathy, it does not remove the source of metabolic disorders and it does not affect the abnormally high sugar levels, likely because of absence of protective effects on insulin-produced pancreatic cells damaged by STZ. Moreover, in brain tissues, antioxidant efficacy of C<sub>60</sub>-HyFn depends on the regime of administration. C<sub>60</sub>-HyFn display excellent protective potential against oxidative damage of lipids and proteins when followed by the inducing of hyperglycemia. Unexpectedly, astrocytes affected by STZ-induced diabetes appeared to be less reactive as a result of C<sub>60</sub>-HyFn administration at both regimes. It is obvious that not only single mechanism (i.e. oxidative stress) contributes to the astrocytic reaction during diabetes.

Typical GFAP immunostaining slides of hippocampus of all five groups of animals to evaluate astrocyte reactivity *in situ* are depicted in figure 3. In untreated rats (Figure 3A) or rats obtained C<sub>60</sub>-HyFn only (Figure 3C), GFAP immunohistochemistry revealed astroglial cells with typical stellar-like form and numerous thin cell processes. Robust increase in GFAP immunostaining was observed in brain sections of rats with STZ-induced diabetes compared with that in the control rats. Hypertrophic astrocytes with enlarged cell bodies and elongated overlapping processes were apparent in brain of STZ-diabetic animals, thus signs of glial scar formation are evidently seen (Figure 3B). It is important to note that similar trend in elevation of GFAP immunolabeling in cerebral cortex (data not shown) of STZ-diabetic rats from group II correlates with upregulation of this astrocytosis marker revealed by Western blot. Both C<sub>60</sub>-HyFn prophylaxis and treatment reduced the number of GFAP-immunostained astrocytes as well as extent of their hypertrophy in diabetic animals (Figures 3D and 3E). These data are also in accordance with results obtained by GFAP immunoblotting.

## Discussion

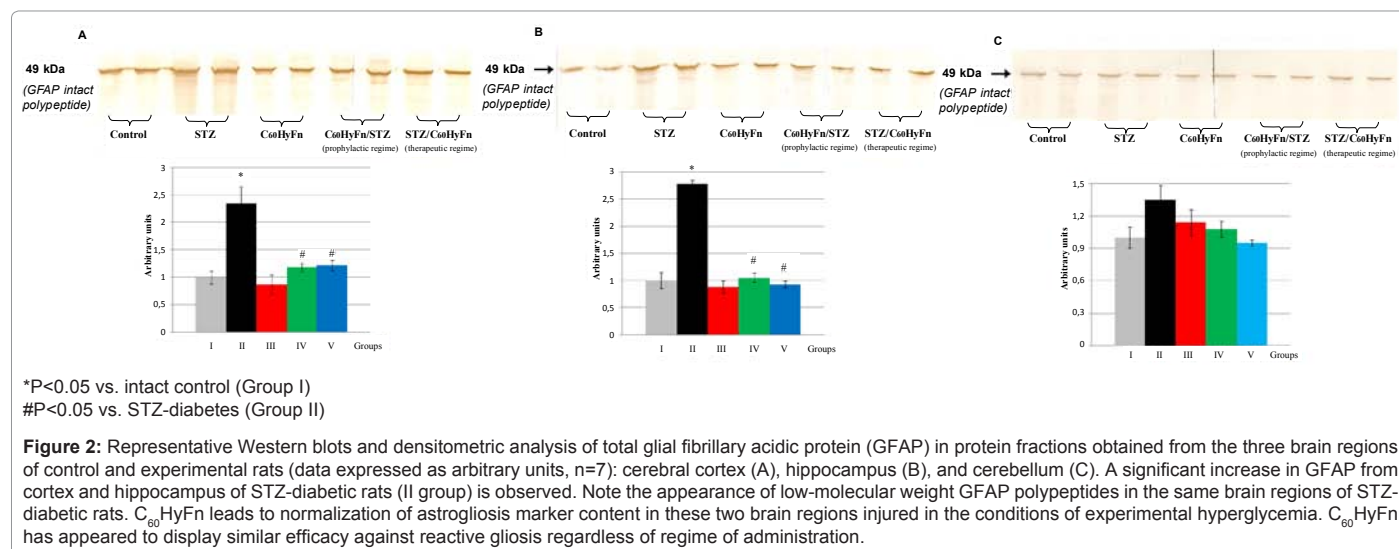
Diabetes mellitus causes damage to many vital organs including brain and liver, mostly due to increased free radical generation that is responsible for development of oxidative stress leading to further metabolic abnormalities and development of various complications [34]. Oxidative stress occurs in the cellular system when over-production of free radicals, i.e. ROS, overwhelms anti-oxidative reserve of the system, and then sub-cellular structures undergo destructive changes [35]. Also, oxidative stress represents the cornerstone in the intersection of pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy, serving as a crucial target for therapeutic strategies [36]. In diabetic neuropathy, oxidative

| Organ | Treatment  |                |   |  |  |
|-------|--|----------------|---|--|--|
|       | Group I (untreated control)                        | Group II (STZ) | Group III (C <sub>60</sub> -HyFn control) | Group IV (C <sub>60</sub> -HyFn prophylactic regime + STZ) | Group V (STZ + C <sub>60</sub> -HyFn therapeutic regime) |
|       | <b>TBARS content, nM/mg protein</b>                |                |   |  |  |
| Liver | 45 ± 5.2   | 173 ± 23.0 *   | 28 ± 6.3                                  | 39 ± 9.1 #   | 32 ± 7.2 #   |
| Brain | 27 ± 7.4   | 59 ± 9.5 *     | 31 ± 4.8                                  | 47 ± 8.2   | 25 ± 6.8 #   |
|       | <b>Carbonylated protein content, nM/mg protein</b> |                |   |  |  |
| Liver | 4 ± 0.6  | 24 ± 1.7 *     | 3 ± 0.3                                   | 5 ± 0.7 #  | 2 ± 0.5 #  |
| Brain | 8 ± 0.4  | 18 ± 0.6 *     | 11 ± 0.4                                  | 19 ± 0.8 *   | 7 ± 0.9 #  |

\*P < 0.05 vs. intact control (Group I)

#P < 0.05 vs. STZ-diabetes (Group II)

**Table 2:** Levels of oxidative stress indices (LPO levels, carbonylated protein content) in brain tissues of control and experimental rats (n=7).



stress mainly results from hyperglycemia-induced impairment of mitochondrial electron transfer, which leads to increased production of superoxide anion by mitochondria [37], through protein kinase C-dependent activation of membrane-associated NADPH oxidase [38], and by glucose auto-oxidation [39]. Sustained hyperglycemia causes depletion of antioxidants furthermore aggravating oxidative stress [4]. Besides these triggering mechanisms, neuronal damage is further worsened by subsequent cascade of pathologic processes such as ischemia, inflammation, advanced glycation end-products formation, changes in transcription factors resulting in modified genes expression [40].

Strategy of treatment of diabetic neuropathy and liver injury is focused on the elimination of causes of cell damage, particularly oxidative stress, which plays a central role. Due to the fact that pathophysiological mechanisms of hyperglycemia are believed to involve the increased generation of free radicals, we hypothesized that oxidative damage over the hyperglycemia would be reduced if antioxidant treatment is applied. C<sub>60</sub> fullerene is the third natural allotropic form of carbon after graphite and diamond, and has unique physicochemical properties and biological activities [41-43]. Pristine C<sub>60</sub> fullerene, along with some water-soluble derivatives, has recently gained considerable attention as a promising candidate for many biomedical applications [44]. Series of numerous scientific publications highlight ability of fullerenes to serve as potent anti-oxidant *in vivo*, at the same time demonstrating minimal or no side effects, which makes possible to administer them in conditions associated with oxidative stress [18,20,45]. It is shown that C<sub>60</sub> is more potent antioxidant than  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid, thus it can be used as free-radical eliminating agent for treating diseases, which are associated with abnormally high levels of membrane lipid peroxidation. Both liposoluble and water-soluble C<sub>60</sub> derivatives could effectively protect membrane lipids from ROS-induced peroxidation, in this way maintaining integrity of cellular membranes [46].

To the best of our knowledge, current study is the first experimental investigation on the pristine chemically non-modified water-soluble C<sub>60</sub> fullerene as an effective and safe drug for diabetic complication. To date, the only study was performed to test neuroprotection effect of nanoparticles of porphyrin adducts of cyclohexil fullerene C<sub>60</sub> (<sup>25</sup>Mg-PMC<sub>16</sub>) to diminish oxidative stress, attenuate mitochondrial dysfunction and improve metabolic processes in neurons of rats with STZ-induced diabetes [47]. However, it should be mentioned,

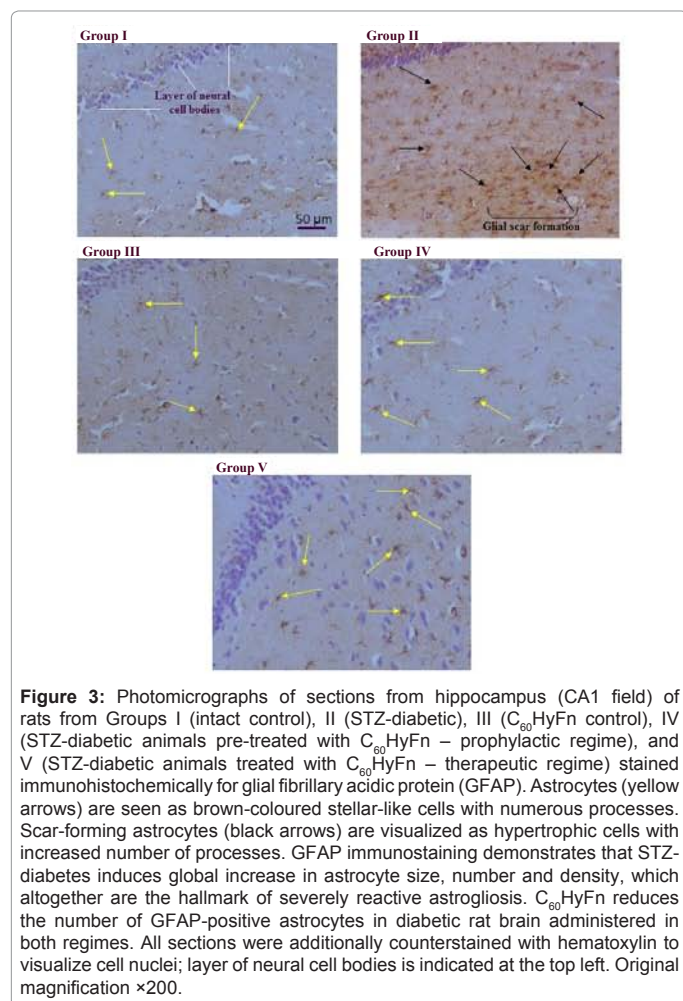
that protective effects of this fullerene-containing derivative is likely determined by Mg molecule, with known neuroprotective activity through inhibition of neuronal apoptosis and inflammation [48] but not cyclohexyl derivative of C<sub>60</sub> itself.

In our study, model of STZ-induced diabetes, which is relevant to chronic oxidative stress, has been provided [7,49]. STZ mostly affects insulin-producing  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans without influencing directly other organs after systemic administration [29]. In particular, disturbed glucose metabolism is the main cause of diabetic neuropathy, and it was thought that only maintained glucose control within the normal range provides protective action on glial and neural cells. C<sub>60</sub>HyFn is not involved in glucose metabolism, thus cannot eliminate the main result of STZ action, but it may be beneficial acting as antioxidant and abating side effects of hyperglycemia. Results of the current study parallel to our previous study [23], in which C<sub>60</sub>HyFn was not shown to be sugar-lowering agent; however it provided excellent protective effects on male gonads, sperm cells and restored reproductive function disrupted by hyperglycemia in rats with STZ-diabetes. Nevertheless, further studies will be performed to investigate influence of C<sub>60</sub>HyFn on insulin-producing cells in experimental diabetic animals for future pharmacotherapeutic applications of fullerenes.

Diabetic encephalopathy and neuropathy, as well as hepatic injury are being studied intensively and described in scientific literature all over the years [2,50,51]. Considering facts that these organs are extremely susceptible to oxidative impact due to high rate of metabolism and relatively increased oxygen consumption, the aim of the first part of our study was to measure and compare the levels of main oxidative stress markers in rats with STZ-induced diabetes and estimate if C<sub>60</sub>HyFn would be a beneficial in this pathological condition. Analysis of diabetic rat brains and livers showed elevated oxidative stress markers including lipid peroxidation (LPO) products and protein carbonylated derivatives. Diabetes-induced oxidative stress affects liver more than brain due to pro-oxidant-antioxidant imbalance. This observation is in line with earlier obtained data demonstrating that long-term hyperglycemic state disturbs redox state in liver tissue more profoundly in comparison with other organs [4].

C<sub>60</sub>HyFn administration did not correct hyperglycemia in STZ-treated rats. At the same time, we observed protective effect of fullerenes





on liver tissue and brain affected by oxidative damage at the level of sub-cellular macromolecules. Thus, it was demonstrated that C<sub>60</sub>HyFn expressed potent anti-oxidative effectiveness in these organs. It was shown that hydrated fullerene preserves hepatocytes membrane lipids and intracellular proteins against hyperglycemia-induced oxidative stress in all regimes of administration. In case of observation over the decreased rate of oxidative stress markers in brain tissue (LPO and POM), our study demonstrates that C<sub>60</sub>HyFn exhibits beneficial effect only after hyperglycemia is managed (group V), as we did not observe lowering of markers of oxidative stress in group IV (STZ-diabetic rats pre-treated with fullerene). Our interpretation of these results is based on experimental proof that liver is an organ, in which accumulation and further metabolism of C<sub>60</sub> generally occur, and expression of its antioxidant potential could be more pronounced in liver than in other organs [52]. Present study shows that C<sub>60</sub>HyFn displays hepatoprotective effect, which is in line with previous data obtained in earlier investigation on rodents, showing hepatoprotective effect in a model of ROS-mediated liver injury induced by acute CCl<sub>4</sub> intoxication [20]. These authors have recently obtained important results, which are widely discussed by scientific community, indicating C<sub>60</sub> dissolved in olive oil almost doubles the lifespan of rats. It has been suggested that the effect on lifespan is mainly due to the attenuation of age-associated increases in oxidative stress [53].

Chemically non-modified C<sub>60</sub> as well its water-soluble derivatives have been considered as powerful liver-protective agents in several studies

*in vivo*. In particular, it has been demonstrated that polyhydroxylated fullerene (fullerenol) alleviates doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with experimental malignancies [54]. One of the possible reasons for the absence of C<sub>60</sub>HyFn noticeable antioxidant effects in rats injected with this agent prior development of hyperglycemia (group IV), may be attributed to non-permeability of healthy blood brain barrier (BBB) for hydrated C<sub>60</sub> molecules and their nano-associates. On the contrary, C<sub>60</sub>HyFn as highly hydrophilic agent is able to enter hepatocytes due to functional features of liver cells [55]. BBB is considered to form a neurovascular unit, in concert with astrocytes, pericytes, neurons and extracellular matrix that protects brain from circulating neurotoxic substances while maintaining nutrients and ions in brain at levels necessary for neuronal function. It is recognized that BBB is only crossed by the molecules, which are lipid soluble and have molecular mass <400 Da [56,57]. At the same time, C<sub>60</sub>HyFn is highly hydrophilic supramolecular complex and has more molecular mass (>720 Da), which makes impossible to penetrate BBB. In addition, size of individual C<sub>60</sub> molecule (approx. 2 nm) with the first stable shell of interfacial water, does not allow such hydrated fullerene to penetrate through plasma membrane of a cell. A number of publications [58-60] have reported that very few or no pristine C<sub>60</sub> nanoparticles penetrate through lipid membrane and pass the BBB. Although, we reported that antioxidant effects of C<sub>60</sub>HyFn is observed in diabetic brain only when administered after achievement of hyperglycemic state. Nevertheless, the mechanism of action and biodistribution of C<sub>60</sub>HyFn are still not explained in whole extent, besides general anti-oxidative effect is satisfactory. It could be suggested that BBB overcoming by C<sub>60</sub>HyFn and its further probable penetration into diabetic brain could be possible due to specific disease-induced changes in the structure and functionality of this biological system. The observation that STZ-induced diabetes produces a progressive increase in BBB permeability to small molecules [61,62] at least partially may support this hypothesis.

In the scientific literature, C<sub>60</sub> fullerene and some of its water-soluble derivatives are referred as antioxidants and believed to reduce highly reactive harmful chemical species, such as oxygen and nitrogen free radicals, *in vitro* and *in vivo* [18,63,64]. C<sub>60</sub>HyFn is proposed to treat diseases associated with oxidative stress by virtue of its long-lasting antioxidant properties. It has been shown in previous *in vivo* studies that C<sub>60</sub>HyFn reduces oxidative stress in CNS of rats chronically exposed to ethyl alcohol [21] also significantly improves reproductive function in case of experimental model of diabetes in rats [23]. Clinical studies have demonstrated that C<sub>60</sub>HyFn holds promise as antioxidant for effective pathogenetic therapy of bronchial asthma [65]. The results of the recent study [22] indicate that C<sub>60</sub>HyFn displays significant anti-radical and radioprotective activities both *in vitro* and *in vivo* neutralizing irradiation-generated OH-radicals in aqueous medium and increases survival rate of mice irradiated in the lethal dose of X-rays. Data obtained in this investigation and many other experimental studies cited above shed light on the subtle mechanism of antioxidant mechanism of C<sub>60</sub>HyFn action. Hydrated C<sub>60</sub> fullerene is considered as a new class of anti-radical acting drugs with several unique features and advantages, which is rather different compared to other known antioxidants. First of all, fullerene can no longer be interpreted as a free radical scavenger ("radical sponge") for the reason that reactivity of pristine C<sub>60</sub> and its nano-clusters in aqueous medium against free radicals is very limited [28,66]. Antiradical activity of C<sub>60</sub>HyFn is most likely realized due to its unique catalytic properties in aqueous medium via enzyme-like mechanism acting as SOD-mimetics [67,68]. Explained above mechanism guarantees long-lasting antioxidant effects of C<sub>60</sub>HyFn expressed even at low and super-low

concentrations ( $10^{-9}$ - $10^{-15}$  M). Another exclusive property of C<sub>60</sub>HyFn is that it can neutralize only excessive free radicals, while sustains unaffected minimal level, maintaining balance between oxidative and anti-oxidative capacity, which is necessary for normal functioning of biological systems. This basal level of free radicals can be interrupted by any other antioxidant overload that may have deleterious consequences. In contrast, “nanodrug” C<sub>60</sub>HyFn can self-regulate its radical removing activity—a property lacking in many of current pharmacological antioxidants. It should be mentioned that C<sub>60</sub>HyFn has rate-limited free-radical regulating activity, which differs it from other antioxidants. Finally, it is important that the main advantage of C<sub>60</sub>HyFn water solutions (C<sub>60</sub>FWS) is that they are absolutely non-toxic in wide range of concentrations for mammals and other living organisms [28,69].

The prevalence of diabetes mellitus is increasing worldwide and it is expected that the number of subjects suffering from diabetic neuropathy will grow in the near future [70]. So, seeking for more efficient agents, which might prevent or treat oxidative stress-related diseases and therefore counteract diabetic-induced neuropathy, remains a pressing problem. The second part of our study was aimed to clarify ability of C<sub>60</sub>HyFn to counteract process of reactive gliosis (astrocytosis) in experimental diabetes. Astrocytes play pivotal role in neuronal metabolism, function and survival, consequently modifications in these cells are important in the pathogenesis of diabetes mellitus neuropathy [6]. Glial reactivity is characteristic feature of brain damages, and excessive astrocytosis can be harmful for neural regeneration through interrupting neurite outgrowth in injured CNS [71].

One of the considerable markers indicating astroglial activation caused by CNS injury, aging and neurodegeneration is increased levels of GFAP, which is astrocyte intermediate filament cytoskeletal protein, however, astroglial response reaction may vary according to the severity and duration of the diabetes [14,72]. Several mechanisms may account for the astrocyte reaction in STZ-induced diabetes. These mechanisms include increases in the polyol pathway, protein glycation, disturbed calcium homeostasis and oxidative stress [40]. Correlations of GFAP levels altered with excessive free radical generation have been clearly documented [7]. Results of our study confirm suggestion that increased levels of GFAP and its degradation products are indicative of astrocyte reactivity caused by diabetes-induced oxidative stress. Due to excessive generation of free radicals is involved in pathophysiological mechanisms at hyperglycemia, we hypothesized that glial reactivity in diabetic rats can be reduced by antioxidant C<sub>60</sub>HyFn. The current study showed that glial cells respond to the diabetes by overexpression and degradation of GFAP in a few weeks after the onset of diabetes. It has been revealed that C<sub>60</sub>HyFn displays beneficial effects expressed in prevention of reactive astroglial gliosis in diabetic brain. Immunological analysis has revealed that elevated levels of GFAP are observed in cerebral cortex and hippocampus compared to cerebellum. Thus, these brain sections, responsible for cognitive functions, can be considered as more vulnerable CNS structures observed to damage during diabetes. These findings are synchronized with well-known observation that cognitive function decline and memory impairment are among main symptoms of diabetic encephalopathy in humans [3]. Limited proteolysis of GFAP intact 49 kDa polypeptide can be induced by Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes, calpains, with increased activity in some brain regions in STZ-diabetic rats [73]. Cytoskeleton of astrocyte is comprised of GFAP intermediate filaments, and their disruption can lead to malformations of astrocyte morphology. As a result, metabolic and trophic support to neurons, integrity of the BBB as well as synaptic plasticity can be altered. It has been earlier established that fullerene

water-soluble polyhydroxylated derivative, fulleranol, is able to attenuate  $\beta$ -induced increase in intracellular free Ca<sup>2+</sup> level [74]. Based on this observation, we suppose that C<sub>60</sub>HyFn prevents GFAP cleavage in diabetic brain by diminishing of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. Neuro- and glioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene are well-documented. It has been just shown that C<sub>60</sub>HyFn prevents neurotoxicity induced by amyloid- $\beta$  peptide in rat hippocampus [75]. C<sub>60</sub>HyFn attenuates astrocyte dysfunction and restores behavioural characteristics in rats after prolonged intoxication with ethyl alcohol [21].

It should be noted that C<sub>60</sub>HyFn decreased astrocyte reactivity despite the regime of administration, either injected in preventive or therapeutic doses, nonetheless its antioxidative effects in brain tissue were only seen in the case when stable hyperglycemia had been induced (group V). It is likely that several, rather than a single, cellular events account for the reactive gliosis at diabetic neuropathy. Multisystemic alterations occur in many organs, most prominent and significant are liver changes with subsequent development of hepatic encephalopathy with neuronal damage [4]. Complications of diabetes mellitus comprise among others liver injury beginning from hepatocytes vacuolar dystrophy, undergoing hepatic steatosis, steatohepatitis, which can progress to cirrhosis [51]. Liver damage is accompanied by hyperammonemia, which is the main contributing factor of hepatic encephalopathy. It has been shown that abnormally high levels of ammonia in blood have toxic effects on astrocytes and can damage neurons [76]. In clinical studies with human subjects diagnosed with hepatic encephalopathy, significant changes in astrocyte morphology and impairments of GFAP metabolism have been described [77]. Therefore, we assumed that one of the possible causes of glial reactivity in diabetic rats could be partial liver failure induced by oxidative stress, and marked hepatoprotection of C<sub>60</sub>HyFn in model of STZ-diabetes can indirectly mediate its neuroprotective effects through potent alleviation of glial dysfunction.

Diabetes mellitus type I, or insulin dependent diabetes, is characterized by onset of symptoms at young age group, while type II affects people in their advanced years. Initial symptoms of type I diabetes are very conspicuous, such as high levels of glucose in blood, or extreme hyperglycemia with accompanying keto-acidosis, early development of hepatic steatosis with hepatitis, if occasionally left untreated without the administration of appropriate doses of insulin, even liver failure may occur with fatal outcome [78]. On the contrary, diabetes mellitus type II is characterized by the substantial onset of symptoms. Patients are often diagnosed occasionally during routine medical examination, when applied to hospital for other reasons caused by long standing crippling step-by-step hyperglycemia, e.g. myocardial infarction, hypercholesterolemia, hypertension, angina pectoris, atherosclerosis, retinopathy, cataracts, moderate liver steatosis, peripheral neuropathy and other symptoms and signs [79]. Time and severity of development of complications are different for both types of diabetes. As type I diabetes starts in young age, when patient reaches advanced age, disease is already lasting for several decades. In case of diabetes type II, complications usually occur within 15-20 years. In both cases it is important to control level of glycemia within the near normal range. Due to advancement of new methods to achieve tight control of glucose in blood, fewer complications develop, although lack of full control requires administration of anti-oxidative preparations regularly. Effectiveness of administered drugs also depends upon pathogenesis of complication induced by toxic oxygen species over the years. Everything depends upon state of cell injury, if alterations are at their reversible or irreversible stage, theoretically anti-oxidative drugs may eliminate harmful impact to stop progression of cascade of

oxidative reactions [80]. Thus it is obvious, that duration of disease, as well sustained control of hyperglycemia are crucial factors in the pathogenesis of diabetes mellitus complications, not only administered drugs. Thus, effectiveness of these anti-oxidative drugs is influenced by physiological conditions of the human body. Considering these factors, attention should be focused on clinical expressions of diabetes mellitus, although *in vitro* and *in vivo* studies confirmed that current drug, i.e. hydrated chemically non-modified fullerene has proved to be appropriate drug to overcome oxidative stress at the early stages of disease, when it is possible to prevent development of complications of diabetes. At the same time, studies should be performed at the population level. Also, investigation of influence of fullerene not only on the development of early complications, but also late consequences of diabetes at larger study group of population is required in the nearest future.

## Conclusion

In fine, we presume that the present study represents the first attempt to estimate potential beneficial effects of chemically unmodified hydrated C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>HyFn) in the experimental model of diabetes mellitus. Different antioxidative efficacy of C<sub>60</sub>HyFn in brain and liver, as hyperglycemia-sensitive organs, has been demonstrated in diabetic rats. Also, C<sub>60</sub>HyFn appeared to be efficient against diabetes-induced reactive astrogliosis, thus facilitating neuronal survival. Based on the results obtained, we assume that C<sub>60</sub>HyFn does not affect oxidation balance of biomolecules in normalcy, however acting as efficient and safe antioxidant and tissue-protecting agent during diabetes. Nanostructures of hydrated C<sub>60</sub> fullerene can be recommended to apply separately or with conventional scheme of treatment as additional remedy to prevent and anticipate complications of diabetes in initial stages of disease and to manage diabetic complications such as liver injury and neuropathy.

## References

- Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, et al. (2010) Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 7: 15-25.
- Little AA, Edwards JL, Feldman EL (2007) Diabetic neuropathies. *Pract Neurol* 7: 82-92.
- Gispén WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23: 542-549.
- Karaağaç N, Salman F, Dođru-Abbasođlu S, Uysal M (2011) Changes in prooxidant-antioxidant balance in tissues of rats following long-term hyperglycemic status. *Endocr Res* 36: 124-33.
- Butterworth RF (2003) Hepatic encephalopathy. *Alcohol Res Health* 27: 240-246.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Baydas G, Reiter RJ, Yasar A, Tuzcu M, Akdemir I, et al. (2003) Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 35: 797-804.
- Lechuga-Sancho AM, Arroba AI, Frago LM, Pañeda C, Garcia-Caceres C, et al. (2006) Activation of the intrinsic cell death pathway, increased apoptosis and modulation of astrocytes in the cerebellum of diabetic rats. *Neurobiol Dis* 23: 290-299.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25: 1439-1451.
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93: 421-443.
- EPA/630/R-95/001F (1998) Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. *Federal Register* 63: 26926-26954.
- O'Callaghan JP, Sriram K (2005) Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 4: 433-442.
- Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Roig P, et al. (2002) Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type I diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain Res* 957: 345-353.
- Baydas G, Donder E, Kiliboz M, Sonkaya E, Tuzcu M, et al. (2004) Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Mosc)* 69: 1001-1005.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A (2005) Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 4: 5.
- Oktayoglu SG, Basaraner H, Yanardag R, Bolkent S (2009) The effects of combined treatment of antioxidants on the liver injury in STZ diabetic rats. *Digest Dis Sci* 54: 538-546.
- Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, Lotharius J, Lin TT, et al. (2001) Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 7: 243-246.
- Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, et al. (2008) Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 118: 1532-1543.
- Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, et al. (2005) [60] fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett* 5: 2578-2585.
- Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Klochkov VK, Andrievsky GV (2008) Nanostructures of hydrated C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology* 246: 158-165.
- Andrievsky GV, Bruskov VI, Tykhomyrov AA, Gudkov SV (2009) Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 47: 786-793.
- Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Ozercan I, et al. (2011) Protective effects of nanostructures of hydrated C(60) fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology* 282: 69-81.
- Andrievsky GV, Kosevich MV, Vovk OM, Shelkovsky VS, Vashchenko LA (1995) On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J Chem Soc Chem Commun*: 1281-1282.
- Andrievsky GV, Klochkov VK, Karyakina EL, Mchedlov-Petrosyan NO (1999) Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C<sub>60</sub> by electron microscopy. *Chem Phys Lett* 300: 392-396.
- Andrievsky GV, Klochkov VK, Boryduh AB, Dovbeshko GI (2002) Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C<sub>60</sub> fullerene with help of FTIR reflectance and UV-VIS spectroscopy. *Chem Phys Lett* 364: 8-17.
- Avdeev MV, Khokhryakov AA, Tropin TV, Andrievsky GV, Klochkov VK et al. (2004) Structural features of molecular-colloidal solutions of C<sub>60</sub> fullerenes in water by small-angle neutron scattering. *Langmuir* 20: 4363-4368.
- Andrievsky GV, Klochkov VK, Derevyanchenko LI (2005) Is the C<sub>60</sub> fullerene molecule toxic?! Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostruct 13: 363-376.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43: 1326-1333.
- Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Donder E (2005) Novel role for gapapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 26: 417-422.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.
- Lipinski B (2001) Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 15: 203-210.



35. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
36. Vincent AM, Feldman EL (2004) New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 5: 227-236.
37. Moreira PI, Oliveira CR (2011) Mitochondria as potential targets in antidiabetic therapy. *Handb Exp Pharmacol*: 331-356.
38. Inoguchi T, Nawata H (2005) NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 6: 495-501.
39. Karasu C (2010) Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J* 4: 240-256.
40. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.
41. Kroto HW, Heath JR, O'Brian SC, Curl RF, Smalley RE (1985) C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Nature* 318: 162-163.
42. Kratschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K, Huffman DR (1990) Solid C<sub>60</sub>: a new form of carbon. *Nature* 347: 354-358.
43. Satoh M, Takayanagi I (2006) Pharmacological studies on fullerene (C<sub>60</sub>), a novel carbon allotrope and its derivatives. *J Pharmacol Sci* 100: 513-518.
44. Anilkumar P, Lu F, Cao L, Luo PG, Liu JH, et al. (2011) Fullerenes for applications in biology and medicine. *Curr Med Chem* 18: 2045-2059.
45. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE (2010) Intrinsic biological property of colloidal fullerene nanoparticles (nC<sub>60</sub>): lack of lethality after high dose exposure to human epidermal and bacterial cells. *Toxicol Lett* 197: 128-134.
46. Wang IC, Tai LA, Lee DD, Kanakamma PP, Shen CK, et al. (1999) C(60) and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem* 42: 4614-4620.
47. Hosseini A, Abdollahi M, Hassanzadeh G, Rezayat M, Hassani S, et al. (2011) Protective effect of magnesium-25 carrying porphyrin-fullerene nanoparticles on degeneration of dorsal root ganglion neurons and motor function in experimental diabetic neuropathy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109: 381-386.
48. De Leeuw I, Engelen W, De Block C, Van Gaal L (2004) Long term magnesium supplementation influences favourably the natural evolution of neuropathy in Mg-depleted type 1 diabetic patients (T1dm). *Magnes Res* 17: 109-114.
49. Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, et al. (2007) Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 28: 276-285.
50. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, et al. (2005) Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diab Care* 28: 956-962.
51. Smith BW, Adams LA (2011) Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 7: 456-465.
52. Moussa F, Roux S, Pressac M, Génin E, Hadchouel M, et al. (1998) In vivo reaction between [60] fullerene and vitamin A in mouse liver. *New J Chem* 22: 989-992.
53. Baati T, Bourasset F, Gharbi N, Njim L, Abderrabba M, et al. (2012) The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene. *Biomaterials* 33: 4936-4946.
54. Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, et al. (2009) Protective effects of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials* 30: 1184-1196.
55. Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, et al. (1995) In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: <sup>14</sup>C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol* 2: 385-389.
56. Pardridge WM (2001) Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discov Today* 6: 1-2.
57. Barbu E, Molnar E, Tsibouklis J, Gorecki DC (2009) The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv* 6: 553-565.
58. Spurlin TA, Gewirth AA (2007) Effect of C<sub>60</sub> on solid supported lipid bilayers. *NanoLett* 7: 531-535.
59. Yamada T, Jung DY, Sawada R, Matsuoka A, Nakaoka R, et al. (2008) Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on brain functions differ in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 8: 3973-3980.
60. Shinohara N, Matsumoto T, Gamo M, Miyauchi A, Endo S, et al. (2009) Is lipid peroxidation induced by the aqueous suspension of fullerene C<sub>60</sub> nanoparticles in the brains of *Cyprinus carpio*? *Environ Sci Technol* 43: 948-953.
61. Huber JD, VanGilder RL, Houser KA (2006) Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2660-H2668.
62. Hawkins BT, Lundeen TF, Norwood KM, Brooks HL, Egleton RD (2007) Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 50: 202-211.
63. Chiang LY, Lu FJ, Lin JT (1995) Free radical scavenging activity of water-soluble fullereneols. *J Chem Soc Chem Commun* 12: 1283-1284.
64. Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, et al. (2009) The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 30: 611-621.
65. Shirinkin SV, Chymosov MI, Andrievskii GV, Vasil'chenko LV (2009) [Prospects for the use of fullerenes as antioxidants in pathogenetic therapy of bronchial asthma]. *Klin Med (Mosk)* 87: 56-58.
66. Lee J, Song W, Jang SS, Fortner JD, Alvarez PJ, et al. (2010) Stability of water-soluble C<sub>60</sub> clusters to OH radical oxidation and hydrated electron reduction. *Environ Sci Technol* 44: 3786-3792.
67. Andrievsky GV (2008) Water specifically structured with hydrated pristine fullerenes as a universal regulator of biological processes. Proceedings of the Third Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water.
68. Bensasson RV, Brettreich M, Frederiksen J, Gottinger H, Hirsch A, et al. (2000) Reactions of e<sub>aq</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>•-</sup>, HO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) with a dendro[60]fullerene and C<sub>60</sub>[C(COOH)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (n = 2-6). *Free Rad Biol Med* 29: 26-33.
69. Takahashi M, Kato H, Doi Y, Hagiwara A, Hirata-Koizumi M, et al. (2012) Sub-acute oral toxicity study with fullerene C<sub>60</sub> in rats. *J Toxicol Sci* 37: 353-361.
70. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diab Care* 27: 1047-1053.
71. Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32: 638-647.
72. Lechuga-Sancho AM, Arroba AI, Frago LM, Garcia-Caceres C, de Celix AD, et al. (2006) Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology* 147: 5314-5324.
73. Camins A, Verdager E, Folch J, Pallàs M (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev* 12: 135-148.
74. Huang HM, Ou HC, Hsieh SJ, Chiang LY (2000) Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullereneol-1, carboxylate C60 in PC12 cells. *Life Sci* 66: 1525-1533.
75. Makarova EG, Gordon RY, Podolski IY (2012) Fullerene C60 prevents neurotoxicity induced by intrahippocampal microinjection of amyloid-beta peptide. *J Nanosci Nanotechnol* 12: 119-126.
76. Brusilow SW, Cooper AJ (2011) Encephalopathy in acute liver failure resulting from acetaminophen intoxication: new observations with potential therapy. *Crit Care Med* 39: 2550-2553.
77. Bélanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (2002) Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int* 41: 155-160.
78. Lambert P, Bingley PJ (2002) What is Type 1 Diabetes? *Medicine* 30: 1-5.
79. Monnier L, Colette C, Owens DR (2008) Type 2 diabetes: a well-characterised but suboptimally controlled disease. Can we bridge the divide? *Diabetes Metab* 34: 207-216.
80. Rother KI (2007) Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med* 356: 1499-1501.