

**BIOLOGICZNE ZASTOSOWANIA
NANOLUMINOFORÓW DOMIESZKOWANYCH
LANTANOWCAMI**

**BIOLOGICAL APPLICATIONS OF LANTHANIDE
DOPED NANOMARKERS**

**Małgorzata Misiak^{1,2}, Katarzyna Prorok²,
Artur Bednarkiewicz^{1,2*}**

¹ *Institut Niskich Temperatur I Badań Strukturalnych, PAN,
ul. Okolna 2, 50-422 Wrocław, Polska*

² *Wrocławskie Centrum Badań EIT+,
ul. Stabłowicka 147/149, 54-066 Wrocław, Polska*

**e-mail: A.Bednarkiewicz@int.pan.wroc.pl*

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Właściwości spektroskopowe lantanowców
 - 1.1. Mechanizmy wzbudzenia
 - 1.2. Właściwości luminescencyjne
 - 1.3. Mechanizmy konwersji energii w górę
 - 1.4. Istotne biologicznie właściwości nanoluminoforów
2. Zastosowania w naukach biologicznych
 - 2.1. Testy heterogeniczne
 - 2.2. Testy homogeniczne
 - 2.3. Nanoczujniki luminescencyjne
 - 2.4. Bioobrazowanie
 - 2.5. Terapia fotodynamiczna
 - 2.6. Nanotermometria
 - 2.7. Hypertermia – zlokalizowane podgrzewanie
 - 2.8. Platformy nanobiotechnologiczne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Małgorzata Misiak studiowała w latach 2005–2010 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W roku 2010 uzyskała tytuł magistra chemii ze specjalnością chemia biologiczna za pracę magisterską „Kompleksy jonów wapnia i magnezu z ligandami bisfosfonianowymi” (promotor prof. T. Kowalik-Jankowska) wykonaną w Zespole Chemii Bioinorganicznej i Biomedycznej. Od 2011 roku jest zatrudniona we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ w projekcie NanoMat podzadaniu NAOMIS na stanowisku chemika. W ramach projektu jest uczestnikiem studium doktoranckiego w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Obecnie zajmuje się syntezą i cha-

rakterystyką nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Jej zainteresowania obejmują ponadto możliwości zastosowania syntezowanych związków w naukach biologicznych.



mgr Katarzyna Prorok w 2011 roku ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego na specjalizacji Chemia fizyczna. Pracę magisterską wykonywała w Zespole Dielektryków. W pracy tej zajmowała się zjawiskiem konwersji energii wzbudzenia z zakresu podczerwonego na widzialny w ScVO_4 domieszkowanym jonami Tm^{3+} , Yb^{3+} . Od 2011 roku jest zatrudniona w WCB EIT+, w projekcie NanoMat, w podzadaniu NAOMIS, którego kierownikiem jest dr inż. Artur Bednarkiewicz. Jej zainteresowania naukowe obejmują syntezę oraz charakterystykę nanoluminoforów, a także ich zastosowanie w biobrazowaniu i biodetekcji.



dr Artur Bednarkiewicz ukończył Wydział Inżynierii Biomedycznej na Politechnice Wrocławskiej w 1998 roku. Tytuł doktora nauk fizycznych uzyskał w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych (INTiBS) Polskiej Akademii Nauk (PAN) we Wrocławiu w 2003 roku. Zarówno pracę magisterską (dotyczącą laserów neodymowych) jak i pracę doktorską (dotyczącą laserów i spektroskopii kryształów domieszkowanych jonami iterbu) wykonał w grupie prof. dr hab. Wiesława Stręka. Po 3 letnim stażu podoktorskim w Joint Research Centre, Italy, Komisji Europejskiej, powrócił do INTiBS PAS i równocześnie zainicjował powstanie interdyscyplinarnego zespołu w ramach Wrocławskiego Centrum

Badań EIT+. Grupa skupia się na wykorzystaniu nanoluminoforów do biodetekcji i biobrazowania – NAOMIS (ang. *Nanoparticle Assisted Molecular Imaging and Sensing*).

ABSTRACT

Fluorescence is one of the most commonly used methods of biodetection, mainly due to the high sensitivity, non-invasiveness, simplicity, and also due to the availability of the whole range of powerful light sources, a wide range of photodetectors, and numerous and sensitive measuring methods. From the point of view of biodetection and bioimaging, the important characteristics of such fluorophores are large Stokes shift, narrow absorption/emission lines as well as stable and efficient luminescence.

Traditional organic dyes applied in biology reveal very fast photobleaching and limited opportunities for simultaneous detection of many biomolecules, what stimulate development of new fluorescent markers. Fast and intensive development of nanotechnology and chemical engineering observed in recent years, aims at designing the nanophosphors or luminescent nanoplatforms, that demonstrate desirable properties and devised functionality. However, new phosphors are not included yet in broad practical applications, mainly because of the need to adapt the measuring apparatus so as to fully exploit their potential. From among the fluorescent nano-particles, silica dye doped nanoparticles, quantum dots, nanocolloidal metallic nanoparticles, and lanthanide doped nanoluminophores show the largest application potential. This article discusses the unique physico-chemical properties of lanthanide doped nanoparticles, which beside very long luminescence lifetimes and narrow emission bands, enable to obtain a visible emission under the near infrared photoexcitation (called anti-Stokes emission), offering improved sensitivity, stability, repeatability and accuracy of the fluorescent biodetection and bioimaging methods.

In this review, physico-chemical properties of lanthanide doped nanoluminophores and many examples of their biological applications have been discussed. The first chapter presents spectral characteristics of rare-earth ions with particular regard to the mechanism of energy transfer and up-conversion, which is a fundamental difference and the decisive advantage compared with other known fluorescent markers. The luminescent properties of lanthanides are demonstrated based on the most commonly used nanomaterials singly doped with Eu^{3+} and Tb^{3+} and the codoped matrices, like Yb^{3+} - Tm^{3+} , Yb^{3+} - Er^{3+} or Yb^{3+} - Ho^{3+} co-doped phosphores. The features of these materials are best suited from the point of view of biodetection and bioimaging. The next chapter gives an overview of the applications of lanthanide doped nanoluminophores in biological sciences. Different types of hetero-/homo-genous tests and luminescence based sensors for pH, CO_2 , the level of glucose, and other analytes are presented. Then, basic aspects of bioimaging, photodynamic and thermo-therapy, nanothermometry as well as nano-bio-technology platforms have been summarized. In conclusion suggestions of new research directions and new biological applications of lanthanide doped nanoparticles have been presented.

Słowa kluczowe: nanoluminofory konwertujące w górę, luminescencja, biotesty, zastosowania biomedyczne

Keywords: up-converting nanoparticles, luminescence, bioassays, biomedical applications

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AF	– autofluorescencja (ang. <i>Autofluorescence</i>)
APBA	– kwas aminofenyloboronowy (ang. <i>Amino Phenyl Boronic Acid</i>)
APTE	– sumowanie fotonów na drodze transferu energii (fr. <i>Addition de Photons par Transferts d'Énergie</i>)
BTB	– błękit bromotymolowy (ang. <i>Bromothymol Blue</i>)
CFU	– jednostka tworząca kolonię (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
CR	– relaksacja krzyżowa (ang. <i>Cross-Relaxation</i>)
CT	– przeniesienia ładunku (ang. <i>Charge-Transfer</i>)
DDS	– matryca krzemionkowa domieszkowana barwnikami organicznymi (ang. <i>Dye-Doped Silica</i>)
ESA	– absorpcja ze stanu wzbudzonego (ang. <i>Excited-State Absorption</i>)
ETU	– sumowania fotonów na drodze transferu energii (ang. <i>Energy-Transfer Upconversion</i>)
F	– fluorofor (ang. <i>Fluorophore</i>)
FRET	– Försterowski rezonansowy transfer energii (ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
FWHM	– szerokość połówkowa (ang. <i>Full Width at Half Maximum</i>)
GSA	– absorpcji ze stanu podstawowego (ang. <i>Ground-State Absorption</i>)
HSA	– ludzka albumina surowicza (ang. <i>Human Serum Albumin</i>)
IgG	– immunoglobulina G (ang. <i>Immunoglobulin G</i>)
Ln:NC	– nanoluminofor domieszkowany jonami lantanowców (ang. <i>Lanthanide:Nanocrystal</i>)
LRET	– luminescencyjny rezonansowy transfer energii (ang. <i>Luminescence Resonance Energy Transfer</i>)
MRI	– obrazowanie rezonansem magnetycznym (ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
NIR	– nisko energetyczne promieniowanie podczerwone (ang. <i>Near Infrared</i>)
NP	– nanocząsteczki (ang. <i>Nanoparticles</i>)
OCT	– optyczna koherentna tomografia komputerowa (ang. <i>Optical Coherence Tomography</i>)
PA	– proces lawinowej emisji fotonów (ang. <i>Photon Avalanche</i>)
PDT	– terapia fotodynamiczna (ang. <i>Photodynamic Therapy</i>)

PET	– pozytonowa emisyjna tomografia komputerowa (ang. <i>Positron emission tomography</i>)
Q	– wygaszacz (ang. <i>Quencher</i>)
QDs	– kropki kwantowe (ang. <i>Quantum Dots</i>)
RET	– rezonansowy transfer energii (ang. <i>Resonance Energy Transfer</i>)
RhBITC	– izotiocyanian rodaminy B (ang. <i>Rhodamine B Isothiocyanate</i>)
SHG	– generacja drugiej harmonicznej (ang. <i>Second Harmonic Generation</i>)
siRNA	– małe inerferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
TCSPC	– metoda zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo (ang. <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>)
test ELISA	– test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorbcyjny (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
TPE	– emisja dwufotonowa (ang. <i>Two-Photon Emission</i>)
UC	– konwersja energii w górę (ang. <i>Upconversion</i>)
UCNPs	– konwertujące w górę nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców (ang. <i>Upconverting Nanoparticles</i>)
UV	– ultrafiolet (ang. <i>Ultraviolet</i>)

WSTĘP

Nanotechnologia jest nową dziedziną nauki skupiającą się na tworzeniu funkcjonalnych materiałów, urządzeń i systemów. Obserwuje się znaczny postęp w opracowywaniu i optymalizacji technik syntezy, modyfikacji powierzchni oraz nowych i coraz liczniejszych zastosowań nanomateriałów. Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się funkcjonalne nanomateriały i nanocząsteczki (NP) o wymiarach poniżej 50 nm w zastosowaniach biotechnologicznych i biologicznych. Ich wielkość jest wówczas porównywalna z rozmiarem wielu biomolekuł, a tym samym umożliwia wnikanie w głąb komórek. Pokrycie powierzchni NP odpowiednimi biomolekułami (np. przeciwciałami) powoduje, że mogą krążyć w organizmie nawet przez kilka dni i w sposób selektywny akumulować się w zadanych miejscach organizmu (np. komórkach nowotworów), by następnie umożliwić określenie ich położenia za pomocą obrazowania lub też inicjować zlokalizowaną chemioterapię, termoterapię czy też terapię fotodynamiczną [1, 2].

Istotną zaletą stosowania nanomateriałów jest możliwość łatwej i precyzyjnej kontroli oraz optymalizacji ich właściwości fizyko-chemicznych. Przykładem może być wpływ rozmiaru kropek kwantowych na ich właściwości luminescencyjne [3]. Innym ciekawym przykładem jest odpowiednio zaprojektowana chemiczna modyfikacja powierzchni nanopręcików złota, które pod wpływem obniżonego pH w nowotworach agregują, umożliwiając wykonanie zabiegu zlokalizowanej termoterapii [4, 5]. Nanomateriały wykazują bardzo często właściwości fizykochemiczne istotnie odbiegające od ich makroodpowiedników. Przykładem mogą być kropki kwantowe i nanowytrącenia metali szlachetnych, a także nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców, których właściwości luminescencyjne w skali nano zależą od otoczenia chemicznego [6]. Unikalne właściwości optyczne, elektryczne czy też magnetyczne powodują, że nanomateriały mogą być precyzyjnie zaprojektowane tak, by spełniały równocześnie jedną lub więcej funkcji biotechnologicznych. Istnieją liczne próby łączenia różnych metod obserwacji nanomateriałów (np. metod optycznych, pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej PET oraz rezonansu magnetycznego MRI [7]), funkcji czujnikowych (np. pomiar pH, CO₂, temperatury, obecności analitu, stopnia uwolnienia leku itp.) czy też równoczesnego dostarczenia i uwalniania leków do chorobowo zmienionych tkanek.

Jednym z najpowszechniej stosowanych sposobów biodetekcji czy bioobrazowania jest wykorzystanie znaczników fluorescencyjnych ze względu na ich funkcjonalność, znikomą inwazyjność oraz wysoką czułość pomiaru fluorescencji [8]. Niebagatelne znaczenie mają również aspekty techniczne sposobu detekcji, m.in. dostępność źródeł światła wzbudzenia oraz detektorów zdolnych do rejestracji sygnałów (intensywności, widma, kinetyki, anizotropii itp.). Pomiar fluorescencji pozwala ponadto na zdalny i bezdotykowy odczyt, łatwą integrację i brak interakcji z innymi metodami obrazowania (ang. *Optical Coherent Tomography*, OCT; ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) czy detekcji (np. pomiary impedancji). Istotne jest również tzw. multipleksowanie, czyli zdolność wykrywania wielu ana-

litów w jednej próbce, możliwe dzięki spektralnej dekonwolucji emisji pochodzącej z wielokolorowych fluoroforów obecnych w próbce. Ta właściwość wpływa na wydajność i przepustowość testów diagnostycznych, co z kolei odgrywa istotną rolę w badaniach nowych leków czy w testach schorzeń genetycznych.

W ostatnich latach, jako sondy fluorescencyjne w biologicznej detekcji stosowano barwniki organiczne, białka fluorescencyjne, a także chelaty lantanowców (Eu^{3+} i Tb^{3+}). Posiadają one wiele zalet takich jak biokompatybilność, łatwość ich modyfikacji poprzez kowalencyjną koniugację molekuł oraz relatywnie wysoką wydajność fluorescencji. Znaczniki te wykazują jednak krótkie czasy życia stanów wzbudzonych (prócz kompleksów lantanowców), są toksyczne, ulegają fotowysbieleniu i chemicznej degradacji. Dodatkowo barwniki organiczne zazwyczaj charakteryzują się względnie szerokimi pasmami absorpcji oraz emisji, przez co utrudniona jest ich detekcja [9]. Ponieważ trudno jest selektywnie wzbudzić pojedynczy fluorofor, trudno jest również spektralnie odseparować emisję pochodzącą od różnych znaczników.

Aby uzyskać stabilne i wydajne luminofory, opracowane zostały nanowymiarowe hybrydy organiczno/nieorganicznych nanocząstek, składających się z polimeru bądź też krzemionkowej matrycy domieszkowanej barwnikami organicznymi [10]. W przypadku pokrycia polimerem (np. polistyrenem) otrzymane cząsteczki wykazywały jednak skłonność do aglomeracji, a także uszkodzenia powłoki, co w konsekwencji prowadziło do wycieku barwników i uniemożliwiało ich zastosowanie w charakterze biomarkerów luminescencyjnych [11]. Znacznie korzystniejsze parametry udało się uzyskać w przypadku luminoforów składających się z matrycy krzemionkowej domieszkowanej barwnikami organicznymi (ang. *Dye Doped Silica*, DDS). Poprawie uległa wydajność kwantowa fluorescencji oraz fotostabilność. Uzyskane związki można stosunkowo łatwo zdyspergować w wodzie, a także zmodyfikować ich powierzchnię poprzez sprzężenie bioaktywnych molekuł. Ponadto, wielkość cząstek i zakres spektralny fluorescencji mogą być stosunkowo łatwo dostosowane do wymagań konkretnego zastosowania. Krzemionka separuje cząsteczki barwnika od środowiska zewnętrznego, przez co są one chronione przed działaniem tlenu, wody, a także rozpuszczalników, dzięki czemu ograniczone jest ich fotowysbielenie oraz degradacja [12]. Co więcej, krzemionka jest fotochemicznie obojętna, przezroczysta dla światła widzialnego, nie bierze udziału w procesie transferu energii ani elektronów. W zależności od wielkości krzemionkowej nanocząsteczki można w niej umieścić od kilkuset do kilku tysięcy molekuł barwników, co może skutkować nawet 10 000-krotnym zwiększeniem intensywności sygnału fluorescencji w porównaniu z pojedynczymi molekułami fluoroforów organicznych [13]. DDS były stosowane jako sondy dla ultraczułego bioobrazowania i detekcji [14], a także, do monitorowania złożonych procesów biologicznych na poziomie komórkowym [15]. DDS pozwalają również na selektywne znakowanie szerokiej gamy biomolekuł, komórek rakowych i mikroorganizmów [16].

Molekuły barwników umieszczone w krzemionkowej matrycy charakteryzują się szerokimi pasmami absorpcji i emisji oraz krótkimi czasami życia fluorescencji. Utrudnia to analizy, które wymagają znakowania i śledzenia wielu, jednocześnie przebiegających procesów biologicznych. Interesujące rozwiązanie tego problemu zaproponowali Wang i Tan [13], którzy domieszkowali nanocząsteczki krzemionkowe kilkoma różnymi rodzajami cząsteczek barwników fluorescencyjnych. Spektralne kody barwne powstały na skutek wielokrotnego rezonansowego transferu energii (FRET) między poszczególnymi barwnikami w DDS. Uzyskane w ten sposób duże przesunięcie Stokesa oraz możliwość stworzenia wielu kodów barwnych jest bardzo interesującym rozwiązaniem z punktu widzenia analiz wieloparametrycznych [13].

Wraz z rozwojem nanotechnologii, jako alternatywa dla typowych bioznaczników fluorescencyjnych pojawiły się nowe materiały luminescencyjne o konkurencyjnych właściwościach fizykochemicznych. Przykładem są półprzewodnikowe kropki kwantowe (ang. *Quantum Dots*, QDs) oraz nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców (ang. *Lanthanide Doped Nanocrystal*, Ln:NC).

Kropki kwantowe są kilku nanometrowymi, półprzewodnikowymi krystalitami składającymi się z atomów II-VI (np. CdS, CdTe, CdSe, ZnSe) oraz III-V (np. InP, InAs) grupy układu okresowego [17]. Luminescencja tych nanocząsteczek wynika z efektów kwantowych, które wpływają na dyskretyzację gęstości dozwolonych stanów elektronowych. Właściwości spektroskopowe QDs w dużej mierze zależą od rozmiaru i kształtu krystalitu, te parametry z kolei mogą być precyzyjnie kontrolowane podczas syntezy przez dobór czasu i temperatury oraz odpowiednie ligandy [18–20]. Ponadto, kropki kwantowe cechują się szerokim zakresem absorpcji promieniowania UV oraz emisją w zakresie widzialnym zależną od rozmiaru nanokrystalitu [21]. Szerokość połowkowa pasma emisji (ang. *Full Width Half Maximum*, FWHM) kropek kwantowych w zależności od ich składu i rozmiaru wynosi 40–80 nm. Jest ona wystarczająca do dekonwolucji spektralnej emisji i detekcji co najmniej kilku analitów znakowanych różnymi kropkami kwantowymi w jednej próbce. Poprzez umieszczenie różnych kropek kwantowych a także regulację ich względnych koncentracji w krzemionkowych kulkach, uzyskuje się kody barwne [22, 23]. Takie znaczniki są za duże, by mogły być wykorzystane w biologicznych badaniach *in vivo*, jednak nadają się do testowania leków czy też badań przesiewowych schorzeń genetycznych. Wydajna luminescencja kropek kwantowych może być również użyta w czujnikach opartych na efekcie FRET, tj. Försterowskim rezonansowym transferze energii, gdzie pełnią one funkcję donora dla organicznych akceptorów [24, 25]. Ze względu na toksyczność metali ciężkich, wchodzących w skład typowych kropek kwantowych (Cd, Se itp.), a także w celu poprawy ich właściwości spektroskopowych (np. wyeliminowania fotomigotania, fotowybielania, poprawy bezwzględnej intensywności emisji) opracowano metody syntezy pozwalające na uzyskanie struktur typu rdzeń–powłoka. Pokrycie QD nieorganiczną warstwą (np. ZnS [26], SiO₂ [27]), bądź też organicznym polimerem [28] minimalizuje ich cytotoxyczność [29]

i poprawia biokompatybilność oraz właściwości emisyjne. Powłoka chroni również półprzewodnikowy rdzeń przed chemiczną degradacją. Pokrycie powłoką ma szczególne znaczenie z punktu widzenia nanotoksykologii, ograniczonej akumulacji i zdolności do wydalania tych nanokrystalitów z organizmu [30].

W niniejszym artykule, omówione zostały właściwości oraz zastosowania biotechnologiczne innej, obiecującej grupy nanoluminoforów, których luminescencja pochodzi z optycznie aktywnych jonów lantanowców zamkniętych w nanorozmiarowych matrycach dielektrycznych. Zaletami tych nanoluminoforów są m.in. wąskie linie absorpcyjne i emisyjne (FWHM 10–20 nm), długie czasy zaniku luminescencji (μs – ms), bardzo duża fotostabilność, a także możliwość uzyskania wydajnej emisji anty-Stokesowskiej. Stosowane matryce dielektryczne nie zawierają szkodliwych komponentów, więc w przeciwieństwie do wielu barwników organicznych czy kropek kwantowych uważane są za nietoksyczne [31]. Istniejące doniesienia literaturowe potwierdzają znikomą toksyczność chemiczną tych związków [32, 33], jednak problem toksykologii nanomateriałów jest bardziej złożony i nie ogranicza się jedynie do składu chemicznego. Współczesna toksykologia dopiero wypracowuje metody szacowania szkodliwości wytworów nanotechnologii, mając na uwadze zarówno mały rozmiar, wysoką reaktywność chemiczną nanocząsteczek, ich głęboką penetrację i długą retencję w organizmie, oraz wysoki stosunek powierzchni do objętości nanocząsteczek [34, 35].

Biologiczne zastosowania nanomateriałów wymagają jednak opracowania i optymalizacji metod modyfikacji ich powierzchni [36–38]. Funkcjonalizacja i biokoniugacja powierzchni nanoznaczników zapewnia nie tylko biokompatybilność, ale przede wszystkim jest istotna dla uzyskania biospecyficzności, czyli selektywnego wykrywania biomolekuł (np. białek, antygenów, DNA, RNA, komórek nowotworowych itp.) [39]. Zarówno nanoluminofory domieszkowane lantanowcami, jak i metody ich biodetekcji czy bioobrazowania pozwalają zminimalizować lub nawet wyeliminować wpływ innych biokomponentów obecnych w próbkach biologicznych. Jak wiadomo, komórki i tkanki silnie rozpraszają, absorbują lub emitują światło, co w wielu przypadkach utrudnia prowadzenie ultraczułych pomiarów [40]. Ponadto, możliwość projektowania właściwości optycznych tych nanoluminoforów przez dobór matrycy, syntezę kompozytów i struktur typu rdzeń–powłoka, kontrolę fazy krystalicznej czy też składu domieszek, może prowadzić do szeregu nowych biotechnologicznych zastosowań. Może to służyć przyspieszaniu i uproszczeniu pomiarów biologicznych, takich jak testy obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, czy też wykrywania mutacji genetycznych w testach przesiewowych [41].

1. WŁAŚCIWOŚCI SPEKTROSKOPOWE LANTANOWCÓW

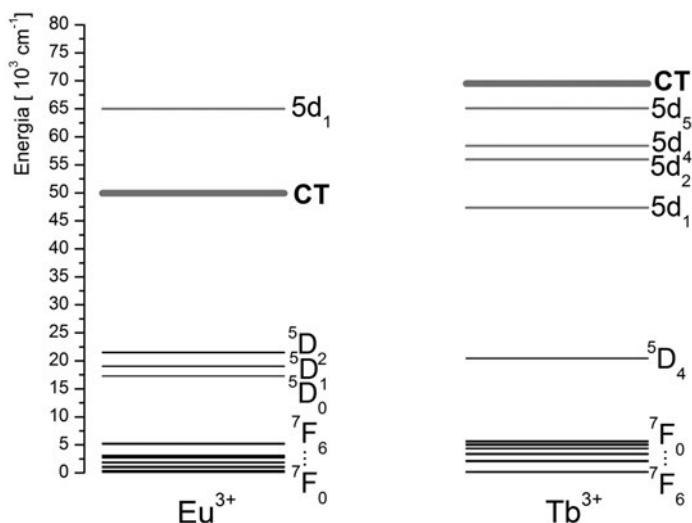
1.1. MECHANIZMY WZBUDZENIA

Luminescencja jonów lantanowców może być wynikiem trzech rodzajów przejść elektronowych: przeniesienia ładunku (ang. *charge transfer*, CT), przejść pomiędzy powłokami 4f i 5d oraz najbardziej charakterystycznych dla jonów lantanowców przejść w obrębie powłoki 4f. Przejścia CT związane są z przeniesieniem elektronu walencyjnego z liganda na orbital metalu lub z procesem odwrotnym, z jonu metalu na ligand. Przejścia te są dozwolone regułami Laporte, co wiąże się z wysokim przekrojem czynnym na absorpcję. Najczęściej występują przy wzbudzeniu wysokoenergetycznym promieniowaniem UV o energii około 40000 cm^{-1} ($\lambda < 250\text{ nm}$). Wyjątek stanowią jony, które mogą być relatywnie łatwo zredukowane do +2 stopnia utlenienia (Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+}), bądź też utlenione do +4 (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Tb^{3+}). W tym przypadku przejście CT występuje przy energii około $30\,000\text{ cm}^{-1}$ ($\lambda < 330\text{ nm}$) [42]. Przejścia te skutkują pojawieniem się szerokich pasm o intensywności zależnej od symetrii otoczenia jonu centralnego. Na Rysunku 1 przedstawiono schemat poziomów energetycznych jonów Eu^{3+} oraz Tb^{3+} z uwzględnieniem poziomów 5d oraz pasm CT. Często obserwowanym przejściem CT w widmach elektronowych pierwiastków ziem rzadkich jest przejście $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$, którego maksimum znajduje się przy około 250 nm. W przypadku jonów Eu^{3+} przejście to pełni funkcję tak zwanej anteny efektywnie absorbującej energię wzbudzenia i przekazującej ją do poziomów ${}^4\text{F}_6$. Jako skutek tego transferu obserwuje się emisję światła o większej intensywności niż w przypadku luminoforu, w którym CT nie zachodzi, a proces wzbudzenia odbywa się przez przejścia f-f [43]. Wykorzystanie nanoznaczy, w których istnieje możliwość wywołania luminescencji poprzez wzbudzenie pasma CT, jest jednak problematyczne z kilku powodów. Po pierwsze, światło ultrafioletowe z tego zakresu jest szkodliwe dla komórek i tkanek. Po drugie, promieniowanie to jest silnie rozpraszane na strukturach komórkowych oraz pochłaniane przez chromofory tkankowe, indukując w wielu przypadkach ich autofluorescencję (AF). Jeśli jednak AF jest zaniechywalna, a pomiar następuje w biotestach *in vitro*, nanoluminofory mogą być bardzo interesującą alternatywą, np. dla chromatografii czy elektroforezy zastępując kłopotliwe testy izotopowe [44, 45].

Kolejnym rodzajem przejść elektronowych, występującym w jonach ziem rzadkich, są przejścia pomiędzy powłokami 4f \rightarrow 5d. Ich energia w dużej mierze zależy od środowiska otaczającego jon metalu, gdyż zewnętrzne orbitale 5d wchodzi w bezpośrednią interakcję z orbitalami otaczających je ligandów. Jako przykład mogą posłużyć trójwartkatnie jony ceru, których długość emitowanej fali może wynosić od 290 do 400 nm w zależności od matrycy, w której są umieszczone. Przejścia 4f \rightarrow 5d wymagają użycia wysokoenergetycznego promieniowania i są obserwowane tylko dla niektórych trójwartkatnich jonów, takich jak Ce^{3+} , Pr^{3+} , Tb^{3+} oraz dwuwartkatnich np. Eu^{2+} , Yb^{2+} , Sm^{2+} [42]. Przejścia 4f \rightarrow 5d są przejściami dozwolonymi regułami

wyboru, co skutkuje szerokimi i intensywnymi pasmami emisji, oraz relatywnie krótkimi czasami życia stanu wzbudzonego (kilka μs).

W większości przypadków widzialna emisja lantanowców pochodzi z przejść elektronowych w obrębie powłoki f ($4f \rightarrow 4f$). Przejścia te są przejściami zabronionymi regułami Laporte, więc przekrój czynny na absorpcję takich materiałów jest około 2–3 rzędy mniejszy niż dla barwników organicznych czy kropek kwantowych. Z kolei czasy życia luminescencji (tj. średni czas przebywania elektronów w stanie wzbudzonym) sięga dziesiątek mikrosekund, do nawet pojedynczych milisekund. Elektrony znajdujące się na powłoce $4f$ są silnie ekranowane przez całkowicie zapełnione powłoki $5s^2$ i $5p^6$, dzięki czemu są one chronione od otaczającego je środowiska. Słabo oddziałują z otoczeniem i nie biorą udziału w tworzeniu wiązań chemicznych. W konsekwencji czynniki zewnętrzne (np. pole krystaliczne) mają niewielki wpływ na właściwości spektroskopowe jonów lantanowców na +3 stopniu utlenienia. Konsekwencją są wąskie pasma absorpcji i emisji jonów lantanowców umieszczonych w nieorganicznej matrycy (FWHM wynosi około 10–20 nm), które przypominają zazwyczaj widma wolnego jonu [46]. Z powodu wąskich i słabych pasm absorpcji lantanowców, korzystne jest stosowanie wąskich spektralnie i intensywnych źródeł światła, np. laserów lub diod LED. Z kolei dostępne na rynku ultraczułe fotodetektory, umożliwiają detekcję pojedynczych fotonów. Tak więc, mimo stosunkowo niedużej bezwzględnej intensywności luminescencji znaczników zawierających jony lantanowców, detekcja czy biobrazowanie z ich użyciem nie stanowi technicznej przeszkody. Ponadto, niewielka szerokość połówkowa emisji lantanowców w matrycach krystalicznych pozwala na łatwą interpretację widm w przypadku, gdy dochodzi do nakładania się pasm emisji kilku jonów. Długie czasy zaniku fluorescencji umożliwiają również, w technicznie prosty sposób, poprzez pomiary rozdzielcze w czasie, zniwelować autofluorescencję komponentów biologicznych. Jedną z podstawowych zalet matryc (współ)domieszkowanych jonami lantanowców jest możliwość uzyskania wydajnej emisji anty-Stokesowskiej, tj. emisji wysokoenergetycznych fotonów przy wzbudzeniu fotonami o mniejszej energii. Zjawiska dwufotonowej emisji barwników organicznych i kropek kwantowych są znane i stosowane w biologii i obrazowaniu biologicznym, jednak lantanowce oferują kilka rzędów wielkości wyższą efektywność tych procesów [37, 47, 48]. Procesy transferu energii i konwersji energii w górę, zostaną omówione poniżej.



Rysunek 1. Schemat poziomów energetycznych jonów Eu^{3+} oraz Tb^{3+}
 Figure 1. Energy level diagram of Eu^{3+} and Tb^{3+} ions

1.2. WŁAŚCIWOŚCI LUMINESCENCYJNE

Emisja jonów ziem rzadkich obejmuje cały zakres spektralny od UV (Gd^{3+}) poprzez promieniowanie widzialne (Tm^{3+} – niebieskie, Tb^{3+} – zielone, Sm^{3+} – pomarańczowe, Eu^{3+} – czerwone) do zakresu NIR (Pr^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}) [49]. Dwa jony, La^{3+} i Lu^{3+} , nie wykazują przejść f-f, dlatego w ich przypadku nie obserwuje się emisji światła. Położenie pasm emisji f-f nie zależy od składu chemicznego matrycy oraz od fizycznych rozmiarów krystalitów. Jednak struktura tych pasm oraz względna intensywność, a także czasy życia emisji podlegają zmianom przy redukcji rozmiarów. Wynika to z rosnącego wówczas stosunku powierzchni do objętości nanokrystalitów, i wszystkich, wynikających z tego faktu konsekwencji. Na powierzchni nanokrystalitów obecne są ligandy, których drgania mogą modyfikować procesy transferu energii lub modulować emisję promienistą i niepromienistą. W nanomateriałach obserwuje się mniejszą gęstość fononów niż w matrycach mikrokrystalicznych [50]. Ponadto, przejścia dipolowo-dipolowe silnie zależą od współczynnika załamania ośrodka, w którym następuje emisja fotonów [6, 51]. W przypadku nanomateriałów efektywny współczynnik załamania, zależny od parametrów matrycy oraz chemicznego otoczenia, determinuje właściwości emisyjne jonów lantanowców [6]. Jedną z najcenniejszych zalet nanoluminoforów domieszkowanych lantanowcami w zastosowaniach biologicznych jest możliwość uzyskania emisji anty-Stokesowskiej [52]. Zjawisko to, nazywane konwersją energii w górę (ang. *Up-conversion*, UC), jest nieliniowym procesem optycznym, w którym wzbudzając nisko energetycznym promieniowaniem podczerwonym (NIR) otrzymuje się emisję światła widzialnego, bądź też ultrafioletowego, o energii fotonów wyższej niż energia foto-

nów promieniowania pompującego. Pojęcie konwersji energii w górę zostało pierwszy raz sformułowane przez Auzela, w połowie lat sześćdziesiątych. W 1966 roku, zademonstrowano luminofor CaWO_4 współdomieszkowany jonami Yb^{3+} i Er^{3+} , w którym zachodziła efektywna konwersja dwóch niskoenergetycznych fotonów (~ 1000 nm) na fotony o wyższej energii (540 i 650 nm) [53]. Dalsze badania zjawiska konwersji promieniowania podczerwonego na widzialne umożliwiły rozwój takich urządzeń jak detektory kwantowe [54], czujniki temperatury [55] oraz lasery [56]. Wykorzystanie efektu UC ograniczone było przez ponad 30 lat jedynie do materiałów monokrystalicznych i mikrometrycznych proszków. Wzrost zainteresowania nanotechnologią i nanocząsteczkami nastąpił na początku lat dziewięćdziesiątych. Dostrzeżono możliwość zastosowania konwertujących w górę nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców (ang. *Up-converting Nanoparticles*, UCNPs) w testach bioanalitycznych oraz w obrazowaniu luminescencyjnym [38]. Jednakże wykorzystanie zjawiska konwersji energii w biologii i medycynie było ograniczone głównie ze względu na trudność syntezy nanorozmiarowych cząstek, które wykazywałyby wysoką intensywność emisji oraz wysoką dyspersję i stabilność koloidalną w zawiesinach wodnych. Dopiero pod koniec lat dziewięćdziesiątych UC została wykorzystana w testach biologicznych i obrazowaniu medycznym [57].

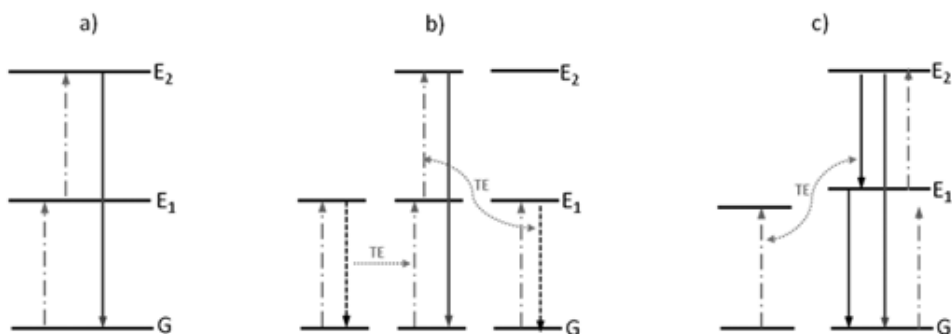
Konwertujące w górę nanoluminofory koloidalne syntezowane są zwykle jako nieorganiczne matryce – najczęściej halogenki lub tlenki np. NaYF_4 , LaF_3 , YF_3 , Y_2O_3 , domieszkowane optycznie aktywnymi trójwartościowymi jonami lantanowców np. Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} . Większość luminoforów zawiera jony Yb^{3+} stosowane jako uczulacz, a także jony Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} , rzadziej Pr^{3+} w charakterze emitera. Badania wykazały, że ze względu na właściwości fononowe, najbardziej efektywnymi w procesie konwersji energii w górę są kryształy fluorków $\beta\text{-NaYF}_4$ domieszkowane jonami $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ lub $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ [58–60].

1.3. MECHANIZMY KONWERSJI ENERGII W GÓRĘ

Proces konwersji energii w górę może zachodzić według jednego z następujących mechanizmów: (1) absorpcji ze stanu wzbudzonego ESA (ang. *Excited State Absorption*), (2) sumowania fotonów (fr. *Addition de Photons par Transferts d'Énergie*, APTE) na drodze transferu energii ETU (ang. *Energy Transfer Up-conversion*) oraz (3) w procesie lawinowej emisji fotonów PA (ang. *Photon Avalanche*). Procesy te polegają na absorpcji kolejnych fotonów wzbudzających, a sam mechanizm fizyczny znacznie się różni od wielofotonowej absorpcji i generacji wyższych harmonicznych. UC wmatrycy $\beta\text{-NaYF}_4$ domieszkowanej jonami Er^{3+} oraz Yb^{3+} charakteryzuje się około 10^5 razy większą wydajnością niż ma to miejsce w przypadku rodaminii 6G oraz fluoresceiny, w których emisja światła jest wynikiem dwufotonowej absorpcji [61]. Zademonstrowano, że sprawność konwersji energii w górę (η_{UC}) jest 3 [47] do 10^7 [48] razy większa w porównaniu do wydajności dwufotonowej absorpcji w kropkach kwantowych (η_{QDs}). Istnieją również inne możliwe procesy konwersji energii

w górę, jak na przykład kooperatywna emisja (obserwowana w parach jonów Yb^{3+}), kooperatywne uczulanie (np. w Yb^{3+} - Eu^{3+}) czy też procesy nieliniowe (np. generacja drugiej harmonicznej). Wydajność tych procesów jest jednak 3 do 10 rzędów niższa niż proces APTE [62].

Na Rysunku 2a przedstawiono mechanizm absorpcji ze stanu wzbudzonego, w którym wzbudzenie następuje poprzez absorpcję kolejnych fotonów pompujących $h\nu_{\text{ex}}$, w obrębie jednego jonu. W wyniku absorpcji fotonu $h\nu_{\text{ex}} = E_1 - G$, elektron ze stanu podstawowego G jest przeniesiony do stanu E_1 . Proces ten nosi nazwę absorpcji ze stanu podstawowego (GSA). Absorpcja kolejnego fotonu przez ten sam jon, powoduje wzbudzenie elektronów, tym razem z poziomu E_1 do kolejnego wyższego poziomu E_2 , z którego następuje emisja światła ($E_2 \rightarrow G$), przy czym $E_2 - G > h\nu_{\text{ex}}$. Absorpcja ze stanu wzbudzonego jest bezpośrednim skutkiem metastabilnego charakteru stanów wzbudzonych w jonach lantanowców, co wiąże się z dużym prawdopodobieństwem absorpcji fotonów przez wzbudzony jon. Dodatkowym warunkiem zaistnienia ESA jest dopasowanie energetyczne fotonów wzbudzających i różnicy energetycznej $\Delta E = E_2 - E_1$ pomiędzy wzbudzonymi poziomami E_1 i E_2 .



Rysunek 2. Schemat najbardziej wydajnych mechanizmów konwersji energii w górę. a) Absorpcja ze stanu podstawowego (GSA) $G \rightarrow E_1$, i absorpcja ze wzbudzonego (ESA) $E_1 \rightarrow E_2$; b) sumowanie fotonów (APTE) na drodze transferu energii (ETU); c) proces lawinowy (PA). Czerwoną linią -.-. zaznaczono wzbudzenie, czarną linią ---- bezpromienistą relaksację, natomiast linią ciągłą - emisję.

Figure 2. Most efficient UC processes found in lanthanide doped nanoparticles. a) Excited state absorption (ESA), b) energy transfer upconversion (ETU), c) photon avalanche (PA). The dash-dotted red, dashed black and solid arrows represent photon excitation, nonradiative relaxation and emission processes, respectively.

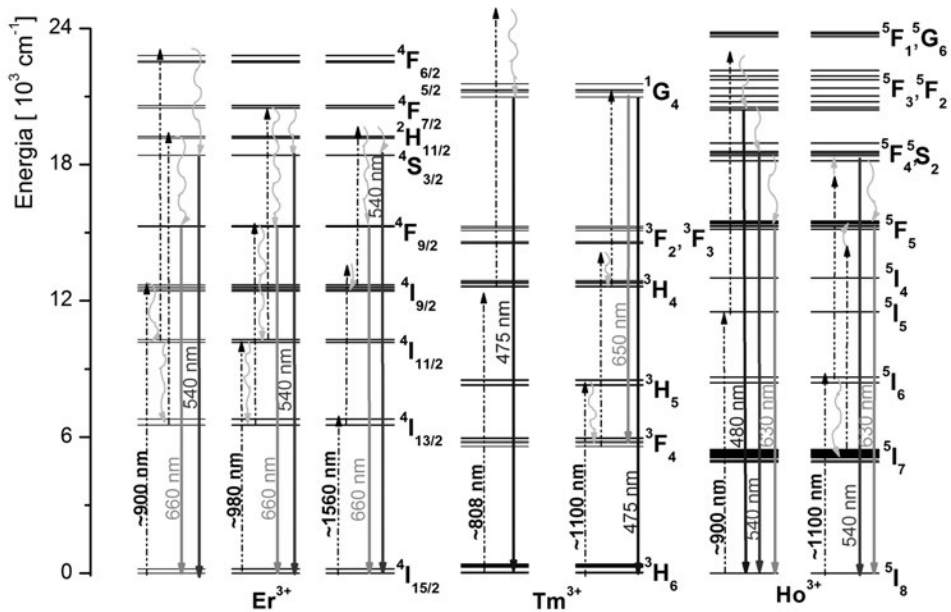
Na wydajność procesu konwersji w górę, ma również wpływ różnica energii ΔE między poziomem emitującym a dowolnym, niżej leżącym, poziomem energetycznym (tzw. przerwa energetyczna). Zgodnie z prawem przerwy energetycznej [63], wraz ze wzrostem tej różnicy, prawdopodobieństwo depopulacji poziomów wzbudzonych na drodze bezpromienistej maleje eksponencjalnie. Depopulacja bezpromienista staje się nieefektywna, gdy wartość ΔE jest przynajmniej pięciokrotnie większa od energii fononów dostępnych w matrycy. Proces ten ma krytyczne znaczenie dla obsadzenia poziomów energetycznych i wydajności kwantowej emisji. Jak

pokazano na Rysunku 3, jony Er^{3+} oraz Tm^{3+} posiadają stosunkowo duże przerwy energetyczne pomiędzy poziomami pośrednimi a emitującymi, co skutkuje wydajną emisją anty-Stokesowską. Prawo przerwy energetycznej ma szczególne znaczenie przy wyborze matrycy, która będzie domieszkowana. Poszukiwane są materiały o jak najmniejszej częstotliwości odcięcia (ω_{max}), tzn. o niskoenergetycznych drganiach sieci krystalicznej, po to, by zminimalizować bezpromienistą depopulację poziomów energetycznych. Dlatego matryce fluorkowe (np. NaYF_4 , LaF_3 , SrF_2) oraz chlorkowe (np. LaCl_3) o $\omega_{\text{max}} \sim 250\text{--}350\text{cm}^{-1}$ pozwalają uzyskać wydajniejszą luminescencję anty-Stokesowską w porównaniu do matryc tlenkowych (np. YAlO_3 , $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) o $\omega_{\text{max}} \sim 550\text{--}700\text{cm}^{-1}$ [64].

Przykładem absorpcji ze stanu wzbudzonego jest anty-Stokesowska emisja obserwowana w jonach Er^{3+} . Różnica energetyczna pomiędzy poziomem ${}^4\text{I}_{11/2}$ a ${}^4\text{I}_{15/2}$ ($\sim 10350\text{ cm}^{-1}$) jest w przybliżeniu równa różnicy energetycznej pomiędzy poziomem ${}^4\text{F}_{7/2}$ a ${}^4\text{I}_{11/2}$ ($\sim 10370\text{ cm}^{-1}$). Dzięki takiej konfiguracji poziomów energetycznych ${}^4\text{I}_{15/2}$, ${}^4\text{I}_{11/2}$ oraz ${}^4\text{F}_{7/2}$, jony erbu przy wzbudzeniu promieniowaniem 980 nm wykazują konwersję energii w górę. Na Rysunku 3 przedstawiono schematy konwersji energii w górę w jonach Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} , które często stosowane są jako aktywatory. Luminofory domieszkowane pojedynczo lantanowcami charakteryzują się jednak niską wydajnością procesów konwersji energii, głównie ze względu na procesy wygaszania koncentracyjnego oraz niekorzystnie niskie przekroje czynne na ESA. Źródłem wygaszania koncentracyjnego jest tzw. relaksacja krzyżowa (ang. *Cross-relaxation*, CR), która w wyniku transferu energii między dwoma jonami prowadzi do depopulacji stanów wzbudzonych. Na podstawie schematu energetycznego przedstawionego na Rysunku 2b, proces wygaszania koncentracyjnego można wyjaśnić następująco. Dwa sąsiadujące jony znajdujące się w stanach podstawowym G oraz wzbudzonym E_2 , przechodzą w wyniku procesu CR do poziomów energetycznych E_1 . Proces relaksacji krzyżowej jest zależny od dopasowania energii między odpowiednimi poziomami ($E_1 - G$ względem $E_2 - E_1$), a także od koncentracji jonów aktywnych, a tym samym od odległości między nimi.

Kolejnym mechanizmem konwersji energii w górę, który może zachodzić pomiędzy jonami lantanowców, jest proces lawinowej emisji fotonów. Schemat tego procesu został przedstawiony na Rysunku 2c. Charakterystyczny dla tego procesu jest brak absorpcji ze stanu podstawowego, wynikający z niedopasowania energetycznego pomiędzy poziomem G a E_1 z energią fali wzbudzającej. Promieniowanie pompujące jest natomiast rezonansowo dopasowane do przejść pomiędzy metastabilnym poziomem E_1 a stanami o wyższej energii E_2 . Poziom E_1 jest początkowo pusty, a jego obsadzenie buduje się powoli w wyniku emisji $E_2 \rightarrow E_1$ lub w wyniku procesów niepromienistego transferu energii (np. relaksacji krzyżowej). Objawia się to występowaniem progowej wartości mocy wzbudzenia, powyżej której obserwuje się lawinowy wzrost intensywności emisji. Po przekroczeniu progu procesu lawinowego, promieniowanie wzbudzające jest silnie absorbowane w wyniku ESA, a intensywność fluorescencji wzrasta o kilka rzędów. Proces lawinowej emisji fotonów jest bardzo interesującym, ale niezbyt często spotykanym zjawiskiem, gdyż zależy od

subtelnego współgrania wielu parametrów takich jak czasy życia stanów wzbudzonych, schemat poziomów energetycznych, wielkość niedopasowania energii między odpowiednimi poziomami elektronowymi [65–71].

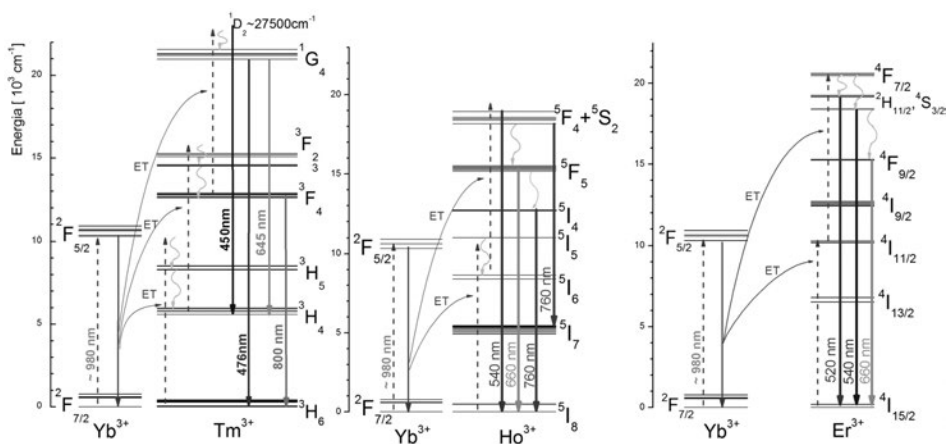


Rysunek 3. Schematy poziomów energetycznych i mechanizmów konwersji energii w górę w jonach Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} dla różnych linii wzbudzających (900, 980, 1560 nm dla Er^{3+} , 808 i 110 nm dla Tm^{3+} oraz 900 i 1100 nm dla Ho^{3+}). Linia przerywaną zaznaczono wzbudzenie; linią falowaną wielofononową relaksację, linią ciągłą – emisję.

Figure 3. Schematic energy level diagram showing typical UC processes for Er^{3+} , Tm^{3+} and Ho^{3+} using different excitation light. The dashed, wavy and solid arrows represent photon excitation, multiphonon relaxation and emission processes, respectively.

Aby uniknąć niepromienistej depopulacji poziomów wzbudzonych koncentracja jonów aktywatorów winna być odpowiednio niska i dobrana do stosowanej matrycy. Stosowanie niskich stężeń jonów domieszkujących prowadzi niestety do obniżenia bezwzględnej intensywności luminescencji. Dodatkowo, większość jonów ziem rzadkich, posiada niski czynny przekrój na absorpcję promieniowania z zakresu NIR, co powoduje, że materiały zawierające tylko jeden rodzaj domieszki, charakteryzują się niską wydajnością konwersji energii wzbudzenia. Istotny wzrost efektywności tych procesów następuje w przypadku dodawania fotonów zgodnie z mechanizmem ETU, którego schemat został przedstawiony na Rysunku 2b. W tym celu matrycę współdomieszkuje się jonami aktywatorów oraz jonami spełniającymi rolę uczulacza, głównie jonami Yb^{3+} . Jony te posiadają prosty schemat poziomów energetycznych, tylko z jednym stanem wzbudzonym $^2\text{F}_{5/2}$ (Rys. 4). Intensywne pasmo absorpcji przy około 980 nm, można przypisać przejściu $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$. Pasmo to może być skutecznie pompowane bardzo wydajnymi diodami laserowymi (np.

InGaAs/GaAs 900–1100 nm). Wzbudzone jony iterbu wykazują długie czasy zaniku luminescencji dzięki czemu są zdolne do magazynowania energii. Struktura elektronowa iterbu minimalizuje dodatkowo niekorzystne procesy tłumienia koncentracyjnego, więc stężenie jonów Yb^{3+} w matrycy może 10–20 krotnie przewyższać ilość jonów aktywatora. Istnieją też nanomateriały pełnokoncentracyjne, np. $\text{NaYbF}_4:\text{Tm}^{3+}$ [72, 73], które mogą bardzo efektywnie absorbować promieniowanie wzbudzające obniżając tym samym próg emisji. Co ważne, wspomniane przejście jest quasi-rezansowe w stosunku do przejść f-f wielu innych lantanowców, co sprzyja efektywnemu transferowi energii między jonami uczulacza a aktywatora. Najbardziej efektywną konwersję energii w górę wykazują matryce współdomieszkowane parami jonów: $\text{Er}^{3+}-\text{Yb}^{3+}$ [59] oraz $\text{Tm}^{3+}-\text{Yb}^{3+}$ [74]. Na Rysunku 4 przedstawiono schematy energetyczne procesów konwersji energii w wymienionych parach jonów.



Rysunek 4. Schematy energetyczne przedstawiające proces UC zachodzący w parach jonów $\text{Yb}^{3+}-\text{Tm}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}-\text{Ho}^{3+}$ oraz $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$. Linią przerywaną oznaczono wzbudzenie, falowaną wygaszanie bezpromienne, natomiast linią ciągłą przedstawiono emisję fotonów.

Figure 4. Upconversion mechanism of the Yb/Er, Yb/Tm and the Yb/Ho co-doped UCNPs. The dashed, wavy and solid arrows represent photon excitation, multiphonon relaxation and emission processes, respectively.

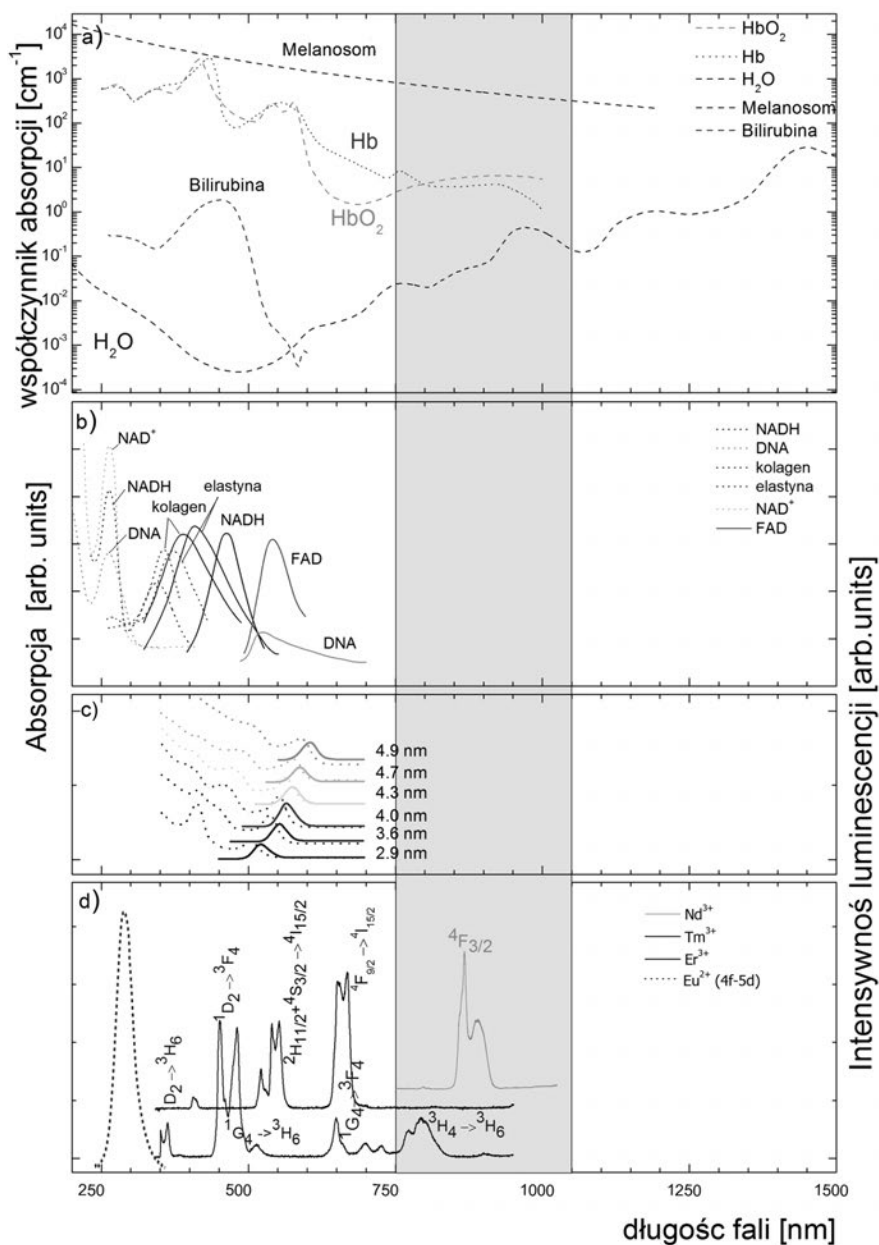
Absorpcja promieniowania o długości fali 980 nm przez jon uczulacza (Yb^{3+}) prowadzi do transferu energii i wzbudzenia jonów aktywatora (np. Tm^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+}), w których obserwuje się emisję światła widzialnego. W przypadku jonów Tm^{3+} silna niebieska emisja powstaje w wyniku przejścia $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{F}_4$ oraz $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$. Natomiast emisja światła czerwonego, o mniejszej intensywności, pochodzi z przejścia $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_4$. W przypadku domieszkowania jonami $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$, obserwowana emisja pochodzi z przejść: $^2\text{H}_{11/2} + ^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^5\text{I}_4 \rightarrow ^5\text{I}_8$, $^2\text{H}_{11/2} + ^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_7$. W parze jonów $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, na skutek UC następuje emisja głównie z poziomów $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$ oraz $^4\text{F}_{9/2}$ do poziomu podstawowego $^4\text{I}_{15/2}$.

W porównaniu z typową emisją Stokesowską zachodzącą w organicznych barwnikach fluorescencyjnych oraz w kropkach kwantowych, proces konwer-

sji w górę wykazuje liczne zalety. Zastosowanie wzbudzenia promieniowaniem z zakresu podczerwieni pozwala uniknąć problemów, które pojawiają się w przypadku wzbudzenia materiału biologicznego promieniowaniem UV. Po pierwsze, promieniowanie ultrafioletowe ma ograniczoną zdolność penetracji tkanek, których składniki z jednej strony silnie rozpraszają, a z drugiej strony silnie absorbują padające fotony. Chromofory tkankowe takie jak kolagen, elastyna, porfiryny, NADH, FAD czy DNA, pod wpływem UV, wykazują silną autofluorescencję. Rezultatem jest obniżona dokładność i czułość detekcji. Złożonym zagadnieniem jest również wyodrębnienie użytecznego sygnału oraz poprawa stosunku sygnału do szumu. Zastosowanie promieniowania NIR do wzbudzenia luminoforów pozwala wyeliminować autofluorescencję gdyż w tkankach brak jest endogennych absorberów fal z tego zakresu. Można wówczas uzyskać znacznie większą czułość analiz niż w przypadku tradycyjnie stosowanych barwników fluorescencyjnych. Pozwala to znacznie uprościć konstrukcję układów do wzbudzenia i detekcji, a tym samym zwiększyć przepustowość analiz, zmminiaturyzować systemy czujnikowe oraz zwiększyć dostępność i powszechność szybkich testów diagnostycznych. Stosowanie wzbudzenia NIR pozwala również ograniczyć fotouszkodzenie komórek i tkanek przy jednoczesnym wzroście głębokości penetracji, d_p , światła wzbudzającego. Dla światła z zakresu UV d_p wynosi nie więcej niż kilka milimetrów, natomiast dla promieniowania podczerwonego wartość ta może sięgać nawet 10-15 centymetrów w przypadku tkanki tłuszczowej [75]. Problematyka ta jest szerzej omówiona w rozdziale poświęconym obrazowaniu.

1.4. ISTOTNE BIOLOGICZNIE WŁAŚCIWOŚCI NANOLUMINOFORÓW

Trudno jest jednoznacznie wskazać, które z nanoluminoforów takich jak kropki kwantowe, kulki krzemionkowe wypełnione barwnikami organicznymi, czy też domieszkowane lantanowcami nanokrystality wykazują cechy najkorzystniejsze z punktu widzenia zastosowań biologicznych. Na Rysunku 5 porównano przykładowe widma absorpcji i luminescencji jonów lantanowców, kropek kwantowych oraz barwników organicznych a także wyjaśniono pojęcie „okna optycznego skóry”. Długie czasy życia poziomów wzbudzonych lantanowców oraz odporność na fotowysbielanie, które jest wyjątkowo uciążliwe i problematyczne w przypadku barwników organicznych, umożliwiają prowadzenie obrazowania *in vivo* w czasie rzeczywistym, pozwalając tym samym na zrozumienie wielu procesów zachodzących w żywej komórce bądź całym organizmie.



Rysunek 5. Zestawienie widm absorpcji (linie przerywane) i luminescencji (linie ciągłe) różnych fluoroforów organicznych oraz nanoluminoforów, tzn. a) chromoforów tkankowych i wody; b) molekuł organicznych [49]; c) kropek kwantowych [70]; d) widma luminescencji jonów Nd³⁺, Tm³⁺, Er³⁺ oraz Eu²⁺. Szary obszar 750–1100 nm to tzw. okno optyczne skóry

Figure 5. The absorption (dashed lines) and emission (solid lines) spectra of different organic fluorophores and luminescent nanoparticles, i.e. a) tissue chromophores, water absorption and the optical window of skin; b) luminescence spectra of biological molecules [49]; c) emission and absorption spectra of quantum dots [70]; d) luminescence spectra of the Nd³⁺, Tm³⁺, Er³⁺ and Eu²⁺ ions

W porównaniu z kropkami kwantowymi konwertujące w górę nanoluminofory wykazują dłuższe czasy życia luminescencji i brak tak zwanego „migotania” podczas emisji. Dodatkowo, nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców pozwalają na uzyskanie dużej ilości kodów barwnych do równoczesnej detekcji wielu analitów w jednej próbce poprzez zmianę rodzaju lub stężenia jonów domieszkujących [59]. Podobne możliwości oferują kulki krzemionkowe domieszkowane mieszaninami kropek kwantowych [77] lub barwników organicznych [78], jednak tylko nanoluminofory domieszkowane lantanowcami pozwalają równocześnie zachować skalę nanometryczną.

Z punktu widzenia zastosowań biologicznych wadą nanoluminoforów jest niewielki przekrój czynny na absorpcję oraz mało wydajna, choć stabilna luminescencja. Ze względu na mechanizm fizyczny emisji anty-Stokesowskiej w lantanowcach, proces konwersji energii w górę obserwowany w UCNP jest wydajniejszy od emisji dwufotonowej (ang. *Two-Photon Emission*, TPE) czy też generacji drugiej harmonicznej (ang. *Second Harmonic Generation*, SHG). W przeciwieństwie do procesów TPE oraz SHG, które wynikają z nieliniowych właściwości materiałów przy odpowiednio silnym pobudzeniu, emisja anty-Stokesowska w jonach lantanowców wynika z sumowania fotonów w procesach transferu energii między rzeczywistymi i długo żyjącymi poziomami elektronowymi. Maestro i współpracownicy [47] porównali względną intensywność emisji UCNP (20 nm α -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺, $\lambda_{\text{exc}} = 980$ nm, $\lambda_{\text{emi}} = \sim 540$ and 650 nm), sferycznych kropek kwantowych o średnicy 4 nm ($\lambda_{\text{em}} \sim 650$ nm) oraz nanoprecinków złota (45 × 10 nm, $\lambda_{\text{surf.plasmon}} \sim 830$ nm, $\lambda_{\text{emi}} = 570\text{--}680$ nm). Pod wpływem 100-fs impulsowego wzbudzenia (1 MW/cm²), UCNP wykazywały odpowiednio ~ 2 i ~ 3 razy większą efektywność emisji anty-Stokesowskiej niż kropki kwantowe i nanoprecinki złota w przeliczeniu na jedną nanocząsteczkę. Jednak pod wpływem wzbudzenia podczerwonym laserem pracy ciągłej (1 MW/cm²), emisję widzialną wykazywały jedynie UCNP. Z kolei Heer wraz ze współpracownikami [48] porównali 1% wag. zawiesiny koloidalne β -NaYF₄: 20%Yb³⁺, 2%Er³⁺ oraz 5 nm kropki kwantowe Cd-Se-ZnS używając tej samej geometrii pomiarowej oraz laserowego wzbudzenia ciągłego 10 kW/cm² odpowiednio na 974 oraz 909 nm. Zarejestrowano 7 rzędów wielkości większą intensywność luminescencji fluorkowych UCNP w porównaniu do dwu-fotonowej emisji kropek kwantowych czy nanoprecinków złota, ale wyniki nie były normalizowane do pojedynczych nanocząsteczek jak w pracy Maestro. Wysoka efektywność emisji anty-Stokesowskiej oraz relatywnie niska progowa intensywność wzbudzenia konwertujących w górę nanocząstek pozwala na znaczne uproszczenie aparatury i upowszechnienie tych metod badawczych. Jak dotąd, spośród znanych znaczników luminescencyjnych, jedynie UCNP pozwoliły uzyskać dwu-fotonowe obrazowanie z wykorzystaniem nielaserych źródeł światła, czy też wysokorozdzielcze i głębokie obrazowanie dwu-fotonowe w mikroskopii szerokiego pola [79].

Kolejnym ważnym zagadnieniem dotyczącym zastosowań nanoluminoforów w naukach biomedycznych, jest brak rozpuszczalności większości nanocząsteczek w roztworach wodnych [80]. Nieorganiczne nanokryształy mają zdolność pozosta-

wania w formie koloidalnych zawiesin wodnych jedynie po modyfikacji powierzchni [59], czyli funkcjonalizacji. Proces ten polega na wprowadzeniu hydrofilowych grup funkcyjnych (np. $-OH$), które umożliwiają zdyspergowanie nanoznaczyków w roztworach wodnych. Kolejnym krokiem, niezbędnym do zastosowania nanoluminoforów w naukach biologicznych, jest ich biokoniuagacja, czyli kowalencyjne lub adsorpcyjne dołączanie specyficznych molekuł biologicznych (np. przeciwciał [81], białek [82] czy też aptamerów, czyli krótkich nici DNA/RNA [83]) do powierzchni nanocząsteczek. Proces ten jest szczególnie istotny i niezbędny dla uzyskania specyficzności detekcji i użyteczności tych związków w biologii oraz medycynie.

Należy również zwrócić uwagę na kwestię toksyczności nanoznaczyków. W porównaniu do najpowszechniej stosowanych kropek kwantowych (np. CdSe), wykorzystujących związki kadmu i selenu, omawiane nanoluminofory nie wykazują praktycznie żadnej chemicznej toksyczności pierwotnej. Niemniej jednak konieczne są dalsze badania toksyczności *in vivo*, wynikającej z potencjalnej dekompozycji nanokrystalitów, rozmiaru hydrodynamicznego tych nanoluminoforów (opisującego tendencję do aglomerowania), albo zaburzenia funkcjonowania organów w wyniku zatkania kapilarnych naczyń krwionośnych. Wiele przeprowadzonych eksperymentów biologicznych wskazuje na brak toksyczności tych materiałów, sugerując tym samym możliwość zastosowania ich w biologii i medycynie [31, 46]. Można jednak przypuszczać, że w związku z odkładaniem się nanoluminoforów w organach wewnętrznych [84], głównie w wątrobie i śledzionie [85], dominującym sposobem wykorzystania tych obiecujących materiałów w biologii będą zastosowania *in vitro* w testach przesiewowych. Dalsza optymalizacja i poprawa biokompatybilności nanocząsteczek może w przyszłości umożliwić zastosowania *in vivo* w ludzkim organizmie.

2. ZASTOSOWANIA W NAUKACH BIOLOGICZNYCH

Wyjątkowe właściwości spektroskopowe jonów lantanowców, takie jak wąskie pasma emisji, zdolność do konwersji energii w górę, odporność na fotowysielanie i stabilna luminescencja spowodowały wzrost zainteresowania możliwością wykorzystania tych związków w naukach biologicznych. Listę różnych nanoluminoforów, domieszkowanych jonami lantanowców, wraz ze stosowaną metodą funkcjonalizacji/biokoniuagacji oraz ich zastosowaniem przedstawiono w Tabeli 1.

W naukach biomedycznych UCNPs mogą być wykorzystane w obrazowaniu optycznym [61, 86], w testach fluorescencyjnych zarówno homogenicznych (wykorzystujących mechanizm FRET [41, 87]) jak i heterogenicznych [88, 89], a także w terapii fotodynamicznej [90]. Istnieją również przykłady badań nanoluminoforów pod kątem zastosowań w nanotermometrii [91], zlokalizowanej hipertermii [92] czy też wykorzystania ich jako platformy nano-biotechnologicznej [93]. W literaturze obcojęzycznej ukazało się kilka interesujących artykułów przeglądowych opisujących wykorzystanie konwertujących w górę nanoluminoforów w naukach biologicz-

nych [38, 46, 94]. W polskiej literaturze brakuje podobnych prac na temat aktualnego stanu wiedzy z dziedziny omawianej w niniejszym artykule.

Tabela 1. Zestawienie stosowanych w biologii nanomateriałów luminescencyjnych domieszkowanych lantanowcami. Przedstawiono skład matrycy, zastosowaną domieszkę, ligand oraz docelowe zastosowanie.

Table 1. A list of available nanocolloidal luminescent materials used in biological experiments. The composition, dopant ions, ligands and target application was compared.

Matryca	Domieszka	Ligand	Zastosowanie	Ref.
Fe ₃ O ₄ /Gd ₂ O ₃	Eu ³⁺	Neutrawidyna, DNA	wykrywanie mutacji w DNA	[95]
Gd ₂ O ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Poli(tlenek etylenu) PEG	znacznik fluorescencyjny, kontrast w MRI	[96]
Gd ₂ O ₃	–	SiO ₂ , PEG	multimodalneobrazowanie	[2]
La ₂ O ₂ S	Yb ³⁺ , Er ³⁺	przeciwciała anti-E2	oznaczenie estradiolu	[97]
LaF ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂	dostarczanie leków, bioobrazowanie, biosensing	[98]
LaF ₃	Ce ³⁺ , Tb ³⁺	Chlorowodorek polialilolaminy PAH) Polistyrenosulfonian sodu (PSS) Chitozan Glukoza	oznaczanie glukozy	[99]
LaF ₃	Ce ³⁺ , Tb ³⁺	Kopolimer kwasu metakrylowego i styrenu	niespecyficzna sonda DNA	[100]
NaGdF ₄	Tm ³⁺ , Er ³⁺ , Yb ³⁺	Kwas azelainowy	multimodalne obrazowanie <i>in vivo</i>	[101]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEG	kontrast w OCT obrazowanie <i>in vivo</i>	[102]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Tm ³⁺	kwas poliakrylowy (PAA)	długoterminowe obrazowanie <i>in vivo</i>	[33]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	streptawidyna	detekcja DNA	[103]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂ + kwas foliowy (FA)	detekcja komórek rakowych	[104]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂ , przeciwciała	znakowanie i obrazowanie komórek HeLa, terapia fotodynamiczna	[90, 105]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Poli(etylenoimina) PEI ftalocyjaninazyńku	terapia fotodynamiczna	[106]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	Kwas foliowy chitosan	obrazowanie komórek nowotworowych płuc	[107]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEI	obrazowanie <i>in vivo</i> nicieni	[108]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺ , Gd ³⁺	Cytrynian/kwas oleinowy (OA), ¹⁸ F	multimodalna tomografia emisyjna, rezonans magnetyczny	[7]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	SiO ₂	obrazowanie siRNA w żywych komórkach	[109]

Matryca	Domieszka	Ligand	Zastosowanie	Ref.
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Tm ³⁺ Yb ³⁺ , Ho ³⁺ Yb ³⁺ , Ho ³⁺ , Ce ³⁺	–	obrazowanie <i>in vivo</i>	[110]
NaYF ₄	Yb ³⁺ , Er ³⁺	NaYF ₄ /SiO ₂	terapia fotodynamiczna	[95]
NaYF ₄	Nd ³⁺		hipertermia	[92]
NdF ₃	–	SiO ₂	obrazowanie NIR-NIR <i>in vivo</i>	[111]
Y ₂ O ₃	Er ³⁺	PEG	detekcja komórek rakowych	[112]
Y ₂ O ₃	Yb ³⁺ , Er ³⁺	PEG streptawidyna	biologiczne znakowanie	[113]
YVO ₄	Eu ³⁺	–	oznaczanie H ₂ O ₂ i silnych utleniaczy	[114]

Ze względu na unikalne właściwości fizyko-chemiczne (omówione w sekcji 1.2.), nanoluminofory domieszkowane lantanowcami mogą być stosowane w wielu dziedzinach nauk biologicznych [38, 94, 115–118]. Na Rysunku 6 przedstawiono klasyfikację biologicznych zastosowań nanoluminoforów. Podzielono je na 3 kategorie: zastosowania pasywne (obrazowanie), modulacyjne (czujniki) oraz aktywne (terapię).

W większości udokumentowanych badań, Ln:NPs stanowią pasywne luminofo-ry, których właściwości spektroskopowe zasadniczo nie podlegają wpływom chemicznego otoczenia. Po odpowiedniej modyfikacji powierzchni nanoluminofory selektywnie wiążą się z odpowiednimi grupami funkcyjnymi na powierzchni komórek. W wyniku akumulacji tak zmodyfikowanych znaczników w preparatach biologicznych możliwe jest obrazowanie morfologii i struktury tkanek, komórek i struktur subkomórkowych (Rozdział 3.4.). Zalety UCNPs w zastosowaniach pasywnych, wynikają z wysokiej fotostabilności [119] tych związków, a także z możliwości obrazowania ich lokalizacji w tkankach i organach w długotrwałych eksperymentach *in vitro* lub *in vivo*. Ponadto wykorzystanie metod dwufotonowych pozwala badać lokalizację nanoznaczników nie tylko w cienkich preparatach komórkowych, ale również w całych organach lub nawet w małych zwierzętach. Takie nanoluminofory wykorzystuje się również chętnie do obrazowania innymi, wymienionymi na Rysunku 6 i omówionymi w Rozdziale 3.4. i 3.6., metodami.

pojawieniem się emisji akceptora. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane w biologii do badania procesów biochemicznych, badania konformacji białek czy też wykrywania nukleotydów. W porównaniu z tradycyjnie stosowanymi w tym celu barwnikami organicznymi, zastosowanie UCNPs do konstrukcji tych czujników umożliwia znaczne uproszczenie metod pomiarowych, gdyż wykonanie testów nie wymaga wyrafinowanego oczyszczania i przygotowania próbek biologicznych. Takie rozwiązanie oferuje również znaczną poprawę czułości poprzez wyeliminowanie sygnału tła.

Ostatnią grupą zastosowań modulacyjnych omawianych znaczników jest analiza bezpośrednia, gdzie zmianom otoczenia (np. temperatury, stężenia związków chemicznych) towarzyszą zmiany właściwości spektroskopowych samych lantanowców wbudowanych w znaczniki. Zastosowania te są omówione w Rozdziałach 3.3., 3.5. i 3.6.

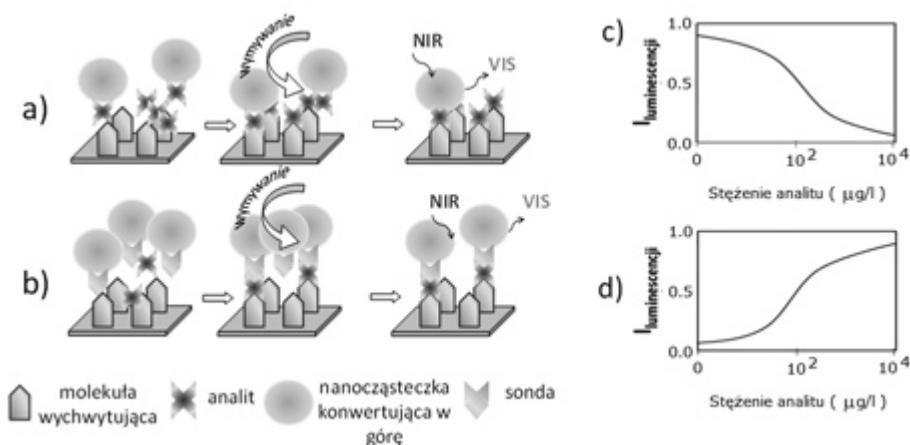
Domieszkowane lantanowcami nanoznaczniki mogą również aktywnie oddziaływać na komórki. Zarówno możliwość lokalnego podgrzania otoczenia, jak i intencjonalne generowanie wolnych rodników, doskonale nadają się do zastosowań w hipertermii lub terapii fotodynamicznej nowotworów. Największą zaletą UCNP w tej grupie zastosowań jest możliwość wykorzystania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni, które zapewnia głębokie wnikanie światła wzbudzającego w tkanki i mało inwazyjną terapię. Zagadnienia te zostały omówione w Rozdziale 3.5. i 3.7. Interesujące są również hybrydy, czyli platformy nanobiotechnologiczne, które łączą w sobie kilka z w/w cech, umożliwiając wielomodalne obrazowanie skojarzone z wielomodalną terapią. Takie hybrydy omówiono w Rozdziale 3.8.

Aktualnie jednym z najpowszechniej rozwijanych zastosowań znaczników luminescencyjnych są analizy pozaustrojowe, gdyż odgrywają ważną rolę w badaniach materiału biologicznego i szybkim wykrywaniu substancji będących wskaźnikami zagrożenia zdrowia ludzkiego, czy też środowiska naturalnego [120]. W obszarze zainteresowań są testy przesiewowe chorób genetycznych, obecności zanieczyszczeń bakteryjnych w wodzie i produktach spożywczych oraz wykrywanie zakażeń drobnoustrojowych itp. [121]. Idealne testy powinny umożliwiać przeprowadzenie analizy w sposób szybki i wysoce wydajny bez konieczności złożonego przygotowania próbek, co powinno nie tylko znacząco skracać czas analizy, ale także obniżyć jej koszty. Ze względu na czułość i techniczną prostotę metod pomiarowych, a także dostępność czułych detektorów i efektywnych źródeł światła, w testach biologicznych najczęściej stosuje się metody bazujące na fluorescencji.

Testy wykorzystujące luminescencję można podzielić na testy heterogeniczne oraz homogeniczne. Testami heterogenicznymi nazywane są testy prowadzone w układach wielofazowych zawierających fazę stacjonarną i fazę ruchomą. Wymagany jest w nich etap oddzielania substancji będących zanieczyszczeniami i tych, które nie brały udziału w przeprowadzanej reakcji. Testy homogeniczne z kolei są prowadzone w układach jednofazowych i nie wymagają etapu rozdzielania, co jest niewątpliwą zaletą i może znacznie uprościć oraz przyspieszyć analizy.

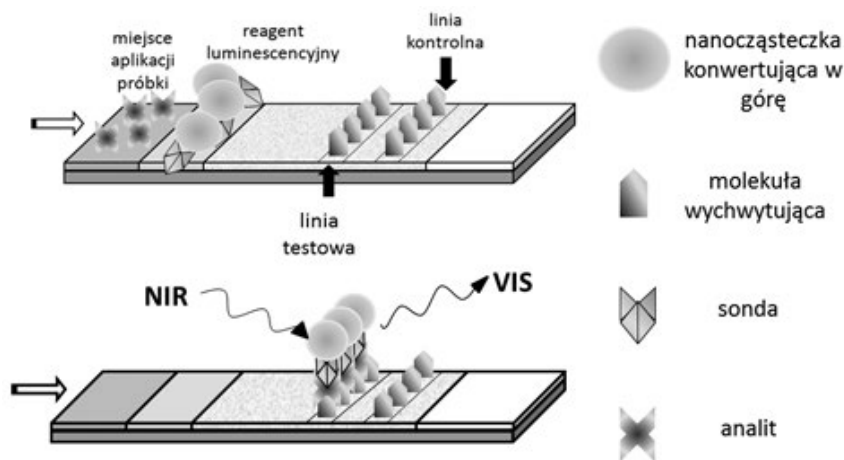
2.1. TESTY HETEROGENICZNE

Rozróżniane są dwa rodzaje testów heterogenicznych: test konkurencyjny oraz niekonkurencyjny [46]. W przypadku testu konkurencyjnego, przedstawionego na Rysunku 7a, analit konkuruje ze znakowaną sondą w wiązaniu do wychwytyjącej molekuly przeciwciała. Intensywność luminescencji uzyskana w takim eksperymencie jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia analitu w badanej próbce, co jest pokazane na wykresie 7c. W teście niekonkurencyjnym, przedstawionym schematycznie na Rysunku 7b, znakowana sonda przyłącza się do molekuly wychwytyjącej dopiero po uprzednim przyłączeniu cząsteczki analitu. Jak przedstawiono na Rysunku 7d uzyskana intensywność sygnału jest więc wprost proporcjonalna do stężenia analitu w próbce.



Rysunek 7. Schemat testu heterogenicznego z udziałem nanocząstek konwertujących w górę
Figure 7. Schematic illustration of heterogenic assay with up-converting nanoparticles

Jednym z bardziej znanych testów heterogenicznych jest test przepływu boczno-inaczej zwany testem kasetkowym. Na Rysunku 8, pokazano najczęściej stosowany test kasetkowy, w którym płytka testowa jest podzielona na kilka obszarów. Na płytce wydzielona jest strefa, na którą naniesiona zostaje próbka z analitem. Tuż za nią znajduje się kolejna strefa płytki z cząsteczkami odpowiedzialnymi za selektywne przyłączenie analitu i generację sygnału podlegającego późniejszej detekcji. Dzięki działaniu sił kapilarnych, badana próbka przepływa wzdłuż płytki, a cząsteczki analitu wiążą się z odpowiednimi biomolekułami, które są znakowane luminoforami. Następnie, takie koniugaty przemieszczają się wraz z roztworem wzdłuż membrany nitrocelulozowej, gdzie są selektywnie wyłapywane przez molekuly wychwytyjące, które osadzono na liniach testowych oraz kontrolnych. Przykładem wykorzystania testu kasetkowego z użyciem konwertujących w górę nanocząstek luminoforów był test na obecność narkotyków w ślinie, a także wykrywanie obecności bakterii *Escherichia coli* O157:H7 [122].



Rysunek 8. Test przepływu bocznego z użyciem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów
Figure 8. Lateral flow test with up-converting nanoluminophores

Odróżnienie analitów następowało w wyniku rejestracji położenia luminescencyjnego kompleksu na płytce jak i barwę charakterystyczną dla wychwyconego luminoforu.

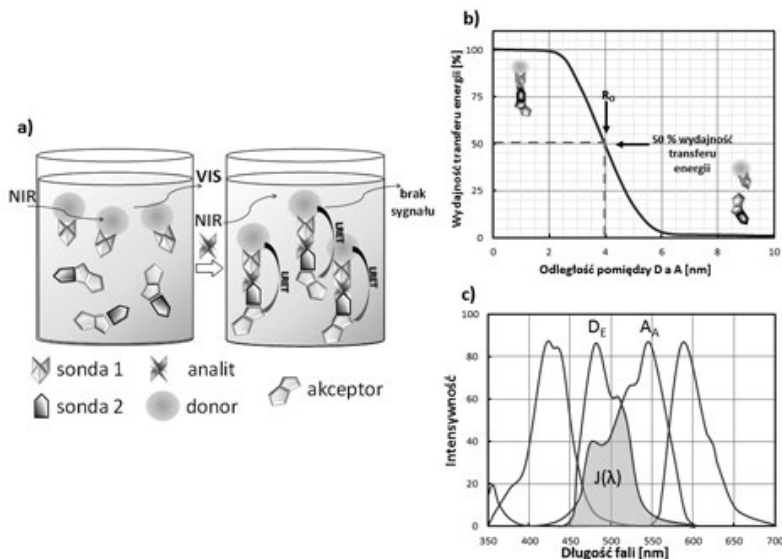
Test kasetkowy z użyciem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów został również wykorzystany do detekcji małych Gram-ujemnych pałeczek bakterii *Yersinia pestis* [123]. Dolny limit detekcji wyniósł 10^4 CFU/ml. Ilość ta jest wystarczająca do wykrycia bakterii we krwi organizmu zakażonego *Y. pestis* [123]. Zastosowany schemat testowy był dziesięciokrotnie bardziej czuły niż test immunochromatograficzny oparty na koloidalnych cząsteczkach złota [124]. Mader [125] w swojej rozprawie doktorskiej przedstawiła badania nad możliwością wykrywania ludzkiej albuminy surowiczej HSA (ang. *human serum albumin*) w oparciu o konkurencyjny model testu heterogenicznego.

Corstjens [126] wraz ze współpracownikami opracowali heterogeniczny niekonkurencyjny test kasetkowy do wykrywania nawet 0,7 fmoI pojedynczej nici oligonukleotydu oparty na mechanizmie hybrydyzacji kanapkowej. Test przepływu bocznego z użyciem nanocząsteczek $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ został także wykorzystany do detekcji kwasu 3-fenoksybenzoesowego. Związek ten jest traktowany jako wskaźnik ekspozycji na insektycydy pyretroidowe – grupę organicznych związków naturalnych bądź syntetycznych używanych do ochrony roślin przed szkodnikami [127]. Dzięki wykorzystaniu nanoluminoforów osiągnięto limit detekcji kwasu fenoksybenzoesowego na poziomie 1,4 $\mu\text{g/l}$ [128]. W teście ELISA (ang. *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) dla tego samego analitu dolny limit detekcji wynosi 0,1 ng/ml co świadczy o nieznacznie większej czułości standardowego testu [127]. Jednak czułość testu nie zawsze ma decydujące znaczenie w wyborze metody pomiarowej, szczególnie tam, gdzie liczy się koszt, szybkość i prostota wykonania analizy.

Testy kasetkowe znajdują również szerokie zastosowanie w analizach ilościowych, do wykrywania wielu analitów jednocześnie [122]. Poprawa stosunku sygnału do szumu, poprzez użycie znaczników zdolnych do konwersji energii w górę, zwiększa możliwości wykorzystania takiego schematu testowego do analizy pozaustrojowej wielu biologicznych komponentów. Wzbudzenie światłem podczerwonym pozwala zwiększyć czułość analiz, przede wszystkim poprzez wyeliminowanie autofluorescencji.

2.2. TESTY HOMOGENICZNE

Innym przykładem testów luminescencyjnych są testy homogeniczne wykorzystujące mechanizm LRET (ang. *Luminescence Resonance Energy Transfer*). Mechanizm LRET jest analogiczny do znanego zjawiska Försterowskiego bezpromienistego transferu energii (FRET) [129, 130]. Zjawisko to polega na bezpromienistym i rezonansowym przekazaniu energii z donora (D), będącego w stanie wzbudzonym, do znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie akceptora (A) w stanie podstawowym. Efektywność transferu energii η_{DA} między D i A zależy od stopnia nakładania się widm emisji donora D_E i absorpcji akceptora A_A (tzw. całki nakładania $J(\lambda)$), względnej orientacji dipoli obu molekuł oraz od odległości między nimi R_{DA} . Opisane zależności wraz ze schematem testu homogenicznego przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Schemat testu jednorodnego wykorzystującego mechanizm LRET (a). Zależność wydajności procesu transferu energii LRET od odległości pomiędzy molekułami donora i akceptora (b), $J(\lambda)$ oznacza całkę pokrywania się emisji donora D_E i absorpcji akceptora A_A (c)

Figure 9. A schematic illustration of homogenous assay exploiting the LRET mechanism (a). The dependence of LRET efficiency on distance between donor and acceptor molecules (b), $J(\lambda)$ denotes overlap integral of donor's emission D_E and acceptor's absorbance A_A (c)

Mechanizm FRET zachodzi poprzez oddziaływania dipol–dipol dalekiego zasięgu i jest efektywny w obrębie odległości pomiędzy D i A porównywalnych z wymiarami większości biologicznych makromolekuł, tj. od 1 do 10 nm. FRET znajduje powszechne zastosowanie w naukach biologicznych i służy do badania zmian konformacji białek, reakcji asocjacji lub dysocjacji, charakteryzacji miejsca wiązania antygen–przeciwciała, hybrydyzacji DNA/RNA i w konsekwencji bioobrazowania i biodetekcji. Wynika to z faktu, że efektywność FRET zależy monotonicznie od odległości R_{DA} , dzięki czemu zjawisko to zyskało nazwę „linijki spektroskopowej” [131].

Zbliżaniu się molekuł donora i akceptora towarzyszy bezpromienisty transfer energii, co skutkuje wygaszaniem fluorescencji donora i pojawieniem się emisji światła z molekuł akceptora [41, 131]. Najbardziej wiarygodną metodą pomiaru stężenia analitu jest jednak porównanie czasów życia luminescencji donora w obecności akceptora (τ_{DA}) i czasów życia emisji izolowanego donora (τ_D) [131]. Znajomość τ_{DA} oraz τ_D ($\tau_{DA} < \tau_D$) pozwala w prosty sposób wyznaczyć efektywność transferu energii ($\eta = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$). Tak uzyskana wartość η , pozwala z kolei oszacować odległości R_{DA} między molekułami donora i akceptora. Wynika to z faktu, że sprawność transferu energii η jest równocześnie funkcją odległości R_{DA} , zgodnie z równaniem $\eta = [1 + (R_{DA}/R_0)^6]^{-1}$. R_0 jest odległością Forstera, czyli odległością, przy której $\eta = 50\%$ i jest to stała, zależna od użytych molekuł D i A.

Jako donory i akceptory tradycyjnie stosowano molekuły barwników organicznych. Ich cechy foto-fizyczne wprowadzają jednak wiele niejednoznaczności i potencjalnych źródeł błędów, zarówno na etapie pomiaru jak i interpretacji danych. Ich bardzo krótkie czasy życia, na poziomie piko-/nanosekund, znacznie komplikują stronę techniczną pomiaru. Zmuszają do stosowania ultrakrótkich impulsów światła wzbudzającego oraz ultraszybkich detektorów (fotopowielaczy, fotodiod lawinowych), a także techniki zliczania fotonów (ang. *time correlated single photon counting*, TCSPC). Barwniki organiczne wymagają wzbudzenia w zakresie ultrafioletu lub wysokoenergetycznej części światła widzialnego, co sprzyja pojawieniu się autofluorescencji biomolekuł i przyczynia się do obniżenia czułości biotestów. Ponadto, molekuły organiczne wykazują niewielkie przesunięcie Stokes’a i bardzo szerokie pasma emisji, co sprzyja nakładaniu się pasm emisji donora i akceptora, i ze względu na stosowaną metodę detekcji pozornie podnosi efektywność transferu energii. Molekuły organiczne podlegają również fotowysyblaniu, co ogranicza czas prowadzenia eksperymentu i w konsekwencji zmniejsza czułość biotestów.

Jako molekuły donorów, stosowane są również chelaty i kryptaty lantanowców. Związki te charakteryzują się większą foto-stabilnością oraz długimi czasami życia luminescencji. Jednak w porównaniu z nanoluminoforami, chelaty i kryptaty jonów lantanowców w roztworach wodnych wykazują większe wygaszanie luminescencji lantanowca, gdyż zapewniają mniejszą ochronę przed oddziaływaniem z molekułami rozpuszczalnika [132]. Sondy luminescencyjne, zawierające jon lantanowca, muszą charakteryzować się wysoką stabilnością termodynamiczną, inertywnością oraz wysyceniem sfery koordynacyjnej centralnego jonu lantanowca. Zaprojektowanie

i synteza takich organicznych związków specyficznie chelatujących jony lantanowców wymaga dużego doświadczenia. Większość chelatowych związków jonów lantanowców wymaga obecności organicznych ligandów służących jako anteny lub uczulacze jonu Ln^{3+} . Większość organicznych uczulaczy jest jednak podatna na fotowybielanie, co uniemożliwia długotrwałe i efektywne pomiary [133]. Poza tym, wygaszanie luminescencji takiego kompleksu może zachodzić również poprzez transfer elektronu między jonem lantanowca a ligandem [134].

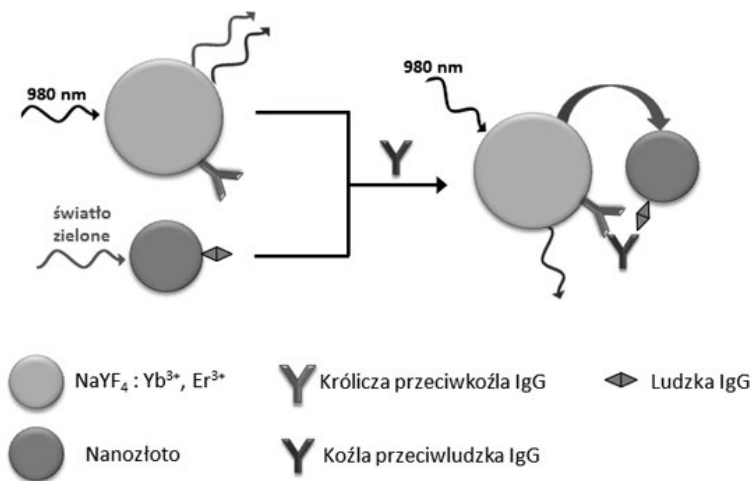
W charakterze akceptorów można również użyć innych luminoforów, np. kropek kwantowych. Te wykazują jednak „migotanie” a maksimum emisji jest zależne od wielkości krystalitów. W większości przypadków kropki kwantowe wymagają, podobnie jak barwniki organiczne, wzbudzenia w zakresie światła UV lub niebieskiego, co indukuje autofluorescencję tła i skutkuje spadkiem czułości prowadzonych analiz. W przypadku jonów lantanowców i ich związków kompleksowych można zaniedbać autofluorescencję poprzez użycie wzbudzenia impulsowego oraz zastosowanie technik pomiarów/obrazowania rozdzielczych w czasie. Techniki te są jednak bardziej skomplikowane i czasochłonne w porównaniu do bezpośrednich pomiarów intensywności luminescencji. Wadą większości kropek kwantowych jest ich cytotoksyczność. Przypuszcza się, że jest ona spowodowana w głównej mierze uwalnianiem jonów Cd^{2+} z rdzenia kropek kwantowych a także oddziaływaniem ze składnikami żywej komórki [135].

Metody detekcji LRET pozwalają wykryć niewielki nawet sygnał z uczulanej donorem emisji akceptora. Stosuje się pomiary czasów życia luminescencji donora lub samej intensywności emisji donora, które wynikają z oddziaływania między donorem a akceptorem. Dzięki wykorzystaniu mechanizmu FRET możliwe jest wykrycie analitu nawet w niewielkich subnanomolowych stężeniach [136]. Ma to krytyczne znaczenie, ponieważ minimalizuje objętość próbek i ilość użytych reagentów.

Po wzbudzeniu światłem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) w nieobecności analitu obserwuje się sygnał w postaci światła widzialnego. W obecności analitu dochodzi do bezpromienistego przekazania energii zgodnie z mechanizmem LRET od donora do akceptora i obserwowana emisja donora zanika, a czas życia jego luminescencji ulega skróceniu.

Testy homogeniczne oparte na mechanizmie LRET znalazły zastosowanie między innymi w wykrywaniu śladowych (nanomolowych) stężeń awidyny w próbkach biologicznych [137]. Wykorzystano do tego celu przyłączone do biotyny nanokoloidalne złoto oraz biotynyłowane nanoluminofory konwertujące w górę. W celu wykorzystania w analizach ilościowych metody FRET zmierzono widma luminescencyjne w funkcji stężenia awidyny w próbce. Luminescencja była wygaszana stopniowo wraz ze wzrostem stężenia awidyny. Wykazano liniową zależność między względną intensywnością luminescencji a stężeniem awidyny w przedziale od 0,5 nM do 370 nM. Odpowiedzialne za ten efekt są specyficzne interakcje między biotyną i awidyną, które umożliwiają łączenie biotynyłowanych nanocząsteczek złota z powierzchnią biotynyłowanych UCNPs i tym samym zajście zjawiska LRET.

Innym przykładem wykorzystania mechanizmu FRET był test immunologiczny koziej przeciwludzkiej immunoglobuliny G (IgG) przedstawiony schematycznie na Rysunku 10 [138]. Test ten umożliwił detekcję i ilościowe oznaczenie przeciwciał, na podstawie spadku intensywności luminescencji nanoluminoforów UCNP. Na skutek reakcji immunologicznej pomiędzy kozią przeciwludzką IgG (przeciwciało pierwszorzędowe) i dwoma innymi białkami (antygen na powierzchni donora i drugorzędowe przeciwciało na powierzchni akceptora) następowało zmniejszenie odległości pomiędzy donorem i akceptorem. W wyniku zbliżenia się molekuł, energia wzbudzonego promieniowaniem NIR donora ($\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$) była bezpromieniście wygaszana przez nanocząsteczki złota, pełniące rolę akceptora.



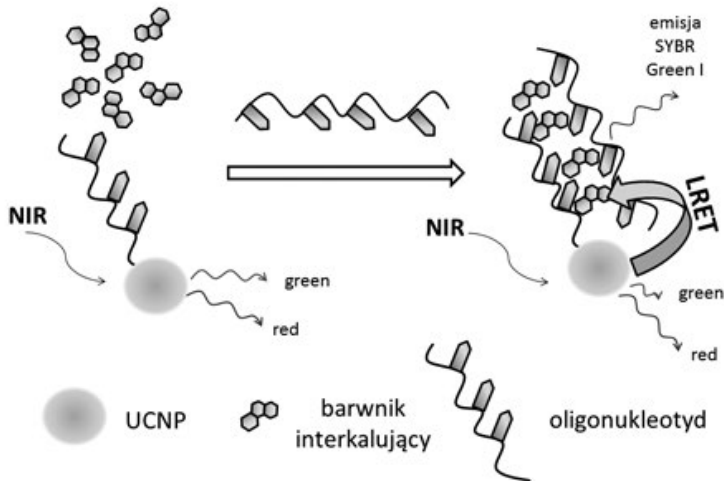
Rysunek 10. Schemat procesu LRET pomiędzy $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (donor) a nanocząsteczką Au (akceptor)

Figure 10. Scheme of LRET process between $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (donor) and Au nanoparticle (acceptor)

Przedstawiony mechanizm może być wykorzystany w różnorodnych testach służących do wykrywania innych bio-molekuł. Kumar i Zhang [136] opisali sposób wykorzystania UCNP do detekcji DNA. Stosowanie nanoluminoforów w testach DNA/RNA, nie wymaga użycia radioaktywnych izotopów przez co ogranicza problemy produkcji, użycia i utylizacji radioaktywowanych testów, które stosowane są jeszcze obecnie.

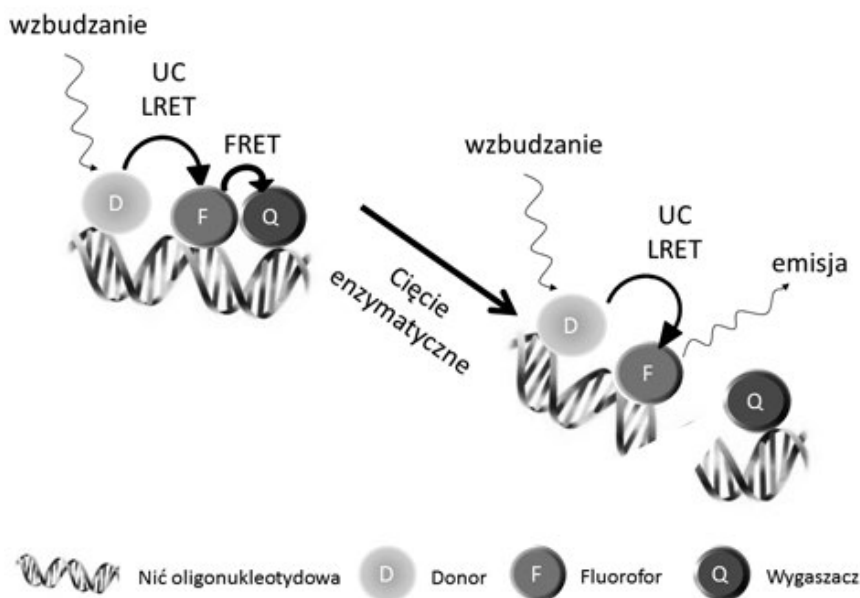
Na Rysunku 11 przedstawiono schemat działania sondy DNA wykorzystujący mechanizm LRET. Sonda oligonukleotydowa połączona z UCNP wiąże się z komplementarnym fragmentem DNA lub RNA. Barwnik interkalujący wbudowuje się w podwójną nić kwasu nukleinowego, tym samym zmniejsza się odległość dzieląca go od konwertujących w górę nanocząsteczek i możliwy jest transfer LRET między UCNP a barwnikiem. Wydajność kwantowa luminescencji barwnika znacznie wzrasta po dodaniu do badanego roztworu nici komplementarnej do nici DNA znakowanej nanocząsteczkami. Wydajność wiązania barwnika organicznego do poje-

dynczej nici DNA jest niska i dlatego przy braku nici docelowej (komplementarnej do nici znakowanej), emisja barwnika interkalującego jest nieznaczna. W obecności docelowej nici DNA dochodzi do hybrydyzacji z sondą i barwnik interkaluje między dwie nici z wydajnością znacznie większą niż w przypadku nici pojedynczych. Opracowany test pozwala na czułe analizy ilościowe z progiem detekcji na poziomie 20 fmol. Tak wysoką czułość osiągnięto dzięki wzbudzeniu w zakresie światła podczerwonego, co pozwala uniknąć bezpośredniego wzbudzenia barwnika organicznego oraz autofluorescencji materiału biologicznego. Z kolei Jiang i Zhang [109] wykorzystali mechanizm FRET do badania cząsteczek siRNA (ang. *small interfering RNA*) w żywych komórkach. Cząsteczki siRNA to małe interferujące dwuniciowe RNA odpowiedzialne za specyficzne i wybiórcze wyciszenie genów w zależności od ich sekwencji nukleotydu. Użycie nanocząsteczek w dostarczaniu siRNA do wybranych komórek może znaleźć zastosowanie w terapii klinicznej.



Rysunek 11. Sondy DNA wykorzystujące mechanizm LRET
Figure 11. DNA probes using LRET mechanism

Podobna metoda została wykorzystana do analizy aktywności endonukleazy – enzymu odpowiedzialnego za proces cięcia oligonukleotydów [139]. Rysunek 12 przedstawia reakcję hydrolizy enzymatycznej katalizowaną przez endonukleazę, która prowadzi do rozdzielenia fluoroforu (F) i wygaszacza (Q), które są ulokowane w różnych miejscach oligonukleotydu. W konsekwencji odblokowana zostaje emisja fluoroforu wzbudzanego na drodze mechanizmu LRET przez konwertującą w górę nanocząsteczkę luminoforu również przyłączoną do nici oligonukleotydu. W tym przypadku obserwacja emisji świadczy o obecności w układzie aktywnej formy enzymu endonukleazy. Ten test umożliwia bezpośredni pomiar aktywności bez konieczności znakowania analizowanego białka.



Rysunek 12. Wykrywanie aktywności enzymatycznej
Figure 12. Enzymatic activity detection

Kolejnym przykładem wykorzystania konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów i mechanizmu FRET, może być, przedstawiony przez Wang'a i Li [99], nieenzymatyczny pomiar glukozy w roztworach wodnych. W doświadczeniu wykorzystany został mechanizm LRET, w którym nanokryształy $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ modyfikowane glukozą służyły jako donory, a modyfikowany kwasem aminofenyloboronowym (APBA) izotiocyanian rodaminu B (RhBITC) jako akceptor energii. Dodanie glukozy do systemu zwiększa efektywną odległość między donorem a akceptorem poprzez konkurencyjne wiązanie wolnej i związanej z nanokryształami glukozy do grup kwasu boronowego.

Interesująca jest także przedstawiona przez Kuningasa i współpracowników metoda wykrywania estradiolu w surowicy krwi [97, 140]. W eksperymencie użyto nanoluminofory $\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ pokryte przeciwciałami E2, które w procesie konkurencyjnego wiązania estradiolu z surowicy krwi pozwoliły na wykrywanie jego nanomolowych stężeń bez skomplikowanego, czasochłonnego przygotowania i oczyszczania próbek.

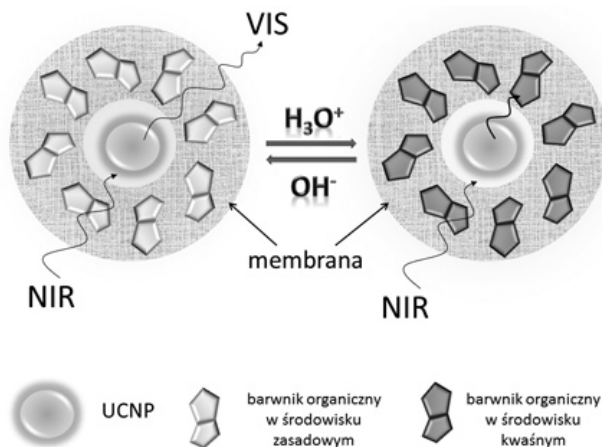
Nanoluminofory wykorzystano także jako niespecyficzne sondy DNA [100]. Nanokryształy $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$ okryte polimerem wykazują fluorescencję głównie ze względu na przejścia energetyczne zachodzące w jonie Tb^{3+} . Wykazano, że fluorescencja pochodząca z jonów terbu może być wygaszana przez kwasy nukleinowe. Wygaszanie zachodzi po utworzeniu wiązań wodorowych między DNA i resztą kwasu karboksylowego polimeru okrywającego nanoluminofor. Ze względu na bliskie położenie molekuł związanych wiązaniami wodorowymi możliwy jest transfer

energii między jonem terbu, a molekułą DNA. Oznaczenie stężenia DNA z wykorzystaniem tego efektu było możliwe poprzez pomiar zmian intensywności luminescencji jonów Tb^{3+} .

2.3. NANOCZUJNIKI LUMINESCENCYJNE

Konwertujące w górę nanoluminofory mogą być także użyte, jako czujniki pH [141], tlenu [142], dwutlenku węgla [143] czy też amoniaku [144]. Ponieważ proces konwersji energii w górę nie zależy od parametrów układu innych niż temperatura [115], konieczne jest stosowanie nanokrystalitów w połączeniu z odpowiednio dobranymi związkami wrażliwymi na dany parametr, np. eterami koronowymi czy barwnikami organicznymi. Pod wpływem zmiany danego parametru układu, molekuly te reagują zmianą położenia pasm lub intensywności absorpcji i w ten sposób modulują emisję nanoluminoforu.

Na Rysunku 13 przedstawiono schemat czujników pH opartych na UCNP. Po wzbudzeniu nanokrystalitu promieniowaniem z zakresu podczerwieni następuje emisja promieniowania widzialnego, którego intensywność jest modulowana przez zmieniającą się pod wpływem jonów wodorowych absorpcję barwnika organicznego. Podstawowym wymogiem jest nakładanie się widma emisji UCNP i absorpcji wskaźnika, który nie powinien wykazywać luminescencji. Takie sondy pH działają więc na zasadzie efektu wewnętrzznego filtra.



Rysunek 13. Schemat działania czujników pH opartych na konwertujących w górę nanoluminoforach
Figure 13. A scheme of pH sensors based on up-converting nanoluminophores

Sun wraz ze współpracownikami [141] zbudowali czujnik składający się z nanoprecytów $NaYF_4:Er^{3+}, Yb^{3+}$ oraz błękitu bromotymolowego BTB będącego powszechnie używanym wskaźnikiem pH. Zależnie od tego czy BTB jest obecny w swojej formie zasadowej czy kwasowej, wykazuje on różną absorpcję czerwonej i zielonej

emisji pochodzącej od cząsteczek luminoforu. Główną zaletą tego rozwiązania jest możliwość obserwacji zmian pH w próbkach biologicznych i w głębszych obszarach tkanek, poprzez wykorzystanie wzbudzenia promieniowaniem podczerwonym i eliminację autofluorescencji. Taka sonda może służyć również, jako wskaźnik rozpuszczonych gazów o odczynie kwasowym (np. CO_2) [143] lub zasadowym (np. NH_3) [144], a także jako bioczuJNIK w reakcjach enzymatycznych, w których protony są wytwarzane bądź konsumowane.

W czujnikach gazów zwykle używana jest membrana selektywnie przepuszczająca cząsteczki gazów, ale nieprzepuszczająca protonów. Taka osłona czyni czujnik niewrażliwym na zmiany zewnętrznego pH [144]. W oparciu o podobną zasadę działania, Ali ze współpracownikami zademonstrował czujnik dwutlenku węgla pozwalający na wykonywanie pomiarów w zakresie stężeń 0,11 do 3% [143].

Analitem, którego pomiar odgrywa istotną rolę w fizjologii, diagnostyce i technologii klinicznej oraz badaniach środowiskowych, jest tlen. Achatz ze współpracownikami zaprojektowali pierwszy wzbudzany promieniowaniem NIR czujnik tlenu oparty na nanokrystalitach $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ i związku kompleksowym irydu(III) [142]. Luminescencja UCNP w zakresie widzialnym po wzbudzeniu promieniowaniem podczerwonym jest wykorzystana do fotowzbudzania kompleksu irydowego, który z kolei jest wygaszany przez tlen cząsteczkowy. Wykazano całkowicie odwracalny wzrost i spadek emisji pochodzącej od kompleksu irydu(III) przy pomiarach prowadzonych odpowiednio w środowisku argonu i czystego tlenu.

Opisana w tym rozdziale zasada działania czujników hybrydowych jest bardzo prostym, ale skutecznym i poszukiwanym sposobem pomiarów wielu analitów chemicznych i biologicznych. Przykładem może być wykrywanie wewnątrzkomórkowych molekuł sygnalizacyjnych (np. cząsteczek nadtlenu wodoru H_2O_2), które znajduje liczne zastosowania w zrozumieniu procesów zachodzących w komórkach. Zdolność komórki do generowania różnych odpowiedzi na sygnały, w powstawanie których zaangażowane są te same przekaźniki drugiego stopnia nie jest obecnie wystarczająco poznana, a wynika to z braku odpowiednich metod pomiarowych. Casanova ze współpracownikami [114] wykorzystali szczególne własności nanokrystalitów YVO_4 domieszkowanych jonami Eu^{3+} do ilościowych i dynamicznych pomiarów stężenia H_2O_2 w żywych komórkach. Jony Eu^{3+} mogą być fotoredukowane do jonów Eu^{2+} . Utlenianie zredukowanych jonów europu, a tym samym przywrócenie luminescencji Eu^{3+} , zależy od stężenia H_2O_2 w badanej próbce. Odpowiedź czujnika nie jest specyficzna dla H_2O_2 – podobna regeneracja fluorescencji może zostać wykorzystana do pomiaru stężenia innych utleniaczy fizjologicznych np. ClO^- lub NO .

2.4. BIOOBRAZOWANIE

Obrazowanie optyczne jest jedną z najpowszechniej stosowanych metod badawczych w biologii i medycynie. Obrazowanie z wykorzystaniem znaczników

i metod fluorescencyjnych pozwala badać nie tylko morfologię i strukturę organizmów żywych, ale zrozumieć również funkcjonowanie oraz mechanizmy wielu zjawisk i procesów biologicznych.

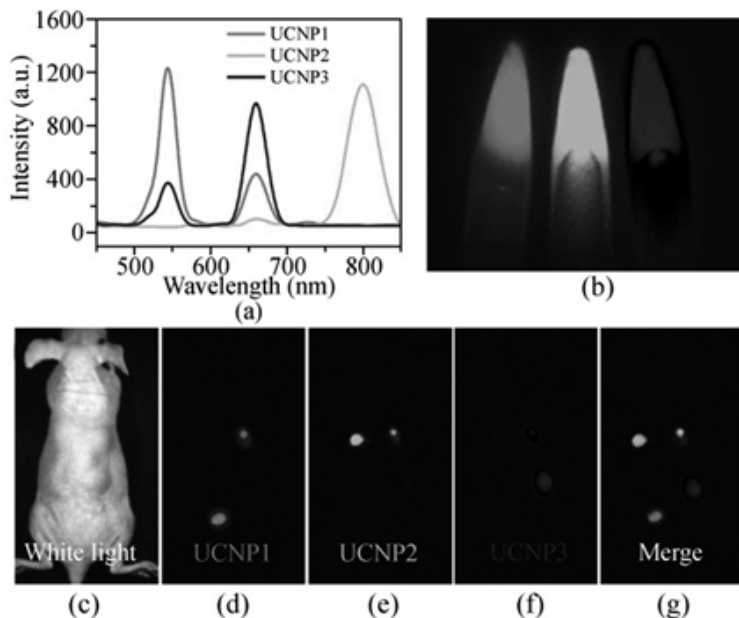
Jednym z podstawowych problemów związanych z wykorzystaniem tradycyjnych fluorescencyjnych barwników organicznych, kropek kwantowych oraz domieszkowanych barwnikami organicznymi nanocząstek krzemionkowych jest rozpraszanie światła wzbudzającego i emitowanego. Problematyczny jest także wysoki współczynnik absorpcji chromoforów tkankowych oraz obecność autofluorescencji biochemicznych składników tkanek. Długości fali światła stosowane do wzbudzania nanocząsteczkowych luminoforów konwertujących w górę mieszczą się w zakresie tzw. okna optycznego skóry. Światło o energii z tego zakresu jest słabiej absorbowane przez składniki skóry, przez co zdolne jest do głębszej penetracji tkanek i wzbudzenia nanoluminoforów.

Obrazowanie optyczne z wykorzystaniem konwertujących w górę nanocząsteczek luminoforów znajduje coraz więcej zastosowań głównie dzięki niewielkiej inwazyjności, głębokiej penetracji wzbudzającego światła podczerwonego a także odporności nanocząsteczek na fotowysyblanie. Nanokrystaliny NaYbF_4 , domieszkowane jonami Er^{3+} , Tm^{3+} oraz Ho^{3+} , wykorzystano w obrazowaniu komórek nowotworowych [73]. Współdomieszkowanie jednej matrycy kilkoma jonami lantanowców pozwala uzyskać emisję w zakresach długości fal odpowiadających różnym barwom. Znana jest także praca przedstawiająca obrazowanie przewodów pokarmowych nicieni *Caenorhabditis elegans* [145].

Pierwszy eksperyment z użyciem UCNP obrazujący *in vivo* tkanki małych ssaków został przeprowadzony z nanokrystalinami $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ pokrytymi polietylenoiminą [31]. Badacze obrazowali także *in vitro* komórki macierzyste szpiku kostnego, wykazując brak toksyczności stosowanych nanokrystalin. Badania prowadzono stosując roztwory nanokrystalin o stężeniach 1 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$, przy czasie ekspozycji od 24 do 48 godzin [31].

Tian wraz ze współpracownikami [110] zademonstrowali możliwość wielobarwnego bioobrazowania żywych organizmów. Aby uzyskać obrazy pozbawione autofluorescencji, wykorzystano nanoluminofory $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ i $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}/\text{Ce}^{3+}$ wzbudzone wiązką światła o długości fali 974 nm. Dzięki selektywnej biofunkcjonalizacji powierzchni tych różnobarwnych nanokrystalin, ukazano możliwość jednoczesnego obrazowania kilku różnych tkanek [110]. Inną metodę uzyskania różnobarwnej emisji anty-Stokesowskiej zaproponował Cheng ze współpracownikami. Zespół ten zsyntetyzował serię nanoluminoforów NaYF_4 wykazujących różnokolorową emisję, którą to modyfikowano zmieniając względną ilość i rodzaj jonów domieszkujących (Y^{3+} , Yb^{3+} , $\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) [146]. Obrazowanie luminescencji *in vivo*, przedstawione na Rysunku 14, zademonstrowano wstrzykując żywej myszy nanokrystaliny pokryte amfifilowym polimerem. Nanoluminofory wykorzystano w multipleksowanym mapowaniu naczyń limfatycznych. Zsyntetyzowanych nanocząstek użyto także do wielokolorowego znakowania komórek nowotworowych i śledzenia komórek *in vivo* przez obrazowanie luminescencji

nanoluminoforów. Dodatkowo, autorzy porównali czułość kropek kwantowych i nanoluminoforów w obrazowaniu *in vivo*. Ze względu na autofluorescencję tła, limit detekcji UCNP był o rząd wielkości niższy niż konwertujących w dół kropek kwantowych.



Rysunek 14. Wielokolorowe bioobrazowanie. a) Widma emisji trzech zawiesin UCNPs po wzbudzeniu światłem lasera przy 980 nm. b) Zdjęcie fluorescencji trzech roztworów nanokrystalitów. c) Zdjęcie żywej myszy. d), e), f), wielokolorowe obrazy luminescencji *in vivo* żywej myszy po wstrzyknięciu różnych roztworów UCNPs. g) Złożenie obrazu trzech kolorów UCNPs. Umieszczono za zgodą z [141], L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res*, 3 (2010), pp. 722–732

Figure 14. Multicolor imaging. A) Emission spectra of three UCNPs solutions after excitation with laser radiation at 980 nm. B) Photography of the fluorescence of three nanocrystals solutions. C) Photo of live mouse. d), e), f), multicolor *in vivo* images of luminescence in live mouse after injection of three UCNPs solutions. g) Image of three colors of UCNPs. Reproduced with permission from [141], L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res*, 3 (2010), pp. 722–732

Jalil ze współpracownikami badali biokompatybilność UCNP $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ pokrytych otoczką krzemionkową [147]. Nanokrystality wykazały dobrą biokompatybilność zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Badane komórki pozostawały żywe nawet przy wysokich stężeniach nanokrystalitów. Badania biodystrybucji *in vivo* wykazały, że płuca oraz serce są organami docelowymi dla nanozwiązków. Dowiedziono jednak, że już po 7 dniach od wstrzyknięcia organy te są oczyszczone z wprowadzonych UCNP. W długim czasie po podaniu tych nanocząsteczek stwierdzono, że odkładają się one w wątrobie i śledzionie. Zagadnienia nanotoksykologii omawianych znaczników luminescencyjnych jak i samych związków lantanowców są znacznie bardziej złożone [33, 148–150] i wykraczają poza ramy niniejszej pracy.

Wykorzystanie emisji w zakresie podczerwieni stwarza możliwość obrazowania głębiej położonych tkanek wskutek mniejszego rozpraszania i tłumienia promieniowania z tego zakresu spektralnego. Zhou ze współpracownikami (89) przeprowadzili inny eksperyment wykorzystujący obrazowanie NIR-NIR. Do tego celu wykorzystano nanoluminofory $\text{NaGdF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ pokryte kwasem azelainowym. Kompleksy paramagnetycznego gadolinu są równocześnie najpowszechniej stosowanym środkiem kontrastującym w technice rezonansowego obrazowania magnetycznego (MRI) [61]. Jony Gd^{3+} wbudowane w matrycę domieszkowaną innymi lantanowcami, pozwalają na prowadzenie obrazowania multimodalnego, tzn. zarówno metodami fluorescencyjnymi ($\text{UV} \rightarrow \text{Vis}$), wykorzystując właściwości konwersji energii w górę ($\text{NIR} \rightarrow \text{Vis}$, NIR) jak i rezonansowego obrazowania MRI [151].

W innym eksperymencie wykorzystano nanokrystality NdF_3 pokryte otoczką krzemionkową SiO_2 , które po wzbudzeniu światłem o długości fali 730 nm emitowały światło w zakresie podczerwieni o długości fali 1056 nm [111]. Poza obrazowaniem badano także dystrybucję nanokrystalitów NdF_3 w żywym organizmie. Eksperyment pokazał, że badane nanokompozyty nie agregują, ani nie osadzają się w płynach ciała, natomiast podlegają niespecyficznemu wychytowi przez różne organy. Nanomateriały domieszkowane jonami Nd^{3+} są atrakcyjne ze względu na swoją wyjątkową charakterystykę spektralną emisji i wzbudzenia, fotostabilność, niską toksyczność oraz wysoko wydajny proces fluorescencji w żywych tkankach.

Do obrazowania *in vitro* komórek nowotworowych oraz *in vivo* myszy zaproponowano wykorzystanie wzbudzania światłem o długości fali 915 nm, które w przeciwieństwie do światła 980 nm, nie powoduje lokalnego przegrzania tkanek, gdyż jest słabiej absorbowane przez molekuły wody. Uzyskane przez badaczy widma fluorescencji potwierdziły, że wzbudzanie wiązką o długości 915 nm jest korzystniejsze w głębokim obrazowaniu tkanek niż użycie wiązki 980 nm [72].

Wyzwaniem dla dzisiejszej onkologii jest udoskonalenie metod wczesnego wykrywania nowotworów. Zako wraz ze współpracownikami [112] zademonstrowali możliwość obrazowania komórek nowotworowych z użyciem nanokrystalitów połączonych z cyklicznym peptydem RGD. Peptyd ten specyficznie rozpoznaje integralną $\alpha_v\beta_3$, która jest eksponowana na powierzchni komórek niektórych nowotworów, ale nie występuje w znaczących ilościach na komórkach zdrowych tkanek. Konwertujące w górę nanoluminofory badano również pod względem użyteczności we fluorescencyjnej tomografii dyfuzyjnej [86]. Wyjątkowo dobry stosunek sygnału do szumu pozwala wyeliminować artefakty powstające przy rekonstrukcji obrazu, które pojawiają się w przypadku stosowania tradycyjnych fluoroforów. Nieliniowy proces konwersji w górę jest zależny od mocy wzbudzenia i dlatego pozwala uzyskać lepszą rozdzielczość przestrzenną rozmieszczenia fluoroforów i wyraźniejsze obrazy trójwymiarowe. Stabilne nanoluminofory o długotrwałej luminescencji zostały wykorzystane do obrazowania różnych organów żywej myszy [152]. W zależności od zastosowanej modyfikacji powierzchni nanozwiązków uzyskiwano specyficzne znakowanie różnych organów.

Komórki macierzyste dostarczane do organów patologicznie zmienionych wykazują duże możliwości terapeutyczne. Wciąż nie ma jednak wystarczającej wiedzy na temat rozmieszczenia i miejsca przeznaczenia wprowadzonych komórek, przez co znacznie utrudnione jest efektywne wykorzystanie terapii z ich udziałem. Idris ze współpracownikami [153] opisali eksperyment z użyciem nanoluminoforów, który w przyszłości może rozwiązać ten problem. Do śledzenia komórek macierzystych *in vitro* oraz *in vivo* wykorzystano nanoluminofory $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ pokryte otoczką SiO_2 . Wykazano, że zastosowane nanokrystality pozwalają na:

- (i) jednoznaczną wysokorozdzielczą detekcję przeszczepionych komórek,
- (ii) obrazowanie w całkowicie unaczynionych głębokich tkankach,
- (iii) dynamiczne obrazowanie *in vivo* w czasie rzeczywistym dzięki wysokiej fotostabilności,
- (iv) nieinwazyjne obrazowanie komórek w organizmach żywych przez przynajmniej jeden tydzień od wprowadzenia do żywego systemu.

Użycie UCNP umożliwiło otrzymanie kontrastu pozwalającego na wysokorozdzielcze obrazowanie tkanek i struktur subkomórkowych do głębokości $\sim 1\text{--}2$ mm, co jest porównywalne z wynikiem otrzymanym w wysokorozdzielczej mikroskopii dwufotonowej. Głębokość penetracji promieniowania podczerwonego w głąb tkanek może sięgać nawet 10–15 cm w zależności od struktury i składu badanych tkanek. Wówczas jednak rozdzielczość optyczna jest na tyle mała, że można mówić jedynie o obrazowaniu miejsc, w których następuje chwilowa zwiększona akumulacja UCNP.

Innym ważnym w naukach biologicznych zagadnieniem, jest możliwość obserwacji pojedynczych biomolekuł. Celem jest badanie oddziaływań molekularnych w żywych komórkach. Znane są prace przedstawiające wyniki badań dotyczące wykorzystania do tego celu nanorurek diamentowych [154, 155], kropek kwantowych [156] i nanowiązków złota [157]. Beaurepaire ze współpracownikami [158] zaproponowali wykorzystanie nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Jednym z pierwszych tego typu badań było obrazowanie rozmieszczenia kanałów sodowych w miocytach mięśnia sercowego. Eksperyment ten pokazał możliwość zastosowania nanoluminoforów w długoterminowych badaniach dynamiki dyfuzji biomolekuł i określaniu położenia docelowych receptorów, migracji kompleksów sygnalizujących czy też czynników patogennych w komórkach i tkankach.

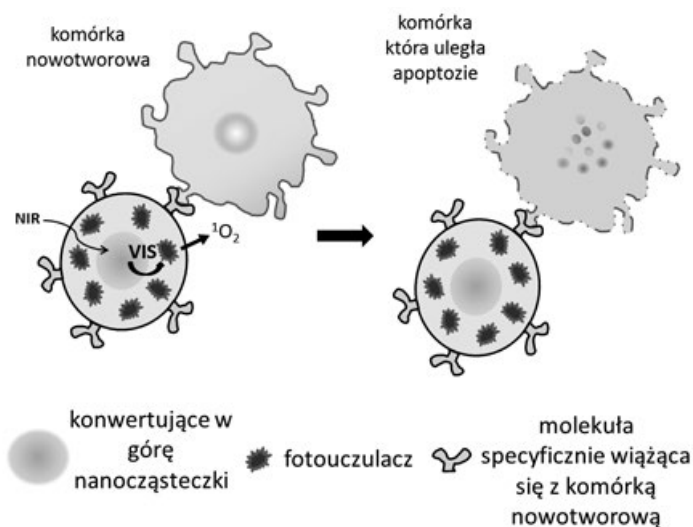
2.5. TERAPIA FOTODYNAMICZNA

Diagnostyka i terapia fotodynamiczna jest jedną z nowoczesnych metod wykrywania i leczenia nowotworów. Po ogólnoustrojowym lub miejscowym wprowadzeniu fotouczulacza, następuje inkubacja i jego selektywna akumulacja w pobliżu komórek nowotworowych. Mechanizm wychwytu i retencji fotouczulacza nie jest do końca poznany [159, 160]. Jako fotouczulacze stosuje się pochodne porfiryn

(np. Fotofrin®), chlorofilu (np. Chlorin e6) lub prekursory fotouczulaczy (np. kwas δ -aminolewulinowy, δ -ALA, dostępny pod nazwą handlową Levulan®) [161–163]. Fotouczulacz pod wpływem naświetlania inicjuje reakcję fotochemiczną i prowadzi do powstania wolnych rodników hydroksylowych lub molekuł wysoce reaktywnego tlenu singletowego [164]. Powstające molekuły mają zdolność niszczenia biomolekuł znajdujących się w pobliżu cząsteczek fotouczulacza, co w konsekwencji prowadzi do intencjonalnego uszkodzenia całych komórek i tkanek.

Trzy główne mechanizmy, prowadzące do zniszczenia tkanki nowotworowej, to bezpośrednia fotodestrukcja komórek nowotworowych, zamknięcie naczyń krwionośnych dostarczających substancje odżywcze do zmienionej tkanki i aktywacja odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym [165]. Procesy te są ograniczone do obszarów, w których selektywnie zgromadził się fotouczulacz.

Terapia fotodynamiczna, PDT, (ang. *photodynamic therapy*) jest inicjowana tylko w obecności światła o odpowiednim natężeniu i odpowiedniej długości fali. Dzięki małej inwazyjności procedury naświetlania, a także dzięki ograniczeniu terapii tylko do obszaru poddanego naświetlaniu, terapia fotodynamiczna stanowi alternatywę dla wysoce inwazyjnych zabiegów chirurgicznych, chemioterapii czy radioterapii.



Rysunek 15. Schemat terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem nanocząsteczek konwertujących w górę
Figure 15. Schematic illustration of photodynamic therapy with the use of up-converting nanoparticles

Konwencjonalna terapia fotodynamiczna wykorzystuje promieniowanie z zakresu widzialnego bądź UV, które ogranicza skuteczność terapeutyczną metody w związku z silnym rozpraszaniem i pochłanianiem promieniowania wzbudzonego przez materiał biologiczny.

Konwertujące w górę nanocząstki znalazły zastosowanie jako nośniki fotouczulaczy i wtórne źródła światła wzbudzonego w terapii przeciwnowotworowej [90,

166]. Umożliwiło to wzbudzenie fotouczulaczy promieniowaniem podczerwonym, którego głębokość penetracji w tkankach przewyższa kilkukrotnie tę dla promieniowania z zakresu widzialnego. Warto zaznaczyć, że nanoluminofory stosowane jako źródło światła wzbudzającego fotouczulacz, stanowią trwałe i stabilne w czasie znaczniki luminescencyjne do obserwacji kinetyki i obszaru akumulacji biofunkcjonalizowanych nanozwiązków. Na Rysunku 15 przedstawiono schemat terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem konwertujących w górę nanoluminoforów. Rdzeń składający się z UCNP jest okryty powłoką, w którą wbudowane są cząsteczki fotouczulacza. Taka struktura jest powierzchniowo aktywowana molekułami, które umożliwiają specyficzne łączenie się z komórkami nowotworowymi. Pod wpływem wzbudzającego światła podczerwonego konwertujący w górę rdzeń emituje światło widzialne, które z kolei wzbudza cząsteczki fotouczulacza i za jego pośrednictwem powoduje generowanie reaktywnych form tlenu. Duża zdolność niszczenia i niewielka zdolność dyfuzji tlenu singletowego powoduje, że w głównej mierze niszczone są komórki nowotworowe w pobliżu których zlokalizowane są omawiane nanomateriały. Pokazano, że zastosowane nanoluminofory generują milimolowe ilości tlenu singletowego pod wpływem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni o intensywności wzbudzenia dużo mniejszej niż stosowane w przypadku innych technik dwufotonowych.

Przykładem wykorzystania struktur typu rdzeń/powłoka/powłoka może być ich użycie w terapii fototermicznej komórek nowotworowych [95]. W tym przypadku, nanowymiarowe złoto zostało osadzone na pokrytych powłoką krzemionkową nanokrystalitach $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$. Poprzez wzbudzenie nanoluminoforów, wyemitowane fotony promieniowania zielonego ulegały sprzężeniu z plazmonami powierzchniowymi nanocząstek Au, prowadząc do konwersji energii światła w energię ciepłą. Wspomniane doświadczenie umożliwia potencjalne zastosowanie badanych nanozwiązków w jednoczesnym obrazowaniu i terapii fototermicznej komórek nowotworowych.

2.6. NANOTERMOMETRIA

Wielu reakcjom zachodzącym w komórkach towarzyszą zmiany temperatury [167]. Jednak wykonanie pomiarów temperatury z wystarczającą mikrometryczną rozdzielczością przestrzenną i odpowiednią rozdzielczością temperaturową ($\Delta T < 1^\circ\text{C}$) jest jednym z trudniejszych zagadnień w biologii komórki. Badania umożliwiają śledzenie wielu mechanizmów zachodzących na poziomie komórkowym i obserwację zmian w żywych tkankach. Optyczna detekcja temperatury może opierać się na pomiarach bezwzględnej lub względnej intensywności fluorescencji, a także na zmianach położenia pików luminescencyjnych materiałów nanokrystalicznych. Zależność intensywności przejść bezpromienistych od temperatury umożliwia wykorzystanie barwników fluorescencyjnych do pomiaru temperatury żywych komórek w diagnostyce nowotworów. Organiczne fluorofory ulegają jednak dość

szybko wybielaniu, uniemożliwiając prowadzenie pomiarów długoterminowych [168]. Rozwiązaniem tego problemu może być użycie nieorganicznych luminoforów odpornych na fotowysbielanie, np. nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców. Znane są także nanotermometry złożone z nanorurek węglowych wypełnionych ciekłym Ga, które umożliwiają pomiar temperatury z wysoką rozdzielczością przestrzenną [169].

Dzięki wykorzystaniu zależnej od temperatury luminescencji nanokrystalitów NaYF_4 domieszkowanych jonami Er^{3+} i Yb^{3+} , możliwy stał się pomiar rozkładu temperatury w układach biologicznych z rozdzielczością przestrzenną umożliwiającą badanie pojedynczych komórek. Vetrone ze współpracownikami [91] zademonstrowali możliwość użycia wrażliwej na temperaturę zielonej konwersji w górę nanoluminoforu $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$ jako czujnika temperatury w roztworach oraz komórkach nowotworowych HeLa. W pomiarach wykorzystano pasma emisji odpowiadające przejściom ${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ i ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ jonu Er^{3+} , mierząc stosunek ich intensywności w funkcji zmian temperatury. Ze względu na niewielką różnicę energetyczną między wymienionymi poziomami wzbudzonymi (wynoszącą $\sim 720 \text{ cm}^{-1}$), wzbudzenie poziomu ${}^2\text{H}_{11/2}$ następuje z ${}^4\text{S}_{3/2}$ na drodze termicznej. Wykonano pomiary temperatury w żywych komórkach od 25°C do termicznie indukowanej śmierci komórek w 45°C . Wykazano, że badane luminofory mogą być użyte jednocześnie do obrazowania oraz w charakterze nanotermometrów. Z kolei Alencar wraz ze współpracownikami [170] badali nanokrystality $\text{BaTiO}_3:\text{Er}^{3+}$. Mierzona intensywność luminescencji zależy od intensywności procesów relaksacji bezpromienistej zależnych z kolei od wielkości nanokrystalitów. W literaturze opisanych jest wiele luminoforów (w tym konwertujących w górę) wykorzystywanych w termometrii. Obszerny opis związków używanych do pomiarów temperatur podczas różnych procesów znajduje się m.in. w przeglądowej publikacji Aldena i współpracowników [171]. Większość z nich służy jednak do pomiaru bardzo wysokich temperatur. Wykorzystywane są w pomiarze temperatury podczas procesów spalania lub pirolizy, do analizy rozprzestrzeniania się płomieni w pożarach, do pomiarów temperatur podczas procesów zachodzących w turbinach gazowych czy też w silnikach spalinowych. Z punktu widzenia nauk biologicznych interesujące są materiały zapewniające pomiary o dużej rozdzielczości w zakresie fizjologicznych zmian temperatury. Dokładna kontrola i optymalizacja procesu wytwarzania nanomateriałów pozwala otrzymywać jednorodne biokompatybilne nanokrystality o optymalnej wielkości i pożądanych właściwościach.

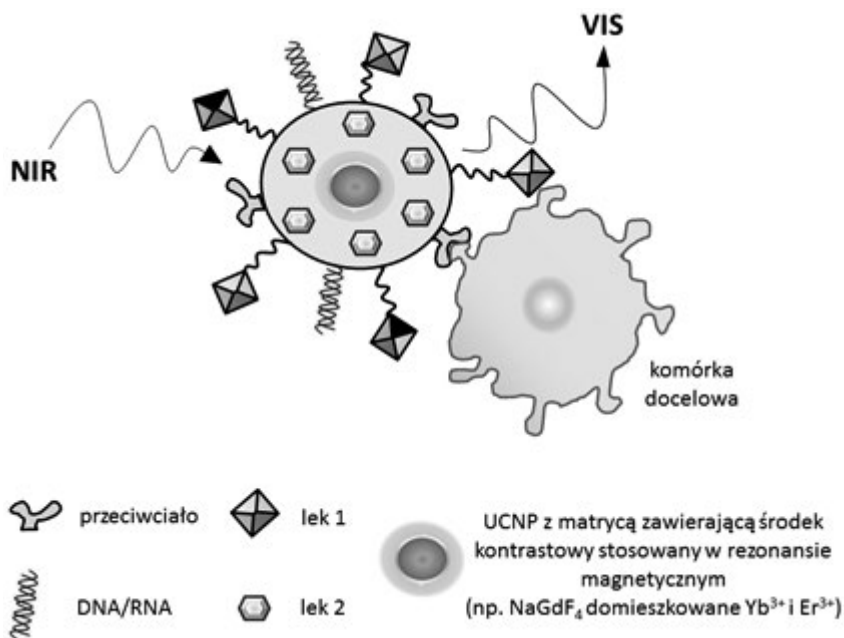
2.7. HIPERTERMIA – ZLOKALIZOWANE PODGRZEWANIE

Już w XIX wieku udało się skorelować spektakularną regresję zmian nowotworowych u pacjentów z wysoką (około 40°C) temperaturą, która towarzyszyła infekcjom bakteryjnym. Obserwacja ta sprawiła, że zainteresowano się możliwością leczenia nowotworów z wykorzystaniem podwyższonej temperatury [172, 173].

Udowodniono, że terapia ciepłem niszczy tkanki nowotworowe lub działa synergistycznie do innych metod leczenia, takich jak radioterapia czy chemioterapia. Głównym źródłem terapii jest aktywacja limfocytów T, uwalnianie białek szoku termicznego, aktywacja czynników transkrypcyjnych NF- κ oraz komórek *natural killers*, a także wzrost ekspresji genu kodującego immunogeny peptyd HSP90 eksponowany na powierzchni komórek nowotworowych. Niestety, ogólnoustrojowe podwyższenie temperatury działa destrukcyjnie nie tylko na tkanki nowotworowe prowadząc do osłabienia całego organizmu i niekiedy nieodwracalnych zmian w zdrowych tkankach. W celu zminimalizowania uszkodzeń zdrowych organów ważne stało się opracowanie metody przestrzennego ograniczenia zabiegu hipertermii. Zlokalizowana hipertermia jest terapią, która pozwala na dokładną kontrolę i miejscowe stosowanie hipertermii w celu niszczenia wybranych tkanek. Terapia ta, wykorzystuje nanowymiarowe cząsteczki zdolne do przekształcenia energii zewnętrznego źródła (np. fotonów czy też pola magnetycznego) w energię cieplną, która jest przekazywana do otaczających tkanek i komórek. Przestrzenna lokalizacja jest zwykle osiągnięta poprzez aktywację nanocząsteczek biomolekułami np. antygenami, pozwalającymi uzyskać wybiórcze i specyficzne biologicznie wiązanie do określonych komórek. W praktyce klinicznej stosowane były nanocząstki złota z przyłączonym fluoroforem, oraz Fe_3O_4 jako kontrastem do obrazowania rezonansem magnetycznym i kropkami kwantowymi jako luminoforami [174]. Postępy leczenia były obserwowane za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, który jest jednak niekomfortową i kosztowną metodą obrazowania. Niedawno wykazano, że zlokalizowane podgrzewanie można uzyskać za pomocą dwufunkcyjnych nanocząstek NaYF_4 silnie domieszkowanych jonami Nd^{3+} . Nanokrystality te mogą służyć do zlokalizowanej fototerapii z jednoczesnym bioobrazowaniem NIR-NIR [92].

2.8. PLATFORMY NANOBIOTECHNOLOGICZNE

Różnorodność zastosowań i zalety nanoluminoforów konwertujących w górę opisane w poprzednich rozdziałach pozwalają przewidzieć, że ich cząsteczki mogą być w prosty sposób zaadaptowane do pełnienia więcej niż jednej funkcji [175]. Rysunek 16 przedstawia schematycznie nanocząstkę pełniącą rolę platformy nanobiotechnologicznej. Przykładowo platformy, przenoszące chemioterapeutyki w celu kontrolowanego i przedłużonego uwalniania leków, mogą dodatkowo przenosić fotouczulacze stosowane w terapii fotodynamicznej. Dodatkowo platformy te, mogą zawierać środki kontrastujące stosowane w magnetycznym rezonansie jądrowym, pozytronowej tomografii PET, a także w tradycyjnym obrazowaniu fluorescencyjnym [176]. Kumulacja tych nanokompozytów w obszarach chorobowych jest wysoce selektywna dzięki aktywacji powierzchni nanocząstek z odpowiednimi molekułami.



Rysunek 16. Schemat przedstawiający wielofunkcyjne nanoplatfomy

Figure 16. Schematic illustration of multifunctional nanoplatfoms

Hu wraz ze współpracownikami [104] wykorzystali pokryte osłonką krzemionkową nanokryształy $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ do specyficznego obrazowania komórek nowotworowych. Pokrycie krzemionką umożliwia wprowadzenie do otoczki organicznego barwnika fluorescencyjnego oraz odpowiednią modyfikację powierzchni nanokompozytów. Tak powstały kompleks pokryty cienką osłonką z nanocząsteczek złota, a następnie warstwą glikolu polietylenowego i kwasu foliowego, który umożliwił lokowanie się nanocząsteczek w obszarach o obniżonym pH. Tak zsyntetyzowane nanoluminofory mogą służyć zarówno do obrazowania za pomocą luminescencji [104], jak i rezonansu magnetycznego, a także mogą być zastosowane w terapii fototermicznej [1].

Innym przykładem wykorzystania wielofunkcyjnych nanocząsteczek było zaprojektowanie nanozwiązków zawierających paramagnetyczny rdzeń Gd_2O_3 [2]. W eksperymencie pokazano możliwość jednoczesnego obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego oraz fluorescencji. Son i współpracownicy [177] wykorzystali wielofunkcyjne nanokryształy do wykrywania mutacji w pojedynczym nukleotydzie. Dzięki wykorzystaniu nanokrysztalitów $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, zmutowane fragmenty DNA mogły być odseparowane od reszty próbki poprzez działanie pola magnetycznego. W eksperymencie wykorzystano zarówno właściwości magnetyczne jak i luminescencyjne nanokrysztalitów.

PODSUMOWANIE

Konwertujące w górę nanoluminofory znajdują zastosowania w konstrukcji biotestów i biocujników, w znakowaniu biologicznym, a także w obrazowaniu i terapii fotodynamicznej. Jedną z największych zalet UCNP jest możliwość wykonania analiz opartych na zjawisku LRET. Ta technika pomiarowa otwiera drogę do szybkich i przesiewowych testów chorób, mutacji genetycznych a także testowania leków *in vitro*, po to by zawęzić olbrzymią bazę „proto-leków” do najbardziej obiecujących związków [178]. Testy wykorzystujące mechanizm LRET są jednorodne, nie wymagają separacji ani wymywania, znacznie ułatwiając detekcję analitu w próbkach bezpośrednio po pobraniu. Ze względu na relatywnie długi zasięg LRET’u, jako bioaktywne makromolekuły mogą być użyte białka, przeciwciała, itp., posiadające znaczne rozmiary. Zapewnia to wysoką biologiczną specyficzność i wiarygodność detekcji. Możliwość wykrycia nawet mało intensywnego sygnału z pomiarów intensywności luminescencji, a także czasów życia donora znacznie minimalizuje objętość próbki i ilość reagentów prowadząc do obniżenia kosztów analiz.

Kolejną zaletą nanoluminoforów oraz nanokrystalitów wielofunkcyjnych, jest możliwość użycia ich, jako nośniki leków. Zastosowanie odpowiednich nanonośników może poprawić rozpuszczalność, biodostępność czy też odporność chemoterapeutyków na degradację enzymatyczną. Wielofunkcyjne nanoplatfomy pozwalają ponadto na łączenie kilku metod obrazowania, umożliwiają równoczesną weryfikację uwalniania leków oraz inicjują zlokalizowaną foto- lub termoterapię. Mimo wielu potencjalnych zalet nanotechnologii w badaniach *in vivo*, konieczna jest weryfikacja wpływu nanocząsteczek na organizmy żywe i środowisko. Te same cechy, które są pożądane i użyteczne z punktu widzenia technologii czy biomedycyny (np. mały rozmiar, przenikanie bariery krew-mózg itp.), mogą przyczynić się do niespodziewanej nanotoksyczności.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Wykorzystanie Nanotechnologii w nowoczesnych materiałach” – NanoMat (POIG.01.01.02-02-002/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2). A.B. dziękuje również za finansowe wsparcie Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Nr N N507 58 49 38.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Cheng, K. Yang, Y. Li, J. Chen, C. Wang, M. Shao, S.T. Lee, Z. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 7385.
- [2] J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J.-L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5076.
- [3] W.W. Yu, Y.A. Wang, X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 4300.
- [4] Y.H. Chang, D.T. Bau, Y.S. Lee, C.Y. Chen, H.J. Huang, F.J. Tsai, C.H. Tsai, C.Y.C. Chen, *Adv. Mater. Res.*, 2009, **79-82**, 565.
- [5] J. Ye, P. Van Dorpe, W. Van Roy, K. Lodewijks, I. De Vlaminck, G. Maes, G. Borghs, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 3110.
- [6] R.S. Meltzer, S.P. Feofilov, B. Tissue, H.B. Yuan, *Phys. Rev. B*, 1999, **60**, 14012.
- [7] J. Zhou, M. Yu, Y. Sun, X. Zhang, X. Zhu, Z. Wu, D. Wu, F. Li, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1148.
- [8] F. Wang, W.B. Tan, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, *Nanotechnology*, 2006, **17**, R1.
- [9] M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao, S. Xu, *Nanomedicine: NBM*, 2011, **7**, 710.
- [10] A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 1028.
- [11] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 4988.
- [12] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 4056.
- [13] L. Wang, W. Tan, *Nano Lett.*, 2005, **6**, 84.
- [14] S. Santra, D. Dutta, B.M. Moudgil, *FBP*, 2005, **83**, 136.
- [15] S.W. Bae, W. Tan, J.-I. Hong, *Chem. Commun.*, 2011.
- [16] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res*, 2008, **1**, 99.
- [17] W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 40.
- [18] X. Peng, L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich, A.P. Alivisatos, *Nature*, 2000, **404**, 59.
- [19] T.T. Tan, S.T. Selvan, L. Zhao, S. Gao, J.Y. Ying, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 3112.
- [20] T. Jin, F. Fujii, E. Yamada, Y. Nodasaka, M. Kinjo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9288.
- [21] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538.
- [22] D.K. Yi, S.T. Selvan, S.S. Lee, G.C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J.Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4990.
- [23] X. Gao, S. Nie, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11575.
- [24] L. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10378.
- [25] J.H. Kim, S. Chaudhary, M. Ozkan, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 195105.
- [26] F. Dubois, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **129**, 482.
- [27] P. Yang, N. Murase, J. Yu, *Colloids Surf., A*, 2011, **385**, 159.
- [28] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W.J. Parak, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 703.
- [29] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia, *Nano Lett.*, 2003, **4**, 11.
- [30] X. Gao, L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshall, J.W. Simons, S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, **16**, 63.
- [31] D.K. Chatterjee, A.J. Rufaihah, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 937.
- [32] L. Cheng, K. Yang, M. Shao, X. Lu, Z. Liu, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 1327.
- [33] L. Xiong, T. Yang, Y. Yang, C. Xu, F. Li, *Biomaterials*, 2010, **31**, 7078.
- [34] A. Elsaesser, C.V. Howard, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2012, **64**, 129.

- [35] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Small, 2008, **4**, 26.
- [36] F. Meiser, C. Cortez, F. Caruso, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**, 5954.
- [37] J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, Dalton Trans., 2008, 5687.
- [38] H.S. Mader, P. Kele, S.M. Saleh, O.S. Wolfbeis, Curr. Opin. Chem. Biol., 2010, **14**, 582.
- [39] L. Ding, H. Ju, J. Mater. Chem., 2011, **21**, 18154.
- [40] T. Ukonaho, T. Rantanen, L. Jämsen, K. Kuningas, H. Pääkkilä, T. Lövgren, T. Soukka, Anal. Chim. Acta, 2007, **596**, 106.
- [41] T. Soukka, T. Rantanen, K. Kuningas, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2008, **1130**, 188.
- [42] J.-C.G. Bünzli, Acc Chem Res, 2005, **39**, 53.
- [43] Y. Wang, X. Guo, T. Endo, Y. Murakami, M. Ushirozawa, J. Solid State Chem., 2004, **177**, 2242.
- [44] A. Mayer, S. Neuenhofer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, **33**, 1044.
- [45] T. Soukka, H. Härmä, *Lanthanide Nanoparticules as Photoluminescent Reporters* [w:] *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, P. Hänninen, H. Härmä (Ed.), Springer Ser Fluoresc (2011) 7: 89–114, DOI 10.1007/4243_2010_11, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, published online: 26 October 2010.
- [46] F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, X. Liu, Analyst, 2010, **135**, 1839.
- [47] L.M. Maestro, E.M. Rodriguez, F. Vetrone, R. Naccache, H.L. Ramirez, D. Jaque, J.A. Capobianco, J.G. Solé, Opt. Express, 2010, **18**, 23544.
- [48] S. Heer, K. Kömpe, H.U. Güdel, M. Haase, Adv. Mater., 2004, **16**, 2102.
- [49] J.-C.G. Bünzli, S. Comby, A.-S. Chauvin, C.D.B. Vandevyver, J. Rare Earths, 2007, **25**, 257.
- [50] A. Bednarkiewicz, M. Maćzka, W. Strek, J. Hanuza, M. Karbowski, Chem. Phys. Lett., 2006, **418**, 75.
- [51] M.L. Debasu, D. Ananias, A.G. Macedo, J. Rocha, L.s.D. Carlos, J. Phys. Chem. C, 2011, **115**, 15297.
- [52] F. Auzel, Chem. Rev., 2003, **104**, 139.
- [53] F. Auzel, C.R. Acad. Sci., 1966, **262**, 1016.
- [54] Z. Hong-Lou, L. Ning, X. Da-Yuan, Z. Xu-Chang, L. Wei, L. Hui-Chun, Chin. Phys. Lett., 2005, **22**, 1806.
- [55] P.V. dos Santos, M.T. de Araujo, A.S. Gouveia-Neto, J.A. Medeiros Neto, A.S.B. Sombra, Appl. Phys. Lett., 1998, **73**, 578.
- [56] H. Scheife, G. Huber, E. Heumann, S. Bär, E. Osiać, Opt. Mater., 2004, **26**, 365.
- [57] H.J. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vail, R.S. Niedbala, H.J. Tanke, Anal. Biochem., 1999, **267**, 30.
- [58] K.W. Krämer, D. Biner, G. Frei, H.U. Güdel, M.P. Hehlen, S.R. Lüthi, Chem. Mater., 2004, **16**, 1244.
- [59] J.F. Suyver, J. Grimm, K.W. Krämer, H.U. Güdel, J. Lumin., 2005, **114**, 53.
- [60] H. Schäfer, P. Ptacek, K. Kömpe, M. Haase, Chem. Mater., 2007, **19**, 1396.
- [61] P. Il, J.H. Kim, K.T. Lee, K.-S. Jeon, H. Bin Na, J.H. Yu, H.M. Kim, N. Lee, S.H. Choi, S.-I. Baik, H. Kim, S.P. Park, B.-J. Park, Y.W. Kim, S.H. Lee, S.-Y. Yoon, I.C. Song, W.K. Moon, Y.D. Suh, T. Hyeon, Adv. Mater., 2009, **21**, 4467.
- [62] F. Auzel, Chem. Rev., 2004, **104**, 139.
- [63] S.A. Payne, C. Bibeau, J. Lumin., 1998, **79**, 143.
- [64] A.A. Kaminskii, *Crystalline lasers: physical processes and operating schemes*, CRC Press Boca Raton 1996.
- [65] J. Marie-France, Opt. Mater., 1999, **11**, 181.
- [66] F. Auzel, Y.H. Chen, J. Lumin., 1995, **65**, 45.
- [67] W.E. Case, M.E. Koch, A.W. Kueny, J. Lumin., 1990, **45**, 351.

- [68] N. Garnier, R. Moncorge, H. Manaa, E. Descroix, P. Laporte, Y. Guyot, *J. Appl. Phys.*, 1996, **79**, 4323.
- [69] S. Guy, M.F. Joubert, B. Jacquier, C. Linares, *Ann. Phys.*, 1995, **20**, 117.
- [70] M. Malinowski, A. Wnuk, Z. Frukacz, G. Chadeyron, R. Mahiou, S. Guy, M.F. Joubert, *J. Alloys Compd.*, 2001, **323**, 731.
- [71] S. Xiao, L. Zhou, Q.Q. Wang, H. Deng, S.H. Yang, *Chin. Phys. Lett.*, 2009, **26**, 124209.
- [72] Q. Zhan, J. Qian, H. Liang, G. Somesfalean, D. Wang, S. He, Z. Zhang, S. Andersson-Engels, *Acs Nano*, 2011, **5**, 3744.
- [73] M. Wang, C. Mi, Y. Zhang, J. Liu, F. Li, C. Mao, S. Xu, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 19021.
- [74] J.F. Suyver, J. Grimm, M.K. van Veen, D. Biner, K.W. Krämer, H.U. Güdel, *J. Lumin.*, 2006, **117**, 1.
- [75] F. Wang, D.K. Chatterjee, Z. Li, Y. Zhang, X. Fan, M. Wang, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 5786.
- [76] W. Jiang, E. Papa, H. Fischer, S. Mardyani, W.C.W. Chan, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 607.
- [77] Y.-C. Cao, Z.-L. Huang, T.-C. Liu, H.-Q. Wang, X.-X. Zhu, Z. Wang, Y.-D. Zhao, M.-X. Liu, Q.-M. Luo, *Anal. Biochem.*, 2006, **351**, 193.
- [78] R.P. Bagwe, C. Yang, L.R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir*, 2004, **20**, 8336.
- [79] J. Pichaandi, J.-C. Boyer, K.R. Delaney, F.C.J.M. van Veggel, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 19054.
- [80] S. Majuru, M.O. Oyewumi, [w:] *Nanotechnology in Drug Delivery*, M.M. Villiers, P. Aramwit, G.S. Kwon (Eds), Springer New York, New York, 2009.
- [81] T. Soukka, H. Härmä, J. Paukkunen, T. Lövgren, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2254.
- [82] J.-Q. Gu, J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 6589.
- [83] J.K. Herr, J.E. Smith, C.D. Medley, D. Shangguan, W. Tan, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2918.
- [84] C. Buzea, I.I. Pacheco, K. Robbie, *Biointerphases*, 2008, **4**, MR17.
- [85] C. Salthouse, S. Hildebrand, R. Weissleder, U. Mahmood, *Opt. Express*, 2008, **16**, 21731.
- [86] C.T. Xu, J. Axelsson, S. Andersson-Engels, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, **94**, 251107.
- [87] K. Kuningas, T. Rantanen, T. Ukonaho, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7348.
- [88] P. Corstjens, M. Zuiderwijk, A. Brink, S. Li, H. Feindt, R.S. Niedbala, H. Tanke, *Clin. Chem.*, 2001, **47**, 1885.
- [89] P.L.A.M. Corstjens, L. van Lieshout, M. Zuiderwijk, D. Kornelis, H.J. Tanke, A.M. Deelder, G.J. van Dam, *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 171.
- [90] P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar, M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4526.
- [91] F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarrón, A. Juarranz de la Fuente, F. Sanz-Rodríguez, L. Martínez Maestro, E. Martín Rodríguez, D. Jaque, J. García Solé, J.A. Capobianco, *Acs Nano*, 2010, **4**, 3254.
- [92] A. Bednarkiewicz, D. Wawrzynczyk, M. Nyk, W. Strek, *Appl. Phys. B*, 2011, **103**, 847.
- [93] C. Wang, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1110.
- [94] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou, *Acs Nano*, 2011, **5**, 8488.
- [95] L.P. Qian, L.H. Zhou, H.-P. Too, G.-M. Chow, *J. Nanopart. Res.*, 2010, **13**, 499.
- [96] R.M. Petoral, F. Söderlind, A. Klasson, A. Suska, M.A. Fortin, N. Abrikosova, L.a. Selegård, P.-O. Käll, M. Engström, K. Uvdal, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 6913.
- [97] K. Kuningas, T. Ukonaho, H. Päkikilä, T. Rantanen, J. Rosenberg, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 4690.
- [98] Y. Yang, Y. Qu, J. Zhao, Q. Zeng, Y. Ran, Q. Zhang, X. Kong, H. Zhang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, **2010**, 5195.
- [99] L. Wang, Y. Li, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 4203.
- [100] L. Wang, P. Li, L. Wang, *Luminescence*, 2009, **24**, 39.
- [101] J. Zhou, Y. Sun, X. Du, L. Xiong, H. Hu, F. Li, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3287.
- [102] G. Zhang, Y. Liu, Q. Yuan, C. Zong, J. Liu, L. Lu, *Nanoscale*, 2011, **3**, 4365.
- [103] Z. Chen, H. Chen, H. Hu, M. Yu, F. Li, Q. Zhang, Z. Zhou, T. Yi, C. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 3023.

- [104] H. Hu, L. Xiong, J. Zhou, F. Li, T. Cao, C. Huang, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 3577.
- [105] M. Wang, C.-C. Mi, W.-X. Wang, C.-H. Liu, Y.-F. Wu, Z.-R. Xu, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *Acs Nano*, 2009, **3**, 1580.
- [106] D.K. Chatterjee, Z. Yong, *Nanomedicine*, 2008, **3**, 73.
- [107] Q. Chen, X. Wang, F. Chen, Q. Zhang, B. Dong, H. Yang, G. Liu, Y. Zhu, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 7661.
- [108] J. Chen, C. Guo, M. Wang, L. Huang, L. Wang, C. Mi, J. Li, X. Fang, C. Mao, S. Xu, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2632.
- [109] S. Jiang, Y. Zhang, *Langmuir*, 2010, **26**, 6689.
- [110] Z. Tian, G. Chen, X. Li, H. Liang, Y. Li, Z. Zhang, Y. Tian, *Lasers Med. Sc.*, 2009, **25**, 479.
- [111] X.F. Yu, L.D. Chen, M. Li, M.Y. Xie, L. Zhou, Y. Li, Q.Q. Wang, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4118.
- [112] T. Zako, H. Nagata, N. Terada, A. Utsumi, M. Sakono, M. Yohda, H. Ueda, K. Soga, M. Maeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2009, **381**, 54.
- [113] M. Kamimura, D. Miyamoto, Y. Saito, K. Soga, Y. Nagasaki, *Langmuir*, 2008, **24**, 8864.
- [114] D. Casanova, C. Bouzigues, T.-L. Nguyen, R.O. Ramodiharilafy, L. Bouzahir-Sima, T. Gacoin, J.-P. Boilot, P.-L. Tharaux, A. Alexandrou, *Nat Nano*, 2009, **4**, 581.
- [115] D.E. Achatz, R. Ali, O.S. Wolfbeis, [w:] *Luminescence Applied in Sensor Science*, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni (Eds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010.
- [116] D.K. Chatterjee, M.K. Gnanasammandhan, Y. Zhang, *Small*, 2010, **6**, 2781.
- [117] J. Shen, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *Dalton Trans.*, 2008, 5687.
- [118] D. Vennerberg, Z. Lin, *Sci. Adv. Mater.*, 2011, **3**, 26.
- [119] G. Tian, Z. Gu, L. Zhou, W. Yin, X. Liu, L. Yan, S. Jin, W. Ren, G. Xing, S. Li, Y. Zhao, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 1226.
- [120] N.B. Ramírez, A.M. Salgado, B. Valdman, *Braz. J. Chem. Eng.*, 2009, **26**,
- [121] P.L. Corstjens, S. Li, M. Zuiderwijk, K. Kardos, W.R. Abrams, R.S. Niedbala, H.J. Tanke, *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, 2005, **152**, 64.
- [122] R.S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo, *Anal. Biochem.*, 2001, **293**, 22.
- [123] Z. Yan, L. Zhou, Y. Zhao, J. Wang, L. Huang, K. Hu, H. Liu, H. Wang, Z. Guo, Y. Song, H. Huang, R. Yang, *Sens. Actuators, B*, 2006, **119**, 656.
- [124] B.Y. Jung, S.C. Jung, C.H. Kweon, *J. Food Prot.*, 2005, **68**, 2140.
- [125] H.S. Mader, M. Link, D.E. Achatz, K. Uhlmann, X. Li, O.S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 5416.
- [126] P.L. Corstjens, M. Zuiderwijk, M. Nilsson, H. Feindt, R. Sam Niedbala, H.J. Tanke, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 191.
- [127] G. Shan, H. Huang, D.W. Stoutamire, S.J. Gee, G. Leng, B.D. Hammock, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 218.
- [128] M. Nichkova, D. Dosev, S.J. Gee, B.D. Hammock, I.M. Kennedy, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6864.
- [129] K.E. Sapsford, L. Berti, I.L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 4562.
- [130] B. Herman, V.E. Centonze Frohlich, J.R. Lakowicz, T.J. Fellers, M.W. Davidson, *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy* [online], Olympus FluoView Resource Center: FRET Introductory Concepts, [2012-05-23]. Dostępny w Internecie: <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>.
- [131] L. Stryer, R.P. Haugland, *PNAS*, 1967, **58**, 719.
- [132] I. Hemmilä, V. Laitala, *J. Fluoresc.*, 2005, **15**, 529.
- [133] X. Xiao, J.P. Haushalter, K.T. Kotz, G.W. Faris, *Biomed. Opt. Express*, 2011, **2**, 2255.
- [134] J.-C.G. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 1048.

- [135] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A.M. Seifalian, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4717.
- [136] M. Kumar, P. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2431.
- [137] L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6054.
- [138] M. Wang, W. Hou, C.-C. Mi, W.-X. Wang, Z.-R. Xu, H.-H. Teng, C.-B. Mao, S.-K. Xu, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 8783.
- [139] T. Rantanen, M.-L. Järvenpää, J. Vuojola, K. Kuningas, T. Soukka, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 2008, **47**, 3811.
- [140] K. Kuningas, H. Pakkila, T. Ukonaho, T. Rantanen, T. Lovgren, T. Soukka, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 145.
- [141] L.-N. Sun, H. Peng, M.I.J. Stich, D. Achatz, O.S. Wolfbeis, *Chem. Commun.*, 2009,
- [142] D.E. Achatz, R.J. Meier, L.H. Fischer, O.S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 260.
- [143] R. Ali, S.M. Saleh, R.J. Meier, H.A. Azab, I.I. Abdelgawad, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators, B.*, 2010, **150**, 126.
- [144] H.S. Mader, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5002.
- [145] S.F. Lim, R. Riehn, W.S. Ryu, N. Khanarian, C.-k. Tung, D. Tank, R.H. Austin, *Nano Lett.*, 2005, **6**, 169.
- [146] L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee, Z. Liu, *Nano Res.*, 2010, **3**, 722.
- [147] R. Abdul Jalil, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4122.
- [148] L. Cheng, K. Yang, M. Shao, X. Lu, Z. Liu, *Nanomedicine*, London, England, 2011,
- [149] A. Elsaesser, C.V. Howard, *Adv. Drug Del. Rev.* 64, **2012**, 129.
- [150] S. Hirano, K.T. Suzuki, *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104**, 85.
- [151] A. Xia, Y. Gao, J. Zhou, C.Y. Li, T.S. Yang, D.M. Wu, L.M. Wu, F.Y. Li, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7200.
- [152] Q. Le Masne de Chermont, C. Chaneac, J. Seguin, F. Pelle, S. Maitrejean, J.P. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, D. Scherman, *P. Nat. Acad. Sci.*, 2007, **104**, 9266.
- [153] N.M. Idris, Z. Li, L. Ye, E.K. Wei Sim, R. Mahendran, P.C.-L. Ho, Y. Zhang, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5104.
- [154] O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, F. Druon, J.-P. Boudou, T. Sauvage, P. Georges, P.A. Curmi, F. Treussart, *Small*, 2008, **4**, 2236.
- [155] O. Faklaris, V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C.I. Gesset, J.-C. Arnault, A. Thorel, J.-P. Boudou, P.A. Curmi, F.o. Treussart, *ACS Nano*, 2009, **3**, 3955.
- [156] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, *Science*, 2003, **302**, 442.
- [157] D. Lasne, G.A. Blab, S. Berciaud, M. Heine, L. Groc, D. Choquet, L. Cognet, B. Lounis, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 4598.
- [158] E. Beaufrepaire, V. Buissette, M.-P. Sauviat, D. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, D. Casanova, A. Huignard, J.-L. Martin, T. Gacoin, J.-P. Boilot, A. Alexandrou, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 2079.
- [159] J.V. Moore, C.M.L. West, C. Whitehurst, *Phys. Med. Biol.*, 1997, **42**, 913.
- [160] G.-I. Sengee, N. Badraa, Y.K. Shim, *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, **9**, 1407.
- [161] R. Allison, H. Mota, C. Sibata, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 263.
- [162] A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 279.
- [163] R. Allison, G. Downie, X.H. Hu, C. Childs, C. Sibata, *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 27.
- [164] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1998, **90**, 889
- [165] M. Olivo, R. Bhuvanewari, S.S. Lucky, N. Dendukuri, P. Soo-Ping Thong, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 1507.

- [166] B. Ungun, R.K. Prud'homme, S.J. Budijon, J. Shan, S.F. Lim, Y. Ju, R. Austin, *Opt. Express*, 2009, **17**, 80.
- [167] M. Suzuki, V. Tseeb, K. Oyama, S.i. Ishiwata, *Biophys. J.*, 2007, **92**, L46.
- [168] J. Lee, N.A. Kotov, *Nano Today*, 2007, **2**, 48.
- [169] Z. Liu, Y. Bando, J. Hu, K. Ratinac, S.P. Ringer, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 3681.
- [170] M.r.A.R.C. Alencar, G.S. Maciel, C.B. de Araújo, A. Patra, *Appl. Phys. Lett.*, 2004, **84**, 4753.
- [171] M. Aldén, A. Omrane, M. Richter, G. Särner, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2011, **37**, 422.
- [172] U. Hobohm, *Cancer Immunology, Cancer Immunol. Immunother.*, 2001, **50**, 391.
- [173] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, P.M. Schlag, *The Lancet Oncology*, 2002, **3**, 487.
- [174] F.-Y. Cheng, C.-H. Su, P.-C. Wu, C.-S. Yeh, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3167.
- [175] D. Bechet, P. Couleaud, C.I. Frochot, M.-L. Viriot, F.o. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 612.
- [176] Q. Liu, Y. Sun, C.G. Li, J. Zhou, C.Y. Li, T.S. Yang, X.Z. Zhang, T. Yi, D.M. Wu, F.Y. Li, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3146.
- [177] A. Son, A. Dhirapong, D.K. Dosev, I.M. Kennedy, R.H. Weiss, K.R. Hristova, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 1829.
- [178] V. Bergendahl, T. Heyduk, R.R. Burgess, *Appl. Environ. Microb.*, 2003, **69**, 1492.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 marca 2012

**SPEKTROMETRIA MAS W BADANIACH SKAŻEŃ
MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA. CZĘŚĆ I.
KWAS MURAMINOWY JAKO BIOMARKER ŚCIAN
KOMÓRKOWYCH BAKTERII**

INVESTIGATION (DETECTION) OF MICROBAL
ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BY MASS
SPECTROMETRY. PART I. MURAMIC ACID
AS A BIOMARKER OF THE MICROBIAL CELL WALLS

Zbigniew Mielniczuk, Karol Bal

*Centralny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Opakowań,
ul. Konstancińska 11, 02-942 Warszawa
e-mail: mielniczuk@cobro.org.pl, bal@cobro.org.pl*

Abstract

Wstęp

1. Markery chemiczne bakterii
 - 1.1. Wykrywanie skażeń mikrobiologicznych środowiska
2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) w badaniu markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii
3. Przygotowanie próbek kwasu muraminowego do analizy metodą GC/MS – otrzymanie pochodnych trimetylosililowych (TMS)
 - 3.1. Obliczanie ilości komórek bakterii na podstawie zawartości peptydoglikanu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



dr hab. inż. Zbigniew Maksym Mielniczuk, urodzony w 1941 r., ukończył studia chemiczne na Politechnice Warszawskiej w 1971 r. Doktorat nauk technicznych na Akademii Rolniczej w Poznaniu 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Dalhousie, Halifax, Kanada. W latach 1992–1994 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja. Doktor habilitowany nauk biologicznych – Uniwersytet Łódzki 1997 r. Obecnie zatrudniony jako Sekretarz Naukowy oraz Prof. nzw. w Centralnym Ośrodku

Badawczo-Rozwojowym Opakowań COBRO. Autor ponad 40 oryginalnych artykułów oraz około 80 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych



dr Karol Piotr Bal, urodzony w 1949 r. (Krosno), ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Warszawskim w 1972 r. Doktorat nauk chemicznych uzyskał w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Nowego Brunswicku we Fredericton, Kanada. W latach 2005–2006 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja. Adiunkt w IChO PAN w latach 1976–1985. W latach 1986–1998 adiunkt w Instytucie Sportu w Laboratorium Badań Antydopingowych.

W latach 1999–2006 adiunkt w Instytucie Żywności i Żywnienia w Warszawie. Obecnie adiunkt w Centralnym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Opakowań COBRO, Warszawa. Autor ponad 20 oryginalnych artykułów oraz około 30 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 1975 r.

ABSTRACT

Microorganisms synthesize several monomeric chemical structures that are not found elsewhere in nature, e.g. muramic acid (an amino sugar) and D-amino acids (D-alanine and D-glutamic acid) are ubiquitous in bacterial peptidoglycan (PG). Specific sugars (e.g. heptoses) and 3-hydroxylated fatty acids are found in the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) of gram-negative bacteria [42].

The best way to protect against environmental contamination is microbial control. Methods in current use for monitoring of microorganisms mainly include culturing and direct microscopy. However, several factors including samples collection, growth conditions, incubation temperature and interaction between different organisms all affect culturing results.

Additionally, culturing based methods can detect only viable organisms and they are also time consuming, sometimes taking days or weeks.

However, since both living and dead microorganisms express irritating and toxic structures, they should all be taken into consideration [17].

Muramic acid (MuAc), an amino sugar, has been suggested for use as a chemical marker in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination of bacterial peptidoglycan in both clinical and environmental samples. Several derivatives of MuAc have been applied, including the alditol acetate [1, 2], aldnonitrile [3], trifluoroacetyl [4] and trimethylsilyl [5], and methyl ester O-methyl acetate [6] derivatives.

Both the alditol acetate and TMS derivatives have proven suitable for the use with GC-ion-trap tandem MS [7].

The aim of our proposition is a trial of application of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method as an alternative or complement to culturing, microscopy and other assays for detection, characterization and monitoring of microbial contamination of environment (e.g. water, air, air-conditioning systems), contamination of biochemical and food production chain processes, packaging for foodstuffs etc. by direct analysis of bacterial muramic acid as a biochemical marker.

A method is described for the quantitation of muramic acid, a marker of bacterial peptidoglycan as trimethylsilyl (TMS) derivatives using GC/MS method.

The described methods are fast and simple, and can be applied for monitoring of *microbial contamination directly, without prior culturing, in complex environmental samples.*

This method can also be applied for testing processes of cleaning and disinfection on packaging materials or on both packaging materials/foodstuffs in order to decrease their microbial load and thus to ensure better shelf-life.

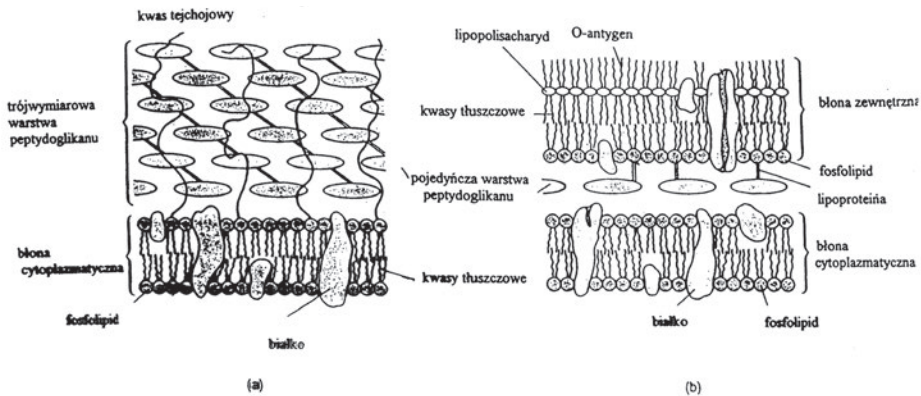
Keywords: muramic acid, peptidoglycan, gas chromatography-mass spectrometry
Słowa kluczowe: kwas muraminowy, peptydoglikan, chromatografia gazowa, spektrometria mas

WSTĘP

Powszechność występowania bakterii w naturze oraz ogromna ich rola, skłoniła naukowców do opracowania metod ich wykrywania i identyfikacji. Badanie struktur chemicznych komórek bakteryjnych, poznanie ich funkcji życiowych, pozwoliło lepiej zrozumieć zakres i znaczenie oddziaływania drobnoustrojów na otaczające środowisko.

Od dawna na przykład wiadomo, że wszystkie bakterie osłonięte są błoną komórkową. Komórki bakterii z wyjątkiem *Mycoplasmatales* i *Archaeobacterie* otoczone są leżącą na zewnątrz błony, ścianą komórkową tworzącą szkielet zewnętrzny decydujący m.in. o kształcie komórki. Dodatkowo u większości bakterii gram-ujemnych występuje zewnętrzna osłona, której brak u bakterii gram-dodatnich.

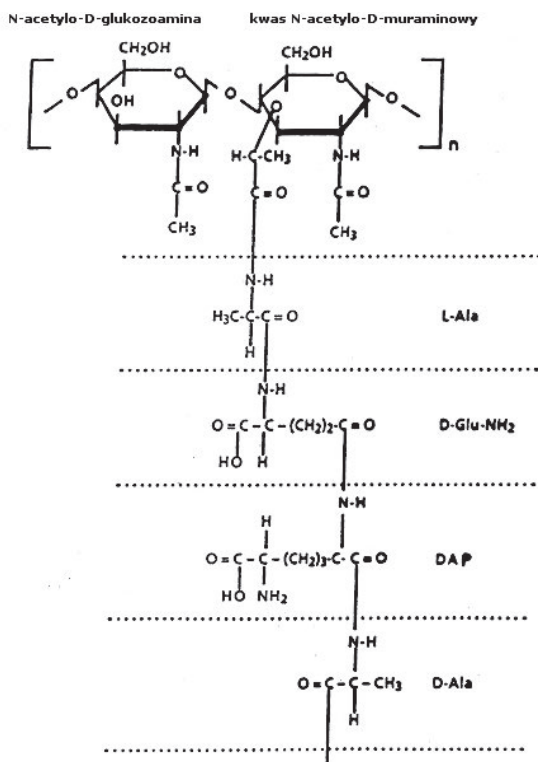
Ściana komórkowa odgrywa ważną rolę w funkcjach życiowych bakterii. Ona to właśnie zawiera wiele unikalnych związków chemicznych, będących składnikami peptydoglikanu (PG, mureina, mukopeptyd), i lipopolisacharydu (LPS, endotoksyna). Schemat struktury ścian komórkowych bakterii pokazano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat struktury ścian komórkowych bakterii: gram-dodatnich (a) i gram-ujemnych (b) [8], po modyfikacjach

Figure 1. Schematic structure of the bacterial cell wall: gram-positive (a) and gram-negative (b) [8], after modifications

U bakterii gram-dodatnich PG jest wielowarstwowy, stanowiący od 40% do 80% całkowitej masy komórki [9]. Natomiast cienki, jednowarstwowy peptydoglikan u bakterii gram-ujemnych jest dodatkowo otoczony zewnętrzną osłoną zbudowaną z białek oraz lipopolisacharydu (LPS). Strukturę chemiczną jednej warstwy peptydoglikanu przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat struktury jednej warstwy peptydoglikanu. Gdzie: L-Ala, L-alanina; D-Glu-NH₂, D-glutamina; DAP, kwas diaminopimelinowy; D-Ala, D-alanina [10], po modyfikacjach
 Figure 2. Schematic structure of one layer of peptidoglycan. Where: L-Ala, L-alanine; D-Glu-NH₂, D-glutamine, DAP, diaminopimelic acid, D-Ala, D-alanine [10], after modifications

Jest to polimer składający się z identycznych podjednostek, zawierający pochodne dwóch aminocukrów: *N*-acetylglukozaaminy i kwasu *N*-acetylmuraminowego połączonych ze sobą wiązaniami beta 1,4-glukozydowymi w łańcuchy kilkudziesięciocłonowe [11]. Do grup karboksylowych kwasu *N*-acetylmuraminowego dołączone są krótkie, liczące po kilka aminokwasów peptydy. Ich skład bywa różny u różnych bakterii przy czym peptydy dwóch sąsiednich łańcuchów łączą się ze sobą z reguły poprzez kwas diaminopimelinowy (DAP) lub lizynę.

1. MARKERY CHEMICZNE BAKTERII

Złożone makrostruktury ścian komórkowych bakterii zawierają monomeryczne związki chemiczne, czasem zupełnie unikalne i nie występujące nigdzie indziej w naturze. W Tabeli 1 przedstawiono kilka przykładów markerów ścian komórkowych bakterii.

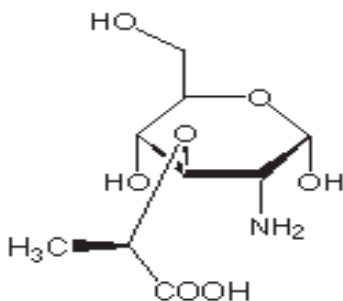
Tabela 1. Markery chemiczne bakterii
Table 1. Chemical markers of bacteria

Marker	Struktura lub rodzaj drobnoustroju
Kwas muraminowy Alanina Kwas D-glutaminowy Kwas diaminopimelinowy	Składniki peptydoglikanu
Kwasy 3-hydroksytłuszczowe Heptoza Kwas 2-keto-3-deoksyoktonowy	Lipopolisacharyd (LPS) bakterii gram-ujemnych
D-arabinitol	Drożdżaki z rodzaju <i>Candida</i> , np. <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>

Związki chemiczne wymienione w Tabeli 1, będące unikalnymi dla niektórych drobnoustrojów, nazywamy markerami chemicznymi bakterii. Niektóre z nich, jak np. kwas muraminowy, mogą występować w wielu grupach drobnoustrojów, inne jak np. kwasy 3-hydroksytłuszczowe mogą być bardzo specyficzne dla określonej grupy bakterii gram-ujemnych.

Kwas muraminowy (kwas [2-amino-3-O-(1-karboxyetylo)-2-deoksy-D-glucozowy], nie spotykany nigdzie indziej w naturze, składnik peptydoglikanu prawie wszystkich bakterii (wyjątkiem są *Archaeobakterie* posiadające sztywną strukturę osłony zwaną pseudomureiną oraz *Mycoplasmatales* otoczone błoną cytoplazmatyczną zawierającą m.in. cholesterol), może służyć jako chemiczny marker wykrywania zanieczyszczeń bakteryjnych w procesach biochemicznych [12], lub zakażeń w schorzeniach reumatycznych [13, 14]. Wykrywany był on w kurzu środowiska naturalnego [15–17], jak również w tkankach ssaków [18–20].

Strukturę chemiczną tego związku pokazano na Rysunku 3.



Rysunek 3. Wzór strukturalny kwasu muraminowego
Figure 3. The structural formula of muramic acid

Kwas ten posiada bardzo złożoną budowę chemiczną, zawiera trzy różne, polarne grupy funkcyjne ($-OH$, $-COOH$ oraz $-NH_2$). Występuje on wyłącznie w drobnoustrojach i dlatego też wykrycie tego związku w badanej próbce pozwala jednoznacznie stwierdzić skażenie bakteriami. Ma to ogromne znaczenie praktyczne.

Poza wyżej wymienionymi, również inne markery chemiczne zostały zidentyfikowane w strukturach peptydoglikanu, lipopolisacharydach i fosfolipidach. Są to m.in. kwasy tłuszczowe, węglowodany, aminokwasy, a także lotne metabolity jak alkohole i krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe [21–30]. Krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe są stosowane do wykrywania i różnicowania bakterii [31–33].

Drugorzędowe, długołańcuchowe alkohole są charakterystycznymi markerami bakterii z rodzaju *Mycobacterium* [34–36], np. 2-eikozanol dla *Mycobacterium avium* [37].

Kwas 27-hydroksy-oktakozanowy, zawierający 28 atomów węgla w cząsteczce, jest typowym składnikiem lipidu A [38].

1.1 WYKRYWANIE SKAŻEŃ MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA

Kontrolę skażeń mikrobiologicznych szeroko rozumianego środowiska naturalnego można prowadzić metodami klasycznymi, takimi jak np. LAL (ang. *Limulus Amebocyte Lysate Test*) [39, 40], immunologicznymi [radioimmunologicznymi (RIA), immunofluorescencyjnymi (IF), immunoenzymatycznymi (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) [41], genetycznymi, polegającymi na identyfikacji ściśle dobranego fragmentu materiału genetycznego z użyciem techniki PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) lub przez hodowlę drobnoustrojów na odpowiednich podłożach (np. agarowych).

Alternatywną do metod klasycznych może być zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC-MS), chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (HPLC/MS/MS) do monitorowania unikalnych markerów, związków chemicznych bakterii, nie występujących nigdzie indziej w naturze, a tym samym do wykrywania skażeń mikrobiologicznych nie tylko w szeroko rozumianym środowisku naturalnym (np. w kurzu, powietrzu, wodzie), ale również np. w materiałach opakowaniowych i opakowaniach przeznaczonych do kontaktu z żywnością.

Chromatografia gazowa (GC), sprzężona najczęściej ze spektrometrią mas (MS) jest szczególnie użyteczną metodą do wykrywania i oznaczania ilościowego markerów chemicznych bakterii. Wysoka czułość i specyficzność tego układu analitycznego umożliwia oznaczenie markerów bezpośrednio w próbkach klinicznych i środowiskowych, bez uprzedniej, często długiej hodowli metodą płytkową [42].

Oznaczanie markerów metodą chromatografii i spektrometrii mas (GC/MS) jest bardzo przydatne w wykrywaniu i identyfikacji niewielkiej liczby drobnoustrojów znajdujących się w próbce [43, 44].

Metodę tę zastosowano między innymi do szybkiego wykrywania *Mycobacterium xenopi* w wodzie pitnej, poprzez oznaczanie zawartości 2-dokozanolu, drugorzędowego alkoholu tłuszczowego, markera charakterystycznego dla tej bakterii [45]. Znajduje ona również zastosowanie w mikrobiologicznej diagnostyce klinicznej [46–57]. Pozwala ona wykrywać zanieczyszczenia bakteriami w tak skompli-

kowanych próbkach jak np. kurz z powietrza [5, 58, 59], w próbkach materiałów klinicznych, czy też w glebie [60–62].

Chlorowcowanie hydroksykwasów, cukrów, aminokwasów, czy też alkoholi pozwala na zastosowanie czułych i specyficznych metod detekcji jakimi są techniki ECD lub GC/MS/CI⁻ [63, 64].

Rozwój innych, nowych technik analitycznych jak wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) sprzężoną ze spektrometrią mas (MS) umożliwia wykrywanie bardziej złożonych struktur komórki bakteryjnej jak fosfolipidy i triglicerydy [65]. Jednak najbardziej uniwersalną techniką w zastosowaniu do wykrywania i ilościowego oznaczania markerów bakterii okazała się być chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas.

2. CHROMATOGRAFIA GAZOWA SPRZEŻONA ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (GC/MS) W BADANIU MARKERÓW CHEMICZNYCH ŚCIAN KOMÓRKOWYCH BAKTERII

Chromatografia gazowa (GC) wprowadzona do laboratoriów kilkadziesiąt lat temu jest obecnie najbardziej wszechstronnie wykorzystywaną techniką analityczną w różnych dziedzinach nauki dla rozdzielania związków chemicznych. Przy czym stosuje się szereg detektorów (np. FID, ECD, NPD itp.), charakteryzujących się często wysoką selektywnością i czułością. Jeśli zamiast klasycznych detektorów, wymienionych wyżej, w chromatografii gazowej użyjemy spektrometr mas, otrzymamy znacznie czulszy układ GC/MS dostarczający więcej informacji o analizowanej próbce, łącznie z absolutną identyfikacją obecnych w niej związków.

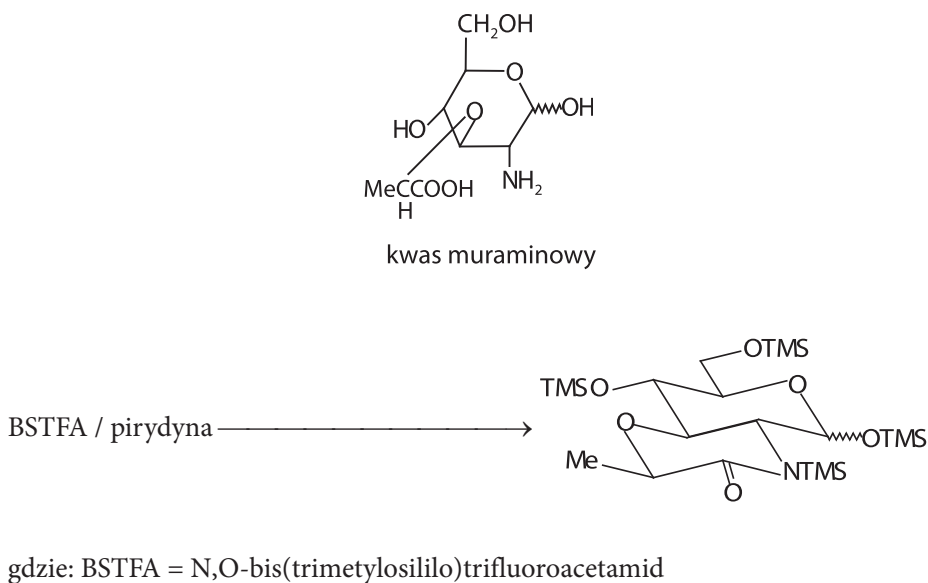
Związki opuszczające kolumnę chromatografu gazowego są wprowadzane, do utrzymywanej w wysokiej próżni (ok. 10^{-5} Tora) komory, gdzie zachodzi ich jonizacja. Jony mogą powstawać w różny sposób w zależności od wymagań analitycznych oraz posiadanego sprzętu. Najczęściej stosowany jest sposób zderzania analizowanych związków ze strumieniem elektronów („electron impact”, EI⁺), wytwarzanych przez włókno renowe.

Jony są rozdzielane w analizatorze mas w zależności od stosunku ich masy do ładunku (m/z), a następnie rejestrowane za pomocą powielacza elektronów. Typowym analizatorem jest kwadrupol, choć w przypadku markerów bakterii często stosowana jest pułapka jonowa [66] ze względu na swoją bardzo wysoką czułość [6].

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK KWASU MURAMINOWEGO DO ANALIZY METODĄ GC/MS – OTRZYMYWANIE POCHODNYCH TRIMETYLOSILILOWYCH (TMS)

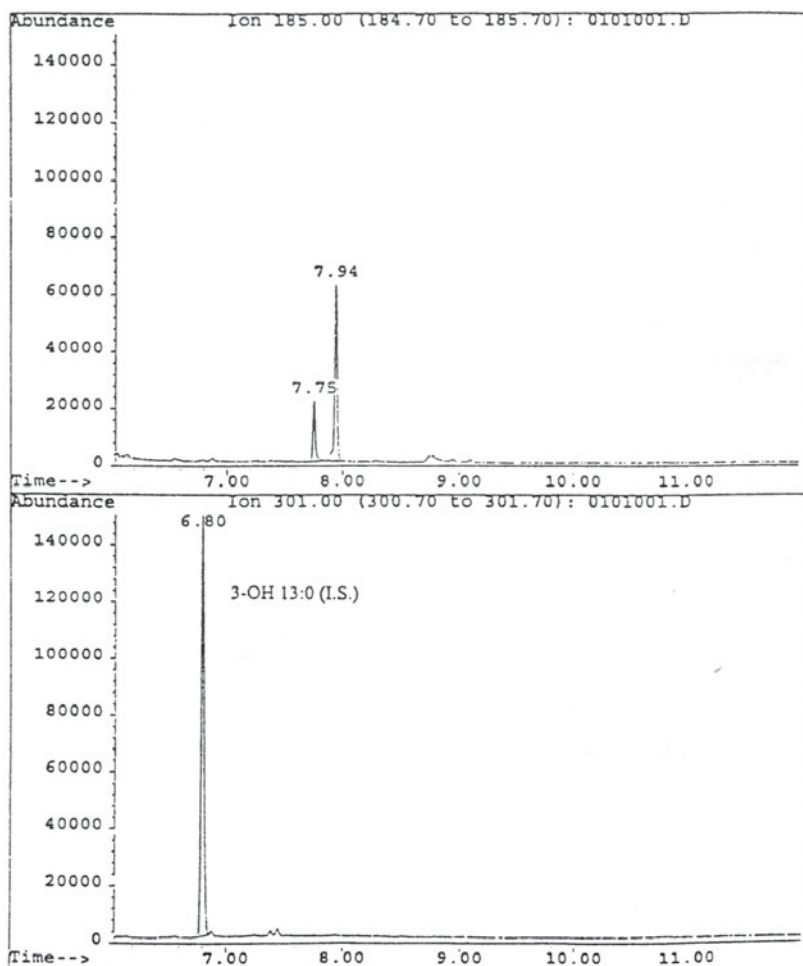
Próbki (np. bakterii, kurzu i innych matryc) do badań metodą GC/MS przygotowywano według procedury opisanej w pracy Mielniczuka i Pogorzelskiej [17]. Otrzymane pochodne TMS są trwałe w czasie długiego przechowywania (ponad miesiąc w temperaturze 4°C). Podobnie postępowano z wzorcem kwasu muraminowego (w zakresie stężeń 25–1000 ng).

Reakcja tworzenia pochodnej TMS kwasu muraminowego ma dość nieoczekiwany przebieg, gdyż zachodzi z cyklizacją i utworzeniem dodatkowego pierścienia laktamowego wg mechanizmu pokazanego na Rysunku 4 [6, 67].



Rysunek 4. Mechanizm powstawania pochodnej TMS kwasu muraminowego
Figure 4. The mechanism of muramic acid TMS derivatisation

Próbki wzorca kwasu muraminowego do wykreślenia krzywych kalibracyjnych jak i pobrane z otoczenia analizowano za pomocą chromatografu gazowego wyposażonego w detektor mas (MSD). Związki były analizowane metodą EI w trybie monitorowania pojedynczych jonów (ang. *single ion monitoring*, SIM). Pochodna TMS kwasu muraminowego występuje na chromatogramie (Rys. 5) w postaci dwóch dobrze rozdzielonych związków o czasach retencji 7,75 i 7,94 min. (na dolnym chromatogramie znajduje się pik wzorca wewnętrznego – TMS pochodnej estru metyloвого kwasu 3-hydroksytridekanowego). Oznaczenia ilościowe pochodnych TMS kwasu muraminowego przeprowadza się monitorując jon $m/z = 185$ [5, 17].

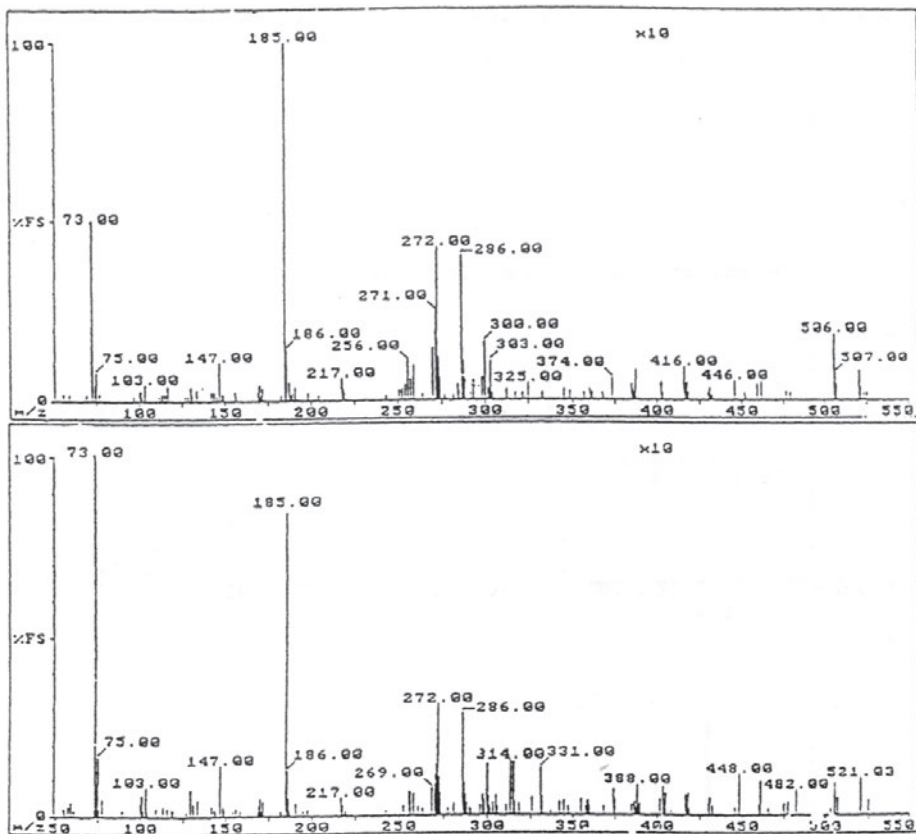


Rysunek 5. Chromatogram jonowy pochodnej trimetylosililowej kwasu muraminowego

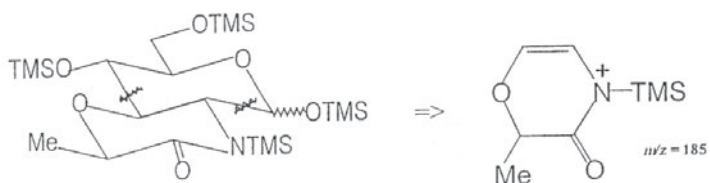
Figure 5. Ion chromatogram of muramic acid trimethylsilyl derivative

Oba piki są prawdopodobnie anomerami tworzącymi się na skutek obecności węgla anomerycznego C_1 i mają one strukturę laktamu [6]. Występowanie kwasu muraminowego jako laktamu zostało opisane wcześniej [68–70]. Jest to również potwierdzone obecnością molekularnego jonu (M) $m/z = 521$ i jonu $m/z = 506$, który jest związany z utratą przez TMS grupy metylowej (M-15). Oba związki mają bardzo podobne widma mas charakteryzujące się silnym jonem $m/z = 185$ (Rys. 6), powstającym prawdopodobnie przez oderwanie m.in. dwóch grup $-O(CH_3)_3Si$, i jednej grupy $-CH_2O(CH_3)_3Si$. Struktura tego jonu (Rys. 7) została określona przez Bala i in. [71].

Dominującym jonem w rejonie niskich mas jest charakterystyczny jon o $m/z = 73$ związany z obecnością grupy $-(CH_3)_3Si$.



Rysunek 6. Widma mas pochodnych trimetylosililowych dwóch anomerów kwasu muraminowego
 Figure 6. Mass spectra of two anomers of muramic acid trimethylsilyl derivatives

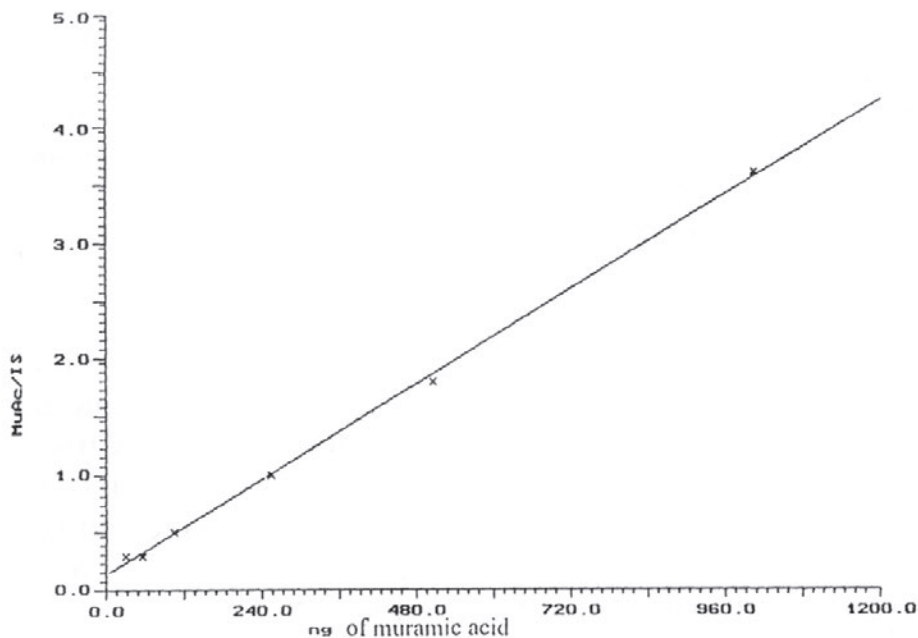


Rysunek 7. Mechanizm powstawania jonu $m/z = 185$ z pochodnej TMS kwasu muraminowego
 Figure 7. The mechanism of ion $m/z = 185$ muramic acid TMS derivative formation

3.1. OBLICZANIE ILOŚCI KOMÓREK BAKTERII NA PODSTAWIE ZAWARTOŚCI PEPTYDOGLIKANU

W celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej monitorowano jony: $m/z = 301$, dla pochodnej metylosililowej wzorca wewnętrznego 3-OH C13:O (3-OTMS-C13-COOCH₃) oraz $m/z = 185$, dla pochodnej sililowej (TMS) kwasu muraminowego.

Krzywa kalibracyjna dla obliczeń ilościowych kwasu muraminowego (MuAc) jest liniowa w badanym zakresie stężeń 25–1000 ng (Rys. 8).



Rysunek 8. Krzywa kalibracyjna dla obliczeń ilościowych kwasu muraminowego

Figure 8. Calibration curve for quantitative calculations of the muramic acid concentration

Charakteryzuje się ona równaniem regresji:

$$y = 0,003x + 0,160,$$

gdzie:

x = stężenie MuAc w badanej próbce (ng),

y = stosunek pola jonu m/z 185 dla MuAc do pola jonu m/z 301 dla IS.

Znając stężenie kwasu muraminowego w badanej próbce, możliwe jest wyliczenie zawartości bakteryjnego peptydoglikanu (PG), wagi komórek bakteryjnych (MuAc stanowi około 7,7% wagi PG i około 0,5 % suchej masy komórek bakteryjnych [4]), jak również ilości komórek (średnia waga komórki bakteryjnej wynosi około $3,55 \times 10^{-12}$ g [2]).

W tabeli poniżej podano przykłady zawartości MuAc, peptydoglikanu (PG), wagę komórek bakteryjnych (WBC) oraz ich ilość (QBC) w 1 mg badanej próbki (17).

Tabela 2. Przykładowe zawartości MuAc, peptydoglikanu (PG), waga komórek bakteryjnych (WBC) oraz ich ilość (QBC) w 1 mg badanej próbki

Table 2. Examples of muramic acid and peptidoglycan content, the weight of bacterial cells (WBC) and quantity (QBC) in 1 mg of the sample

Próbka	MuAc (ng)	PG (ng)	WBC (ng)	QBC
Kurz zebrany z plastiku (opakowanie znajdujące się w magazynie)	3,6	46,7	720,0	203×10^3
Kurz zebrany z mebli laboratoryjnych	13,7	177,4	2732,0	770×10^3

Uzyskane powyżej wartości, wskazują, że najmniej bakterii znajdowało się w zamkniętym magazynie z materiałami opakowaniowymi (203×10^3 komórek bakterii/mg kurzu), najwięcej na szafie stojącej na korytarzu (770×10^3 komórek bakterii/mg kurzu) co jest logicznie uzasadnione ciemnym i zamkniętym pomieszczeniem magazynowym.

Zawartość kwasu muraminowego w 1 mg suchej masy bakterii wynosiła odpowiednio: *E.coli*, 6,3 μg (78,75 μg PG/mg); *Ps.aeruginosa*, 1,4 μg (17,50 μg PG/mg) oraz *P.mirabilis*, 9,5 μg (118,75 μg PG/mg).

W wykonanej przez nas pracy kwas muraminowy oznaczano w komórkach takich bakterii jak *E.coli*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*. Wybór takiego materiału badawczego nie był przypadkowy.

E.coli jest pewnego rodzaju standardem, naturalną florą naszego organizmu, ale z drugiej strony są szczepy chorobotwórcze wywołujące np. biegunki u dzieci. Drobnoustrój ten występuje powszechnie w naszym środowisku i jest wskaźnikiem jego skażenia (miano *coli*), pośrednio wskazując na występowanie innych bakterii.

P.mirabilis, z klinicznego punktu widzenia ważny w przypadku zakażenia dróg moczowych. Bardzo rozpowszechniony w szpitalach (zakażenia wewnątrzszpitalne), łatwo namnaża się. Często przyczyną zakażeń może być np. cewnikowanie, stąd ważna jest kontrola bakteriologiczna używanego sprzętu medycznego, płynów itd.

P.aeruginosa może powodować powikłania np. w leczeniu ran pooperacyjnych.

PODSUMOWANIE

Wiele symptomów chorobowych (np. alergie, astma i inne) może być wywołanych wdychaniem mikroorganizmów obecnych w środowisku. Symptomy te związane są z określonymi bakteriami zawierającymi struktury chemiczne warunkujące ich aktywność biologiczną. Są one często bardzo skomplikowane, unikalne, nie

występujące nigdzie indziej w naturze, złożone z połączonych ze sobą monomerycznych składników zwanych markerami chemicznymi.

Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC/MS) pozwala na wykrywanie i identyfikację tych markerów, co często umożliwia określenie składu mikrobiologicznego analizowanej próbki.

Kwas muraminowy, można oznaczyć ilościowo jako pochodną TMS stosując jako wzorzec wewnętrzny ester metylowy kwasu 3-OH 13:0, dodawany do próbki po hydrolizie i ekstrakcji ale przed silylacją. Jonem monitorowanym tego wzorca jest jon o $m/z = 301$. Jonem o największej abundancji pochodnej TMS kwasu muraminowego jest jon $m/z = 185$, który był użyty do obliczeń zawartości kwasu muraminowego w badanych próbkach środowiskowych i biologicznych (kurz, systemy klimatyzacyjne, itp.).

Można przypuszczać, że obserwowane na chromatogramie dwa piki pochodnej TMS kwasu muraminowego są prawdopodobnie spowodowane występowaniem dwóch anomerów związanych z centrum asymetrii na węglu C_1 .

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Fox, G.E. Black, [w:] *Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms*, Fenselau C. (Ed.), American Chemical Society, Washington, DC, 1994, Chapter 8, 107.
- [2] A. Fox, L. Wright, K. Fox, *J. Microbiol. Methods*, 1995, **22**, 11.
- [3] X. Zhang, W. Amelung, *Soil Biol. Biochem.*, 1996, **28**(9), 1201.
- [4] I. Elmroth, A. Fox, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 1993, **628**, 93.
- [5] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 1995, **670**, 167.
- [6] K. Bal, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 2000, **738**, 57.
- [7] A. Saraf, L. Larsson, *J. Mass Spectrom.*, 1996, **31**, 389.
- [8] *Basic Microbiology*, 7th edition. Harper Collins Publisher, 1992 Chapter 3, Bacterial Morphology str. 48.
- [9] Z. Markiewicz, *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 1993, str. 45.
- [10] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, R.E. Buchanan, N.E. Gobbons. (Eds), 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [11] R. Dziarski, *The 70 kDa peptidoglycan/lipopolisaccharide receptor*, [w:] *Bacterial endotoxin: recognition and effector mechanisms*, Levin J. (Ed.), Experta Medica, 1993 (Proceedings of the 2nd Congress of the International Endotoxin Society), Vienna, 17–20 August 1992.
- [12] I. Elmroth, *Use of chromatography and mass spectrometry for detection of bacterial contamination in biotechnological processes*. Praca doktorska, 1993, Uniwersytet w Lund, Szwecja.
- [13] D.G. Pritchard, R.L., Settime, J.C. Bennett, *Arthritis and Rheumatism*, 1980, **23**, no 5, 608.
- [14] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheumatism*, 1989, **32**, 1268.
- [15] R.H. Findlay, D.J.W. Moriarty, D.C. White, *Geomicrobiol. J.*, 1983, **3**, 135.
- [16] A. Fox, R.M.T. Rosario, L. Larsson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, No. 12, 4354.
- [17] Z. Mielniczuk, Z. Pogorzelska, *Packag. Technol. Sci.*, 2002, **15**, 47.
- [18] A. Fox, J. Schwab, T. Cochran, *Infect. Immun.*, 1980, **526**, 29.
- [19] J. Gilbert, A. Fox, R.S. Whiton, S.L. Morgan, *J. Microbiol. Methods*, 1986, **5**, 271.
- [20] J. Gilbert, A. Fox, *Infect. Immun.* 1987, **55**, 1526.

- [21] A. Fox, S.L. Morgan, *The chemotaxonomic characterization of microorganisms by capillary gas chromatography and mass spectrometry*, [w:] *Instrumental methods for rapid microbiological analysis*, Nelson W.H. (Ed.), Verlag Chemi. Deerfield beach, Florida, 1985, str. 135.
- [22] A. Sonesson, L. Larsson, A. Fox, G. Westerdahl, G. Odham, J. Chromatogr. Biomed. Applic. 1988, **431**, 1.
- [23] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson., Appl. Environm. Microbiol., 1986, **52**, 510.
- [24] D.B. Druecker, *Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography*, Cambridge University Press, Cambridge, 1981.
- [25] E. Jantzen, *Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis*, [w:] *Gas chromatography mass spectrometry. Application in microbiology*, Odham G., Larsson L., Mardh P.A. (Eds.), Plenum Press, New York, 1984.
- [26] E. Jantzen, K. Bryn, *Whole cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in bacterial systematics*, Goodfellow M., Minnikin D.E. (Eds.), The Society for Applied Bacteriology, Technical Series, No. 20, Academic Press, London, 1985.
- [27] E. Jantzen, K. Bryn, *Analysis of cellular constituents from Gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in prokaryotic systematic*, Goodfellow M., O'Donnell A.G., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
- [28] J. Gilbert, A. Fox, Insect. Immun., 1987, **55**, 1526.
- [29] L. Larsson, G. Odham, G. Westerdahl, B. Olsson, J. Clin. Microbiol., 1987, **25**, 893.
- [30] D.C. White, *Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments*, [w:] *Microbes in their natural environments*, Slater J.H., Whittenbury R., Wimpenny J.W.T. (Eds.), Thirty four symposium of the society for general microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, 1983.
- [31] L. Larsson, E. Holst, Acta Path. Immunol. Scand. Sect. B., 1982, **90**, 125.
- [32] M.F. De La Cochetier-Collinet, L. Larsson, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 1984, **305**, 178.
- [33] J.K. McLaughlin, C.L. Meyer, E.T. Papoutsakis, Biotechnol. Bioeng., 1985, **27**, 1246.
- [34] J. Jiminez, L. Larsson, J. Clin. Microbiol., 1986, **24**, 844.
- [35] E. Jantzen, T. Tangen, J. Eng, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 1989, **97**, 1037.
- [36] M. Daffe, M.A. Laneelle, C. Asselineau, V. Levy-Frebault, H. David, Ann. Microbiol. B., 1983, **134**, 241.
- [37] S. Alugupalli, Z. Mielniczuk, L. Larsson, J. Microbiol. Meth., 1992, **15**, 229.
- [38] U.R. Baht, R.W. Carlson, M. Busch, H. Mayer, Inter. J. System. Bacteriology, 1991, **41**, 213.
- [39] J.F. Cooper, J. Levin, H.N. Jr. Wagner, J. Lab. Clin. Med., 1971, **78**, 138.
- [40] P. Friberger, M. Knos, L. Mellstam, *A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate*, [w:] *Endotoxins and their detection with the Limulus ameocyte lysate test*, Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J. (Eds.), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 93, Alan R. Liss, New York, 1982.
- [41] G.H. Zhang, L. Beak, C. Koch, J. Clin. Microbiol., 1988, **26**, 1464.
- [42] L. Larsson, Acta Pathologica Micobiol. Immun. Scand. (APMIS), 1994, **102**, 161.
- [43] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Fox A., Morgan S.L., Larsson L., Odham G., (Eds), Plenum Press, New York, 1990.
- [44] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, J. Microbiol. Meth., 1989, **9**, 57.
- [45] S. Alugupalli, L. Larsson, M. Slosarek, M. Jaresova, Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**, 3538.
- [46] L. Larsson, P.A. Mardh, G. Odham, G. Westerdahl, Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 1981, **89**, 245.
- [47] L. Larsson, G. Odham, G. Westerdahl, B. Olsson, J. Cin. Microbiol., 1987, **25**, 893.
- [48] J. Roboz, R. Suzuki, J.F. Holland, J. Clin. Microbiol., 1980, **12**, 594.

- [49] H. Muranishi, M. Nakashima, R. Isobe, T. Ando, N. Shigematsu, *Diagnost. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, **13**, 235.
- [50] J. Roboz, O. Yu, J.F. Holland, *J. Microbiol. Methods*, 1992, **15**, 207.
- [51] B. Savić, U. Sjöbring, S. Alugupalli, L. Larsson, H. Míórner, *J. Infect. Dis.*, 1992, **166**, 1177.
- [52] D.C. White, *Hydrobiol. Beih. Efgbn. Limnol.*, 1988, **31**, 1.
- [53] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [54] A. Tunlid, D.C. White, *Use of lipid biomarkers in environmental samples*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Fox A., Morgan S., L., Larsson L., Odham G., (Eds), Plenum Press, New York, 1990, str. 259.
- [55] P.D. Nichols, J.M. Henson, C.P. Antworth, J. Parsons, J.T. Wilson, D.C. White *Environ. Toxicol. Chem.*, 1987, **6**, 89.
- [56] G. Odham, A. Tunlid, G. Westerdahl, P. Marden, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 905.
- [57] R.H. Findlay, D.J.W. Moriarty, D.C. White, *Geomicrobiol. J.*, 1983, **3**, 135.
- [58] *Gas chromatography-mass spectrometry. Application in microbiology*, G. Odham, L. Larsson, P.A. Mardh (Eds.), Plenum Press, 1984.
- [59] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, *J. Microbiol. Meth.*, 1989, **9**, 57.
- [60] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 1268.
- [61] L. Zelles, *Biol. Fert. Soils*, 1988, **6**, 125.
- [62] G. Odham, A. Tunlid, G. Westerdahl, L. Larsson, J.B. Guckert, D.C. White, *J. Microbiol. Methods*, 1985, **3**, 331.
- [63] I. Elmroth, A. Fox, L. Larsson, *J. Chrom.*, 1993, **628**, 93.
- [64] A. Fox, R.M.T. Rosario, L. Larsson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 4354.
- [65] M. Cole, C.G. Enke, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1032.
- [66] J. Allison, R.M. Stepnowski, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 1072A.
- [67] K. Bal, Z. Mielniczuk, *Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas w pułapce jonowej do analizy chemicznych markerów bakterii*” I Ogólnopolska Szkoła Spektrometrii Mas, Szczyrk, 6–9 maja 2001.
- [68] P.M. Caroll, *Nature*, 1963, **197**, 694.
- [69] D.L. Popham, J. Helin, C.E. Costello, P. Stelow, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, **93**, (26), 15406.
- [70] A.D. Warth, J.L. Strominger, *J. Biochemistry*, 1972, **11** (8), 1389.
- [71] K. Bal, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 listopada 2011

METODY SYNTEZY 2,2'-BIPIROLIDYNY

METHODS FOR THE SYNTHESIS OF 2,2'-BIPYRROLIDINE

Katarzyna Eichstaedt

*Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Organicznej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
e-mail: kateichs@student.pg.gda.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Metody otrzymywania optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny
 - 1.1. Synteza 2,2'-bipirolidyny z (S)-(+)-2-pirolidynometanolu
 - 1.2. Synteza optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny z pirolu i 2-pirolidonu
 - 1.3. Synteza (S,S)-2,2'-bipirolidyny z kwasu D-winowego bądź D-mannitolu
 - 1.4. Otrzymywanie (R,R)-2,2'-bipirolidyny z (S)-N-1-fenyletyloaminy
 - 1.5. Otrzymywanie optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny na drodze fotodimeryzacji pirolidyny
 - 1.6. Synteza optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny w postaci pochodnej *t*-butoksykarbonylowej na drodze metatezy
 - 1.7. Synteza optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny w postaci pochodnej *N,N'*-bis- α -pikolinowej z wykorzystaniem bromku 3-[(1-etoksy)etoksy]propylomagnezowego

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

inż. Katarzyna Eichstaedt, studentka Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Technologia Organiczna. W 2011 roku ukończyła studia I-szego stopnia z wyróżnieniem na kierunku Chemia uzyskując tytuł inżyniera. Uzyskała stypendium Grupy LOTOS S.A. na rok akademicki 2011/2012. Dyplom magisterski realizuje w Katedrze Chemii Organicznej, w zespole prof. dr hab. inż. T. Połońskiego.

ABSTRACT

Vicinal diamine derivatives form an interesting and significant class of organic compounds. They play an essential role as chelating agents and also as ligands for asymmetric synthesis. They are used in synthesis of biologically active substances and in supramolecular chemistry [1–11]. There has been published a great number of reviews concerning the application and synthesis of 1,2-diamines with special emphasis on their organic potential [1–11]. Without any doubt, chiral 2,2'-bipyrrolidine derivatives are representative family of these compounds. They have gained particular attention since they are widely used. A remarkably broad spectrum of synthetic exploration has been reported for these agents [4, 12–14].

This paper provides description of methods for the synthesis of chiral 2,2'-bipyrrolidine. There are only seven different approaches to obtain (*R,R*) or (*S,S*)-2,2'-bipyrrolidine, five from which take advantage of stereoselective synthesis steps [15–21]. Nevertheless, a method for the synthesis of amine-1, which connects low reagents price with low time-consuming and high yield have not been described yet. Thus, creation of a new strategy for an efficient synthesis of chiral 2,2'-bipyrrolidine is still a challenging topic of studies.

Keywords: 2,2'-bipyrrolidine, vicinal diamines, asymmetric synthesis, C_2 -symmetry

Słowa kluczowe: 2,2'-bipirolidyna, aminy wicynalne, synteza asymetryczna, symetria C_2

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

9-BBN	- 9-bora[3.3.1]bicyklononan
Ac	- grupa acetylowa
Bn	- grupa benzoilowa
Boc	- grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Bz	- grupa benzylowa
DEAD	- azodikarboksylan dietylu
DMDO	- dimetylodioksiran
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMPU	- 1,3-dimetylotetrahydropirydyn-2(1 <i>H</i>)-on
DMSO	- dimetylosulfotlenek
eqv	- równoważnik (ang. <i>equivalent</i>)
Et	- grupa etylowa
<i>i</i> -Pr	- grupa <i>izo</i> -propylowa
Me	- grupa metylowa
Ms	- grupa metanosulfonowa
OEE	- grupa 3-(1-etoksy)etoksylova
Ph	- grupa fenylova
PMB	- grupa <i>para</i> -metokstybenzylova
PPTS	- <i>p</i> -toluenosulfonian pirydyny
<i>t</i> -Bu	- grupa <i>tert</i> -butylowa
Tf	- grupa trifluorometanosulfonowa
TFA	- kwas trifluorooctowy
THF	- tetrahydrofuran
Tr	- grupa trifenylova
Ts	- grupa <i>p</i> -toluenosulfonowa

WPROWADZENIE

Diaminy wicynalne należą do obszernej grupy związków posiadających dwie grupy aminowe przyłączone do sąsiednich atomów węgla. Są to substancje bardzo zróżnicowane pod względem budowy jak i właściwości chemicznych. Można wśród nich znaleźć związki o nieskomplikowanym szkielecie tj. kwas 2,3-diaminopropionowy, jak i substancje o bardziej złożonej budowie przestrzennej np. biotyłę, antybiotyki takie jak edeina, β -(metyloamino)-*L*-alaninę i wiele innych [1]. Ugrupowanie 1,2-diaminowe obecne jest w wielu związkach wykazujących aktywność biologiczną. W medycynie aminy wicynalne, w postaci kompleksów z platyną takie jak cisplatyna, czy *cis*-bis-neodekanian-*trans*- R,R' -1,2-diaminocykloheksan platyny(II) stosowane są jako leki przeciwnowotworowe. *Cis*-*N*-(1-benzyl-2-metylopirolidyn-3-yl)-5-chloro-2-metoksy-4-metyloamino)benzamid i inne diaminy wykazują działanie antydepresyjne, antypsychotyczne i przeciwbólowe. A najnowsze badania dowodzą, że niektóre z 1,2-diamin łągodzą objawy arytmii serca i paraliżu [2, 3].

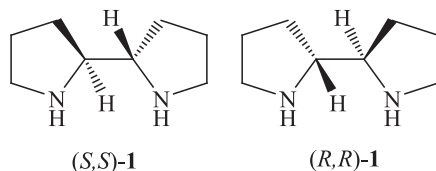
W syntezie organicznej 1,2-diaminy, głównie pochodne 1,2-diaminocykloheksanu, stanowią substraty w reakcjach prowadzących do otrzymywania związków heterocyklicznych i kryptandów [2, 3]. Optycznie czynne diaminy wicynalne wykorzystywane są również w syntezie asymetrycznej, jako katalizatory bądź ligandy. Na przykład Kobayashi pokazał, że dodatek odpowiedniej disulfonamidowej pochodnej diaminy powoduje podniesienie wydajności i enancjoselektywności reakcji tworzenia trójczłonowych układów cyklicznych Simmons-Smith'a z alkoholi alilowych [3]. Z kolei Corey wraz ze współpracownikami wykazał, że pochodna diaminoglinu jest efektywnym katalizatorem reakcji cykloaddycji Dielsa-Aldera [3]. Optycznie czynne 1,2-diaminy stosowane są również do rozdzielania mieszanin racemicznych i tak np.: (*R,R*)-1,2-diaminocykloheksanu używa się do rozdzielania binaftoli [2]. Z innej strony diaminy wicynalne, posiadające ugrupowania chromoforowe np. w postaci grup trinitrofenylowych wykorzystywane są w badaniach stereochemicznych i stereogenicznych [4].

Obecnie znanych jest wiele metod pozyskiwania amin wicynalnych, wśród których warto wymienić:

- syntezę oparte na bezpośrednim przyłączeniu dwóch atomów azotu do alkenu [5],
- syntezę wykorzystujące jako substraty – dieny [6], 1,2-diole [7], α -aminoketony i aldehydy [8], związki karbonyłowe [10] lub β -aminoalkohole [11],
- aminację elektrofilową [9].

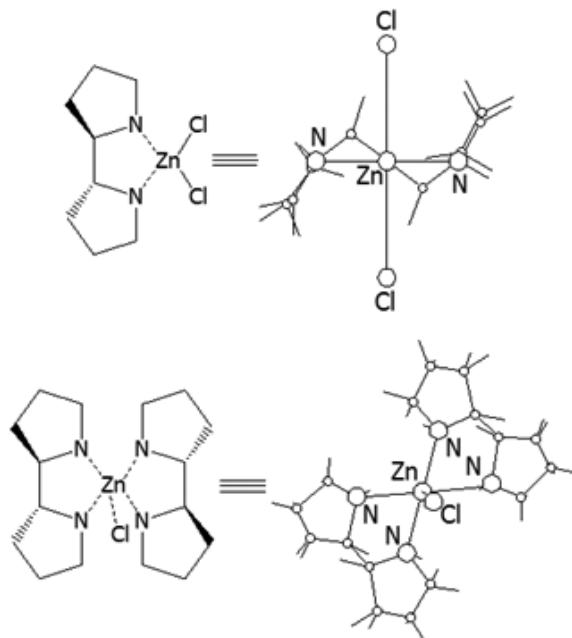
Przykładem diaminy wicynalnej jest 2,2'-bipiroolidyna – **1** (Rys. 1). Jest ona bezbarwną, oleistą cieczą o nieprzyjemnym zapachu. Działa drażniąco na skórę i oczy, może powodować zaburzenia w prawidłowym oddychaniu. Jest czuła na warunki atmosferyczne – wykazuje wrażliwość na tlen, jest higroskopijna i absorbuje CO₂ z powietrza. Ze względu na niestabilność trudno jest określić jej parametry fizykochemiczne. Literaturowa wartość skręcalności właściwej wynosi odpowiednio

– dla izomeru (*R,R*) $[\alpha]^{24}_D - 14,91$ (*c* 1,03; MeOH); dla (*S,S*) $[\alpha]^{24}_D + 14,82$ (*c* 1,01, MeOH) [16].



Rysunek 1. (*S,S*) i (*R,R*)-bipirolidyna – 1
Figure 1. (*S,S*) and (*R,R*)-bipyrrolidine – 1

Chiralna 2,2'-bipirolidyna jest diamina z dwoma centrami asymetrii i jednym elementem symetrii – osią dwukrotną – C_2 . Oznacza to, iż obrót o 180° wokół tej osi sprowadza obiekt do położenia wyjściowego – cząsteczka nakłada się na siebie [22]. Cykliczne, pięciocłonowe diaminy wycynalne podczas reakcji układają się w ten sposób, że podstawnik na jednym atomie azotu leży w pozycji *trans* w stosunku do podstawnika na drugim atomie azotu. Przy takim ułożeniu każdy atom azotu staje się centrum o zdolności chelacyjnej, czego ilustrację stanowi struktura rentgenograficzna kompleksu jednego z enancjomerów 2,2'-bipirolidyny z $ZnCl_2$ (Ryc. 2).



Rysunek 2. Struktura rentgenograficzna kompleksów 2,2'-bipirolidyny z $ZnCl_2$ [15]
Figure 2. X-ray structures of the complexes formed between 2,2'-bipyrrolidine and $ZnCl_2$ [15]

Otrzymuje się go działając na czysty enancjomer diaminy **1** chlorkiem cynku w eterze dietylowym, przy czym należy pamiętać, że możliwe jest otrzymanie kompleksu w formie monomerycznej (diamina : cynk = 1 : 1) lub dimerycznej (diamina : cynk = 2 : 1), istniejącej dzięki silnej zasadowości jednostki pirolidynowej, mogącej zastąpić atom chloru atomem azotu z pierścienia. Obie formy krystaliczne przybierają charakterystyczną strukturę schodkową (Rys. 2), z tą różnicą, że forma monomeryczna posiada idealną symetrię C_2 , dzięki występowaniu czterokoordynacyjnego cynku, a dimeryczna przyjmuje geometrię bipiramidy trygonalnej z atomami azotu w pozycji aksjalnej i atomami chloru i azotu w pozycji ekwatorialnej [15].

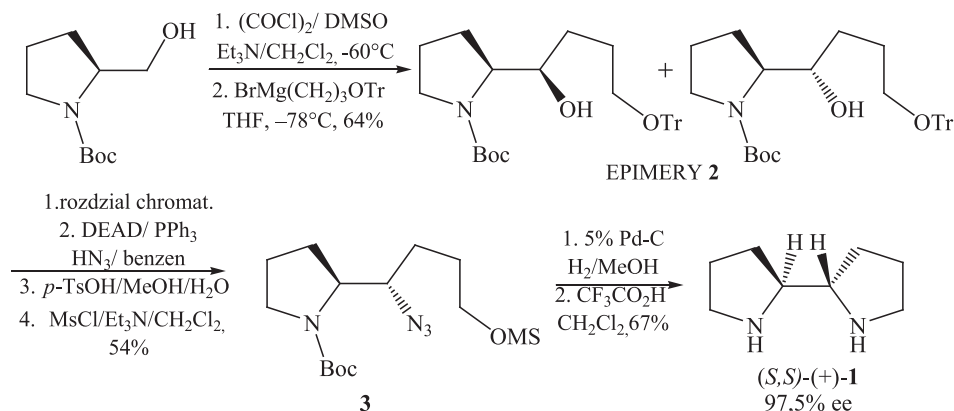
Taka geometria powoduje, że związek ten i jego *N*-podstawione pochodne są niezwykle interesujące i szeroko wykorzystywane w syntezie chemicznej, przede wszystkim jako chiralne ligandy [12, 13].

Obecnie znanych jest 7 różnych strategii otrzymywania chiralnej 2,2'-bipirolidyny. Dwie procedury prowadzą do powstania mieszaniny racemicznej, pozostałe pięć przeprowadza się na drodze syntezy asymetrycznej. Każda z opisanych niżej metod ma swoje zalety, ale żadna nie łączy pożądanej wydajności z niską ceną i/lub czasochłonnością. Z tego powodu obserwuje się poszukiwanie nowych ścieżek syntezy optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny i jej pochodnych. Jednocześnie ciągle odkrywane są nowe możliwości jej wykorzystania [14].

1. METODY OTRZYMYWANIA OPTYCZNIE CZYNNEJ 2,2'-BIPIROLIDYNY

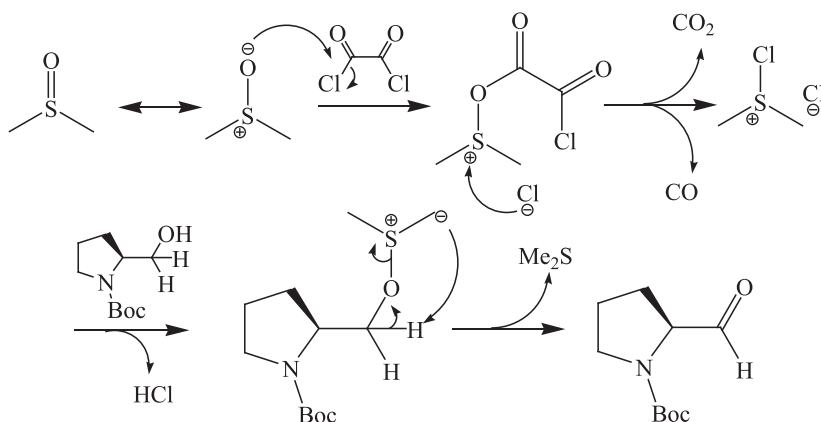
1.1. SYNTEZA 2,2'-BIPIROLIDYNY Z (S)-(+)-2-PIROLIDYNOMETANOLU

Po raz pierwszy optycznie czynną 2,2'-bipirolidynę **1** otrzymano z (S)-(+)-2-pirolidynometanolu na drodze kilkuetapowej procedury przedstawionej na Schemacie 1 [17].



Schemat 1
 Scheme 1

Pierwszy etap opisywanej syntezy to utlenienie *N-t*-butoksykarbonylo-(*S*)-2-pirolidynometanolu do odpowiedniego aldehydu, przebiegające w warunkach reakcji utleniania Swerna [23, 24]. Polega ona na utlenieniu pierwszo- bądź drugorzędowego alkoholu do związku karbonylowego za pomocą chlorku oksalilu, dimetylosylfotlenku oraz zasady organicznej. W początkowym stadium reakcji Swerna reagują ze sobą chlorek oksalilu i DMSO dając chlorek alkoksylsulfoniowy, który następnie atakuje utleniany alkohol. W ten sposób powstaje jon alkoksylsulfoniowy, który zostaje zaatakowany przez zasadę tworząc odpowiedni ylid siarkowy. Ten z kolei w niskiej temperaturze (rzędu -78°C) rozpada się do odpowiedniego związku karbonylowego (Schemat 2).



Schemat 2
Scheme 2

Jako produkty uboczne reakcji powstają siarczek dimetylu, tlenek i dwutlenek węgla oraz chlorek trietyloamoniowy (w przypadku użycia trietyloaminy jako zasady organicznej).

W celu otrzymania pochodnej **2** (Schemat 1) do otrzymanej *N-t*-butoksykarbonylo-2-karbonylopirolidyny dodaje się związek magnezoorganiczny z chronioną grupą hydroksylową w THF. Reakcję prowadzi się w temperaturze -78°C , a otrzymane epimery **2** rozdziela się na drodze chromatografii kolumnowej.

Kolejny etap syntezy obejmuje reakcję Mitsunobu jednego z epimerów **2** z kwasem azotowodorowym wobec trifenylfosfiny i azodikarboksylanu dietylu (DEAD) (Schemat 1) [26, 27] i prowadzi do otrzymania odpowiedniego aminoazydki. Autorzy [17] opisywanej procedury celowo unikali otrzymania azydki **3** bezpośrednio z azydki sodu, co wiązało się z wykorzystaniem wody jako rozpuszczalnika, której pozostałości uniemożliwiłyby wydajne przeprowadzenie kolejnych etapów syntezy.

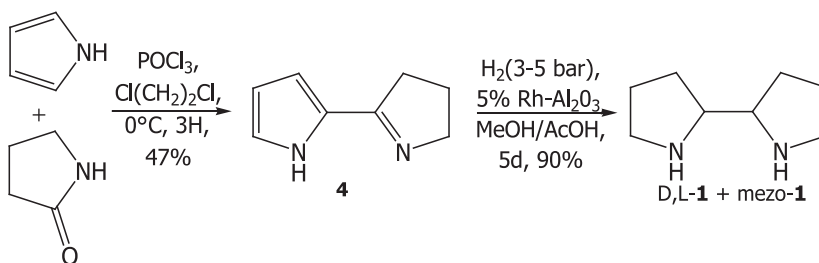
Następny krok procedury, przedstawionej na Schemacie 1 to otrzymywanie estru kwasu metanosulfonowego z produktu reakcji Mitsunobu. Związek ten uzyskuje się usuwając grupę tritylową za pomocą kwasu *p*-toluenosulfonowego, a następnie przeprowadzając estryfikację powstałego alkoholu za pomocą chlorku

mesyłu. Produkt finalny – (*S,S*)-(+)-bipirolidynę **1** otrzymuje się po redukcji związku **3** i następującym po niej usunięciu grup *t*-butoksykarbonylowych z atomów azotu (Schemat 1).

Pomimo niewielu etapów synteza jest mało wydajna – sumaryczna wydajność procesu wynosi 23%. Dodatkowo chcąc otrzymać enancjomer (*R,R'*)-(-)-**1** używa się bardzo drogiego (*R*)-(-)-2-pirolidynometanolu [17].

1.2. SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNEJ 2,2'-BIPIROLIDYNY Z PIROLU I 2-PIROLIDONU

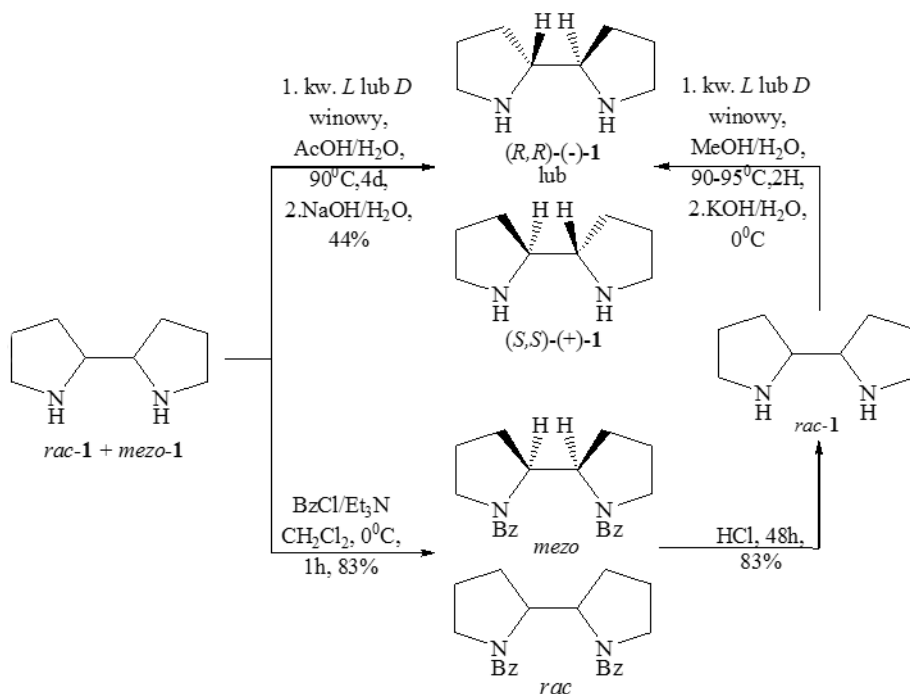
Kolejna metoda syntezy 2,2'-bipirolidyny opisana została przez Hiramę [17] i współpracowników w 1991 roku. Składa się ona z dwóch etapów (Schemat 3) i rozdziału otrzymanych izomerów na czyste enancjomery (Schemat 4). Pierwszy z nich polega na uzyskaniu 2-(1-pirolin-2-yl)pirolu w reakcji pirolu z γ -butyrolaktamem w obecności tlenochlorku fosforu. Notabene, syntezę tę Hirama opublikował już wcześniej, podając, że żądany produkt **4** uzyskuje się z wydajnością sięgającą 97% [18]. Drugi etap to katalityczne uwodornienie otrzymanego 2-(1-pirolin-2-yl)pirolu do 2,2'-bipirolidyny przy użyciu rodu osadzonego na tlenku glinu [28].



Schemat 3
Scheme 3

W wyniku opisaney przez nich procedury otrzymuje się jednocześnie mieszaninę racemiczną i formę *meso* 2,2'-bipirolidyny z 90% wydajnością.

Autorom publikacji [17] udało się oddzielić związek *meso*-**1** od mieszaniny racemicznej za pomocą chromatografii kolumnowej, dzięki różnicom w czasie retencji *N,N'*-dibenzoilowych pochodnych 2,2'-bipirolidyny. Związki te syntezowano działając na *DL*-**1** i *meso*-**1** chlorkiem benzoilu w obecności trietyloaminy (Schemat 4).



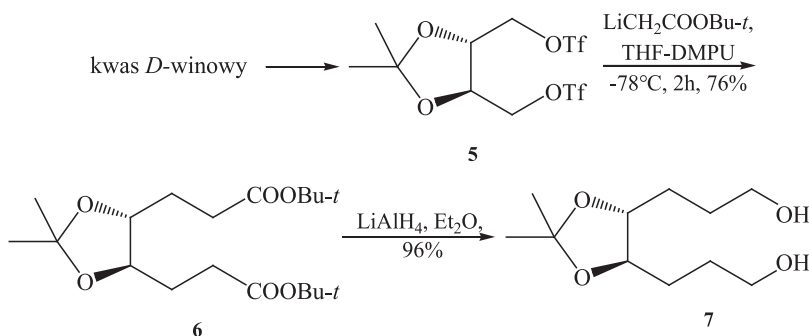
Schemat 4
Scheme 4

Po rozdziale chromatograficznym uzyskane benzoilowe enancjomery 2,2'-bipiperolidyny poddaje się hydrolizie kwasowej otrzymując *rac*-aminę **1** z 83% wydajnością. Optycznie czynne (*R,R'*)-(-)-**1** i (*S,S'*)-(+)-**1** otrzymuje się poprzez rozdzielanie *rac*-**1** za pomocą soli diastereomerycznych z użyciem kwasu winowego. Dodanie *L*-(+)-kwasu winowego do 75% metanolowego roztworu *rac*-**1** powoduje powstanie krystalicznej soli (*R,R'*)-(-)-**1** i *L*-(+)-kwasu winowego, natomiast dodatek *D*-(-)-kwasu winowego do przesączu prowadzi do utworzenia drugiej krystalicznej soli (*S,S'*)-(+)-**1** i *D*-(-)-kwasu winowego. W obu przypadkach chiralną diamienę powolnieniu z kwasu winowego izolowano z 33% wydajnością. W trakcie prowadzonych badań okazało się, że alternatywną metodą pozyskania enancjomerycznych (*R,R'*)-(-)-**1** i (*S,S'*)-(+)-**1** jest bezpośrednie potraktowanie równomolowych ilości izomerów *DL*-**1** i *meso*-**1** kwasem winowym (0,5 equiv) w lodowatym kwasie octowym (1,0 equiv) (Schemat 4). W tym przypadku sól aminy (*R,R'*)-(-)-**1** i *D*-(-) kwasu winowego otrzymano ze znacznie lepszą wydajnością, gdyż po dwukrotnej krystalizacji sięgała ona 44% [27].

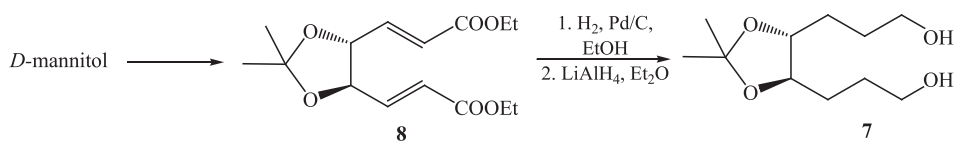
1.3. SYNTEZA (S,S)-2,2'-BIPIROOLIDYNY Z KWASU *D*-WINOWEGO BĄDŹ *D*-MANNITOLU

Odmianą metodę otrzymywania 2,2'-bipiroolidyny zaproponował Kotsuki i współpracownicy w 1995 roku. Jej innowacyjność w porównaniu do wcześniej opisanych procedur polega na wykorzystaniu optycznie czynnych substratów i przeprowadzeniu serii reakcji, w których na żadnym etapie syntezy nie powstają mieszaniny racemiczne, wymagające rozdziału [19].

Wyjściowym reagentem w syntezie 2,2'-bipiroolidyny, zaproponowanej przez Kotsuki'ego, jest związek **7**, który otrzymuje się z *D*-(-)-kwasu winowego lub *D*-(-)-mannitolu (Schemat 5 i 6).

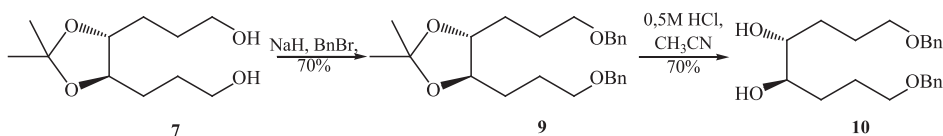


Do uzyskania związku **7** autorzy publikacji wykorzystali handlowo dostępną pochodną kwasu winowego **5**. Substrat ten w reakcji z litowanym octanem *tert*-butyłu dodanym z 2,5 molowym nadmiarem przekształca się w di-*tert*-butylo(4*R*,5*R*)-4,5-(izopropyl)dioksy-1,8-oktanol **6**, a ten z kolei redukowany jest za pomocą glinowodoru litu dając związek **7** (Schemat 5). Diol **7** otrzymuje się również w wyniku podwójnej redukcji handlowo dostępną pochodną mannitolu **8**. Pierwsza z nich obejmuje katalityczne uwodornienie wiązań nienasyconych, obecnych w związku **8**, a druga to redukcja ugrupowań estrowych za pomocą glinowodoru litu (Schemat 6).

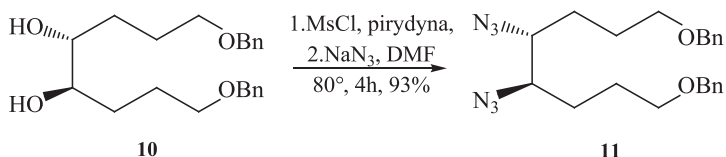


Po otrzymaniu pochodnej **7** przeprowadza się kolejno siedem reakcji, których kluczowe etapy polegają na wprowadzeniu atomów azotu w miejsce wycinalnych grup hydroksylowych i cyklizację związku do dwupięścieniowej diaminy – 2,2'-bipiroolidyny.

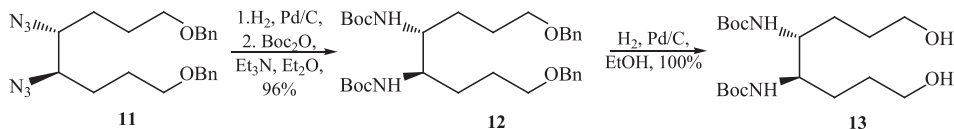
Pierwszą z nich jest reakcja diolu **7** z bromkiem benzylu w obecności wodoroku sodu, prowadząca do uzyskania eteru **9** (Schemat 7). Następna to zdjęcie acetalowej ochrony z reszt wodorotlenowych otrzymanego eteru **9** pod wpływem 0,5 M wodnego roztworu kwasu solnego (Schemat 7). Sumaryczna wydajność reakcji prowadzących do uzyskania diolu **10** wynosi 49%.



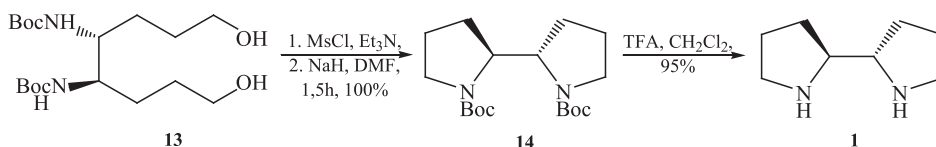
Dalszy etap jest kluczowy dla całej opisywanej syntezy. Obejmuje on wprowadzenie atomów azotu do cząsteczki związku **10** w reakcji substytucji nukleofilowej przebiegającej w podwyższonej temperaturze i prowadzącej do otrzymania wycinalnego diazydku **11** [29].



Następnie przeprowadza się ciąg reakcji, umożliwiających realizację finalnej cyklizacji, które obejmują kolejno redukcję związku **11** na katalizatorze palladowym, reakcję otrzymanej aminy wycinalnej z pirowęglańcem di-*t*-butoksykarbonylu, prowadzącą do otrzymania amidu **12** i redukcję otrzymanego związku **12** do (4*S*,5*S*)-4,5-di(*t*-butoksykarbonyloamino)-1,8-oktanodiolu **13** z wykorzystaniem katalizatora palladowego, zachodzącą ze 100% wydajnością (Schemat 9).



Zamknięcie pierścienia 2,2'-bipirolidyny realizowane jest poprzez przekształcenie związku **13** w jego pochodną estrową, która pod wpływem wodoroku sodu ulega cyklizacji dając związek **14** (Schemat 10). W ostatnim kroku usuwa się ochronne grupy *t*-butoksykarbonylowe z atomów azotu w związku **14** za pomocą kwasu trifluorooctowego, co prowadzi do otrzymania produktu finalnego (*S,S*)-2,2'-bipirolidyny **1**. Wydajności opisywanych reakcji wynoszą odpowiednio 100 i 95% (Schemat 10).



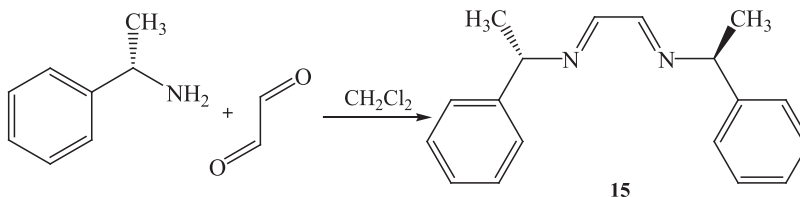
Schemat 10
Scheme 10

Optycznie czynną (*S,S*)-2,2'-bipirolidynę oczyszcza się z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Ze względu na niską stabilność produktu końcowego rozcieńczone frakcje zateża się na wyparce obrotowej z łaźnią lodową [19].

1.4. OTRZYMYWANIE (*R,R*)-2,2'-BIPIROLIDYNY Z (*S*)-1-FENYLOETYLOAMINY

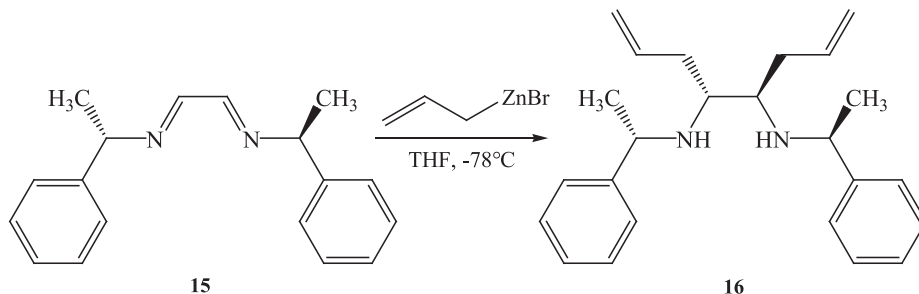
W 2000 roku prof. Alexakis wraz ze współpracownikami opublikował pracę dotyczącą enancjoselektywnej syntezy (*R,R*)-2,2'-bipirolidyny, przebiegającej w pięciu etapach [15]. Dwa pierwsze bazują na procedurze, którą jako pierwszy przedstawił Neumann [30], a później rozwinął Savoia [31] i współpracownicy z Uniwersytetu Bolońskiego.

Pierwszy krok opisywanej syntezy prowadzi do otrzymania chiralnego diazadienu **15** z (*S*)-1-fenyletyloaminy i 40% glioksalu (Schemat 11) [15]. *N,N'*-bis[(*S*)-1-fenyletylo]etanodiiminę **15** można również zsyntezować używając zamiast 40% glioksalu dihydratu trimeru glioksalu i siarczan sodu zamiast siarczanu magnezu, dzięki czemu osiąga się lepszą wydajność [31].



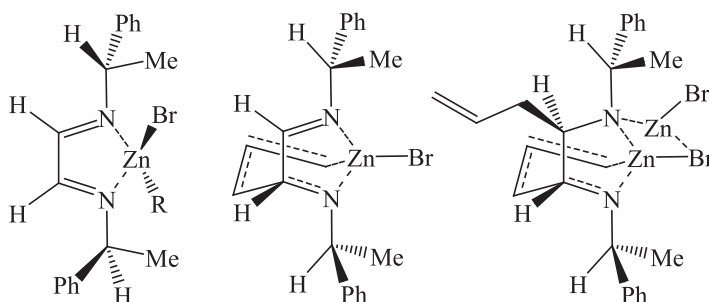
Schemat 11
Scheme 11

Następny etap to reakcja diastereoselektywnej addycji związku metaloorganicznego do diiminy **15** [31]. Do otrzymania *N,N*-bis[(*S*)-1-fenyletylo]-(*R,R*)-4,5-diamino-1,7-oktadienu **16** używa się powstający *in situ* bromek allilocynkowy, który uzyskuje się w reakcji zwyczajowo nazwanej reakcją Barbiera [33] (Schemat 12).



Schemat 12
Scheme 12

Stwierdzono, że związek **15** powstaje przez utworzenie sztywnego chelatu pomiędzy 1,4-heterodienem a atomem cynku (Rys. 3) [31].

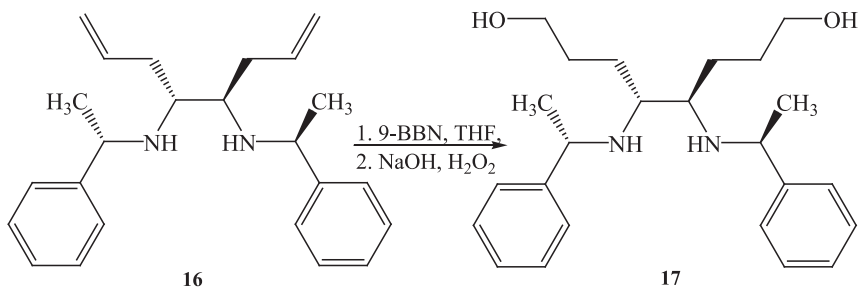


Rysunek 3. Produkty przejściowe prawdopodobnie powstające podczas reakcji diiminy **15** z bromkiem allilocynkowym [31]

Figure 3. Hypothetical transition structure for the reaction of diimine **15** with allylzinc bromide [31]

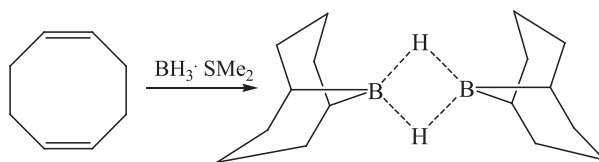
Opisany przebieg reakcji gwarantuje jej wysoką kontrolę steryczną. Natomiast wykorzystanie bardziej reaktywnego w porównaniu do bromku allilocynkowego, związku magnezoorganicznego prowadzi do otrzymania tego samego produktu z podobną diastereoselektywnością, jednak nakłada konieczność kontroli temperatury podczas reakcji na poziomie -78°C i dozowania reagentów małymi porcjami [31]. Wykazano również, że wydajność i diastereoselektywność tego typu reakcji zależy od czasu ich prowadzenia [34].

Kolejny etap syntezy (*R,R*)-2,2'-bipirolidyny opisanej przez Alexakis'a obejmuje borowodorowanie *N,N*-bis[(*S*)-1-fenyletylo]-1,2-etanodiiminy **16** za pomocą 9-borabicyklo[3.3.1]nonanu (9-BBN) i prowadzi do powstania *N,N*-bis[(*S*)-1-fenyletylo]-(*R,R*)-4,5-diamino-1,8-oktadiolu **17** (Schemat 13).



Schemat 13
Scheme 13

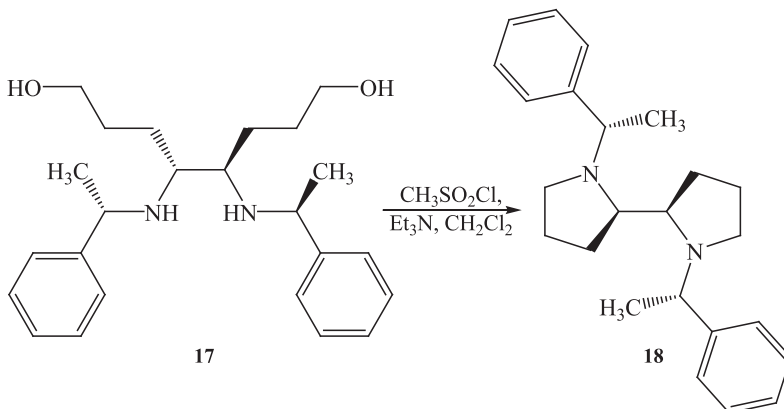
9-BBN wykorzystywany w syntezie otrzymuje się *in situ* z $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ i 1,5-cyklooktadienu w postaci dimeru (Schemat 14) [35, 36].



Schemat 14
Scheme 14

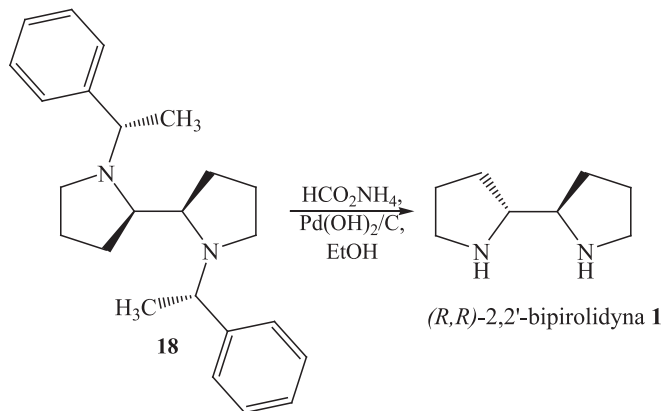
Przebieg tego etapu jest analogiczny do reakcji borowodorowania alkenów za pomocą diboranu $(\text{BH}_3)_2$, która obejmuje addycję borowodoru do wiązania podwójnego, a następnie jego hydrolizę za pomocą nadtlenku wodoru, przebiegającą w silnie zasadowym środowisku [37].

Przedostatni etap opisywanej sekwencji reakcji to cyklizacja diaminiodiolu 17 pod wpływem chorku mesyłu prowadząca do otrzymania *N,N'*-bis[(*S*)-1-fenyletylo]-(*R,R*)-2,2'-bipirolidyny 18 z 96% wydajnością (Schemat 15). Reakcja przebiega w ciągu 15 minut, a jej temperaturę utrzymuje się na poziomie 0°C.



Schemat 15
Scheme 15

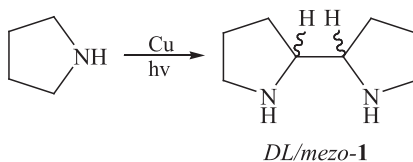
Ostatnim etapem syntezy jest hydrogenacja związku **18**. Przebiega ona z wykorzystaniem katalizatora Pearlmann'a, który jest efektywnym katalizatorem palladowym, selektywnie usuwającym grupy benzytowe i ich pochodne. Jako źródło wodoru w opisywanej reakcji wykorzystuje się mrówczan amonu (Schemat 16).



Uzyskany przez Alexakis'a i współpracowników surowy produkt **1** izolowany jest z mieszaniny reakcyjnej na drodze destylacji próżniowej. Wydajność otrzymywania związku finalnego w postaci bezbarwnej, oleistej cieczy wynosi 61% [15].

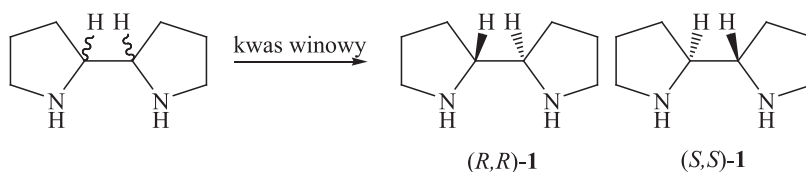
1.5. OTRZYMYWANIE OPTYCZNIE CZYNNEJ 2,2'-BIPIROLIDYNY NA DRODZE FOTODIMERYZACJI PIROLIDYNY

Pierwsza fotochemiczna synteza 2,2'-bipirolidyny opisana została w 2006 roku przez Danemark'a i współpracowników [16].



Reakcję dimeryzacji rodnikowej pirolidyny prowadzi się w fotoreaktorze. Po 7 dniach naświetlania wrzącej mieszaniny reakcyjnej światłem o długości fali 254 nm, emitowanym przez niskociśnieniową lampę rtęciową otrzymuje się mieszaninę *rac*-**1** i *mezo*-**1** (Schemat 17). Nieprzereagowaną pirolidynę oddziela się od produktu na drodze destylacji prostej, a rozdział *rac*-**1** i *mezo*-**1** przeprowadza się wykorzystując destylację próżniową. Wydajność otrzymywania mieszaniny *race*-

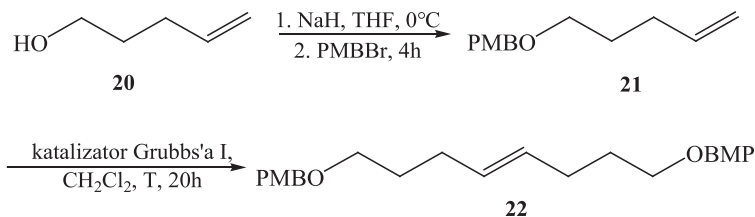
micznej 2,2'-bipiroolidyny wynosi 50%. *Rac*-2,2'-bipiroolidyna rozdzielana jest na czyste enancjomery za pomocą soli diastereomerycznych przy użyciu optycznie czynnego kwasu winowego (Schemat 18) [16], analogicznie jak opisano w punkcie 1.2.



Schemat 18
Scheme 18

1.6. SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNEJ 2,2'-BIPIROOLIDYNY W POSTACI POCHODNEJ *T*-BUTOKSYKARBONYLOWEJ NA DRODZE METATEZY

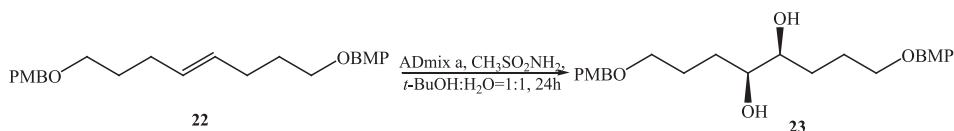
Opisana w 2009 roku przez Keller'a, Gresser'a i Wales'a metoda syntezy optycznie czynnej 2,2'-bipiroolidyny zakłada otrzymanie aminy **1** wykorzystując tanie i łatwo dostępne substraty [20]. Kluczowe etapy tej procedury opierają się na otrzymaniu symetrycznych alkenów w reakcji metatezy [38] oraz na ich asymetrycznym dihydroksylowaniu w reakcji Sharpless'a [39]. Zgodnie ze Schematem 19 pierwszy etap syntezy to reakcja 4-penten-1-olu **20** z bromkiem *p*-metoksybenzylu, prowadząca do otrzymania związku **21**, który z kolei poddany działaniu katalizatora Grubbs'a tworzy symetryczny alken – 1,8-di(*para*-metoksybenzyl)-4-okten **22** (Schemat 19).



Schemat 19
Scheme 19

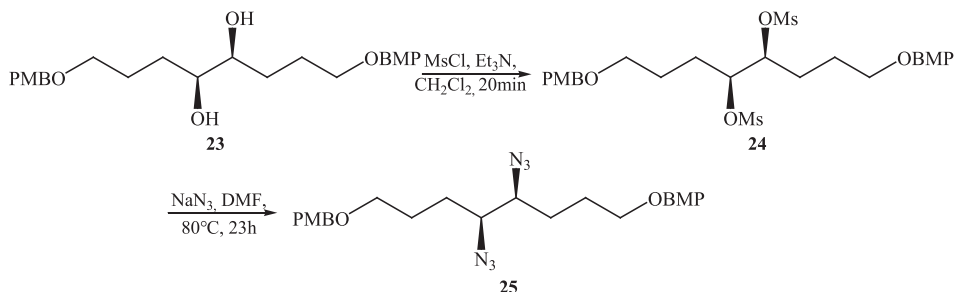
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów [20] okazało się, że obecność grupy *p*-metoksybenzylowej w związku **21** wpływa korzystnie na stereoselektywność i wydajność reakcji powstawania wiązania podwójnego w związku **22**. Jako produkt uboczny reakcji Grubbs'a powstaje styren (w ilościach nieprzekraczających 5% produktu głównego). Następny etap syntezy obejmuje strategię opracowaną przez Sharpless'a i dotyczy addycji grup wodorotlenowych do wiązania podwójnego za pomocą odczynnika hydroksylującego znanego pod nazwą handlową ADMIX. Odczynnik ten zawiera osmian potasu $K_2OsO_2(OH)_4$ (będący źródłem czterotlenku

osmu), żelazycyanek potasu (stanowiący wtórny utleniacz) oraz węglan potasu. Obecnie na rynku dostępne są dwie jego odmiany – ADmix α i β , różniące się składem chemicznym [40, 41]. W swojej syntezie autorzy wykorzystali obie, przy czym otrzymując (*R,R*)-2,2'-di(*t*-butoksykarbonylo)pirolidynę użyli ADmix α , a (*S,S*)-2,2'-di(*t*-butoksykarbonylo)-pirolidynę odmianę β (Schemat 20).



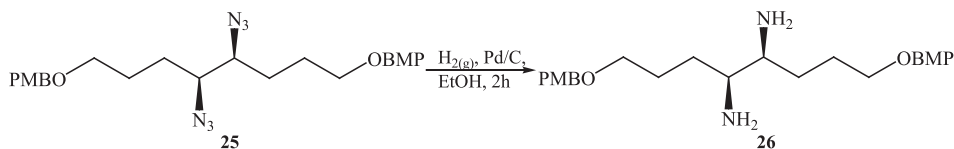
Schemat 20
Scheme 20

Atomy azotu niezbędne do utworzenia finalnego produktu wprowadza się do związku **23** w dwóch etapach (Schemat 21). W pierwszej kolejności związek **23** poddaje się działaniu chlorku kwasu metanosulfonowego otrzymując diester **24**, który z kolei przekształca się w związek **25** za pomocą azydku sodu w reakcji S_N2 .



Schemat 21
Scheme 21

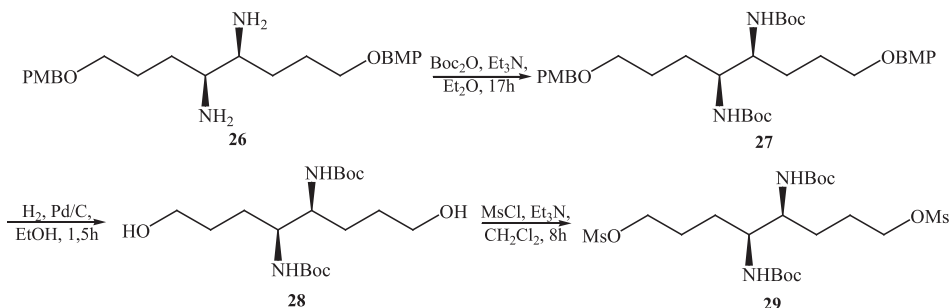
Redukcja pochodnej diazydowej **25** (Schemat 22) wodorem w obecności paladalu osadzonego na węglu prowadzi do otrzymania diaminy **26** i zachodzi bez usunięcia grup *para*-metoksybenzylowych.



Schemat 22
Scheme 22

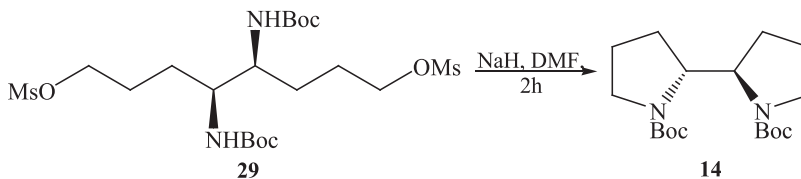
Dalsza ścieżka syntezy będzie przez związek **29** (Schemat 23) otrzymany w ciągu reakcji obejmujących: ochronę grup aminowych w pochodnej **26** za pomocą $(\text{Boc})_2\text{O}$ (pirowęglanu di-*tert*-butoksykarbonylu), usunięcie zabezpieczeń *para*-me-

toksybenzylowych na drodze katalitycznego uwodornienia oraz estryfikację otrzymanego diolu **28** za pomocą chlorku mesylu.



Schemat 23
Scheme 23

W omawianej metodzie produkt końcowy (*R,R*)-2,2'-bis(*t*-butoksykarbonylo)-2,2'-bipiroolidynę **14** uzyskuje się w wyniku reakcji cyklizacji związku **29** pod wpływem wodorku sodu (Schemat 24).



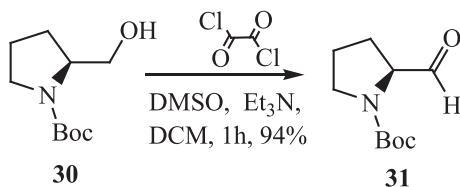
Schemat 24
Scheme 24

Drugi z izomerów 2,2'-bipiroolidy – (*S,S*)-2,2'-**14** można otrzymać w wyniku analogicznej syntezy, z tym, że w reakcji przekształcenia alkenu **22** w diol **23** (Schemat 20) należy zamiast ADmix α użyć jego odmianę β . Wykorzystując opisywaną procedurę [20] otrzymuje się (*R,R*)-2,2-bis(*t*-butoksykarbonylo)-2,2'-bipiroolidynę **14** z 62% wydajnością, podczas gdy (*S,S*)-2,2'-**14** z wydajnością sięgającą 76%.

1.7. SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNEJ 2,2'-BIPIROOLIDYNY W POSTACI POCHODNEJ *N,N'*-BIS-A-PIKOLINOWEJ Z WYKORZYSTANIEM BROMKU 3-[(1-ETOKSY)ETOKSY]PROPYLOMAGNEZOWEGO

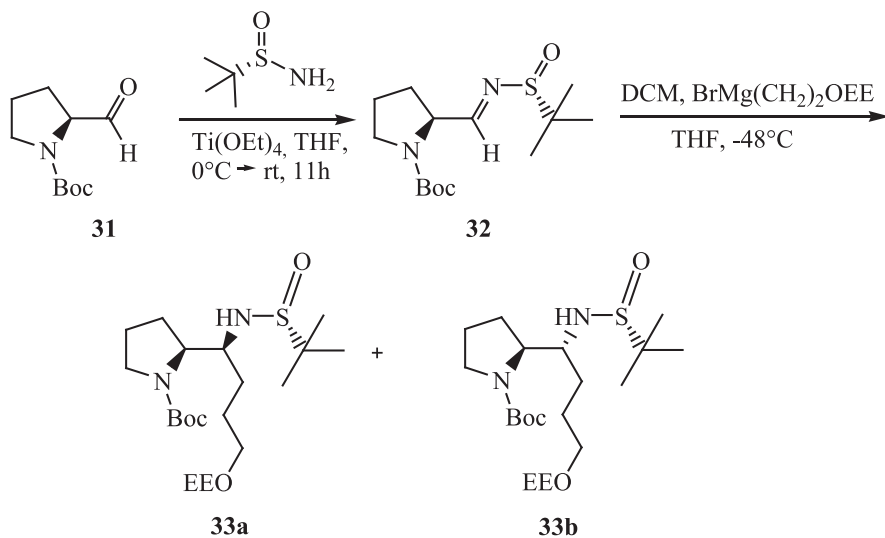
W 2010 roku Xiao-Nan Song i Zhu-Jun Yao opublikowali kolejną metodę syntezy optycznie czynnej pochodnej 2,2'-bipiroolidyny [21]. Ich pomysł jest ulepszeniem pierwszej znanej metody syntezy chiralnej aminy **1** [17] i opiera się na wykorzystaniu jako substratu wyjściowego związku zawierającego jeden pierścień piroolidyny – *N*-butoksykarbonylo-*(S)*-2-piroolidynometanolu [21].

W pierwszym etapie syntezy, analogicznie do strategii opisanej w podpunkcie 1.1, otrzymuje się odpowiedni aldehyd na drodze utleniania Swerna (Schemat 25) [21].



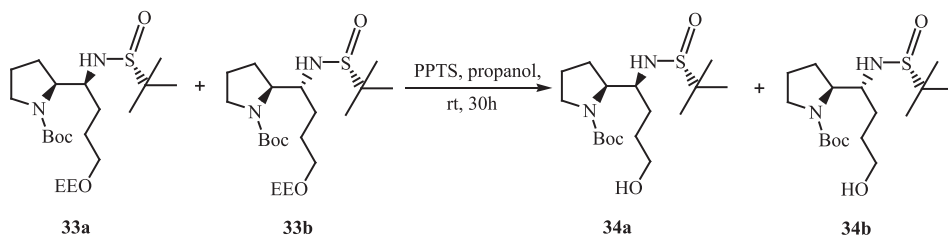
Schemat 25
Scheme 25

Kondensacja związku **31** z (*S*)-*N*-*tert*-butylosulfinamidem w obecności $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ prowadzi do otrzymania sulfiniminy **32**, którą następnie przeprowadza się w pochodne diastereomeryczne **33a** oraz **33b** w wyniku działania bromku 3-[(1-etoksy)etoksy]propylo-magnezowego. Związki te otrzymuje się w stosunku **33a** : **33b** = 31,8 : 1 (Schemat 26) i nie da się ich rozdzielić na drodze chromatografii. Tą samą reakcją można również przeprowadzić z (*R*)-*N*-*tert*-butylosulfinamidem, otrzymując odpowiednie diastereoizomery w stosunku 8,1:1.



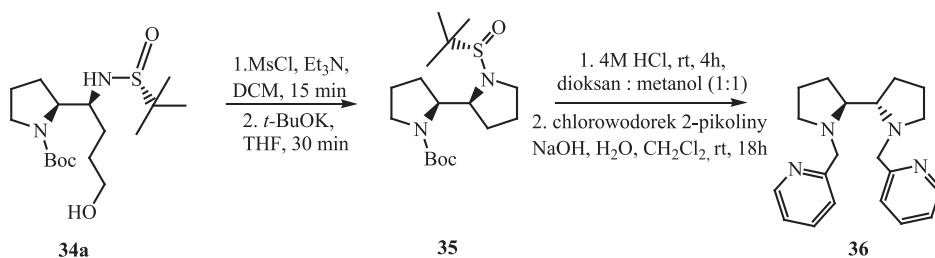
Schemat 26
Scheme 26

W następnym etapie omawianej metody rozszczepia się pochodne eterowe **33a** i **33b** za pomocą *p*-toluenosulfonianu pirydyny w propanolu otrzymując izomery **34a** i **34b** z 94% wydajnością (Schemat 27).



Schemat 27
Scheme 27

Wewnątrzcząsteczkową cyklizację realizuje się działając na wyizolowany z mieszaniny diastereoizomer **34a** chlorkiem kwasu metanosulfonowego i następującej w skutek dodatku silnej zasady – *t*-butanolanu potasu – wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej. Produkt końcowy otrzymuje się ze związku **35**, przeprowadzając kolejno usunięcie grup ochronnych z atomów azotu kwasem solnym i następnie reakcję z chlorowodorkiem 2-pikoliny. Sumaryczna wydajność tych etapów sięga 86% (Schemat 28). Natomiast wydajność całkowita otrzymywania (*S,S*)-PDP – **36** wynosi 39%. Autorom nie udało się jednak wyizolować optycznie czynnej (*S,S*)-bipirolidyny. Próby otrzymania aminy wicynalnej bez podstawników na atomach azotu postępując według opisywanej procedury prowadzą do otrzymania związku *mezo* [21].



Schemat 28
Scheme 28

PODSUMOWANIE

Zbiornicze zestawienie znanych i opisanych dotychczas metod syntezy optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny wskazuje jak trudnym i pracochłonnym zadaniem jest otrzymywanie związków w ich optycznie czystej formie. Demonstruje ono również, że synteza związku o tak prostej budowie jak 2,2'-bipirolidyna może być bardziej kłopotliwa i czasochłonna niż otrzymanie produktu o znacznie bardziej wyrafinowanej strukturze.

W przypadku przedstawionych metod syntezy aminy **1** wykorzystujących achiralne substraty (rozdział 1.2 oraz 1.5) wyraźnie widać, że rozdziały uzyskanych mieszanin racemicznych i form *mezo* **1** na czyste enancjomery są bardziej skomplikowane niż same etapy ich otrzymywania. Natomiast pozostałe przytoczone w niniejszym opracowaniu procedury bazujące na syntezie stereoselektywnej są wieloetapowe i/lub wykorzystują drogie, skomplikowane odczynniki na przykład ADmix. W tym kontekście optymalną procedurą uzyskiwania optycznie czynnej aminy **1** wydaje się być ścieżka zaproponowana przez Alexakis'a (rozdział 1.4), w której jeden z enancjomerów związku **1** otrzymywany jest tylko w 5 etapach z umiarkowaną wydajnością całkowitą sięgającą 56%.

Mimo to, nie ustają prace badawcze dotyczące poszukiwania atrakcyjniejszej strategii uzyskiwania optycznie czynnej 2,2'-bipirolidyny, które argumentowane są jej rosnącym wykorzystaniem w syntezie chemicznej [12, 14, 42, 43].

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję prof. dr hab. inż. T. Połońskiemu oraz dr inż. T. Olszewskiej za nieocenioną pomoc.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.E. Gawaley, J. Aube, *Principles of asymmetric synthesis*, Pergamon, 1996, **14**, 1.
- [2] V. Kurteva, M. Lyapova, *Cent. Eur. J. Chem.*, 2004, **4**, 686.
- [3] D. Lucet, T. Legall, C. Mioskowski, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2580.
- [4] T. Połoński, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 258.
- [5] V. G. Aranda, J. Barluenga, F. Aznar, *Synthesis*, 1974, 504.
- [6] K.B. Sharpless, S.P. Singer, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 2504.
- [7] H.C. Kolb, M.S. Van Nieuwenhze, K.B. Sharpless, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 2484.
- [8] R. Duschinsky, L.A. Dolan, L.O. Randall, G. Lehmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 3150.
- [9] P. Gmeiner, E. Hummel, *Synthesis*, 1996, 621.
- [10] W.L. Neumann, M.M. Rogic, T.J. Dunn, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 3391.
- [11] F.M. Rossi, E.T. Powers, R. Yoon, L. Rosenberg, J. Meinwald, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 10279.
- [12] Y. Ma, Y. J. Zhang, S. Jin, Q. Li, C. Li, J. Lee, W. Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 7388.
- [13] Y. Ma, S. Jin, Y. Kan, Y. J. Zhang, W. Zhang, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 3849.
- [14] K.A. Mamri, H. Ennajih, H. Zouihri, R. Bouhfid, S.W. Ng, E.M. Essassi, *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 2328.
- [15] A. Alexakis, A. Tomassini, C. Chouillet, S. Roland, P. Mangeney, G. Bernardinelli, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **22**, 4093.
- [16] S.E. Denmark, J. Fu, J.M. Lawler, S. Lee, E. Huntsmann, E.J. Grabowski, *J. Org. Synth.*, 2006, **83**, 121.
- [17] T. Oishi, M. Hirama, L.R. Sita, S. Masamune, *Synthesis* 1991, 789.
- [18] M. Hirama, T. Oishi, S. Ito, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 665.
- [19] H. Kotuski, H. Kuzume, T. Gohda, M. Fukuhara, M. Ochi, T. Oishi, M. Hirama, M. Shiro, *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, **6**, 2227.

- [20] M.J. Gresser, P.A. Keller, S.W. Wales, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 4899.
- [21] X. Song, Z. Yao, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 2589.
- [22] W.M. Potapow, *Stereochemia*, PWN, 1986, Warszawa, 47.
- [23] K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 1651.
- [24] A. Dondoni, D. Perrone, *Organic Syntheses*, 2004, **10**, 320.
- [25] R. Bishop, *Organic Syntheses*, 1988, **9**, 692.
- [26] O. Mitsunobu, M. Yamada, M. Teruaki, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1967, 935[27] O. Mitsunobu, *Synthesis*, 1981, 1.
- [28] N. Vegten, D. Ferri, M. Maciejewski, F. Krumeich, A. Baiker, *J. Cat.*, 2007, **249**, 269.
- [29] D. Pinini, A. Iuliano, C. Rosini, P. Salvadori, *Synthesis*, 1990, 1023.
- [30] W.L. Neumann, M.M. Rogic, T.J. Dunn, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5865.
- [31] J. Alvaro, F. Grepioni, D. Savoia, *J. Org. Chem.*, 1997, **109**, 4180.
- [32] H.T. Dieck, J. Dietrich, *Chem. Ber.*, 1984, **117**, 694.
- [33] T. Basile, A. Bocoum, D. Savoia, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 7766.
- [34] A. Bocoum, D. Savoia, A. Umani-Ronchi, *J. Chem. Soc.*, 1993, 1542.
- [35] H.C. Brown, E.F. Knights, C.G. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7765.
- [36] J.A. Soderquist, A. Negron, *Organic Synthesis*, 1998, **9**, 95.
- [37] R.T. Morrison, R.N. Boyd, *Chemia organiczna 1*, PWN, 1994, 587.
- [38] J.B. Bremner, J.A. Coates, D.R. Coghlan, D.M. David, P.A. Keller, S.G. Pyne, *New J. Chem.*, 2002, **26**, 1549.
- [39] B.M. Choudary, N.S. Chodari, K. Jyothi, M.L. Kantam, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 5341.
- [40] H.C. Kolb, M.S. VanNieuwenhze, K.B. Sharpless, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 2483.
- [41] M.H. Junttila, O.E.O. Hormi, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4816.
- [42] E. Sergeeva, J. Kopilov, I. Goldberg, M. Kol, *Chem. Commun.*, 2009, 3053.
- [43] E. Sergeeva, J. Kopilov, I. Goldberg, M. Kol, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 8075.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 kwietnia 2012

2,2'-DIHYDROKSY-1,1'-BINAFTYL (BINOL) I JEGO POCHODNE. WYBRANE SYNTEZY I ZASTOSOWANIE. CZĘŚĆ I.

2,2'-DIHYDROXY-1,1'-BINAPHTHYL (BINOL) AND ITS DERIVATIVES: SELECTED SYNTHESIS METHODS AND APPLICATIONS. PART I.

Dorota Krasowska

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk,
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, Poland
e-mail: dkras@cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Syntezy BINOL-u oraz jego pochodnych w formie racemicznej
2. Synteza optycznie czynnego BINOL-u i jego pochodnych
 - 2.1. Asymetryczne sprzęganie β -naftolu i pochodnych
 - 2.1.1. Związki miedzi
 - 2.1.2. Związki wanadu
 - 2.1.3. Związku rutenu
 - 2.1.4. Związki żelaza
 - 2.1.5. Enzymy
 - 2.2. Metody rozdzielenia mieszaniny racemicznej BINOL-u
3. Funkcjonalizacja pierścienia naftalenowego w cząsteczce BINOL-u
 - 3.1. Podstawienie bi-2-naftolu w pozycji 3,3' pierścienia naftyłowego
 - 3.2. Funkcjonalizowanie BINOL-u w pozycjach 6,6' pierścieni naftyłowych
 - 3.3. Otrzymywanie pochodnych BINOL-ufunkcjonalizowanych podstawnikami w pozycjach 7,7' pierścieni aromatycznych

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

mgr Dorota Krasowska urodziła się w 1979 roku w Stalowej Woli. W 2005 roku ukończyła studia chemiczne na Wydziale Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Po ukończeniu studiów rozpoczęła pracę w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. W 2007 roku rozpoczęła studia doktoranckie w Zakładzie Chemii Heteroorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych pod kierunkiem prof. Józefa Drabowicza. Głównym profilem jej badań jest synteza związków organicznych zawierających stereogeniczny atom siarki lub fosforu oraz chiralnych układów politiofenowych jako wydajnych komponentów w urządzeniach elektronicznych o wymiarach molekularnych.

ABSTRACT

1,1'-Binaphthyl and its derivatives represent a particular class of chemical molecules which chirality results from the restricted rotation about single bond of the two naphthalene rings. This generates the chirality axis. Therefore 1,1'-binaphthyl derivatives exist as two enantiomeric forms called atropoisomers. Moreover, 1,1'-binaphthyls with substituents at 2,2' position exhibit higher rotational barriers around the 1,1'-axis, which affect a very stable chiral configuration. The classical examples of such molecules is 2,2-dihydroxy-1,1'-binaphthyl (BINOL), which has become one of the most utilized chiral ligand and auxiliary for diverse asymmetric syntheses. The unchallenged success of BINOL and its derivatives in the field of transition metal-catalyzed asymmetric reactions or C-C bond forming reactions promoted worldwide an advancement of organic synthesis. The first synthesis of BINOL as racemate was described in 1873. Since then there have been found numerous efficient methods of racemic or enantiomerically pure BINOL preparation and its derivatization. In order to present a brief overview of the most convenient and facile routes to obtain racemic and nonracemic symmetrically substituted 1,1'-binaphthyls based on stoichiometric and catalytic oxidative coupling, classical optical resolution, kinetic enzymatic resolution of racemic mixture or regioselective modification of the binaphthol scaffold the following article is presented.

Keywords: BINOL, atropoisomers, oxidative coupling, optical resolution, enantioselective synthesis, chiral ligands

Słowa kluczowe: BINOL, atropoizomery, utleniające sprzężanie, enancjoselektywna synteza, chiralne ligandy

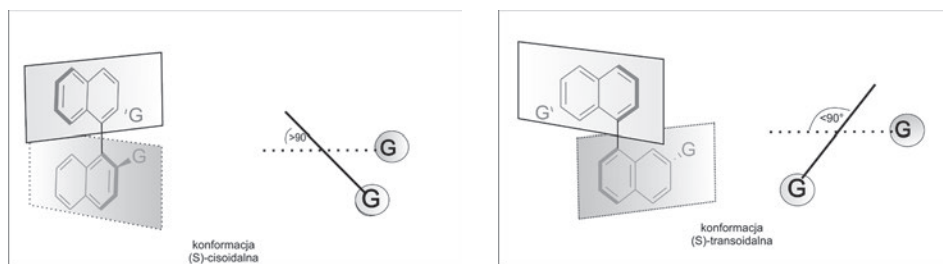
WPROWADZENIE

1,1'-Binaftyl i jego pochodne reprezentują klasę związków, których chiralność wynika z zahamowanej rotacji wokół pojedynczego wiązania łączącego pierścienie naftalenowe. Ten typ izomerii optycznej nazywamy chiralnością osiową. Wykorzystanie obliczeń mechaniki molekularnej [1–4] oraz metod półempirycznych [5] pozwoliło na przeprowadzanie badań nad trwałością konfiguracyjną izomerów optycznych 1,1'-binaftylu oraz jego podstawionych pochodnych.

Bariera rotacji wokół pojedynczego wiązania niepodstawionego 1,1'-binaftylu w benzenie wynosi 23,5 kcal/mol, jest dostatecznie wysoka, aby umożliwić wyizolowanie optycznie czynnych izomerów binaftalenu w temperaturze pokojowej. Połówkowy czas racemizacji enancjomerów 1,1'-binaftylu w temperaturze 50°C w dimetyloformamidzie jest równy 14,5 min., natomiast racemizacja stopionego 1,1'-binaftylu w temperaturze 180°C następuje w kilka sekund. Wprowadzenie podstawników w pozycjach 2,2'-binaftylu powoduje znaczne spowolnienie procesu racemizacji. Wysoka bariera energetyczna reakcji racemizacji optycznie czynnych izomerów 2,2'-dijodo-1,1'-binaftylu wynosi już 46 kcal/mol, co świadczy o silnie zahamowanej rotacji wokół wiązania pojedynczego.

Optycznie czynne enancjomery 2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftylu (BINOL-u) ulegają racemizacji w 195°C w naftalenie z połówkowym czasem równym 270 min., a obliczona bariera energetyczna racemizacji w tych warunkach wynosi 37 kcal/mol [6]. Natomiast ani kwas (*S*)-1,1'-binaftylo-2,2'-dikarboksylowy [7] ani (*R*)-2,2'-dimetylo-1,1'-binaftyl [8] nie racemizują w czasie nawet 40 h w temperaturach odpowiednio 175 i 240°C.

Enancjomeryczne układy binaftylowe przyjmują jedną z dwóch możliwych konformacji: cisoidalną lub transoidalną w zależności od kąta dwuściennego między pierścieniami naftalenowymi. Jeżeli kąt dwuścienny między pierścieniami wynosi mniej niż 90°, wówczas struktura przybiera konformację (*S*)-cisoidalną, natomiast dla większych od 90° – (*S*)-transoidalną (Schemat 1). Optycznie czynny izomer 1,1'-binaftylu w formie krystalicznej istnieje w konformacji transoidalnej, na co wskazuje oznaczony rentgenograficznie kąt dwuścienny równy 103° [9], ale już jego racemiczna forma wykazuje konformację cisoidalną (\sphericalangle 68°). Konformacja cisoidalna preferowana jest dla tych 2,2'-podstawionych pochodnych binaftylowych, których podstawniki G są małych rozmiarów lub są zdolne do tworzenia międzycząsteczkowych słabych wiązań wodorowych (G = OH, OCO₂H, NH₂, OCH₃, CH₃). Dla podstawników o dużych rozmiarach (G = CH₂Br lub CHBr₂) wartości kąta dwuściennego wzrastają, wymuszając tym samym transoidalne ułożenie szkieletu binaftylowego.



Schemat 1. Konformacje układów binaftyłowych
 Scheme 1. Conformations of 1,1'-binaphthyl systems

Pierwsze propozycje dotyczące przypisania konfiguracji absolutnej chiralnych związków binaftyłowych pochodzą z pracy Mislowa opublikowanej w 1958 roku [10]. Założenia te były oparte o analizę stereochemicznych konsekwencji wybranych reakcji w tym redukcję Meerweina-Ponndorfa-Verley'a, a także badania własności optycznych i analizy termiczne optycznie czynnych modeli. Rentgenograficzna analiza strukturalna przeprowadzona dziesięć lat później umożliwiła dokładne ustalenie geometrii i konfiguracji związków binaftyłowych [11].

Ze względu na wysoką trwałość konfiguracyjną enancjomerów 2,2'-podstawionych układów 1,1'-binaftyłowych, związki te zaliczają się grupy najczęściej stosowanych chiralnych substancji pomocniczych zarówno w stechiometrycznych, jak i katalitycznych reakcjach syntezy asymetrycznej. Intensywne badania Crama nad otrzymaniem makrocyclicznych układów „eterowo-binaftyłowych” przyczyniły się do odkrycia i upowszechnienia ich zdolności do selektywnego kompleksowania opartego na tworzeniu układów typu „gość-gospodarz”. W 1987 roku za wkład w rozwój chemii supramolekularnej Cram został uhonorowany Nagrodą Nobla. Pochodne bi-2-naftolu ze względu na przestrzenne preferencje do „wybiórczego” tworzenia kompleksów inkluzyjnych stwarzają możliwość zastosowania ich do rozdziału mieszanin racemicznych.

Wśród pochodnych biaryłowych największym zainteresowaniem cieszą się 2,2'-dipodstawione układy 1,1'-binaftyłu min. BINOL, BINAP, BINAM, NOBIN, które pełnią rolę optycznie czynnych ligandów czy substancji pomocniczych w syntezie organicznej. Chiralne kompleksy metali przejściowych zawierające ligand 2,2'-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftyłowy (BINAP) okazały się niezwykle użytecznymi katalizatorami w reakcji asymetrycznego uwodornienia [12]. Fosfinowe kompleksy rodzaju zastosowane w katalitycznej reakcji uwodornienia enamidów dostarczają dogodnej metody otrzymywania optycznie czynnych α -aminokwasów. Rutenowe związki koordynacyjne są skutecznymi katalizatorami w enancjoselektywnym uwodornieniu różnych funkcjonalizowanych alkenów [13], m.in. w syntezie (S)-Naproksenu [14], powszechnie dziś stosowanego niesteroidowego leku przeciwzapalnego. Zarówno 2,2'-diamino-1,1'-binaftył (BINAM) czy 2-amino-2'-hydrokso-1,1'-binaftył (NOBIN) jako przykłady amin czy aminoalkoholi o chiralności osiowej są cennymi mate-

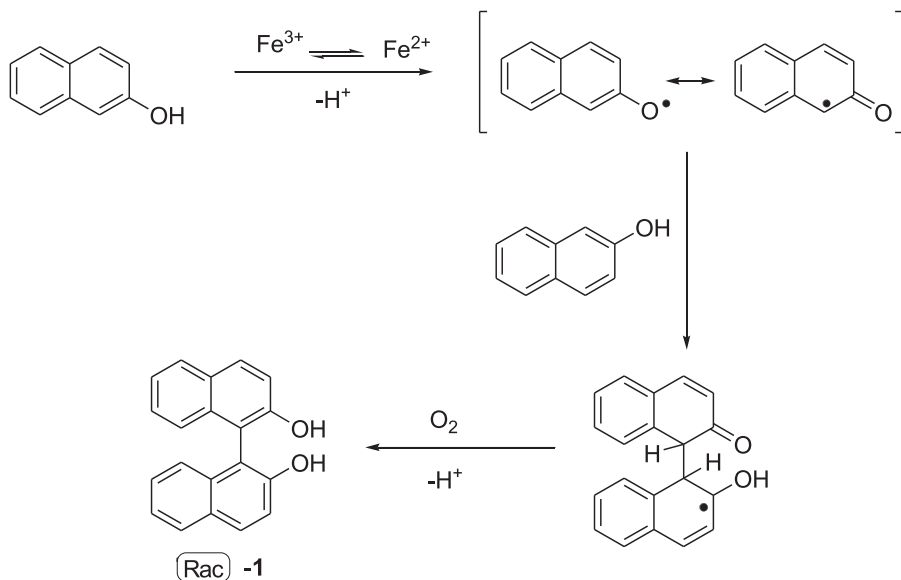
riałami wyjściowymi wciąż intensywnie wykorzystywanymi w konstruowaniu nowych ligandów w asymetrycznej katalizie.

Najczęściej stosowanym chiralnym reagentem jest 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl (BINOL). W literaturze chemicznej nazywany jest również 1,1'-bi-2-naftolem, 1,1'-binaftaleno-2,2'-diolem, 1,1'-binaftylo-2,2'-diolem, 2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftalenem. Jest to bezbarwny kryształ o temperaturze topnienia 214–217°C dla mieszaniny racemicznej i 208–210°C dla optycznie czystych enancjomerów, rozpuszczalny w większości typowych rozpuszczalników organicznych, odporny na działanie wysokich temperaturach, stąd też jego liczne zastosowanie w reakcjach zachodzących w różnych warunkach eksperymentalnych. Ulega częściowej racemizacji w środowisku kwaśnym lub zasadowym w wysokich temperaturach [15].

1. SYNTEZY BINOL-U ORAZ JEGO POCHODNYCH W FORMIE RACEMICZNEJ

Po raz pierwszy BINOL został otrzymany w reakcji utleniającego sprzęgania β -naftolu z użyciem FeCl_3 przez Dianina, który zaprezentował swoje wyniki badań podczas zjazdu rosyjskich chemików w Kazaniu w 1873 roku. Wyniki badań Dianina zostały upublicznione przez von Richtera w *Chemische Berichte* [16] jako fragment jego sprawozdania z konferencji w Kazaniu. Stąd też współcześnie w niektórych doniesieniach pierwsza synteza BINOL-u mylnie przypisywana jest von Richterowi. W 1926 roku pojawiła się praca Pummerera [17] dotycząca syntezy mieszaniny racemicznej BINOL-u w reakcji homosprzęgania dwóch cząsteczek β -naftolu z udziałem FeCl_3 , zawierająca dokładną charakterystykę otrzymanego produktu. Od tamtego czasu do syntezy BINOL-u w reakcjach utleniającego sprzęgania zastosowano z powodzeniem sole lub kompleksy różnych metali takich jak: FeCl_3 [17–20], $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ [21, 22], $\text{Mn}(\text{acac})_3$ [23, 24], kompleksy $\text{Cu}(\text{II})$ z aminami [25–27], TiCl_4 [28] czy kompleksy $\text{Ru}(\text{III})$ [29].

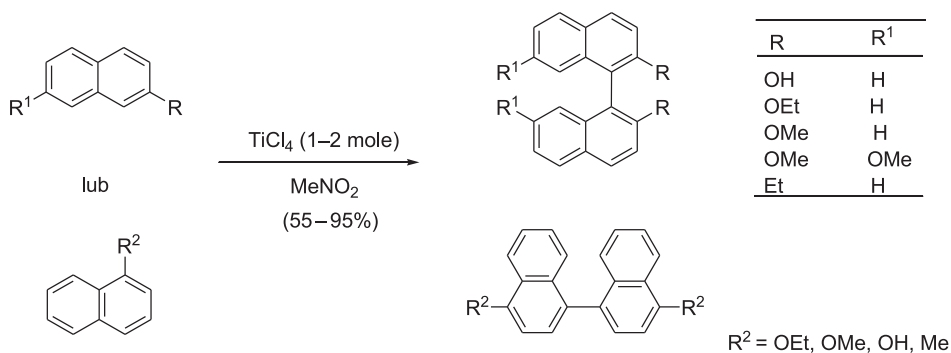
Rodnikowy mechanizm utleniającego sprzęgania 2-naftolu w obecności stechiometrycznych ilości chlorku żelaza(III) zaproponowany został przez Todę [18] i Dinga [30]. W tworzeniu się jednej cząsteczki bi-2-naftolu uczestniczy jeden mol Fe^{3+} . W procesie jednoelektronowego utlenienia β -naftolu z Fe^{3+} generowany jest rodnik naftoksyłowy. Następnie rodnik ten ulega sprzęganiu z obojętną cząsteczką β -naftolu, generując rodnik karbinyłowy z nowo utworzonym wiązaniem C–C. W kolejnym etapie zachodzi eliminacja H^\bullet , który zostaje utleniony za pomocą O_2 obecnego w powietrzu, następuje odłączenie protonu, wskutek czego produkt odzyskuje aromatyczność (Schemat 2).



Schemat 2. Mechanizm rodnikowego oksydacyjnego sprzężenia β -naftolu z użyciem stechiometrycznych ilości soli Fe^{3+} [30]

Scheme 2. Radical mechanism of oxidative coupling of β -naphthol with the stoichiometric amounts of Fe^{3+} salt

W 2000 roku Doussot [28] otrzymał 2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyl oraz 4,4'-dihydroksy-1,1'-binaftyl i ich pochodne jako mieszaniny racemiczne w wyniku homosprzęgania za pomocą TiCl_4 w nitrometanie (Schemat 3). TiCl_4 jako słaby kwas Lewisa, zastosowany w ilości stechiometrycznej, pełnił rolę w tym przypadku wydajnego środka utleniającego w procesie dimeryzacji.

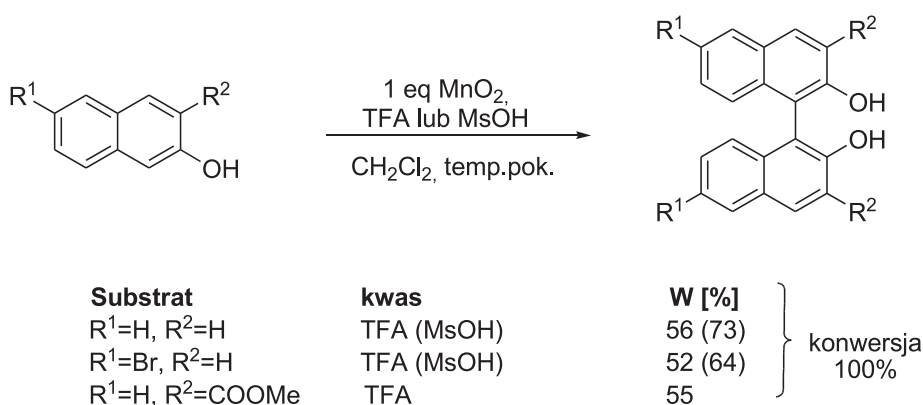


Schemat 3. Symetryczne utleniające sprzężenie pochodnych naftalenowych z użyciem TiCl_4

Scheme 3. Symmetric oxidative coupling reactions of 2-naphthol derivatives with the use of TiCl_4

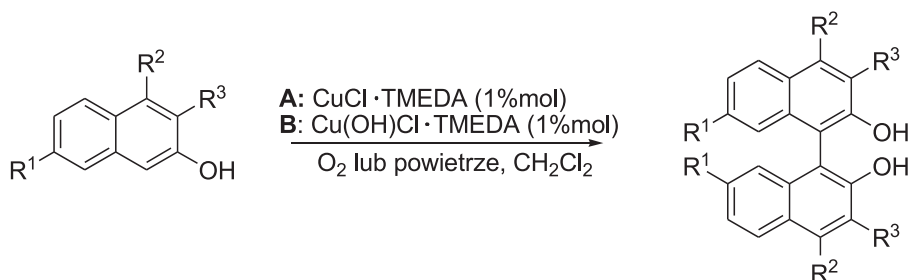
Ciekawe rezultaty uzyskała w 2009 roku grupa badawcza z Iranu, która opracowała metodę sprzęgania pochodnych naftalenu w wodzie z udziałem równomolowych ilości wodorosiarczczanu żelaza(III) lub alternatywnie stosując $\text{Fe}(\text{HSO}_4)_3$ w formie zawieszonyj na żelu krzemionkowym bez użycia rozpuszczalnika w temperaturze 90°C [31]. Wydajności reakcji wynosiły odpowiednio 92 i 91%. Niedrogie, ekologiczne reagenty i wysoka wydajność niewątpliwie stanowią o zaletach tej procedury.

Na uznanie przez wzgląd na swą eksperymentalną prostotę zasługuje niedawno opisana metoda utleniającego sprzęgania pochodnych naftalenu za pomocą MnO_2 w obecności nadmiaru kwasu trifluorooctowego lub metanosulfonowego [32]. Reakcja symetrycznego sprzęgania pochodnych 2-naftolu prowadziła do otrzymania produktów biarylowych z wydajnościami 52–73% (Schemat 4).



Schemat 4. Utleniające sprzęganie pochodnych β -naftolu z użyciem MnO_2
 Scheme 4. Oxidative coupling of β -naphthol derivatives induced by MnO_2

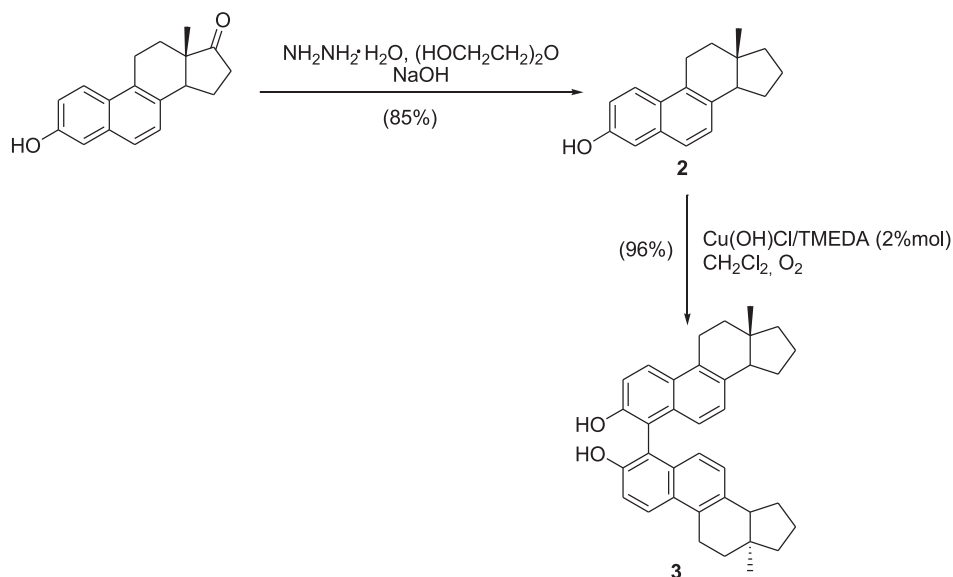
Jedną z najpraktyczniejszych metod syntezy mieszaniny racemicznej bi-2-naftolu i jego pochodnych opracował w 1994 Nakajima [33], wykorzystując katalityczne ilości kompleksu $\text{CuCl}\cdot\text{TMEDA}$ (1% mol). Wydajności reakcji osiągały aż 99%. A w 1999 roku [34] zmodyfikował metodę syntezy BINOL-u oraz jego bis-podstawionych pochodnych poprzez zastosowanie diaminowego kompleksu zasadowego chlorku miedzi w ilości katalitycznej. Wydajności reakcji utleniającego sprzęgania wynosiły 77–96% (Schemat 5).



Metoda	R ¹	R ²	R ³	Wyd.[%] O ₂ /powietrze
A	H	H	H	90/96
A	H	H	Me	92/96
A	MeO	H	H	96/95
A	H	H	COOH	99
A	9-fenantrol			79/77
B	H	H	H	92
B	H	H	Me	95
B	H	H	OMe	96
B	OMe	H	H	95
B	H	H	COOH	90
B	H	-(CH=CH) ₂ -		77

Schemat 5. Katalityczne utleniające sprzężanie pochodnych 2-naftolu z użyciem kompleksów miedzi(I) i (II)
 Scheme 5. Catalytic oxidative coupling of 2-naphthol derivatives in the presence of Cu(I) and Cu(II) complexes

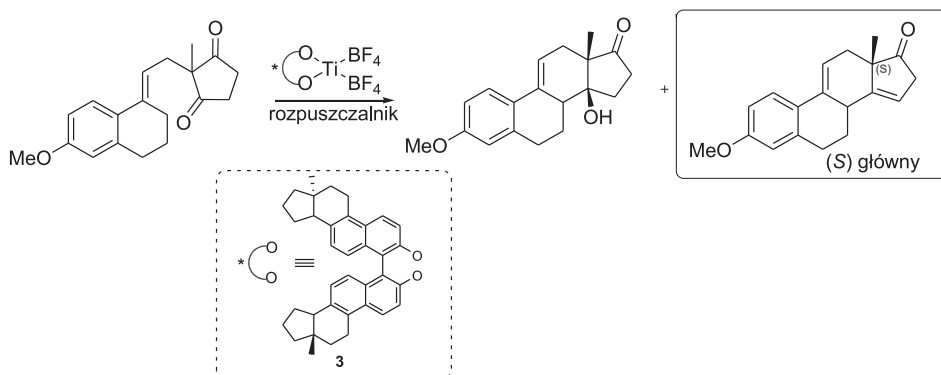
Enev i Mohr [35] zastosowali procedurę Nakajimy w syntezie bis-steroidowej pochodnej BINOL-u 3. Warto zaznaczyć, że w przypadku dimeryzacji dezoksy-ekwileniny 2 kompleks miedzi z tetrametylenodiaminą był efektywnym reagentem sprzęgającym, natomiast zastosowanie FeCl₃ według procedury Pummerera [17] zakończyło się niepowodzeniem (Schemat 6).



Schemat 6. Katalityczne utleniające sprzężanie dezoksy-ekwilenu z udziałem kompleksu miedzi(II) i tetrametylenodiaminy

Scheme 6. Catalytic oxidative coupling of desoxy-equilenine involving Cu(II) and tetramethylenediamine complex

Rok później Enev [36] zastosował otrzymaną bis-steroidową pochodną BINOL-u **3** jako ligand w kompleksie tytanowym, który okazał się efektywnym kwasem Lewisa w enancjoselektywnej cyklizacji Torgova. Głównym produktem cyklizacji był estron o konfiguracji (*S*) i nadmiarze enancjomerycznym równym 70%. Wpływ indukcji asymetrycznej innych badanych ligandów był dużo słabszy, np. w przypadku niepodstawionego BINOL-u enancjoselektywność cyklizacji wynosiła do 47% *ee* dla (*S*)-estronu (Schemat 7).

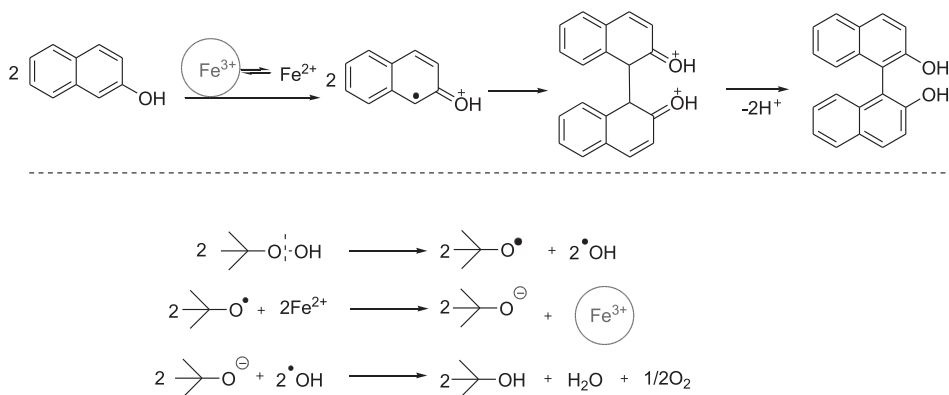


Schemat 7. Zastosowanie steroidowej pochodnej BINOL-u w asymetrycznej cyklizacji Torgova

Scheme 7. Application of bis-steroidal BINOL derivative in catalytic asymmetric Torgov cyclization

Ta sama steroidowa pochodna BINOL-u wykorzystana została przez Bolma i Dabarda jako chiralna substancja pomocnicza w asymetrycznym utlenianiu sulfidów do sulfotlenków [37].

Efektywną metodę katalitycznego sprzęgania z użyciem heterogenicznych katalizatorów żelazowych opisał w 2006 roku hinduski chemik Bhor [38]. Zastosował on sproszkowane minerały glinokrzemianowe takie jak montmorylonit lub bentonit, w których składzie znajduje się tlenek żelaza(III), pełniący funkcję aktywnego reagenta sprzęgającego. Heterogeniczne stałe katalizatory przed użyciem do syntezy bi-2-naftolu, nasycone były odpowiednio roztworami soli żelaza(III) i następnie aktywowane w temperaturze 120 i 550°C. Taka aktywacja prowadziła do bardzo wysokich konwersji substratu w odróżnieniu do eksperymentów, w których użyto handlowe skałki montmorylonitu K10 i bentonitu. Dla tych reakcji wydajności wynosiły odpowiednio 10% i 8%. W reakcji katalitycznego utleniającego sprzęgania β -naftolu konieczny był dodatek silniejszego odczynnika utleniającego. Najbardziej efektywnym okazał się wodoronadtlenek *tert*-butylowy. Jego działanie zostało wyjaśnione w zaproponowanym przez autorów mechanizmie reakcji (Schemat 8). Kluczowym etapem katalitycznego sprzęgania jest regeneracja jonów Fe^{3+} w wyniku utlenienia jonów Fe^{2+} za pomocą rodnika *tert*-butoksyłowego, która umożliwia kontynuowanie rodnikowej dimeryzacji β -naftolu. Wyjaśnienie takiego przebiegu reakcji dowodzi, że katalityczne ilości związków metali są wystarczające.



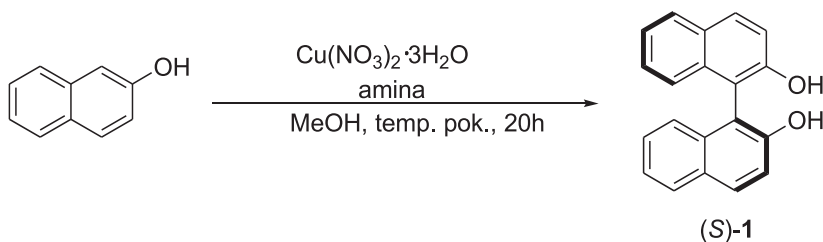
Schemat 8. Mechanizm katalitycznego oksydacyjnego sprzęgania biaryli zaproponowany przez Bhora
 Scheme 8. Mechanism of catalytic oxidative coupling of 2-naphthol units proposed by Bhor

2. SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNEGO BINOL-U I JEGO POCHODNYCH

2.1. ASYMETRYCZNE SPRZĘGANIE β -NAFTOLU I POCHODNYCH

2.1.1. Związki miedzi

Pierwsza asymetryczna synteza optycznie czynnych izomerów BINOL-u opracowana została przez Wynberga [26]. Oparta jest na reakcji sprzęgania w obecności chiralnego kompleksu miedzi(II) z (*S*)- α -fenyloetyloaminą (1:1). Zgodnie z tą procedurą otrzymano został (*S*)-BINOL z wydajnością 62% i niskim nadmiarem enancjomerycznym równym 3%. W 1983 roku Brussee wykorzystał (*S*)-(+)-amfetaminę jako ligand w kompleksie z azotanem miedzi(II) utworzonym *in situ*. Enancjoselektywność reakcji wzrosła aż do 96%, kiedy użyto 8 ekwiwalentów molowych chiralnej aminy (Schemat 9) [39, 40].



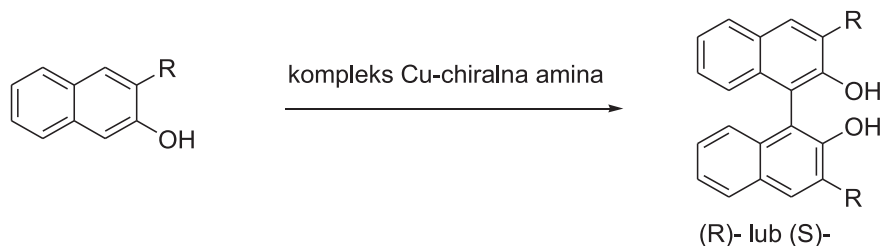
	Amina	Wydajność [%]	ee [%]	Lit.
1		62	3	[38]
2		98	96	[39, 40]

Schemat 9. Asymetryczne utleniające sprzęganie β -naftolu za pomocą chiralnych kompleksów miedzi(II)
 Scheme 9. Asymmetric oxidative coupling of β -naphthol units induced by copper complexes with chiral amines

Reakcje asymetrycznego sprzęgania β -naftolu opisali również Kocovsky i Smrcina w 1992 roku. W obecności stechiometrycznych ilości kompleksu miedzi(II) z (-)-sparteiną reakcja sprzęgania dostarczyła BINOL-u o konfiguracji (*R*) ze 100% nadmiarem enancjomerycznym, ale z niską wydajnością chemiczną (14%) [41].

Rok później ci sami autorzy przedstawili pierwszy przykład katalitycznej wersji reakcji asymetrycznego utleniającego sprzęgania 2-naftolu w obecności 10%-molowych CuCl_2 , (-)-sparteiny oraz AgCl jako odczynnika utleniającego. (R)-BINOL otrzymany został z 3%-owym nadmiarem enancjomerycznym i wydajnością chemiczną 70% [42].

Nakajima zastosował inny chiralny kompleks otrzymany z chlorku miedzi(I) i diaminowych pochodnych (S)-proliny. Enancjoselektywność reakcji sprzęgania β -naftolu w obecności chiralnego kompleksu wynosiła tylko 17%, natomiast w przypadku bi-2-naftoli funkcjonalizowanych podstawnikami elektronoakceptorowymi zaobserwowano lepszą indukcję asymetryczną [43]. Kolejne reakcje utleniającego sprzęgania naftolu i jego pochodnych przeprowadził Kozłowski [44], badając wpływ (S,S)-diaz-*cis*-dekaliny na stereochemię reakcji. W wyniku sprzęgania β -naftolu w obecności chiralnego kompleksu miedzi(I) otrzymany został BINOL o konfiguracji (R) z 17% *ee*. Dla podstawionych pochodnych binaftylowych zastosowanie chiralnej diaminy okazało się znacznie efektywniejsze (*ee* do 95%) (Schemat 11). Wyniki badań nad katalityczną wersją enancjoselektywnego utleniającego sprzęgania β -naftolu z udziałem kompleksów miedzi(I) i (II) z chiralnymi aminami zebrane są w Tabeli 1.



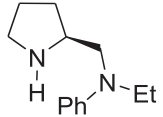
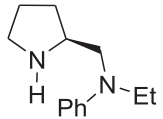
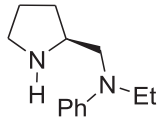
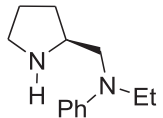
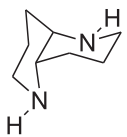
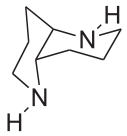
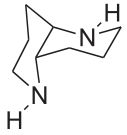
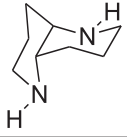
Schemat 11. Asymetryczne sprzęganie pochodnych binaftolowych katalizowane kompleksami miedzi i chiralnych diamin

Scheme 11. Asymmetric coupling of β -naphthol derivatives catalyzed by copper complexes with chiral diamines [44]

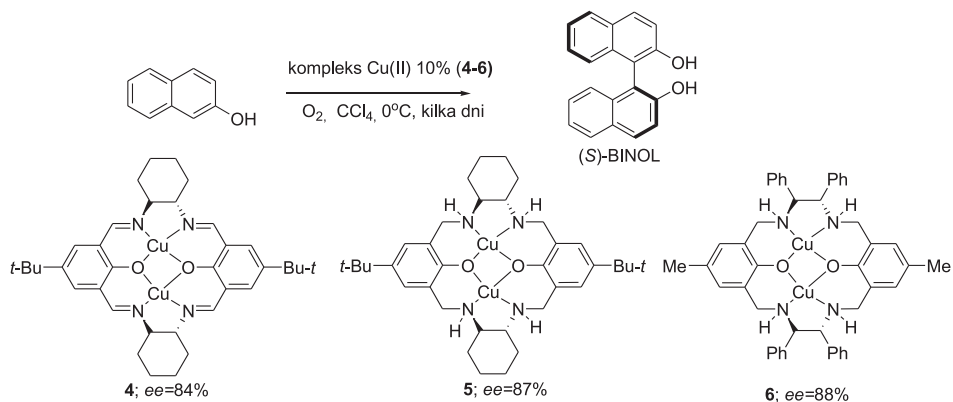
Tabela 1. Porównanie efektywności chiralnych amin w asymetrycznej reakcji utleniającego sprzęgania

Table 1. Comparison of effectiveness of chiral amines in asymmetric oxidative coupling

Sole miedzi	Chiralna diamina	R	Wydajność [%]	ee [%]	Konfiguracja gł. produktu	Ref.
$\text{CuCl}_2/\text{AgCl}$		H	70	3	(R)	[42]
CuCl		H	89	17	(S)	[43]

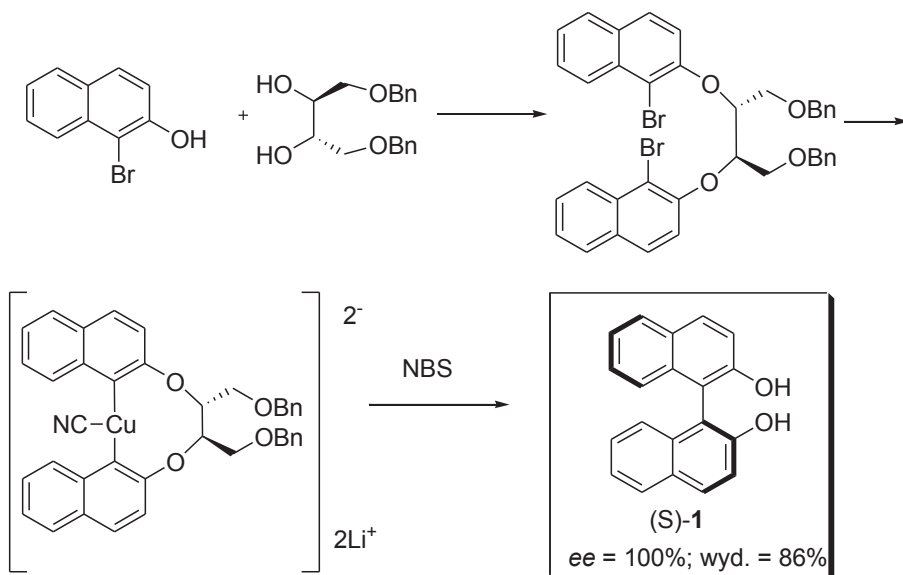
Sole miedzi	Chiralna diamina	R	Wydajność [%]	ee [%]	Konfiguracja gł. produktu	Ref.
CuCl		Me	93	12	(S)	[43]
CuCl		COOMe	85	78	(S)	[43]
CuCl		COOEt	77	73	(S)	[43]
CuCl		COOt-Bu	69	58	(S)	[43]
CuCl		H	80	13	(R)	[44]
CuCl		OBn	77	38	(R)	[44]
CuI		COOBn	79	90	(R)	[44]
CuI		COOMe	85	91-93	(R)	[44]

Badania nad wykorzystaniem kompleksów miedzi(II) z chiralnymi zasadami Schiffa lub diaminą (4–6) jako katalizatorów w asymetrycznym sprzęganiu β -naftolu przeprowadził Gao w 2003 roku [45]. W obecności 10% molowych katalizatorów 4–6 otrzymany został optycznie czynny (S)-BINOL z enancjoselektywnościami 84–88% (Schemat 12).



Schemat 12. Asymetryczna synteza bi-2-naftolu z udziałem kompleksów bimetalicznych
 Scheme 12. Asymmetric synthesis of bi-2-naphthol with the use of bimetallic complexes

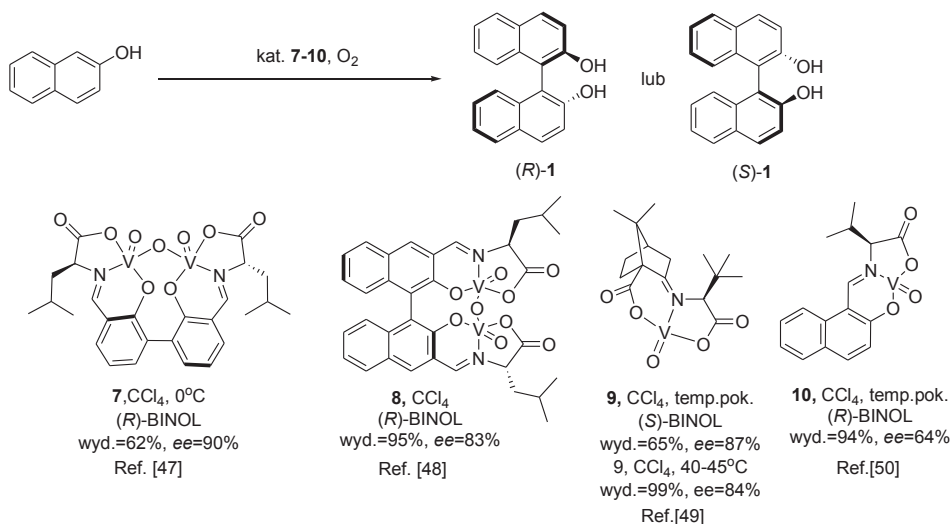
Kilkusetapową asymetryczną syntezę BINOL-u opublikował Lipshutz w 1994 roku. Kluczową przemianę stanowi w niej wewnątrzcząsteczkowe sprzężanie zgenerowanego *in situ* cyjanomiedziorganicznego produktu pośredniego. Anion cyjanomiedziowy potraktowany *N*-bromosykcynoimidem, a następnie wodnym roztworem zasady potasowej ulegał przekształceniu w enancjomerycznie czysty (*S*)-BINOL (Schemat 13) [46].



Schemat 13. Synteza optycznie czynnego BINOL-u
 Scheme 13. Synthesis of optically active BINOL

2.1.2. Związki wanadu

Na początku XXI stulecia równolegle dwie grupy badawcze z Taiwanu i Chin opisały nową metodę katalitycznego asymetrycznego sprzęgania 2-naftolu z wykorzystaniem chiralnych kompleksów wanadu(IV). Reakcje sprzęgania β -naftolu prowadzone w tetrachlorku węgla w obecności tlenu i katalitycznych ilości wybranych kompleksów wanadu dostarczały optycznie czynnych enancjomerów BINOL-u z wysokimi wydajnościami chemicznymi oraz enancjoselektywnością do 90% w zależności od natury zaprojektowanego chiralnego katalizatora (Schemat 14) [47–52].



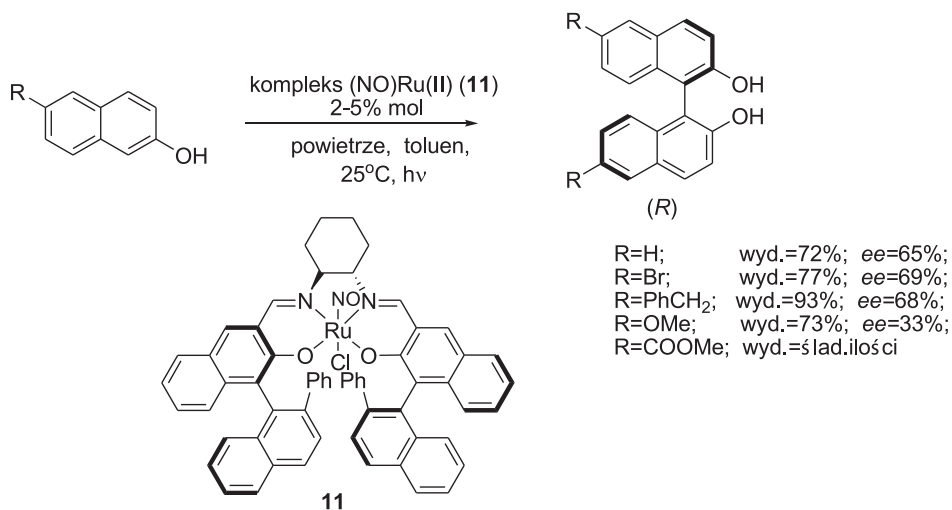
Schemat 14. Zastosowanie kompleksów wanadu(IV) do syntezy optycznie czynnego BINOL-u

Scheme 14. Application of vanadium-based oxidants in the synthesis of optically active BINOL

2.1.3. Związki rutenu

Zastosowanie kompleksów rutenowych jako katalizatorów enancjoselektywnego sprzęgania 2-naftoli zapoczątkował Ohkubo w 1993 roku [53]. Opisana przez niego fotokatalityczna procedura wykorzystująca acetyloacetonian kobaltu(III) jako środek utleniający dostarczyła izomeru (R)-BINOL-u z 16%-owym nadmiarem enancjomerycznym.

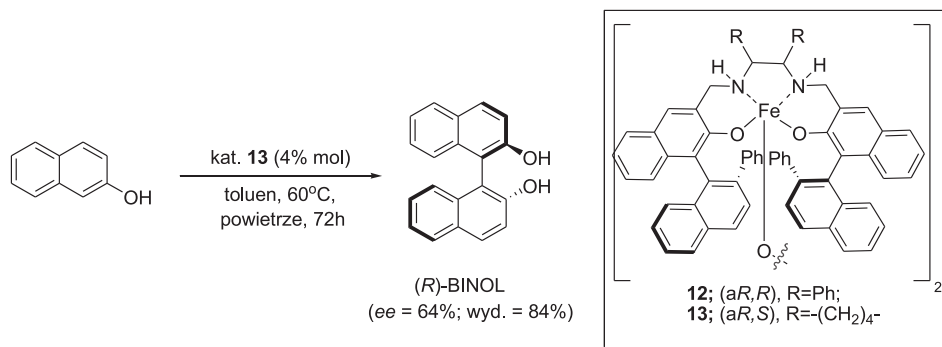
W 2000 roku Katsuki opisał fotoaktywowaną procedurę enancjoselektywnego utleniającego sprzęgania naftoli z udziałem salenowego kompleksu rutenu(II) **11**, w wyniku której otrzymany został (R)-BINOL z 65% nadmiarem enancjomerycznym (Schemat 15) [54, 55].



Schemat 15. Katalityczne asymetryczne sprzężenie z użyciem rutenowego kompleksu salenowego
Scheme 15. Catalytic asymmetric coupling promoted by Ru(II)-salen complex

2.1.4. Związki żelaza

W 2009 roku Katsuki opisał asymetryczną metodę utleniającego homosprzężenia 2-naftolu oraz jego pochodnych katalizowaną chiralnymi kompleksami salanowymi żelaza(III) **12**, **13** z udziałem tlenu z powietrza [56, 57]. W reakcji β -naftolu w toluenie w obecności 4% molowych katalizatora **13** w temperaturze 60°C w ciągu 72 h otrzymany został w przewodzie ($ee = 64\%$) enancjomer (*R*) 1,1'-bi-2-naftolu (Schemat 16). Dla 3,3'-dipodstawionych pochodnych β -naftolu dobrą enancjoselektywność reakcji (77–96% ee) umożliwiło zastosowanie 1% molowego katalizatora salanowego **12**. Kompleksy żelaza zawierające ligandy salenowe, które są strukturalnymi analogami związków salanowych **12** i **13** nieoczekiwanie nie wykazywały aktywności katalitycznej badanych reakcji sprzężania w tych samych warunkach reakcji.



Schemat 16. Salanowe kompleksy żelaza(III) wykorzystane w reakcji utleniającego sprzęganiu
 Scheme 16. The use of Fe(III)-salan complexes in oxidative coupling reaction

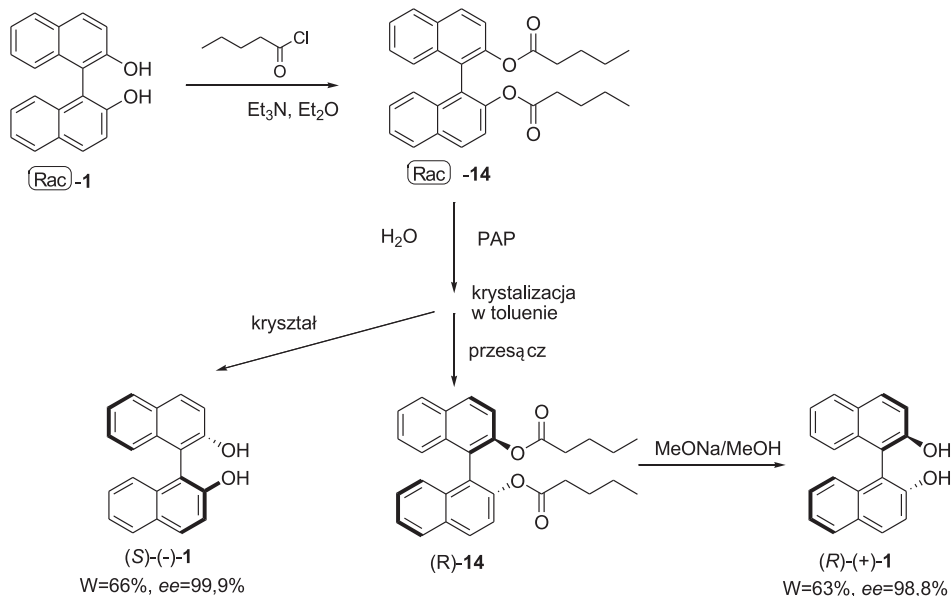
2.1.5. Enzymy

Do biologicznie aktywnych katalizatorów w reakcjach utleniającego sprzęgania 2-naftoli zaliczane są enzymy z grupy peroksydaz. Do tej pory ukazały się doniesienia o zastosowaniu w asymetrycznych reakcjach sprzęgania takich biokatalizatorów jak: peroksydaza chrzanowa (HRP) oraz kultury komórkowe herbaty chińskiej, będące źródłem wysokoaktywnego enzymu. W 1997 roku Sridhar [58] opisał nowatorską reakcję enancjoselektywnego sprzęgania 2-naftolu z użyciem HRP i dodatku 5% H₂O₂, prowadzącą do (*R*)-1,1'-binaftylo-2,2'-diolu z wydajnością chemiczną 75% oraz nadmiarem enancjomerycznym 52%. Jednakże rozbieżne wyniki przedstawił rok później Schreier [59], który na podstawie swoich badań nad dimeryzacją 2-naftolu katalizowaną tym samym enzymem, wykazał, że HRP jest efektywnym katalizatorem, ale niestereoselektywnym dla syntezy biaryli (BINOL: wydajność 35%, ee < 5%). Syntezę optycznie czynnego 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu opartą na utleniającym sprzęganiu katalizowanym kulturami komórkowymi herbaty chińskiej *Camellia sinensis* z udziałem nadtlenku wodoru opisał Takemoto w 2002 roku. Metoda dostarczała optycznie czynnego izomeru BINOL-u o konfiguracji *R* z wydajnością optyczną 59% i chemiczną tylko do 47% [60,61].

2.2 METODY ROZDZIAŁU MIESZANINY RACEMICZNEJ BINOL-U

Znaczny postęp w badaniach nad rozdziałem mieszaniny racemicznej BINOL-u jest wynikiem poszukiwań alternatywnych i tańszych metod pozyskiwania optycznie czynnych związków binaftyłowych. Do rozdziału mieszaniny racemicznej BINOL-u z powodzeniem zastosowano zarówno metody chemiczne jak i biologiczne. Procedurę izolacji enancjomerów BINOL-u na drodze enzymatycznej hydrolizy estru binaftyłowego kwasu walerianowego z użyciem esterazy cholesterolowej (CE) opra-

cował w roku 1989 Kazlauskas [62]. Reakcja hydrolizy katalizowana CE okazała się wysoce enancjoselektywna. Esteraza cholesterolowa jest jednak reagentem kosztownym i trudno dostępnym. Dlatego też Kazlauskas rozważył możliwość zastosowania tańszego i komercyjnie dostępnego surowego wyciągu acetonowego z trzustki wołowej (ang. *pancreas acetone powder*, PAP), w składzie którego oprócz innych enzymów trawiennych znajduje się aktywna esteraza cholesterolowa. Taki surowy enzym zastosowany został do rozdziału enancjomerów BINOL-u w skali 200 gramowej według procedury kinetycznego rozdziału diestrów binaftyliowych kwasu pentanowego **14** (Schemat 17) [63].



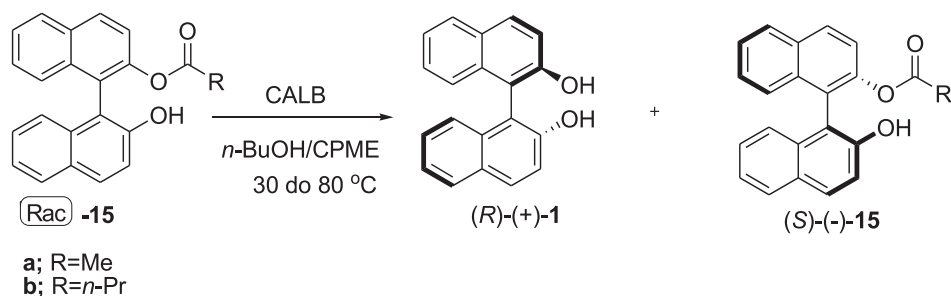
Schemat 17. Kinetyczny enzymatyczny rozdział estrów BINOL-u

Scheme 17. Kinetic enzymatic resolution of BINOL esters

Enancjoselektywne transacylowanie katalizowane enzymami opisał Lin w 1993 roku. W tym przypadku transacylowanie zachodziło między *rac*-1-indanolem i *rac*-2,2'-dimaślanem 1,1'-binaftyliowym, dostarczając (*S*)-1-indanolu i maślanu (*R*)-1-indanolowego oraz odpowiednio (*S*)-BINOL-u i nieprzereagowanego binaftyliowego diestru w formie enancjomeru (*R*). Wśród przebadanych enzymów najlepsze właściwości katalityczne oraz enancjoselektywność wykazywały: lipaza z trzustki wieprzowej, pankreatyna wieprzowa oraz esteraza cholesterolowa. Nadmiary enancjomeryczne wyizolowanego (*S*)-BINOL-u wynosiły 95–98% [64].

Cavazza opracował metodę enzymatycznego kinetycznego rozdziału mieszaniny racemicznej BINOL-u opartą na reakcji monometylowania z udziałem surowiczej albuminy wołowej. W wyniku kinetycznego rozdziału enzymatycznego otrzymany został (*R*)-BINOL z 59% nadmiarem enancjomerycznym oraz (*S*)-2-metoksy-2'-hydrokso-1,1'-bianftyl z $ee = 41\%$ [65].

Spośród wielu lipaz katalizujących reakcje rozdziału enzymatycznego na uwagę zasługuje lipaza *Candida antarctica B* (CALB), znana nie tylko ze swojej niezwyklej trwałości na wysoką temperaturę, ale i charakteryzująca się zdolnością do stereospecyficznego rozpoznawania enancjomerów, dzięki rozróżnieniu przestrzennej konformacji grup acylowych. Jej katalityczną aktywność w enancjoselektywnej hydrolizie monoacylowych pochodnych bi-2-naftolu **15a,b** zaobserwował japoński badacz Aoyagi [66]. Wykazał również, że na przebieg enzymatycznej hydrolizy monoacetylo- i butyrylo-1,1'-bi-2-naftolu ma wpływ temperatura reakcji. W temperaturach reakcji 60° lub 80°C enzym katalizował hydrolizę estru dostarczając enancjomerycznego BINOL-u o konfiguracji (*R*) (Schemat 18).



Substrat	Temp. [°C]	Czas reakcji [h]	BINOL (<i>R</i>)		Monoester	
			Wyd. [%]	ee [%]	Wyd. [%]	ee [%]
15a	30	96	0	–	Rac-	0
15a	60	96	35	28	65	14
15a	80	48	52	23	48	24
15b	30	96	0	–	Rac-	0
15b	60	96	12	99	88	16
15b	80	72	43	91	57	65

Schemat 18. Enzymatyczny rozdział monoacylowych pochodnych 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu za pomocą lipazy CALB

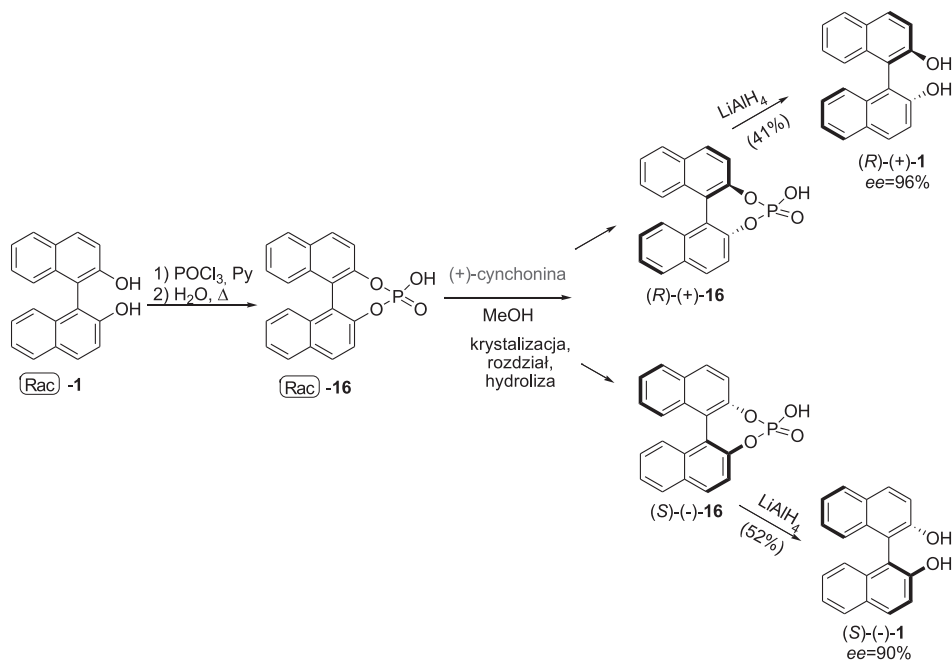
Scheme 18. Enzymatic resolution of monoacyl-BINOL derivatives by CALB-type lipase

Holland ze współpracownikami opracował reakcję enancjoselektywnego rozdziału i desymetryzacji racemicznego BINOL-u katalizowaną lipazą lipoproteinową

produkowaną z *Pseudomonas sp.* i *Pseudomonas fluorescens*. W wyniku biokatalitycznego monoacylowania mieszaniny racemicznej 1,1'-bi-2-naftolu octanem winylu tylko jeden z enancjomerów ulegał konwersji, dostarczając tym samym odpowiednio octanu (*R*)-1,1'-binaftylu (*ee* = 96%) i nieprzereagowanego (*S*)-BINOL-u o nadmiarze enancjomerycznym równym 55% [67].

Metoda chemicznego rozdzielania związków racemicznych polega na reakcji chemicznej enancjomerów (*R*) i (*S*) z chiralną substancją pomocniczą, w wyniku której powstaje para diastereoizomerów różniących się właściwościami fizycznymi. Poprzez wykorzystanie tych różnic możliwe jest ich rozdzielanie. Usunięcie fragmentu chiralnego pomocnika w wyizolowanych diastereoizomerach prowadzi do otrzymania enancjomerycznych produktów.

Jedną z pierwszych metod chemicznego rozdzielania mieszaniny racemicznej kwasu fosforowego otrzymanego z BINOL-u zaproponował Jacques. Polegała ona na utworzeniu diastereoizomerycznych soli kwasu fosforowego **16** i alkaloidu chinowca. Diastereoizomeryczne produkty rozdzielono w wyniku krystalizacji z metanolu, a następnie po zakwaszeniu przekształcono w enancjomery (*R*) i (*S*) kwasu „binafitylofosforowego”. Redukcja otrzymanych enancjomerycznych kwasów za pomocą glinowodoru litu prowadziła do uwolnienia (*R*)- i (*S*)-BINOL-u z nadmiarami enancjomerycznymi odpowiednio 96% i 90% (Schemat 19) [68,69].

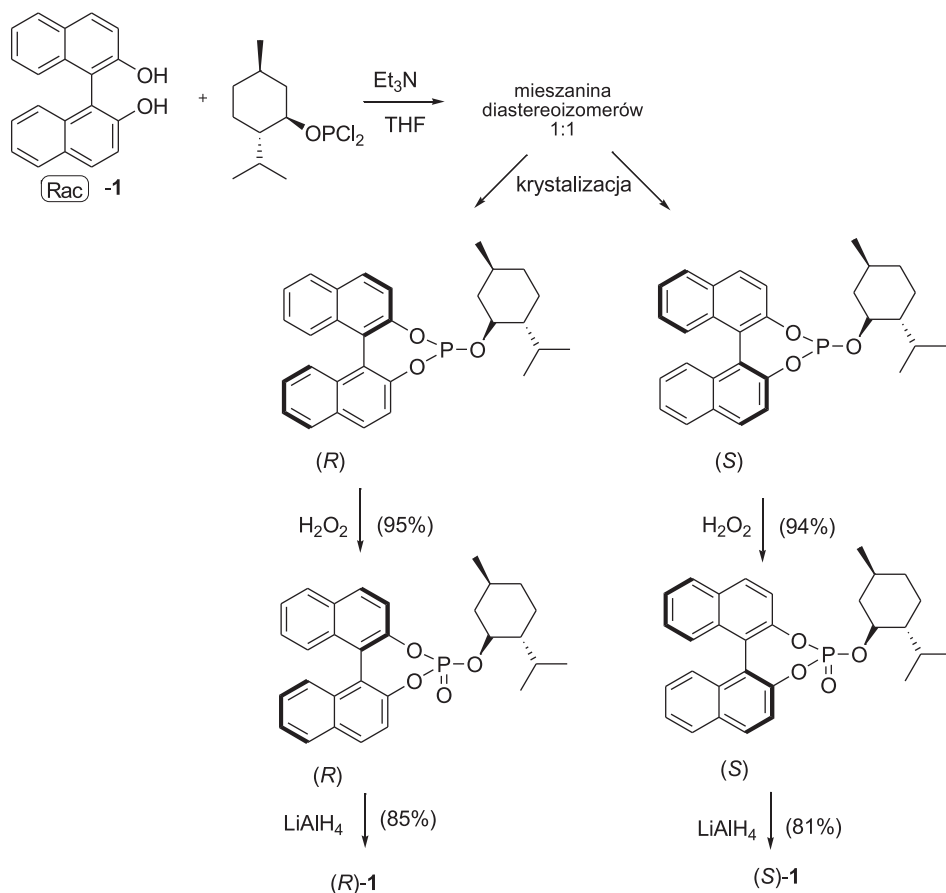


Schemat 19. Rozdział racemicznego BINOL-u poprzez diastereoizomeryczne sole alkaloidowe
Scheme 19. Resolution of racemic BINOL via the formation of diastereomeric alkaloid salts

Ponieważ czystość optyczna enancjomerów otrzymywanych metodą Jacquesa wciąż była daleka od satysfakcjonującej, nie zaprzestano poszukiwań wydajniejszych

metod rozdziálu chemicznego BINOL-u. Efektywną metodę rozdziálu bi-2-naftolu opisałi niezależnie Hu [70] oraz De Lucchi [71]. Polegała ona na utworzeniu diastereomerycznych amidów binaftylowych kwasu (tio)fosforowego z enancjomerycznie czystej (*S*)-(-)- α -fenyloetyloaminy, ich rozdziálu i redukcji za pomocą LiAlH_4 do optycznie czystych izomerów (*R*) i (*S*)-BINOLu.

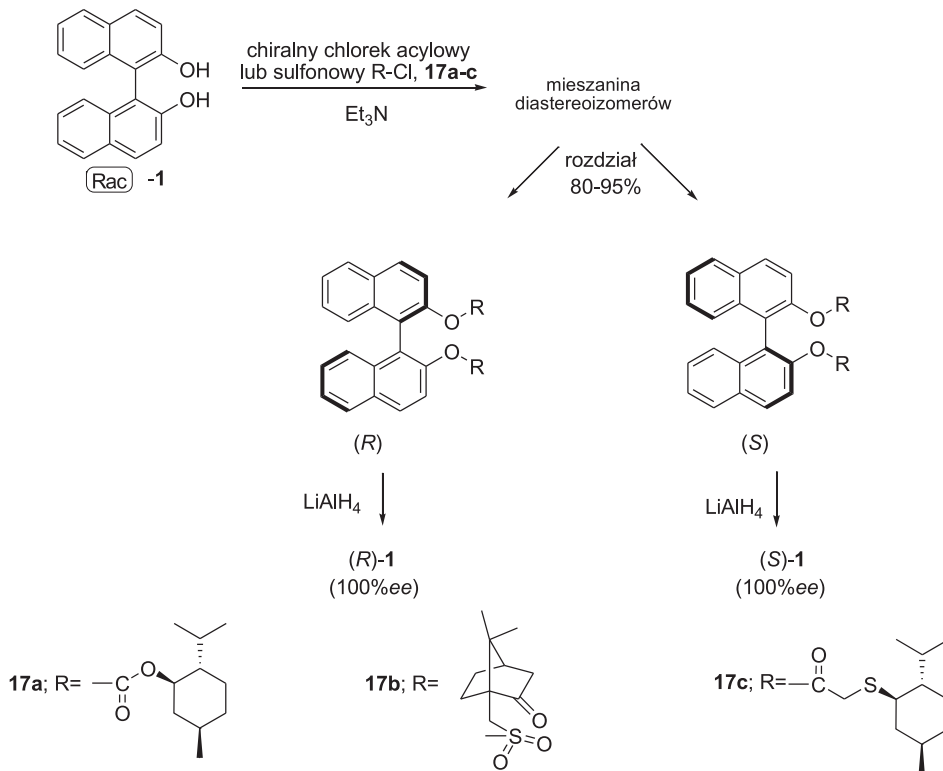
W 1993 Brunnel zaproponował metodę optycznego rozdziálu 1,1'-bi-2,2'-naftolu poprzez tworzenie diastereoizomerów fosforynu 1,1'-binaftylo-*O*-mentylowego. Pojedyncza krystalizacja z eteru dietylowego dostarczała całkowitego rozdziálu izomerów. Tak wyizolowane diastereomerycznie czyste fosforyny po utlenieniu perhydrolem ulegały przekształceniu w estry kwasu fosforowego(V), których redukcja za pomocą LiAlH_4 prowadziła do obu optycznie czynnych izomerów BINOL-u. Całkowita wydajność reakcji była zadowalająca, wynosiła 85% dla izomeru o konfiguracji *R* i 81% dla enancjomeru *S* (Schemat 20) [72].



Schemat 20. Rozdział optyczny rac-BINOL-u za pomocą dichlorofosforynu *O*-(1*R*,2*S*,5*R*)-mentylowego jako chiralnej substancji pomocniczej

Scheme 20. Optical resolution of rac-BINOL using *O*-menthyl phosphorodichloridite as a chiral auxiliary

Dwuetałpowe procedury z wykorzystaniem terpenowych substancji pomocniczych **17a-c** takich jak: chloromrówczan mentylu [73], chlorkek 10-kamforosulfonowy [74], chlorkek neomentyltioacetylowy [75] okazały się niezwykle wydajnymi metodami rozdzielania optycznego mieszaniny rac-BINOL-u (Schemat 21).



Schemat 21. Rozdział mieszaniny racemicznej BINOL-u oparte na jego reakcji z optycznie czynnymi chlorkami kwasowymi

Scheme 21. Resolution of rac-BINOL based on its reaction with optically active acid chlorides

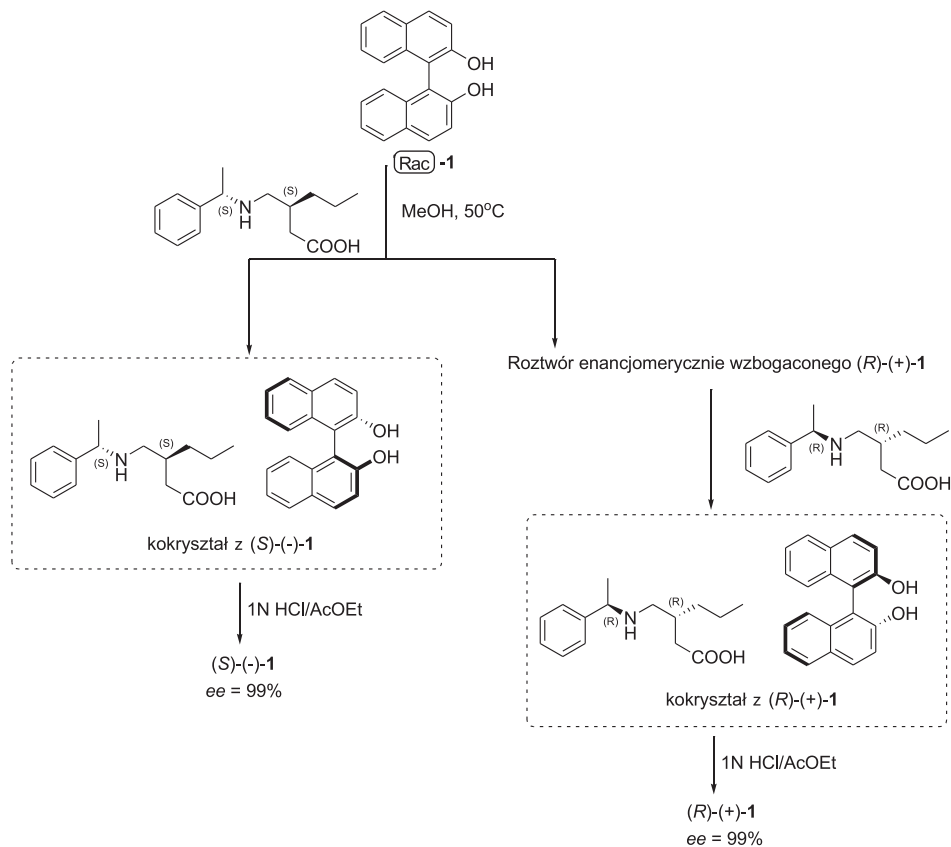
Do rozdzielania BINOL-u i jego pochodnych z powodzeniem zastosowano chiralne aminokwasy. Przykładem może być metoda rozdzielania racemicznej BINOL-u poprzez tworzenie diastereomerycznych diestrów pochodnym aminokwasów. Zgodnie z tym podejściem w wyniku kondensacji chiralnego diolu z *N-tert*-butoksykarbonylo-tryptofanem za pomocą DCC otrzymane zostały odpowiednie diestry. Chromatograficzny rozdzielanie diastereoizomerów, a następnie hydroliza za pomocą metanolego roztworu LiOH dostarcza optycznie czystych izomerów (*R*)- i (*S*)-BINOL-u z wysokimi wydajnościami (odpowiednio 91 i 93%) [76]. Podobna procedura została zastosowana do rozdzielania mieszaniny racemicznej 3,3'-dibenzylksoxy-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftylu polegającego na kondensacji chiralnego diolu z *N-tert*-butoksykarbonylo-alaniną. Otrzymane diastereomeryczne diestry zostały rozdzielone chromatograficznie. Hydroliza zasadowa wyizolowa-

nych diestrów dostarczyła enancjomerów 3,3'-dibenzylloksy-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftylu z wysokimi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznym dla izomeru (*R*) 94% *ee*, oraz (*S*)-izomeru >99% *ee* [77]. Zdolność do tworzenia inkluzyjnych kompleksów BINOL-u z (*S*)-proliną zaobserwował Periasamy. Samorzutna krystalizacja kompleksu w benzenie, jego rozdział, ekstrakcja eterowa i chromatografia prowadziły do uwolnienia (*S*)-BINOL-u z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym tylko 65%. Drugi enancjomer został wyizolowany również z niską wydajnością optyczną (44% *ee*) [78].

Toda i wsp. w 1984 roku opublikowali wyniki badań nad optycznym rozdziałem bi-2-naftolu z użyciem optycznie czynnych sulfotlenków alkiloarylowych jako chiralnych substancji pomocniczych. Zauważyli oni, że sulfotlenki tworzą selektywnie krystaliczne kompleksy w stosunku 1:1 z jednym enancjomerem BINOL-u, które łatwo można wyizolować. Struktura takiego kompleksu (*R*)-BINOL-u z (*R*)-(+)-sulfotlenkiem *m*-tolilowo-metylowym została przez autorów określona metodą analizy rentgenograficznej [79]. Rozdział optyczny BINOL-u według tej procedury prowadził do wyizolowania enancjomeru *R* z 85% *ee* i 86%-ową wydajnością oraz optycznie czystego enancjomeru *S* z 83%-ową wydajnością [80].

Praktyczna procedura rozdziału mieszaniny racemicznej BINOL-u poprzez selektywną krystalizację z chlorkiem (8*S*,9*R*)-(-)-*N*-benzyllocynchonidynowym została oryginalnie opisana przez Todę [81,82] w 1993 roku i zmodyfikowana przez Cai [83], Lin Pu (1995) [84] i Dinga (2000) [85]. Zastosowany chlorek *N*-benzyllocynchonidynowy wykazywał zdolność do tworzenia inkluzyjnych kryształów tylko z (*R*)-BINOL-em. Po wyizolowaniu kryształów i ich hydrolizie otrzymany został enancjomeryczny BINOL o konfiguracji (*R*), natomiast roztwór cieczy macierzystej dostarczał przeciwnego (*S*) enancjomeru BINOL-u. Czystości optyczne otrzymanych BINOL-i wynosiły powyżej 99%, natomiast wydajność chemiczna osiągała wartości do 80% i 76% odpowiednio dla *R* i *S* izomerów.

W ostatnim roku opatentowana została metoda optycznego rozdziału BINOL-u w wyniku selektywnej krystalizacji jego enancjomerów z optycznie czynnymi pochodnymi γ -aminokwasów [86]. W roztworze diastereomerycznie czystego kwasu kwasu (*S,S*)-3-[(1-fenylotetyloamino)metylo]heksanowego z BINOL-em zachodziła samorzutna krystalizacja tylko jednej formy enancjomerycznej (*S*)-BINOL-u z optycznie czystym γ -aminokwasem w postaci kokryształu w stosunku molowym 1:1. Wyizolowanie z cieczy macierzystej przeciwnego enancjomeru BINOL-u było możliwe poprzez powtórzenie procedury rozdziału z dodatkiem enancjomeru (*R,R*)-aminokwasu, który wykazywał zdolność selektywnej krystalizacji z (*R*)-BINOL-em. W wyniku kwasowej hydrolizy otrzymanych kompleksów wyizolowany został (*S*)-BINOL-u z 99% *ee* i 80%-ową wydajnością oraz (*R*)-BINOL-u o takiej samej czystości optycznej z wydajnością chemiczną 70% (Schemat 22).



Schemat 22. Metoda syntezy optycznie czynnych BINOL-i oparta na rozdziale racemicznego bi-2-naftolu poprzez tworzenie molekularnych kryształów z pochodną optycznie czynnego γ -aminokwasu

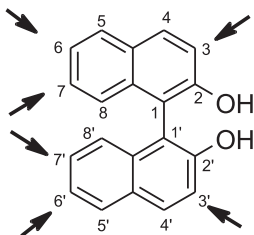
Scheme 22. Preparation of optically active BINOL-s based on the resolution of racemic bi-2-naphthol *via* formation of molecular crystals using optically active γ -amino acids

3. FUNKCJONALIZACJA PIERŚCIENIA NAFTALENOWEGO W CZĄSTECZCE BINOL-U

Metody otrzymywania funkcjonalizowanych ligandów BINOL-u można podzielić na dwie ogólne strategię [87]:

- 1) reakcje sprzęgania podstawionych jednostek β -naftolu (omówione w rozdziale 1. i 2.),
- 2) regioselektywne modyfikowanie szkieletu binaftylowego.

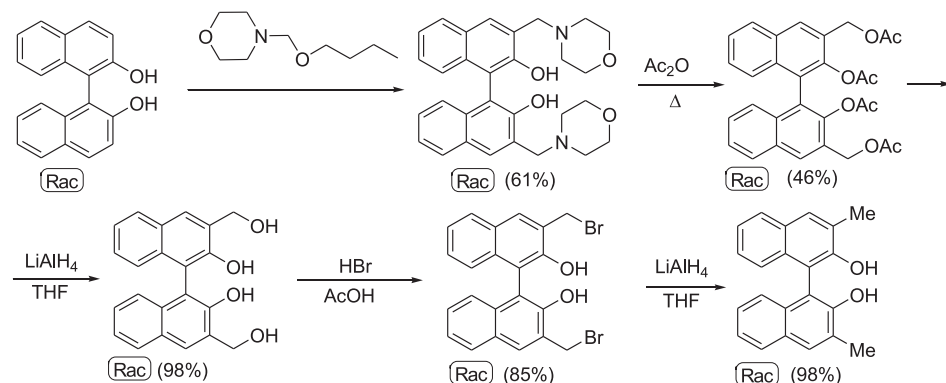
Obie możliwości mają podobne znaczenie i są intensywnie wykorzystywane. W tej części opracowania omówione zostaną wybrane metody bis-podstawienia w różnych pozycjach pierścieni naftalenowych BINOL-u.



Rysunek 1. Najczęściej funkcjonalizowane pozycje układów binaftylowych
Figure 1. Strategic placement of substituents in the binaphthyl backbone

3.1. PODSTAWIENIE BI-2-NAFTOLU W POZYCJI 3,3' PIERŚCIENIA NAFTYLOWEGO

Syntezy szeregu pochodnych BINOL-u funkcjonalizowanych w pozycji 3,3' pierścienia aromatycznego opracowane zostały przez Crama w 1978 roku. W wyniku bezpośredniego podstawienia BINOL-u z użyciem 4-(butoksymetylo) morfoliny otrzymano bis-3,3'-metyloaminową pochodną wykorzystaną do dalszych transformacji grup funkcyjnych [88]. Reakcja acetylowania dostarczała binaftyłowego produktu w formie tetraoctanu, który następnie ulegał redukcji za pomocą LiAlH_4 prowadząc do utworzenia tetrolu. Kolejne transformacje polegające na bromowaniu 3,3'-dihydroksymetylo-bi-2-naftolu, a następnie uwodornieniu 3,3'-dibromometylo-BINOL-u prowadziły do finalnego produktu metylopodstawienia binaftyłu w pozycjach 3 i 3' (Schemat 23).

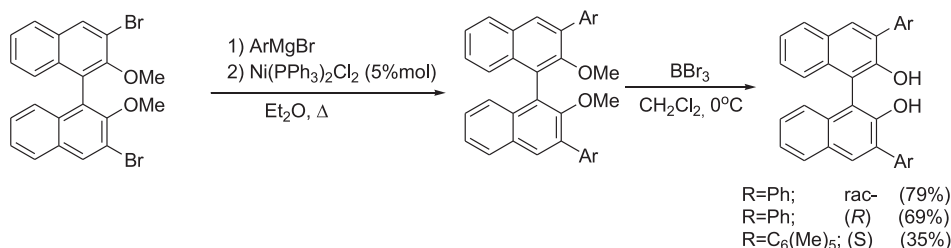


Schemat 23. Funkcjonalizowanie BINOL-u w pozycjach 3,3'
Scheme 23. Functionalization at the 3,3'-positions of BINOL

Różne makrocykliczne polietery binaftyłowe zsyntezowane ostatecznie z 3,3'-podstawionych BINOL-i posłużyły jako ligandy do supramolekularnego kompleksowania chiralnych soli alkiloamoniowych.

Dwa lata później grupa badawcza Crama [89] zastosowała reakcję sprzęgania Kumady 3,3'-dibromo-2,2'-dimetoksy-1,1'-binaftalenu z bromkiem fenylomagnezo-

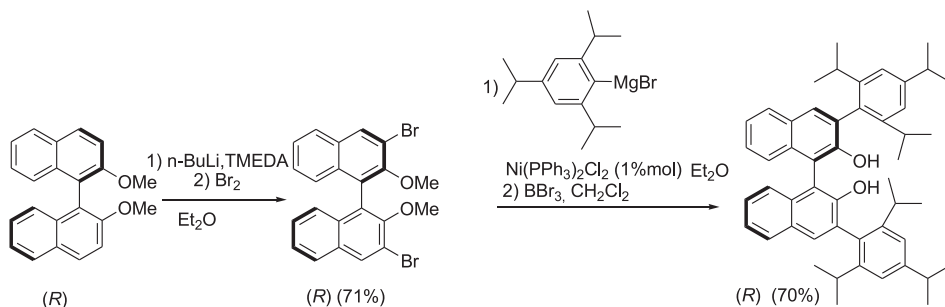
wym oraz pentametylofenylo-magnezowym w obecności katalizatora niklowego(II) (Schemat 24). Otrzymane 3,3'-diarylopodstawione pochodne BINOL-u posłużyły jako substraty do otrzymania nowych eterów koronowych w reakcji kondensacji z di-*p*-toluenosulfonianem glikolu pentaetylenowego. Połącznia te wykazywały zdolność kompleksowania aminokwasów lub ich estrów.



Schemat 24. Synteza 3,3'-difenylu i 3,3'-di(pentametylofenylo)-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftyli

Scheme 24. Synthesis of 3,3'-diphenyl and 3,3'-di(pentamethylphenyl)-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl

Tą samą procedurę wykorzystał Hoveyda w syntezie pochodnych BINOL-u zawierających podstawnik o dużej zawadzie sterycznej np. 2,4,6-tri-izopropylfenylo- (Schemat 25) [90]. Chiralne kompleksy molibdenowe tego ligandu wykorzystane zostały w reakcjach asymetrycznej metatezy prowadzącej do szerokiej gamy sześcioczłonowych karbo- i heterocykli o wysokich nadmiarach enancjomerycznych.

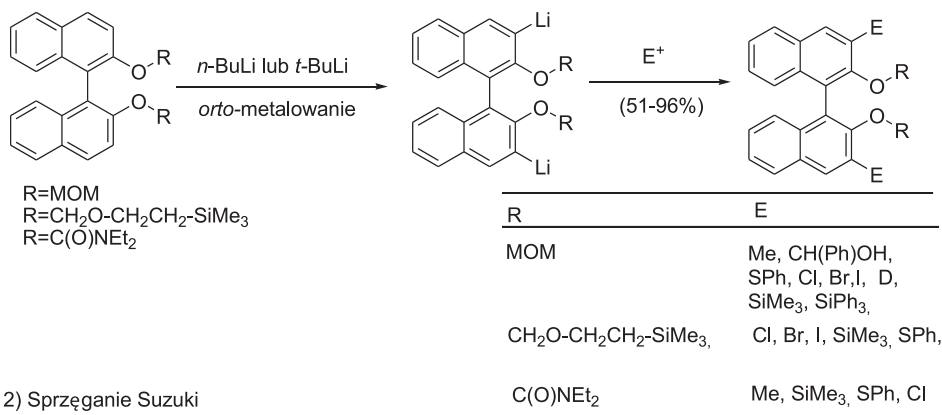


Schemat 25. Synteza (*R*)-3,3'-bis(2,4,6-triizopropylfenylo)-1,1'-binaftylo-2,2'-diolu

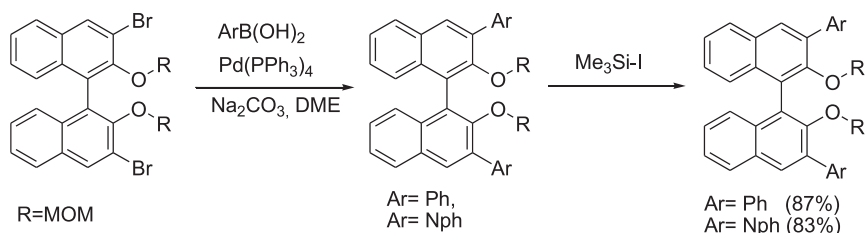
Scheme 25. Synthesis of (*R*)-3,3'-bis(2,4,6-triisopropylphenyl)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diol

Syntezy pochodnych BINOL-u z nowo utworzonym wiązaniem C-C, a także C-S, C-Si, C-halogen w pozycji 3 i 3' przeprowadzone w zespole Sniekusa wykazywały reakcję bezpośredniego *ortho*-litowania BINOL-u i następcze addycje odpowiednich elektrofilu lub alternatywnie metodę sprzęgania Suzuki (Schemat 26) [91].

1) Orto-metalowanie



2) Sprzężanie Suzuki

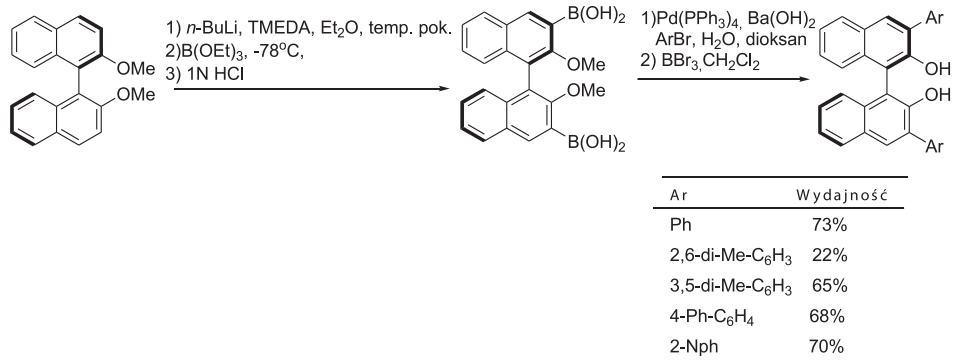


Schemat 26. Syntezy 3,3'-dipodstawionych pochodnych binaftolu

Scheme 26. Synthesis of 3,3'-disubstituted binaphthol derivatives

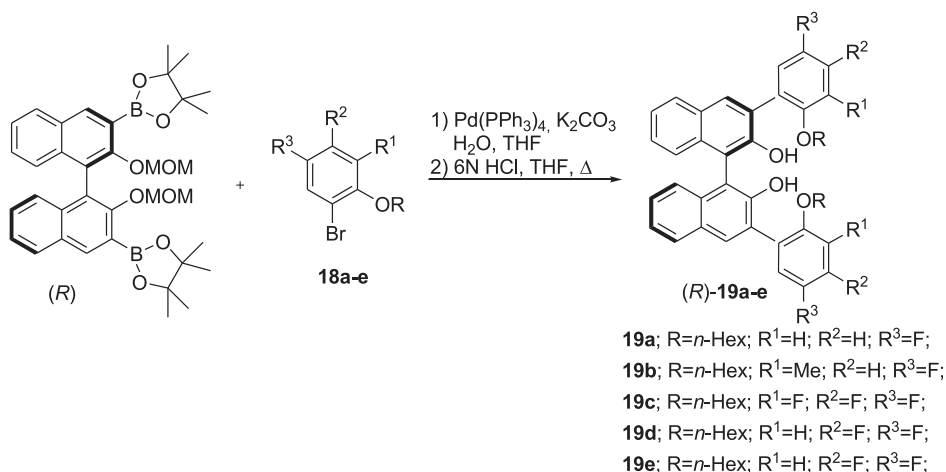
Syntezy pochodnych BINOL-u zawierających ugrupowania arylo(alkilo)silowe przeprowadził kilka lat później Pu, mając na uwadze wykorzystanie ich do otrzymania chiralnych kwasów Lewisa w enancjoselektywnej katalizie reakcji hetero-Dielsa-Aldera niepodstawionych aldehydów z dienami Danishefsky'ego. Kompleksy ligandów binaftyłowych z AlCl_3 dostarczyły produktów cykloaddycji z umiarkowanymi enancjoselektywnościami w zakresie od 25–78% [92].

Kwas 2,2'-dimetoksy-1,1-binaftylo-3,3'-diboronowy został użyty przez Jørgensena jako reagent wyjściowy w syntezie bis-(arylo)podstawionych BINOL-i w oparciu o reakcje Suzuki. Reakcja sprzężania między boronową pochodną binaftyłu i aromatycznymi bromkami przebiegała wydajnie w dioksanie w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 h z udziałem katalizatora palladowego. W tych samych warunkach zastosowanie bromków heteroaromatycznych takich jak 2-pirydyłowy i 2-tienylowy nie dało dobrych rezultatów i wydajności reakcji były bardzo niskie (Schemat 27) [93].



Schemat 27. Metoda otrzymywania kwasu diboronowego i jego sprzężenie z bromkami aryłowymi
Scheme 27. Preparation of diboronic acid and its coupling reaction with aryl bromides

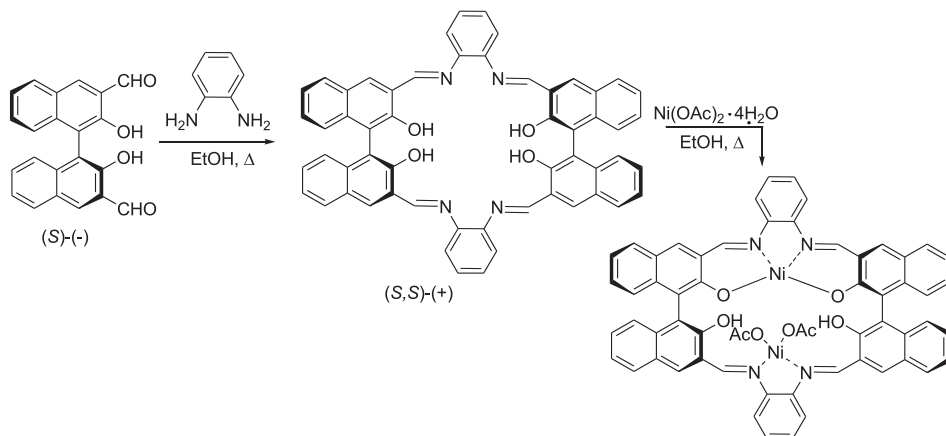
Pu sfunkcjonalizował pierścień naftalenowy BINOL-u fluorowanymi węglowodorami aromatycznymi również w reakcji sprzężania Suzuki, używając estru pinakolowego kwasu binaftyloboronowego oraz odpowiednich bromków arylowych **18a-e** (Schemat 28) [94].



Schemat 28. Reakcja sprzężania Suzuki binaftlowego diestru kwasu boronowego z bromkami fluoroaryłowymi

Scheme 28. Suzuki cross-coupling reaction of binaphthyl boronic acid diester with fluoroaryl bromides

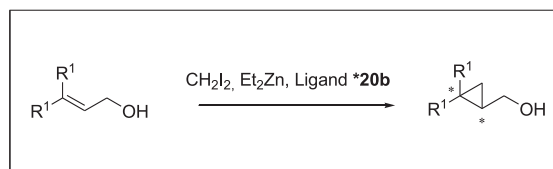
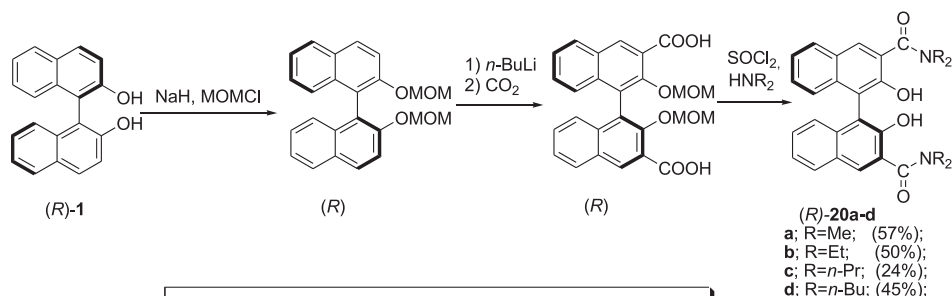
Z myślą o otrzymaniu polimerycznych sprzężonych układów binaftylowych Pu przeprowadził reakcję addycję 1,2-fenyleneodiaminy do (*S*)-3,3'-diformylo-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftyłu. Nieoczekiwanie produktem reakcji był związek makrocykliczny, który okazał się użytecznym ligandem w syntezie chiralnego kompleksu niklowego o właściwościach paramagnetycznych [95].



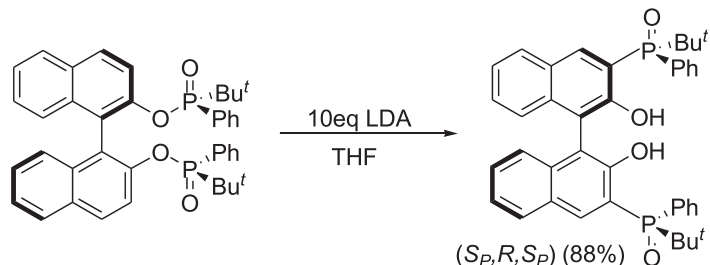
Schemat 29. Synteza salenowego kompleksu binaftylowego z niklem

Scheme 29. Synthesis of BINOL-based salen-Ni(II) complex

Syntezę 3,3'-diamidowych pochodnych BINOL-u opracowała grupa badawcza Katsuki'ego [96]. Kilkuetapową syntezę inicjowała reakcja karboksylowania zabezpieczonego BINOL-u, której produktem był kwas 2,2'-dimetoksymetoksy-1,1'-binaftylo-3,3'-dikarboksylowy. Otrzymany kwas w wyniku reakcji z chlorkiem tionylu przekształcony został w odpowiedni chlorek kwasowy, który łatwo reagował z odpowiednimi aminami drugorzędowymi dając finalnie bis-*N,N*-dialkiloamidowe pochodne BINOL-u **20a–d** z wydajnościami 24–57% (Schemat 30). Otrzymane atropizomeryczne bis-amidy zastosowane zostały między innymi jako chiralne ligandy w asymetrycznym cyklopropanowaniu Simmonsa-Smitha alkoholi (*E*)-allilowych.



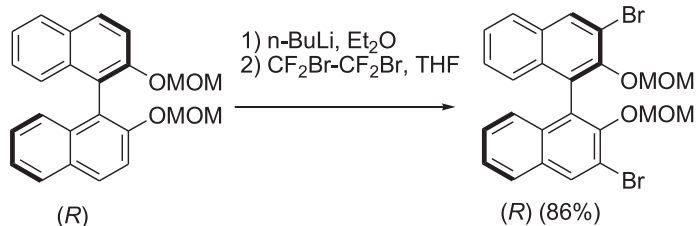
niego badania wykazały, że binaftylowa pochodna bisfosfinianu w obecności nadmiaru zasady ulega przegrupowaniu [1, 3], dostarczając odpowiedniego bisfosfinitenu z retencją konfiguracji na atomach fosforu. Reakcja przegrupowania [1, 3] jest w 100% diastereoselektywna [98].



Schemat 32. Przegrupowanie bisfosfinanu do tlenku fosfiny z udziałem diizopropylamidku litu

Scheme 32. Rearrangement of bisphosphinate to tertiary phosphine oxides upon treatment with lithium diisopropylamide

W patentowym opisie z 2006 zaproponowana została modyfikacja reakcji bromowania di-*O*-metoksymetylo-BINOL-u. W metodzie tej utworzony produkt *ortho*-litowania wyjściowego eteru potraktowany został 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetrafluoroetanem, spełniającym rolę odczynnika bromującego [99].



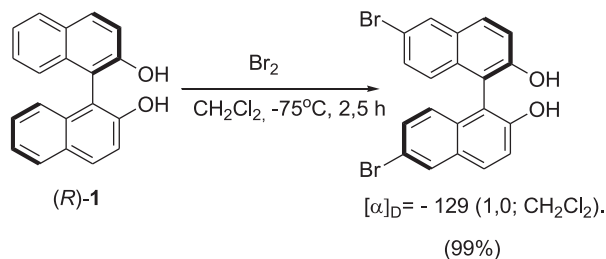
Schemat 33. Synteza 3,3'-dibromo-2,2'-dimetoksymetoksy-1,1'-binafitylu

Scheme 33. Synthesis of 3,3'-dibromo-2,2'-dimethoxymethoxy-1,1'-binaphthyl

3.2. FUNKCJONALIZOWANIE BINOL-U W POZYCJACH 6,6' PIERŚCIENI NAFTYLOWYCH

Wśród zbadanych reakcji funkcjonalizowania BINOL-u w pozycji 6,6'-pierścienia naftalenowego fundamentalną i podstawową przemianą jest aromatyczna substytucja elektrofilowa. Już w latach 30. XX wieku opracowano pierwsze metody elektrofilowego bromowania [100], nitrowania [101] i sulfonowania [102] BINOL-u. W 1979 roku Cram opisał zmodyfikowaną procedurę bromowania optycznie czynnego BINOL-u, otrzymując (*R*)-6,6'-dibromo-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftalen z bardzo wysoką wydajnością. (Schemat 34) [103]. Związek ten okazał się niezwykle cennym

i użytecznym materiałem wyjściowym w reakcjach sprzęganiach prowadzących do pochodnych z nowym wiązaniem węgiel–węgiel lub węgiel–heteroatom oraz do szeregu innych modyfikacji w tych pozycjach układu binaftyłowego.

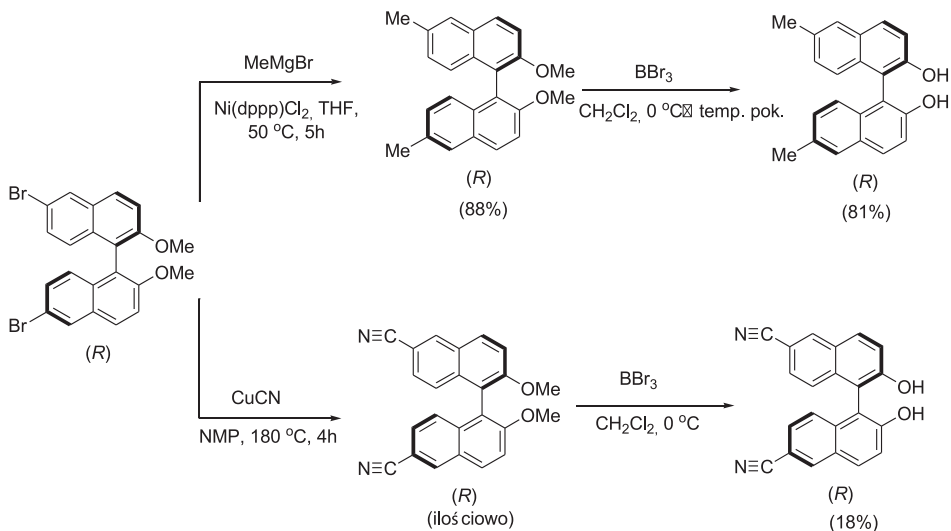


Schemat 34. Elektrofilowe bromowanie (R)-BINOL-u

Scheme 34. Electrophilic bromination of (R)-BINOL

Zablokowanie grup hydroksylowych BINOL-u poprzez alkilowanie lub eteryfikację częściej wykorzystywaną ochronną grupą metylometoksyłową (MOM) pozwoliło na wykorzystanie reakcji 6,6'-dibromowania zabezpieczonej dibromopodstawionej pochodnej BINOL-u w regioselektywnym funkcjonalizowaniu pierścieni aromatycznych za pomocą różnych odczynników elektrofilowych. Formylowanie (S)-6,6'-dibromo-2,2'-dietoksy-1,1'-binaftyłu polegające na dwuetapowej reakcji z udziałem związku litoorganicznego i dimetyloformamidu prowadziło do otrzymania 6,6'-dikarboaldehydowej pochodnej z 89% wydajnością [104].

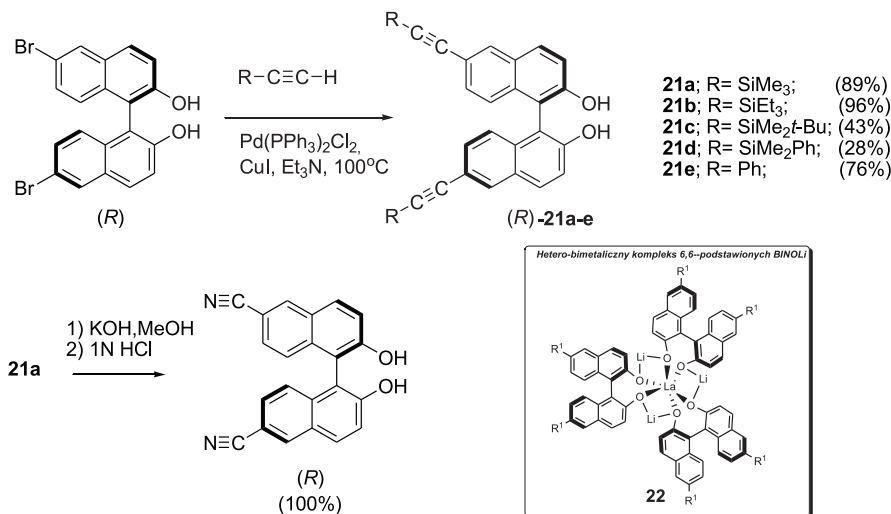
Ogromne zasługi dla rozwoju badań nad funkcjonalizacją BINOL-i i zastosowaniem ich w reakcjach asymetrycznych należy przypisać japońskiej grupie badawczej Shibasaki'ego [105, 106]. Przeprowadziła ona liczne eksperymenty nad syntezą nowych 6,6'-podstawionych pochodnych, stosując reakcje sprzęgania Kumady i Sonogashiry. W wyniku niesymetrycznego sprzęgania Kumady między (R)-6,6'-dibromo-2,2'-dimetoksy-1,1'-binaftyłem a bromkiem metylomagnezowym z udziałem Ni(dppp)Cl_2 jako katalizatora otrzymana została enancjomeryczna pochodna dimetylopodstawionego eteru binaftlowego, która po odbezpieczeniu grup hydroksylowych za pomocą BBr_3 dała odpowiedni (R)-6,6'-Me₂-BINOL. Reakcja nitrylowania z udziałem CuCN w *N*-metylopirylidynie w wysokiej temperaturze, przebiegała ilościowo, natomiast etap demetylowania otrzymanej 6,6'-dinitrylowej pochodnej okazał się mniej wydajny (18%) (Schemat 35).



Schemat 35. Zastosowanie (R)-6,6'-dibromo-2,2'-dimetoksy-1,1'-binaftalenu w reakcji Kumady oraz reakcji nitrylowania

Scheme 35. Applications of (R)-6,6'-dibromo-2,2'-dimethoxy-1,1'-binaphthalene in Kumada reaction and nitrilation

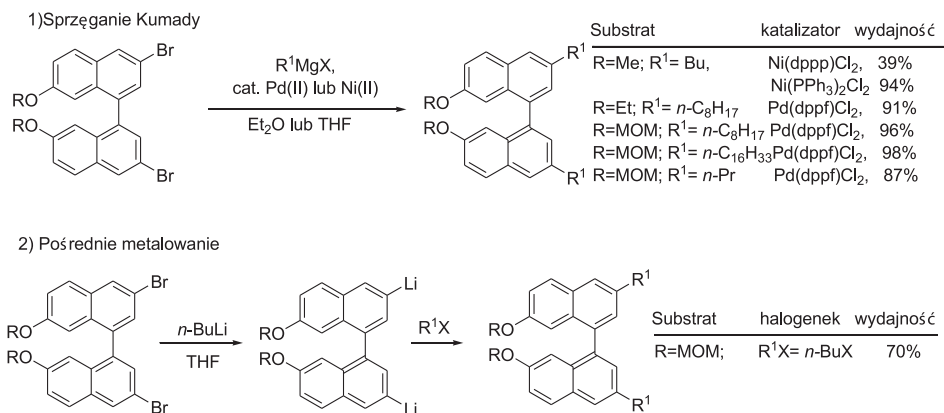
Kolejne modyfikacje pochodnych BINOL-u poprzez wprowadzenie silyloacetylenowych lub fenyloacetylenowych fragmentów polegały na reakcjach sprzęgania przy zastosowaniu katalizatora Pd(II) oraz jodku miedzi jako kokatalizatora. W wyniku reakcji Sonogashiry utworzone zostały bis-6,6'-funkcjonalizowane pochodne bi-2-naftolu z podstawnikami: trialkilosilyloetynyłowymi, dialkiloarylo-silyloetynyłowymi oraz fenyloetynyłowymi **21a-e** z dobrymi wydajnościami (Schemat 36). Otrzymane związki posłużyły do syntezy optycznie czynnych nowych bimetalicznych kompleksów litowo-lantanowych (**22**), które okazały się efektywnymi asymetrycznymi katalizatorami w enancjo- i diastereoselektywnym nitroaldolowaniu aldehydów. Z szerokiej gamy przebadanych różnych kompleksów BINOL-owych jednoznacznie najlepszą asymetryczną indukcję wykazywały pochodne z podstawnikami w pozycjach 6 i 6'.



Schemat 36. Funkcjonalizowanie 6,6'-dibromo-BINOL-u

Scheme 36. Functionalization of 6,6'-dibromo-BINOL

Do syntezy ligandów binaftyłowych zawierających grupy alkilowe w pozycji 6,6'-binaftyłu można zastosować dwa podejścia: a) sprzężenie Kumady z wykorzystaniem odczynników Grignarda i katalizatorów metali przejściowych takich jak Ni(dppp)Cl₂ [106], Pd(dppf)Cl₂ [107], Ni(PPh₃)₂Cl₂ [108]; lub b) dwuetapową procedurę poprzez pośrednie generowanie dilitopochodnej zablokowanej grupa eterową BINOL-u i potraktowanie jej odpowiednim halogenkiem alkilowym (Schemat 37).



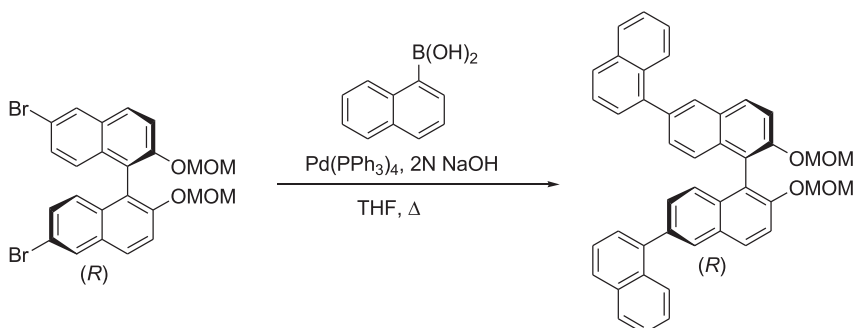
Schemat 37. Synteza 6,6'-bis-alkilopodstawionych pochodnych binaftolu

Scheme 37. Synthesis of bis-alkyl substituted binaphthol derivatives

Nietypowo do otrzymania 6,6'-di-*tert*-butylo-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyłu Kumara Swamy zastosował reakcję Friedela-Craftsa. Reakcja alkilowania BINOL-u

w obecności bezwodnego AlCl_3 dostarczała oczekiwanego produktu z wydajnością 86% oraz 6,6',3,3'-tetra-*tert*-butylo-BINOL-u jako produktu ubocznego. Produkty alkilowania można było rozdzielić wykorzystując różnice rozpuszczalności związków w heksanie [109].

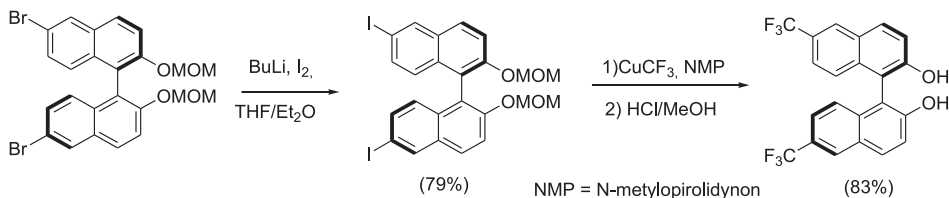
Funkcjonalizowane podstawnikami aryłowymi pochodne BINOL-u otrzymane zostały w wyniku sprzęgania bromków binaftylowych z pochodnymi kwasów aryloboranowych według standardowej procedury Suzuki-Miyaura. Optycznie czynny izomer (*R*)-6,6'-di-1-naftylo-2,2'-metoksymetoksy-1,1'-binaftyłu zsyntezowany został w warunkach jak na Schemacie z 91%-ową wydajnością [110].



Schemat 38. Przykład zastosowania reakcji sprzęgania Suzuki w arylowaniu pochodnych BINOL-u

Scheme 38. An example of Suzuki coupling protocol in BINOL derivatives arylation

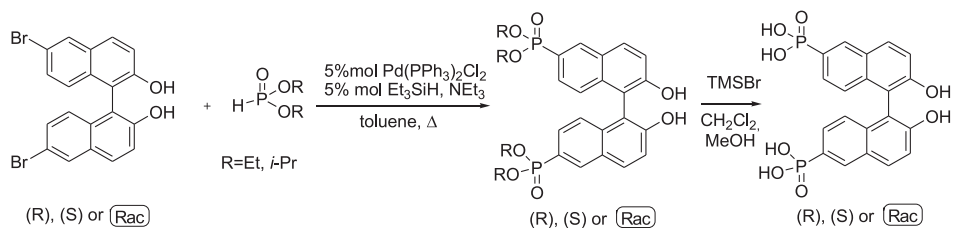
Kobayashi i in. zaproponowali syntezę bis-(6,6'-trifluorometano)-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyłu jako dogodnego ligandu w chiralnych kompleksach cyrkonowych, które następnie zastosowali do enancjoselektywnej reakcji Mannicha eterów siliowo-enolowych z aldiminami. Synteza tego ligandu przebiegała kilkietapowo: poprzez pośrednie litowanie dibromoopochodnej di-*O*-metoksymetylo-BINOL-u i następnie jodowanie w pozycjach 6,6' układu binaftyłowego. Trifluorometylowanie eteru dijodo-BINOL-u za pomocą CuCF_3 *in situ* generowanego z trifluoroocjanu sodu oraz jodku miedzi(I) oraz usunięcie grupy zabezpieczającej MOM przebiegające w metanolowym roztworze kwasu solnego prowadziło do otrzymania (*R*)-6,6'-(CF_3)₂-BINOL-u (Schemat 39) [111].



Schemat 39. Funkcjonalizowanie BINOL-u w pozycjach 6,6' podstawnikami trifluorometylowymi

Scheme 39. Functionalizations of BINOL at 6,6' positions with trifluoromethyl substituents

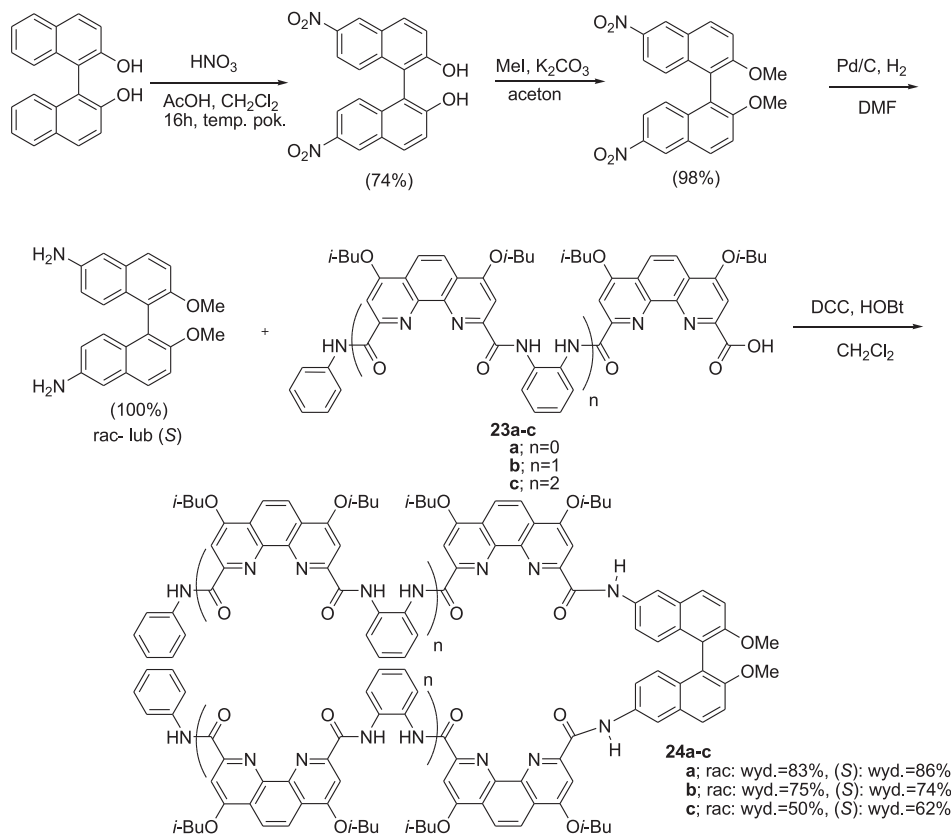
Efektom badań realizowanych przez zespół Villemin nad otrzymaniem połączeń fosforoorganicznych z nowo utworzonym wiązaniem węgiel–fosfor w pozycjach 6,6' pierścieni naftalenowych było opracowanie metody syntezy kwasów difosfonowych lub ich estrów pochodnych BINOL-u [112]. Bezpośrednie fosfonylowanie możliwe było w wyniku katalizowanego kompleksem palladu(II) sprzęgania między 6,6'-dibromo-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftyłem i odpowiednim fosforem dialkylowym. A w łagodnej hydrolizie z bromkiem trimetylosililowym otrzymany następnie został kwas 2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftylo-6,6'-difosfonowy w formie enancjomerów (*R*) oraz (*S*). Binaftyłowe pochodne kwasu difosfonowego badane są pod kątem zastosowania w chiralnych fazach stacjonarnych do HPLC lub jako pomocnicze ligandy w kompleksach organometalicznych cyrkonu lub tytanu.



Schemat 40. Fosfonylowanie 2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftyłu

Scheme 40. Phosphonation of 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl

W 2008 roku chińska grupa badawcza [113] opisała nitrowanie BINOL-u w pozycjach 6,6' za pomocą mieszaniny kwasu azotowego(V) w kwasie octowym, i redukcję 6,6'-dinitro-2,2'-dimetokso-1,1'-binaftyłu do odpowiedniej pierwszorzędowej diaminy. Otrzymana diamina została wykorzystana do syntezy chiralnych pochodnych binaftyłu zawierających helikalne oligomeryczne łańcuchy dikarboksyamidowe pochodne fenantroliny jako nowej klasy zmodyfikowanych drugorzędowych struktur proteinowych zdolnych do oddziaływania z DNA. Tak zaprojektowane oligomery **24a–c** jako enancjomery (*S*) lub mieszaniny racemiczne zostały otrzymane w wyniku kondensacji za pomocą DCC- konwencjonalnie stosowanego odczynnika w tworzeniu wiązań peptydowych – z równomolową ilością 1-hydroksybenzotriazolu. Wydajności reakcji wynosiły od 50% do 86% (Schemat 41).



Schemat 41. Reakcja nitrowania BINOL-u i zastosowanie di-nitropochodnej binaftolu w kolejnych przekształceniach

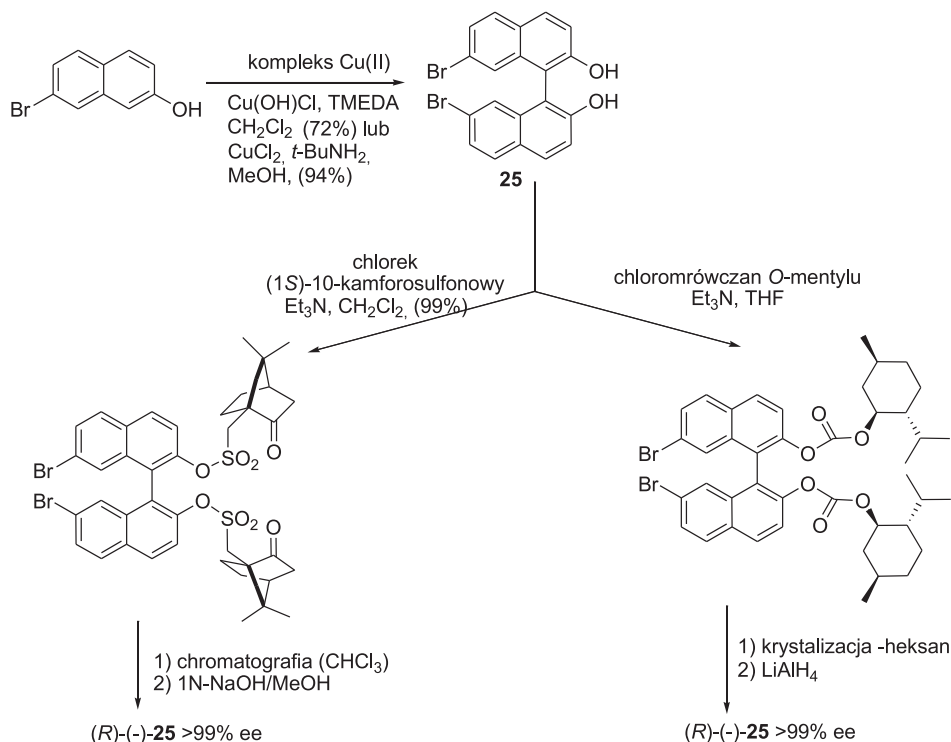
Scheme 41. Nitration of BINOL and the application of di-nitro substituted BINOL derivative in subsequent transformations

3.3. OTRZYMYWANIE POCHODNYCH BINOL-U FUNKCJONALIZOWANYCH PODSTAWNIKAMI W POZYCJACH 7,7' PIERŚCIENI AROMATYCZNYCH

Funkcjonalizowane w pozycjach 7,7' pochodne BINOL-u wykazują znaczący wpływ na przebieg stereochemiczny niektórych reakcji. Wysoka skuteczność tych ligandów w syntezie asymetrycznej, podobnie jak ligandów z podstawnikami w pozycjach 6,6', wynika ze wzrostu zawady przestrzennej wokół centralnego atomu metalu w ich kompleksach. Tego typu kompleksy tytanowe zastosowane zostały np. w cykloaddycji [2+3] olefin i nitronów jako chiralne kwasy Lewisa [114] lub enancjoselektywnej addycji allilotributylocyny do aldehydów [115].

Metoda syntezy (\pm)-7,7'-dibromo-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftylu oparta jest na reakcji symetrycznego utleniającego sprzęgania monomerycznego 7-bromo-2-hydroksynaftalenu z udziałem kompleksu miedzi(II) z aminą. Chemiczny rozdział

optyczny mieszaniny racemicznej poprzez przekształcenie w diastromeryczne sole pochodne kwasu kamforosulfonowego lub chloromrówczanu *O*-mentylowego umożliwił wyizolowanie optycznie czynnych izomerów 7,7'-dibromo-BINOL-u (Schemat 42). Enancjomeryczny (*R*)-7,7'-dibromo-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl stanowił materiał wyjściowy do dalszej reakcji sprzęgania Suzuki z kwasem fenyloboronowym lub *p*-toliloboranowym, w wyniku której otrzymane zostały optycznie czynne izomery (*R*)-7,7'-bis(fenyl)-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftylu oraz (*R*)-7,7'-bis(*p*-tolilo)-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftylu.

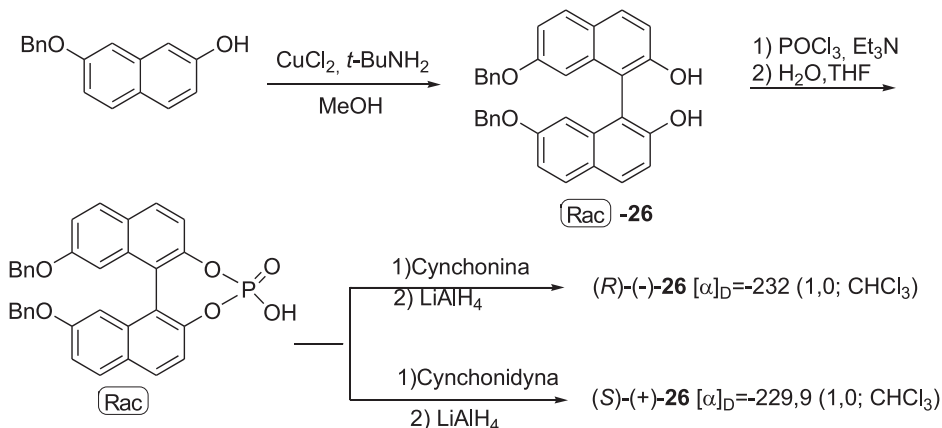


Schemat 42. Synteza optycznie czynnego 7,7'-difenylo-2,2'-dihydrokso-1,1'-binaftylu

Scheme 42. Synthesis of optically active 7,7'-diphenyl-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl

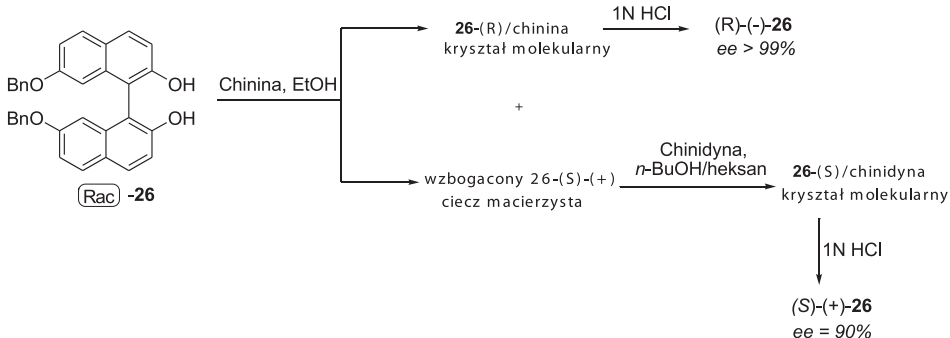
Diederich ze współpracownikami [116] opisał syntezę oraz rozdział na izomery optyczne racemicznego kwasu 7,7'-dibenzylkso-2,2'-(1,1'-binaftylu)-fosforowego. W wyniku homosprzęgania odpowiednich pochodnych β -naftalenu z udziałem chlorkiem miedzi(II) w obecności *tert*-butyloaminy otrzymany został 7,7'-bispodstawiony BINOL 26 jako mieszanina racemiczna. W kolejnym etapie produkt sprzęgania przekształcony został w „ester binolowy” kwasu fosforowego. Zdolność do selektywnego tworzenia soli diastromerycznych tego kwasu z różnymi alkaloidami chinowca pozwoliła na rozdział optyczny izomerów z wydajnością chemiczną 59% dla izomeru (*R*) i 55% dla jego enancjomeru. Redukcja wyizolowanych czystych diastromerycznych soli za pomocą LiAlH₄ dostarczyła odpowiednich enancjome-

rycznych produktów (Schemat 43). Kolejne udane eksperymenty nad rozdziałem optycznym racemicznego 7,7'-dibenzylloksy-BINOL-u **26** z użyciem chininy oraz chinidyny świadczyły o tworzeniu się selektywnych trwałych klaterów między chiralnymi molekułami (Schemat 44).



Schemat 43. Synteza (*R*) i (*S*) enancjomerów 7,7'-dibenzylloksy-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyłu poprzez rozdział diastereoizomerycznych „estrów kwasu fosforowego” z alkaloidami

Scheme 43. Synthesis of (*R*) and (*S*) enantiomers of 7,7'-dibenzylloxy-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl via resolution of diastereomeric phosphoric acid esters using alkaloids



Schemat 44. Bezpośredni rozdział optyczny racemicznego 7,7'-dibenzylloksy-2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftyłu poprzez enancjoselektywne tworzenie klatratów z chininą i chinidyną

Scheme 44. Direct optical resolution of racemic 7,7'-dibenzylloxy-2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl via enantioselective clathrate formation with quinine and quinidine

PODSUMOWANIE

Dobór odpowiedniej metody otrzymywania BINOL-u lub jego pochodnych dokonuje się biorąc pod uwagę między innymi aspekty ekonomiczne, czy techniczne. Najważniejszym jednak kryterium w wyborze procedury jest dobra wydajność i krótki czas reakcji. Podczas gdy mieszaniny racemiczne związków są łatwe w otrzy-

maniu, to synteza pojedynczych enancjomerów stwarza wiele trudności i jest zwykle dużo droższa. Wzrost zapotrzebowania na optycznie czynne substancje obserwuje się nie tylko w laboratoriach akademickich, ale i w przemyśle (szczególnie farmaceutycznym), dlatego też opracowanie dogodnych syntez czystych enancjomerycznych związków organicznych wciąż jest przedmiotem zainteresowań wielu ośrodków akademickich jak i przemysłowych laboratoriów badawczo-rozwojowych. Asymetryczna synteza staje się coraz bardziej praktyczna, natomiast rozdział optyczny mieszanin racemicznych jest konkurencyjny ze względów ekonomicznych.

PODZIĘKOWANIA

Artykuł został przygotowany w związku z realizacją grantu nr N N204 144437 (kierownik projektu profesor Józef Drabowicz) finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego z funduszy na badania naukowe w latach 2009–2012.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V.G. Dashevsky, A.I. Kitaygorodsky, *Theor. Eksp. Khim.*, 1967, **3**, 43.
- [2] A. Gamba, E. Rusconi, M. Simonetta, *Tetrahedron*, 1970, **26**, 871.
- [3] K. Gustav, J. Stübel, U.P. Wild, *Chem. Phys.*, 1978, **31**, 59.
- [4] R.E. Carter, T. Liljefors, *Tetrahedron*, 1976, **32**, 2915.
- [5] M. Kranz, T. Clark, P. von R. Schleyer, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3317.
- [6] L. Meca, D. Řeha, Z. Havlas *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 5677.
- [7] D.M. Hall, E.E. Turner, *J. Chem. Soc.*, 1955, 1242.
- [8] W. Dixon, M.M. Harris, R.Z. Mazengo, *J. Chem. Soc. B*, 1971, 775.
- [9] S.F. Mason, *Molecular Optical Activity and the Chiral Discriminations*; Cambridge University Press: New York, 1982, 73.
- [10] K. Mislow, *Angew. Chem.*, 1958, **70**, 683.
- [11] H. Akimoto, T. Shioiri, Y. Iitaka, S. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, 1968, **1**, 97.
- [12] R. Noyori, H. Takaya, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 345.
- [13] H. Takaya, T. Ohta, K. Mashima, R. Noyori, *Pure&Appl. Chem.*, 1990, **62**, 1135.
- [14] A. Miyashita, A. Yasuda, H. Takaya, K. Toriumi, T. Ito, T. Souchi, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7932.
- [15] E.P. Kyba, G.W. Gokel, F. de Jong, K. Koga, L.R. Sousa, M.G. Siegel, L. Kaplan, G.D.Y. Sogah, D.J. Cram, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 4173.
- [16] V. von Richter, *Chem. Ber.*, 1873, **6**, 1249.
- [17] R. Pummerer, E. Prell, A. Rieche, *Chem. Ber.*, 1926, **59**, 2159.
- [18] F. Toda, K. Tanaka, S. Iwata, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 3007.
- [19] D. Villemin, F. Sauvaget, *Synlett*, 1994, 435.
- [20] M.O. Rasmussen, O. Axelsson, D. Tanner, *Synth. Commun.*, 1997, **27**, 4027.
- [21] B. Feringa, H. Wynberg, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 2547.
- [22] A. Hassner, *Advances in Asymmetric Synthesis*, JAI Press: Greenwich, CT, 1997, 2.

- [23] K. Yamamoto, H. Fukishima, Y. Okamoto, K. Hatada, M. Nakazaki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 1111.
- [24] P. Mastrorilli, F. Muscio, G.P. Suranna, C.F. Nobile, M. Latronico, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2001, **165**, 81.
- [25] B. Feringa, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.*, 1977, 4447.
- [26] B. Feringa, H. Wynberg, *Bioorg. Chem.*, 1978, **7**, 397.
- [27] M. Hovorka, R. Scigel, J. Gunterova, M. Tichy, J. Zavada, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 9503.
- [28] J. Doussot, A. Guy, C. Ferroud, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 2545.
- [29] M. Matsushita, K. Kamata, K. Yamaguchi, N. Mizuno, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 6632.
- [30] K. Ding, Y. Wang, L. Zhang, S. Wu, T. Matsuura, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 1005.
- [31] H. Eshghi, M. Bakavoli, H. Moradi, *Chin. Chem. Lett.*, 2009, **20**, 663.
- [32] W. Kailiang, H. Yanna, L. Zheng, W. Meng, L. Zhihui, S. Bo, Y. Ao, L. Yu, W. Qingmin, *Synthesis*, 2010, **7**, 1083.
- [33] M. Noji, M. Nakajima, K. Koga, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 7983.
- [34] M. Nakajima, I. Miyoshi, K. Kanayama, S.-I. Hashimoto, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2264.
- [35] V. Enev, Ch.L.J. Ewers, M. Harre, K. Nickisch, J.T. Mohr, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7092.
- [36] V. Enev, J. Mohr, M. Harre, K. Nickisch, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, **9**, 2693.
- [37] C. Bolm, O.A.G. Dabard, *Synlett*, 1999, 360.
- [38] M.D. Bhor, N.S. Nandurkar, M.J. Bhanushali, B.M. Bhanage, *Cat. Lett.*, 2006, **112**, 45.
- [39] J. Brussee, J.L.G. Groenendijk, J.M. te Koppele, A.C.A. Jansen, *Tetrahedron* 1985, **41**, 3313.
- [40] J. Brussee, A.C.A. Jansen, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 3261.
- [41] M. Smrcina, M. Lorenc, V. Hanus, P. Sedmera, P. Kocovsky, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 1917.
- [42] M. Smrcina, J. Polakova, S. Vyskocil, P. Kocovsky, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4534.
- [43] M. Nakajima, K. Kanayama, I. Miyoshi, S.I. Hashimoto, *J. Org. Chem.* 1999, **64**, 2264.
- [44] X.L. Li, J. Yang, M.C. Kozlowski, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1137.
- [45] J. Gao, J.H. Beibenspies, A.E. Martell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, **42**, 6008.
- [46] B.H. Lipshutz, F. Kayser, Z. Liu, *Angew. Chem.*, 1994, **106**, 1962.
- [47] Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2002, **41**, 4532.
- [48] Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Chem. Commun.*, 2002, 914.
- [49] N.B. Barhate, C.T. Chen, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 2529.
- [50] S.W. Hon, C.H. Li, J.H. Kuo, N.B. Barhate, Y.H. Liu, Y. Wang, C.T. Chen, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 869.
- [51] C.Y. Chu, B.J. Uang, *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, **14**, 53.
- [52] C.Y. Chu, D.R. Hwang, S.K. Wang, B.J. Uang, *Chem. Commun.*, 2001, 980.
- [53] T. Hamada, H. Ishida, S. Usui, Y. Watanabe, K. Tsumura, K. Ohkubo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1993, 909.
- [54] R. Irie, K. Masutani, T. Katsuki, *Synlett*, 2000, 1433.
- [55] K. Masutani, T. Uchida, R. Irie, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 5119.
- [56] E. Hiromichi, T. Katsuki, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, **131**, 6082.
- [57] H. Wang, *Chirality*, 2010, **22**, 827.
- [58] M. Sridhar, S.K. Vadivel, U.T. Bhalerao, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 5695.
- [59] M.M. Schmitt, E. Schuler, M. Braun, D. Haring, P. Schreier, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2945.
- [60] M. Takemoto, Y. Suzuki, K. Tanaka, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 8499.
- [61] J.M. Brunel, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 857.
- [62] R.J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 4953.
- [63] R.J. Kazlauskas, *Org. Synth.*, 1992, **70**, 60.
- [64] G. Lin, S.-H. Liu, S.-J. Chen, F.-C. Wu, H.-L. Sun, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 6057.
- [65] M. Cavazza, M. Zandomenighi, *Gazz. Chim. Ital.*, 1993, **123**, 723.
- [66] N. Aoyagi, N. Ogawa, T. Izumi, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 4797.

- [67] M. Juarez-Hernandez, D.V. Johnson, H.L. Holland, J. McNulty, A. Capretta, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 289.
- [68] J. Jacques, C. Fouquey, *Org. Synth.*, 1988, **67**, 1.
- [69] J. Jacques, C. Fouquey, *Tetrahedron Lett.*, 1971, **12**, 4617.
- [70] B.Q. Gong, W.Y. Chen, B.F. Hu, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 423.
- [71] D. Fabbri, G. Delogu, O. De Lucchi, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 1748.
- [72] J.M. Brunel, G. Buono, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 7313.
- [73] Z. Li, X. Liang, F. Wu, B. Wan, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 665.
- [74] H.F. Chow, C.W. Wan, M.K. Ng, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 8712.
- [75] Z. Pakulski, A. Zamojski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 111.
- [76] B. M. Panchal, C. Einhorn, J. Einhorn, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 9245.
- [77] K. Tsubaki, H. Morikawa, H. Tanaka, K. Fuji, *Tetrahedron Asymmetry*, 2003, **14**, 1393.
- [78] M. Periasamy, A.S.B. Prasad, J.V.B. Kanth, C.K. Reddy, *Tetrahedron: Asymmetry* 1995, **6**, 341.
- [79] F. Toda, K. Tanaka, T.C.W. Mak, *Chem. Lett.*, 1984, 2085.
- [80] F. Toda, K. Tanaka, S. Nagamatsu, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 4929.
- [81] K. Tanaka, T. Okada, F. Toda, *Angew. Chem. Inr. Ed Engl.*, 1993, **32**, 1147.
- [82] F. Toda, K. Tanaka, Z. Stein, I.I. Goldberg, *Org. Chem.*, 1994, **59**, 5748.
- [83] D. Cai, D.L. Hughes, T.R. Verhoeven, P.J. Reider, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 7991.
- [84] Q.S. Hu, D. Vitharana, L. Pu, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 2123.
- [85] Y. Wang, J. Suna, K. Ding, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 4447.
- [86] R. Bhairab, N.Singh, G. Pal, L. Piyush, M. Suresh, A. Rangan, PCT/IN2010/000141 Int. Appl. (21.07.2011), WO2011086566A1
- [87] Y. Chen, S. Yekta, A.K. Yudin, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 3155.
- [88] D.J. Cram, R.C. Helgeson, S.C. Peacock, L.J. Kaplan, L.H. Domeier, P. Moreau, K. Koga, J.M. Mayer, Y. Chao, M.G. Siegel, D.H. Hoffman, G.D.Y. Sogah, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 1930.
- [89] D.S. Lingenfelter, R.C. Helgeson, D.J. Cram, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 393.
- [90] S.S. Zhu, D.R. Cefalo, D.S. La, J.Y. Jamieson, W.M. Davis, A.H. Hoveyda, R.R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, **121**, 8251.
- [91] P.J. Cox, W. Wang, V. Snieckus, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 2253.
- [92] L.-Z. Gong, L. Pu, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41** 2327.
- [93] K.B. Simonsen, K.V. Gothelf, K.A. Jørgensen, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 7536.
- [94] W. Huang, L. Pu, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 145.
- [95] H.-C. Zhang, W.-S. Huang, L. Pu, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 481.
- [96] H. Kitajima, Y. Aoki, K. Ito, T. Katsuki, *Chem. Lett.*, 1995, 1113.
- [97] R. Kargbo, Y. Takahashi, S. Bhor, G.R. Cook, G. C. L.-Jones, I. R. Shepperson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3846.
- [98] T.-L. Au-Yeung, K.-Y. Chan, R.K. Haynes, I.D. Williams, L.L. Yeung, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 457.
- [99] T. Akiyama, *Eur. Pat. Appl.* No EP 1623971 A1, (08.02.2006).
- [100] A. Corbellini, Pasturini, *Gazzetta Chimica Italiana*, 1930, **60**, 843.
- [101] I.S. Ioffe, *Zhurnal Obshechi Khimii*, 1936, **6**, 1002.
- [102] I.S. Ioffe, S.G. Kusnezow, A.A. Panow, *Zhurnal Obshechi Khimii*, 1939, **6**, 999.
- [103] G.D.Y. Sogah, D.J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 3035.
- [104] H.-J. Deussen, E. Hendrickx, C. Boutton, D. Krog, K. Clays, K. Bechgaard, A. Persoons, T. Bjørnholm, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 6841.
- [105] H. Sasai, R. Arai, Y. Satow, K.N. Houk, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6194.
- [106] H. Sasai, T. Tokugana, W. Shizue, T. Suzuki, N. Itoh, M. Shibasaki, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 7388.
- [107] J.W. How, T. Hayashi, *Chem. Lett.*, 2001, **10**, 976.

- [108] N.M. Brunkan, M.R. Gagne, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 6217.
- [109] E. Balaraman, K.C. Kumara Swamy, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 2037.
- [110] T. Taniguchi, T. Fukuba, S. Nakatsuka, S. Hayase, M. Kawatsura, H. Uno, T. Itoh, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3875.
- [111] H. Ishitani, M. Ueno, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 8180.
- [112] P.A. Jaffres, N. Bar, D. Villemin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1998, 2083.
- [113] H.-Y. Hu, J.-F. Xiang, Y. Yang, Ch.-F. Chen, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 69.
- [114] K. Mikami, M. Ueki, Y. Matsumoto, M. Terada, *Chirality*, 2001, **13**, 541.
- [115] M. Bandin, S. Casolari, P.G. Cozzi, G. Proni, E. Schmohel, G.P. Spada, E. Tagliavini, A.U. Ronchi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3, 491.
- [116] J. Reeder, P.P. Castro, C.B. Knobler, E. Martinborough, L. Owens, F. Diederich, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3151.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lutego 2012

**HIPERWALENTNE ZWIĄZKI SIARKI,
SELENU I TELLURU. CZĘŚĆ 1.
CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA**

**HYPERVALENT COMPOUNDS OF SULFUR,
SELENIUM AND TELLURIUM. PART 1.
GENERAL CHARACTERISTICS**

Adrian Zając

*Zakład Chemii Heteroorganicznej,
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: adrian@cbmm.lodz.pl*

Abstract

1. Pojęcie hiperwalentności, hiperwalentność a reguła oktetu
 2. Mechanizmy izomeryzacji związków hiperwalentnych
 3. Aktywność optyczna związków hiperwalentnych
- Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Adrian Zając ukończył Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie w 2005 roku. Tytuł doktora nauk chemicznych nadano mu w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi w 2011 roku po obronie rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Wybrane połączenia siarkoorganiczne z nisko- i/lub wysokokoordynacyjnym atomem siarki” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Drabowicza. Obecnie pracuje w Zakładzie Chemii Heteroorganicznej CBMiM PAN.

W kręgu jego zainteresowań znajduje się chemia prochiralnych i chiralnych związków heteroorganicznych, w szczególności siarko- i fosforoorganicznych, w tym związków hiperwaleńnych. Jest współautorem kilkunastu publikacji, zarówno oryginalnych, przeglądowych, jak i rozdziałów w książkach, takich jak *Science of Synthesis* czy *Patai's Chemistry of Functional Groups*.

ABSTRACT

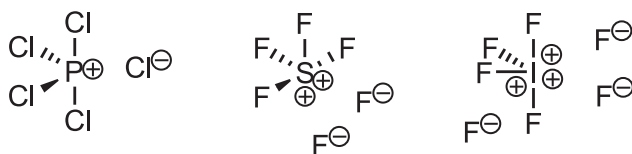
The goal of this four-part review is a presentation of the results of recent studies on the properties and chemistry of hypervalent sulfur, selenium and tellurium compounds.

The term “hypervalency” has been known since 1969 when Musher used it to describe molecules bearing heteroatoms which formally did not fulfill the octet rule. This violation was explained by the postulate concerning the existence of a 3-center 4-electron bond between a hypervalent heteroatom and two axial electronegative ligands. The bond is the a combination of two ligand orbitals and a p_z orbital of a central heteroatom which results in the formation of three molecular orbitals. The distances between the central atom and these two ligands are longer than the length of the typical sp^2 bonds, such as equatorial ones. Moreover, the effective electron density is shifted from the central atom towards the axial ligands what results in the fulfillment of the octet rule of this atom. The geometry of this system is trigonal bipyramid (Fig. 2), except from compounds having three 3-center 4-electron (3c-4e) bonds which have tetragonal bipyramid geometry (Fig. 3). The term “geometry” includes positions of ligands and lone electron pairs. The stability of hypervalent compounds is affected by a few factors: electronegativity of ligands, formation of five-membered cyclic structures involving the central atom and the number of electron shells of the central atom. Martin proposed three-symbol notation N-X-L for these structures, which was further modified (Tab. 1). Hypervalent compounds can isomerize according to various mechanisms: Berry pseudorotation (Scheme 1), turnstile rotation (Scheme 2), cuneal inversion (Scheme 3), lever mechanism (Scheme 4), or Bailar twist (Scheme 5). Furthermore, hypervalent structures of 10-X-4 and 10-X-5 type with trigonal bipyramid geometry, C_1 or C_2 symmetry and at least three different ligands can exist as optically active species (Tab. 2, Fig. 5–7, Scheme 6), especially the “spiro” ones, which are resistant to isomerization. In 1977 Martin and Balthazor proposed extended Cahn-Ingold-Prelog convention for description of the absolute configuration of chiral hypervalent compounds (Fig. 5).

Keywords: hypervalency, 3c-4e bond, sulfurane, persulfurane, selenurane, perselenurane, tellurane, pertellurane, Berry pseudorotation, Martin sulfurane, trigonal bipyramid, tetragonal bipyramid, synthesis, chirality, optical activity, isomerization
Słowa kluczowe: hiperwalentność, wiązanie 3c-4e, sulfuran, persulfuran, selenuran, perselenuran, telluran, pertelluran, pseudorotacja Berry'ego, sulfuran Martina, bipyramida trygonalna, bipyramida tetragonalna, synteza, chiralność, aktywność optyczna, izomeryzacja

1. POJĘCIE HIPERWALENTNOŚCI, HIPERWALENTNOŚĆ A REGUŁA OKTETU

Termin „hiperwaleantność” został po raz pierwszy użyty przez Mushera w 1969 roku w odniesieniu do cząsteczek zbudowanych z pierwiastków grup głównych i nie spełniających reguły oktetu [1, 2]. Określił on cząsteczki hiperwaleantne jako struktury tworzone przez pierwiastki grup 15–18 układu okresowego posiadających inny stopień utlenienia niż ich najniższa trwała wartościowość. W 1984 roku Schleyer zaproponował termin „hiperkoordynacyjność”, co uczyniło klasę związków hiperwaleantnych jeszcze szerszą [2]. W 1916 roku Lewis, opierając się na analizie wzorów cząsteczek wysunął koncepcję, że w większości z nich wiązanie chemiczne między atomami tworzą dwa uwspólnione elektrony lub też para elektronów pochodząca od jednego z nich. Zjawisko to nazwał „regułą dwóch”. Dodatkowo zauważył, że suma elektronów wiązalnych i niewiązalnych danego atomu wynosi osiem, co określił „regułą ośmiu”. Termin ten zmienił Langmuir proponując nową nazwę: „reguła oktetu”. Już formułując swoje reguły Lewis stwierdził, że istnieją od nich odstępstwa. Cząsteczki BF_3 , PCl_5 i SF_6 posiadają mniej (hipowaleantne) lub więcej (hiperwaleantne) niż osiem elektronów w powłoce walencyjnej, a zatem nie spełniają reguły oktetu [3]. Próbuąc wyjaśnić ten fenomen wysunięto wnioski, że orbitale atomu centralnego ulegają hybrydyzacji typu sp^3d oraz sp^3d^2 . Jednakże obliczenia *ab initio* wykazały niewielki udział orbitali d w tworzeniu wiązań w cząsteczkach hiperwaleantnych. Obecnie jedna z uznawanych teorii zakłada polaryzację wiązań między atomem centralnym a związanymi z nim elektroujemnymi ligandami i istnienie struktur rezonansowych (Rys. 1). Spełniają one wtedy regułę oktetu [1, 3].

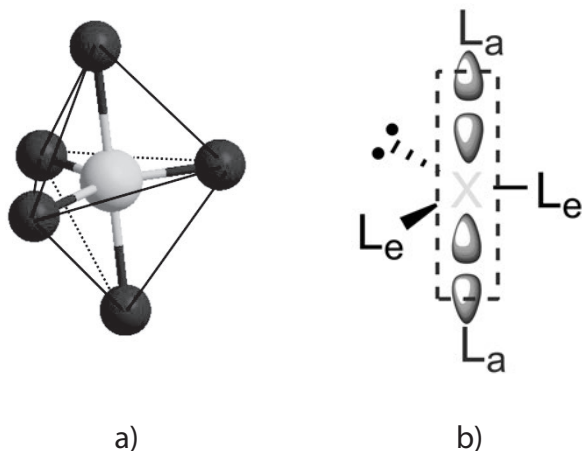


Rysunek 1
Figure 1

Alternatywną teorię sformułowali niezależnie w 1951 roku Pimentel i Rundle w oparciu o analizę struktury rentgenograficznej sulfuranu SF_4 [4]. Ten „prototypowy” hiperwaleantny związek siarki został opisany już w 1911 roku i okazał się posiadać strukturę bipiramidy trygonalnej, uwzględniając wolne pary elektronowe (TBP) (Rys. 2a) [5]. Na podstawie danych eksperymentalnych i obliczeń teoretycznych autorzy wysunęli postulat o istnieniu liniowego 3-centrowego 4-eletronowego wiązania (3c–4e) między atomem centralnym a położonymi apikalnie ligandami (Rys. 2b). W takim przypadku ma miejsce niedobór liczby orbitali w stosunku do liczby elektronów, w związku z czym tworzy się ono jako kombinacja dwóch orbitali

pochodzących od ligandów oraz pojedynczego orbitalu p_z atomu centralnego, co skutkuje powstaniem trzech orbitali molekularnych:

- orbitalu wiążącego zajmowanego przez parę elektronów (ψ_b),
- orbitalu HOMO powstałego z niewiążącego orbitalu NBMO i zajmowanego przez parę elektronów (ψ_n),
- orbitalu antywiążącego nie zajmowanego przez elektrony (ψ_a) [1, 3].



Rysunek 2
Figure 2

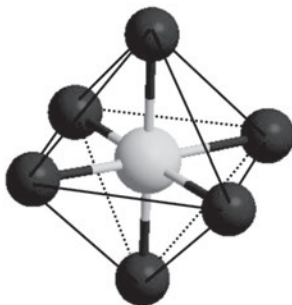
Stwierdzono, że formalne wiązania tworzące wiązanie 3c–4e są dłuższe niż wiązania ekwatorialne, utworzone w typowy sposób (hybrydyzacja sp^2). Badania wykazały również, że gęstości elektronowe w wiązaniu 3c–4e są przesunięte w kierunku apikalnych ligandów (zależnie od ich elektroujemności), co zmniejsza efektywną gęstość elektronową powłoki walencyjnej atomu centralnego, w związku z czym spełnia on regułę oktetu. Tu pojawiło się pytanie o zasadność terminu „hiperwaleńtość” i czy bardziej odpowiednim byłoby określenie „hiperkoordynacyjność”? Ostatecznie, po zbadaniu wielu tego typu związków, uznano oba określenia za poprawne [1, 3].

Na trwałość wiązania 3c–4e ma wpływ kilka czynników, a głównymi są:

- elektroujemność i/lub elektronoakceptorowość ligandów apikalnych – im większa tym wiązanie stabilniejsze [6, 7];
- możliwość tworzenia pięcioczłonowych struktur cyklicznych lub bicyklicznych – spirochalkogenurany są trwalsze i mniej reaktywne niż ich acykliczne analogi [7, 8];
- ilość powłok elektronowych – trwałość chalkogenuranów rośnie w szeregu: $S < Se < Te$ [6, 7].

Specyficznym przypadkiem chalkogenuranów są perchalkogenurany. Związki te posiadają chalkogen jako atom centralny i 6 podstawników (lub 5 podstawników i wolną parę elektronową), które tworzą mniej lub bardziej idealną strukturę

oktaedru (bipiramidy tetragonalnej) (Rys. 3). Przyjmuje się, że tworzą się tu trzy prostopadłe do siebie wiązania 3c–4e, oraz że tego typu struktury są trwalsze niż odpowiednie chalcogenurany. Przykładem mogą tu być tetrafenylotellur i heksafenylotellur. W tetrafenylotellurze wiązanie 3c–4e ma długość 2,30 Å i ulega on reakcji sprzęgania ligandów w utworzeniu difenylotelluridu (tellurku difenylowego) i bifenyłu w benzenie przy temperaturze około 100°C, natomiast heksafenylotellur posiada wiązanie 3c–4e o długości 2,228 Å i jest trwały do temperatury topnienia, czyli do 312°C [1, 9].



Rysunek 3
Figure 3

Martin, współtwórca i posiadacz niekwestionowanych zasług i wkładu w rozwój chemii organicznych związków hiperwalentnych, zaproponował trójznakowy system klasyfikacji tych związków N-X-L, gdzie N – liczba formalnie przypisywanych atomowi X elektronów, X – atom centralny, a L – liczba podstawników kowalencyjnie związanych z atomem centralnym X (Tab. 1) [9].

Tabela 1.
Table 1.

Związek	Oznaczenie w systemie N-X-L
atom X z wolną parą elektronową, połączony z czterema ligandami	10-X-4
atom X połączony z pięcioma ligandami	10-X-5
atom X z wolną parą elektronową, połączony z pięcioma ligandami	12-X-5
atom X połączony z sześcioma ligandami	12-X-6

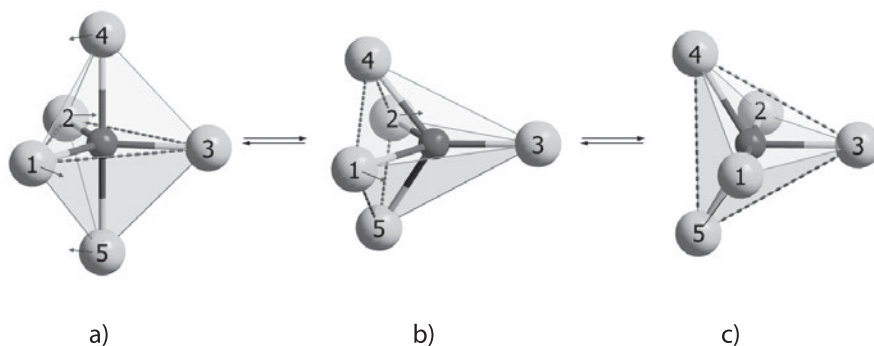
Później, w celu podkreślenia z jakimi ligandami związany jest atom X, do notacji tej wprowadzono dodatkowy symbol N-X-L(YM), gdzie Y – atom liganda połączony z atomem X, M – liczba atomów Y. Dla przykładu, w celu opisu sulfuranu posiadającego wolną parę elektronową, w którym atom centralny jest połączony z czterema atomami węgla należy użyć symbolu: 10-S-4(C4) [6].

2. MECHANIZMY IZOMERYZACJI ZWIĄZKÓW HIPERWALENTNYCH

Główne mechanizmy izomeryzacji związków hiperwaleńnych to:

- pseudorotacja Berry'ego (Ψ) [1, 5, 6, 9, 10],
- rotacja kołowrotowa [1, 5, 9],
- inwersja klinowa [8, 9],
- mechanizm dźwigniowy [5],
- skręt Bailara [1].

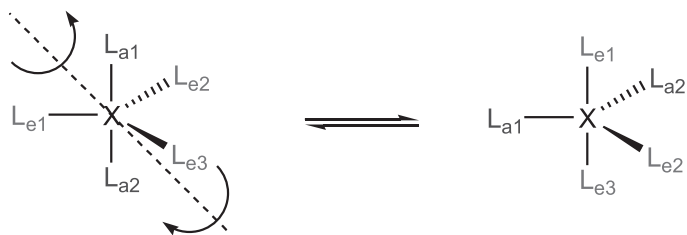
W 1959 roku Berry badając wymianę ligandów w pentafluorku fosforu sformułował mechanizm wyjaśniający to zjawisko nazwane potem pseudorotacją Berry'ego (BPS). Przebieg przedstawia Schemat 1:



Schemat 1. Źródło: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/59/Berry_pseudorotation.png/700px-Berry_pseudorotation.png
Scheme 1.

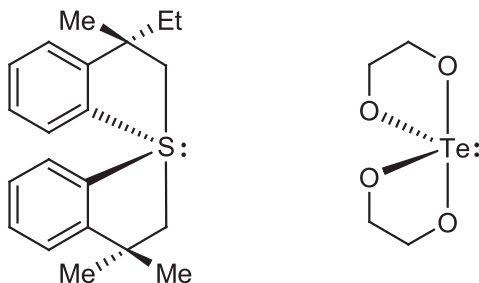
Jest to wymiana ligandów apikalnych i ekwatorialnych, przy czym oba ligandy apikalne ulegają wymianie. Jest ona charakterystyczna dla związków typu 10-X-4 oraz 10-X-5, przy czym w przypadku połączeń 10-X-4 wolna para elektronowa pozostaje w pozycji ekwatorialnej (jest to tzw. *pivot*, w polskim tłumaczeniu: trzon pseudorotacji). Pseudorotacja przebiega przez tetraedyczny stan przejściowy (Schemat 1b). W efekcie otrzymuje się także bipiramidę trygonalną, jednakże z zamienionymi miejscami ligandami apikalnymi i ekwatorialnymi. Bariera energetyczna pseudorotacji maleje w szeregu S > Se > Te [6, 9].

Dziesięć lat później Ugi i Ramirez zaproponowali alternatywny mechanizm, który nazwano rotacją kołowrotową (TR) (Schemat 2). Jeden z apikalnych i jeden z ekwatorialnych ligandów ulegają obrotowi przeciwnie do pozostałych ligandów. Następuje tu jednoczesna wymiana obu ligandów apikalnych na ekwatorialne i *vice versa* [5, 9].

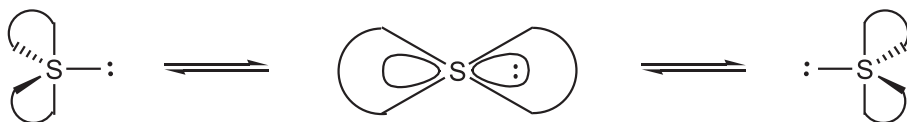


Schemat 2
Scheme 2

Badania ^{13}C NMR spirochalkogenuranów (Rys. 4), w podwyższonej temperaturze wykazały, że niemożliwe jest w takim wypadku zastosowanie mechanizmu BPR, bo należałoby przyjąć, że wolna para elektronowa w jednej z pośrednich struktur zajmuje pozycję apikalną, co jest bardzo niekorzystne energetycznie. Dla termicznej racemizacji tego typu związków Martin zaproponował mechanizm określony mianem inwersji klinowej (Schemat 3). Przebiega ona przez płaski czterocłonowy stan przejściowy [8–10].

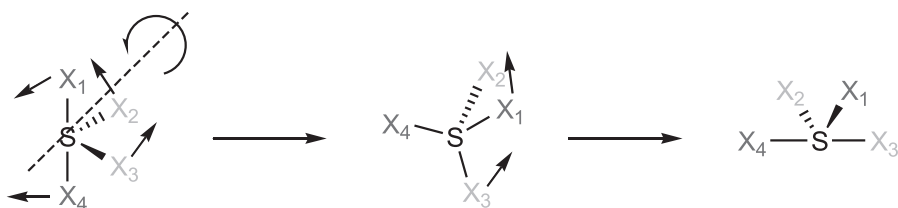


Rysunek 4
Figure 4



Schemat 3
Scheme 3

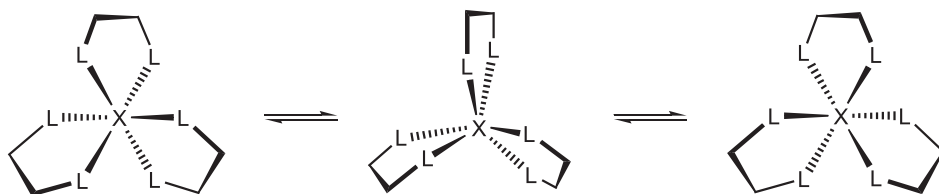
Schleyer zaproponował mechanizm alternatywny do inwersji klinowej. Nazwano go mechanizmem dźwigniowym. Ulegają mu związki typu 10-S-4(Cl₂F₂), a jego rezultatem jest zamiana jednego apikalnego i jednego ekwatorialnego liganda (Schemat 4). Proces ten przypomina rotację kołowrotową, jednak występuje tu stan przejściowy o geometrii C_s [5].



Schemat 4

Scheme 4

W przeciwieństwie do hipervalentnych związków pentakoordynacyjnych, związki heksakoordynacyjne izomeryzują dużo wolniej wg mechanizmu zwanego skrętem Bailara (Schemat 5). Podobnie jak wyżej, wymienione jest to proces niedysocjatywny (wiązania pozostają nienaruszone). Natomiast szybka izomeryzacja jest tu możliwa tylko poprzez dysocjację wiązań [1, 9].



Schemat 5

Scheme 5

3. AKTYWNOŚĆ OPTYCZNA ZWIĄZKÓW HIPERWALENTNYCH

Hiperwaleńne związki typu 10-X-4 i 10-X-5 o geometrii bipiramidy trygonalnej i symetrii C_1 mogą wykazywać chiralność, jeśli posiadają co najmniej trzy różne ligandy (Tab. 2). Systemy takie są jednak niestabilne optycznie. Można zwiększyć ich trwałość przez wprowadzenie spinających odpowiednie pozycje apikalne i ekwatorialne dwuzębnych (bidentnych) ligandów, przy czym tworzy się układ spirochalkogenuranowy. W związku z tym faktem wszystkie wyizolowane dotąd chiralne chalkogenurany stanowią połączenia „spiro” [9].

Tabela 2

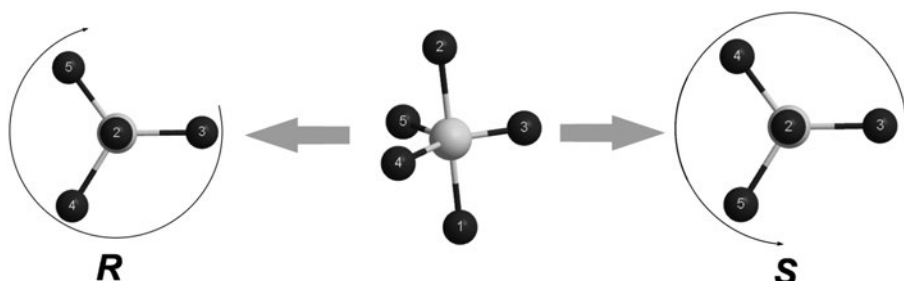
Table 2

Wzór sumaryczny	Ilość struktur
XL_5	1 achiralna
$XL_4^1L^2$	2 achiralne
$XL_3^1L^2_2$	3 achiralne
$XL_3^1L^2L^3$	2 achiralne i 2 pary enancjomerów
$XL_2^1L^2_2L^3$	2 achiralne i 3 pary enancjomerów

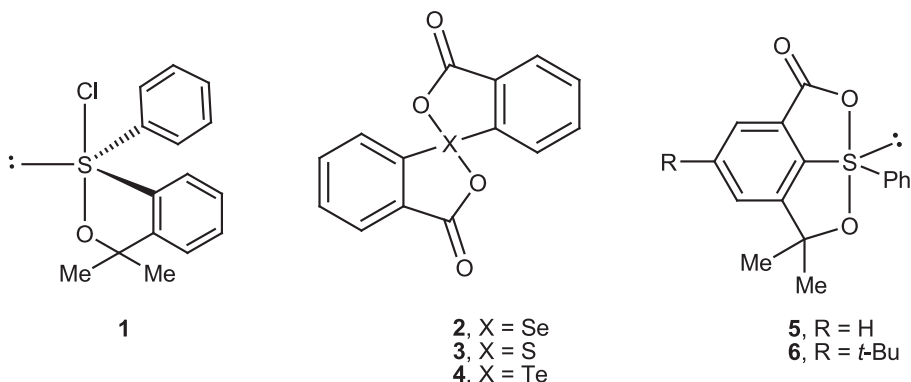
Wzór sumaryczny	Ilość struktur
$XL^1_2L^2L^3L^4$	1 achiralna i 6 par enancjomerów
$XL^1L^2L^3L^4L^5$	10 par enancjomerów

Przypisywanie konfiguracji absolutnej chalkogenuranów odbywa się według rozszerzonej konwencji Cahna–Ingolda–Preloga (CIP) dla struktur bipiramidalnych i zostało zaproponowane przez Martina i Balthazora w 1977 roku. Po określeniu ligandów apikalnych orientuje się strukturę tak, aby wiązanie 3c–4e znajdowało się w linii wzroku, a ligand apikalny „starszy” według reguł CIP był bliżej obserwatora. Następnie określa się „starszeństwo” podstawników ekwatorialnych i, w zależności od tego czy są one ułożone od „najstarszego” do „najmłodszego” zgodnie lub przeciwnie do ruchu wskazówek zegara, przypisuje się konfigurację, odpowiednio, *R* lub *S* (Rys. 5) [11]. Metoda ta została po raz pierwszy użyta do określenia konfiguracji absolutnej (+)-1-chloro-3,3-dimetylo-1-fenylo[3*H*-2,1-benzoksatiolu] **1** (Rys. 6) [11].

Pierwszym, wyizolowanym chiralnym spirochalkogenuranem był związek **2** (Rys. 6) [10, 12–14]. Został on otrzymany na drodze cyklodehydratacji odpowiedniego dikarboksylowego Se-tlenku przez Lessera i Weissa w 1914 roku i przebadany ponownie przez Dahlena i Lindgrena w 1972 roku [10, 12, 14, 15].



Rysunek 5
Figure 5

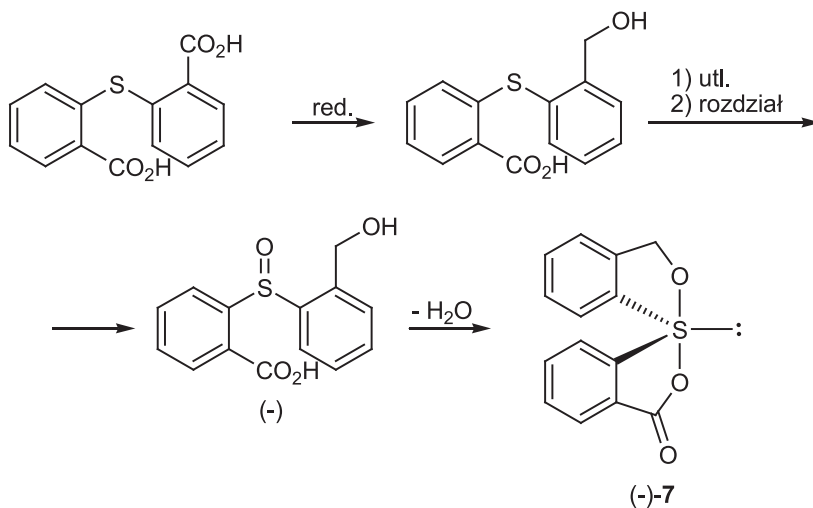
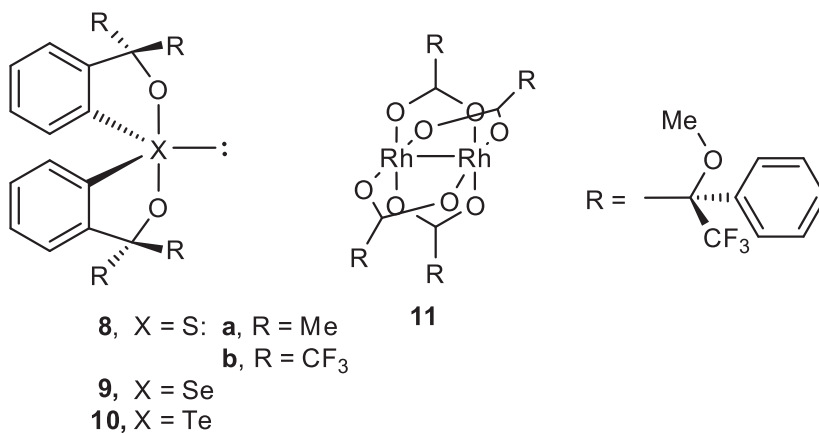


Rysunek 6
Figure 6

Pierwszy analog siarkowy – sulfuran **3** (Rys. 6) – został otrzymany przez Kapovitsa i Kalmana w 1971 roku [10, 16], a w 1993 roku Takaguchi i Furukawa zsyntetyzowali analog tellurowy – telluran **4** (Rys. 6) [10, 17]. Autorzy ci zaproponowali syntezę związków **3** i **4** wychodząc z odpowiedniego selenidu (selenku) lub telluridu (tellurku) i stosując jako utleniacz nadtlenek wodoru [10, 17]. W 1991 roku Kapovits otrzymał optycznie czysty sulfuran (-)-**7** wychodząc z enancjomerycznie czystego sulfotlenku (Schemat 6) [10, 18], a w 1993 roku Allenmark i Claeson zademonstrowali pierwszy enancjoselektywny rozdział chromatograficzny racematu spiro-sulfuranu **3** [10, 19]. Enancjomery związków **5** i **6** zostały natomiast rozdzielone nieklasycznie przy użyciu 2,2'-dihydroksy-1,1'-binaftolu [20].

Pierwszym dowodem ujawniającym istnienie chiralności w układach hiperwalentnych o symetrii C_2 było widmo ^{19}F NMR związku **8b**, pokazujące diastereotopowe kwartety pochodzące od nierównocennych grup perfluorometylowych [9, 21]. W celu określania konfiguracji absolutnej chalkogenuranów stosowane są metody klasyczne, takie jak rentgenograficzna analiza strukturalna, przy użyciu której określano konfiguracje absolutne wielu tego typu związków [10, 12, 14].

Jednakże ze względu na stosunkowo niewielką trwałość niektórych z nich i, w związku z tym, trudności w uzyskaniu dobrej jakości monokryształów, stosuje się w tym celu również metody pośrednie z wykorzystaniem technik dichroizmu kołowego CD (VCD i ECD), dyspersji skręcalności optycznej ORD oraz NMR. W oparciu o analizę widm dichroizmu kołowego określono konfigurację absolutną wydzielonych metodą chromatografii cieczowej na chiralnej fazie stałej enancjomerów połączeń **2–4** i **7** [14]. Technika VCD, wymaga stosunkowo dużej ilości materiału do badań, ale analiza widma oraz obliczenia teoretyczne tego typu widm są stosunkowo proste. Dlatego także tę metodę w połączeniu z obliczeniami DFT wykorzystuje się do określania konfiguracji absolutnej opisywanych związków [10, 12]. Metoda ECD wymaga mniejszej ilości związku potrzebnego do rejestracji widma, natomiast analiza praktyczna, jak i teoretyczna widma jest bardziej skomplikowana. Niemniej jednak, technika ta jest z powodzeniem używana w celu określania konfiguracji chiralnych związków hiperwalentnych [10, 12]. Z równym powodzeniem wykorzystuje się do tego celu ORD, a najlepsze i najpewniejsze rezultaty przynosi połączenia wszystkich tych technik [12]. Wykorzystanie metod NMR do oznaczania właściwości chirooptycznych za pomocą chiralnych odczynników solwatujących lub przesuwających jest obecnie powszechnie uznane i stosowane. Metodą tą określono konfigurację absolutną spirochalkogenuranów **8–10** (Rys. 7), używając w tym celu enancjomerycznie czystego kompleksu rodu **11** (Rys. 7) i obserwując zmianę przesunięcia chemicznego jąder nierównocennych atomów zwanego przesunięciem kompleksacyjnym [22].

Schemat 6
Scheme 6Rysunek 7
Figure 7

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] *Chemistry of Hypervalent Compounds*, Kin-ya Akiba (Ed.), Wiley-VCH, New York, 1999.
- [2] Z. Pu, Q. Li, Y. Xie, H. F. Schaefer III, *Theor. Chem. Acc.*, 2009, **124**, 151.
- [3] R.J. Gillespie, B. Silvi, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **233–234**, 53.
- [4] S. Oae, Y. Uchida, *Acc. Chem. Res.*, 1991, **24**, 202.
- [5] M. Mauksch, P. von R. Schleyer, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 1756.
- [6] S. Sato, O. Takahashi, N. Furukawa, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **176**, 483.
- [7] S. Sato, M. Matsuo, T. Nakahodo, N. Furukawa, T. Nabeshima, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 8091.

- [8] L.J. Adzima, J.C. Martin, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 4006.
- [9] J. Drabowicz, G. Halaba, *Rev. Heteroatom Chem.*, 2000, **22**, 1.
- [10] S. Allenmark, *Chirality*, 2008, **20**, 544.
- [11] J.C. Martin, T.M. Balthazor, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 152.
- [12] A.G. Petrovic, P.L. Polavarapu, J. Drabowicz, Y. Zhang, O.J. McConnell, H. Duddeck, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 4257.
- [13] R. Lesser, R. Weiss, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1914, **47**, 2510.
- [14] S. Claeson, V. Langer, S. Allenmark, *Chirality*, 2000, **12**, 71.
- [15] B. Dahlen, B. Lindgren, *Acta Chem. Scand.*, 1973, **27**, 2218.
- [16] I. Kapovits, A. Kalman, *Chem. Commun.*, 1971, 649.
- [17] Y. Takaguchi, N. Furukawa, *Heteroatom Chem.*, 1995, **6**, 481.
- [18] I. Kapovits, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1991, **58**, 39.
- [19] S. Allenmark, S. Claeson, *Tetrahedron: Asymm.*, 1993, **4**, 2329.
- [20] J. Drabowicz, J.C. Martin, *Tetrahedron: Asymm.*, 1993, **4**, 297.
- [21] E.F. Perozzi, J.C. Martin, I.C. Paul, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 6735.
- [22] T. Gati, G. Toth, J. Drabowicz, S. Moeller, E. Hofer, P. Polavarapu, H. Duddeck, *Chirality*, 2005, **17**, S40.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lutego 2012

WYBRANE SUBSTANCJE CHŁODZĄCE STOSOWANE W KOSMETYKACH

SELECTED COOLING COMPOUNDS USED IN COSMETICS

Michalina Adaszyńska, Maria Swarczewicz

*Zakład Syntezy Organicznej i Technologii Leków,
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
Al. Piastów 42, 71-065 Szczecin
e-mail: mswar@zut.edu.pl; michalina.adaszynska@gmail.com*

Abstract

Wprowadzenie

1. Receptory występujące w skórze a efekt chłodzenia
2. Substancje o własnościach chłodzących
 - 2.1. Mentol i jego naturalne pochodne
 - 2.2. Amidowe pochodne mentolu
 - 2.3. Nowe syntetyczne substancje chłodzące

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr inż. Michalina Adaszyńska, absolwentka kierunku technologia chemiczna na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. W 2010 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera, pracę dyplomową wykonywała w Zakładzie Syntezy Organicznej i Technologii Leków. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego przy Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. inż. Marii Swarczewicz. Prowadzone przez nią badania dotyczą związków

naturalnych występujących w roślinach i ich wykorzystywanie w kosmetykach i lekach.



dr hab. inż. Maria Swarczewicz, kierownik Zakładu Syntezy Organicznej i Technologii Leków w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie od 2005. Zainteresowania naukowe: ocena zagrożeń środowiska i metody ich ograniczania zarówno w wodzie jak i w glebie, ze szczególnym uwzględnieniem pestycydów. Ostatnio zajmuje się analizą jakościową kosmetyków. Nowy kierunek badań zespołu to: związki naturalne w kosmetykach i lekach, ich synteza i wyodrębnianie; analiza składu chemicznego;

opracowywanie receptur kosmetycznych oraz badania aktywności przeciwutleniających i mikrobiologicznych ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych; izolacja oraz identyfikacja allelozwiązków wybranych roślin.

ABSTRACT

Menthol and new cooling compounds are widely used to improve modern toothpastes, gums, breath fresheners, cosmetic lotions, deodorants, shaving gels, and shaving aid composites. This paper reviews the use of menthol and new classes of cooling agents, that have been discovered since the 1970s, in cosmetic preparations. We have presented here 57 chemical structures. In addition, we briefly touch upon cold receptors and mechanism of action. Finally, we add up, recent findings on the production of cooling ingredients in the world. The underlying process in thermoreception depends on ion transport across cellular membranes. Thermoreceptors belong to a class of transient receptor potential (TRP) channels. Among them are temperature-sensitive thermoreceptors TRPM8 or TRPA1. Certain types of chemical agonists activate the same thermoTRP channels, as for example menthol or icilin. Only the (-)-menthol enantiomer possesses clean, desirable minty odor and intense cooling properties (Fig. 1). Natural menthol is normally about 99.0% to 99.6% pure, with the remaining impurities being other constituents found in the cornmint oil. Synthetic (-)-menthol is normally about 99.8% pure and has less of the minty top note than the natural menthol. The other natural and synthetic compounds being menthol-related coolants are showed in Figure 3, as for example, menthone 1,2-glycerol ketal (17). From among 3-carboxamide-*p*-menthane derivatives as commercial cooling agents (Fig. 4), there are for example *N*-ethyl-*p*-menthane-3-carboxamide (25) as WS-3 and [ethyl 3-(*p*-menthane-3-carboxamido)acetate] as WS-5, which is currently the coldest of all commercial cooling agents (27). Other examples of recently discovered carboxamide coolants belong to a series of analogs of WS-23 (28). Of particular interest are various aryl *p*-menthane-3-carboxamides, such as *N*-benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-*p*-menthane-3-carboxamide (36), which was reported to have 100 times more cooling intensity than menthol (Fig. 6). In 2010, Furrer disclosed a series of new *p*-menthane carboxamide and WS-23 analogs as cooling agents [56]. Three particularly potential cooling agents 50, 51 and 52 are shown in Figure 9.

Keywords: cooling ingredients, menthol, menthol-related, carboxamide, cosmetics

Słowa kluczowe: substancje chłodzące, mentol, pochodne mentolu, amidy, kosmetyki

WPROWADZENIE

Wzrastające zainteresowanie przemysłu kosmetycznego na komponenty o właściwościach chłodzących, spowodowało poszukiwanie coraz nowszych związków wykazujących efekt chłodzenia skóry. Kosmetyki chłodzące, czyli preparaty zawierające w swym składzie substancje pobudzające termoreceptory skóry, odgrywają coraz większą rolę w dziedzinie dermatologii i kosmetologii. Do produkcji tego typu preparatów kosmetycznych wykorzystuje się składniki aktywne, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i syntetycznego. Związki chłodzące znajdują się w recepturach preparatów do i po goleniu, w preparatach do opalania, w środkach do pielęgnacji stóp, są też składnikami toników, żelów do mycia, balsamów do ciała, szamponów, past do zębów, preparatów do płukania ust oraz preparatów antycellulitowych. Przedstawiono przegląd literatury na temat mentolu i nowych substancji chłodzących, które były syntezowane od lat 70. ubiegłego wieku. Do tej pory jedną z najważniejszych substancji chłodzących był mentol. Związek ten należy do grupy terpenoidów, który może być pozyskiwany ze źródeł naturalnych, a obecnie za pomocą syntezy chemicznej, metod biotechnologicznych oraz biologii molekularnej. Omówiono związek pomiędzy efektem chłodzenia a receptorami występującymi w skórze. Zwrócono uwagę na substancje chłodzące mające zastosowanie w kosmetykach przedstawiając ich budowę chemiczną, nazwy chemiczne i handlowe. Przedstawiono przegląd substancji chłodzących analogów mentolu pochodzenia naturalnego i syntetycznego ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych amidowych. W ostatnim rozdziale zwrócono uwagę na nowe struktury chemiczne, które wykazują silniejsze działanie chłodzące niż mentol.

1. RECEPTORY WYSTĘPUJĄCE W SKÓRZE A EFEKT CHŁODZENIA

Zmysły człowieka to zdolność organizmu do odbierania i analizy bodźców zewnętrznych i reagowania na nie. Zmysł dotyku rozmieszczony jest zarówno powierzchownie (skóra), jak i głęboko (OUN). Skóra pełni funkcję ochronną, biorącą udział w termoregulacji, oddychaniu, wydalaniu (pot) i gospodarce wodnej, zawiera receptory wrażliwe na dotyk, ucisk, ciepło, zimno, ból oraz barwnik melaninę, który decyduje o jej zabarwieniu. Rozmieszczenie receptorów (Tab. 1) odpowiedzialnych za różnego rodzaju odczucia są w skórze nierównomierne [1, 2]. W skórze występują systemy reagujące na zmiany temperatury. Za efekt chłodzenia odpowiedzialne są termoreceptory (m.in. TRPM8 czy TRPA1), które odgrywają istotną rolę w regulacji cieplnej ciała.

Tabela 1. Receptory występujące w skórze
Table 1. Receptors present in skin

Położenie	Receptor	Rodzaj czucia
Skóra owłosiona	Wolne zakończenia nerwowe	Dotyk, temperatura, ból
	Receptory koszyczkowe mieszków włosowych	
Skóra warg, opuszek palców, skóra nieowłosiona	Wolne zakończenia nerwowe	Dotyk, ból, skrajne temperatury
	Tarczki Merckla	Dotyk
	Ciałka czuciowe Meissnera	Lekki dotyk
	Kolbki końcowe Krausego	Zimno
	Narząd końcowy Ruffiniego	Ciepło, długi dotyk
Warstwa podskórna	Ciałka balszkowate (Pacinięgo)	Ucisk, wibracje

Termoreceptory są to narządy zmysłów rejestrujące zmiany temperatury środowiska zewnętrznego lub wewnętrznego organizmu. Organizm człowieka należy do stałocięplnych, a to oznacza, że jego temperatura wewnętrzna jest utrzymywana na takim samym poziomie, tj. 37°C, niezależnie od temperatury otoczenia. Aby utrzymać stałą temperaturę, w której mogą zachodzić przemiany biochemiczne, konieczne jest sprawne działanie ośrodków termoregulacyjnych, na które składają się właśnie termoreceptory ciepła i zimna. Termoreceptory są to bezosłonowe zakończenia dendrytów protoneuronów w bardzo małych polach recepcyjnych, przy czym receptorów zimna jest od trzy do dziesięciu razy więcej niż receptorów ciepła. Receptory zimna, czyli ciała Krausego, których jest około sto pięćdziesiąt tysięcy, znajdują się w górnych warstwach skóry, blisko jej powierzchni (Tab. 2). Temperaturowe zero fizjologiczne to stan, w którym notuje się jednakową temperaturę powierzchni skóry z otoczeniem. W takiej sytuacji nie są pobudzone żadne receptory. Ciała Krausego reagują w zakresie temperatur 12–35°C, natomiast ich analogi ciepłe, których jest około trzydziestu tysięcy, odbierane są przez zlokalizowane w głębszych warstwach skóry ciała Ruffiniego, które reagują w przedziale 25–45°C [2].

Tabela 2. Termoreceptory skóry
Table 2. Skin thermoreceptors

Receptor	Bodziec progowy	Wrażenie	Zakres temperatury
Termoreceptor ciepła	Wzrost temp. o 0,0001°C/s	Wzrost temperatury skóry	25–45°C
Termoreceptor zimna	Spadek temp. o 0,0004°C/s	Spadek temperatury skóry	12–35°C

Receptory zimna uruchamiane są poniżej 25°C, receptory ciepła powyżej 35°C, natomiast w przedziale temperaturowym 25–35°C działają oba rodzaje termoreceptorów, jednakże w różnych proporcjach. Efekt termiczny jest rodzajem odpowiedzi na bodziec zewnętrzny docierający do termoreceptorów. Bodźcem tym, oprócz zmian temperatury otoczenia, może być działanie różnych substancji. Substancje wywołu-

jące efekt chłodzenia skóry wykazują specyficzne działanie na receptory zimna. W pierwszej fazie krótkotrwałego działania zimna na skórę obserwuje się błądź, spowodowaną skurczem naczyń krwionośnych, wskutek działania mechanizmów regulujących. Aby mechanizm regulujący zadziałał, konieczne jest dotarcie do wnętrza systemów rejestrujących przez odpowiednie wyspecjalizowane kanały jonowe TRP (ang. *Transient Receptor Potential*). Dwa kanały wykazują silną wrażliwość na niskie temperatury: TRPM8 ($< -28^{\circ}\text{C}$) i TRPA1 ($< -18^{\circ}\text{C}$). TRPM8 może być aktywowany przez temperatury poniżej 28°C , lub przez związki wywołujące uczucie chłodu, np. (-)-mentol, icilin. Stwierdzono, że (-)-mentol posiada zdolność uruchomienia reakcji łańcuchowych receptorów czułych na zimno TRPM8, kiedy jest dozowany na skórę [3]. Główną rolę w tym procesie odgrywają kanały jonów wapnia(II). Substancje chłodzące powodują wzrost stężenia jonów wapnia w neuronach receptorów zimna. Pobudzenie neuronów receptorów zimna związane jest z indukowaniem obiegu jonów [2–5]. Ważnymi czynnikami związanymi z efektem chłodzenia są: struktura molekularna cząsteczki, skład jakościowy i ilościowy związku oraz środek wiążący, w którym znajduje się substancja chłodząca [3]. Zucker (2002) wyjaśnił jak odkrycie jonowych kanałów czułych na zimno będzie pomocne w analizie wpływu temperatury na system nerwowy [6]. Peier i in. (2002) opisali aktywację TRPM8, która zależy od obecności mentolu czy iciliny lub obecności niskiej temperatury [7]. Behrendt i in. (2004) przedstawili wyniki badań 70 odorantów i pochodnych mentolu wpływających na rekombinacje receptora zimna TRPM8 (mTRPM8). W dziesięciu substancjach (linalol, geraniol, hydroksycitronellal, WS-3, WS-23, Frescolat MGA, Frescolat ML, PMD38, Coolact P and Cooling Agent 10) stwierdzono, że są one agonistyczne [8]. Wymienione substancje chłodzące i ich struktury chemiczne opisano w dalszych rozdziałach.

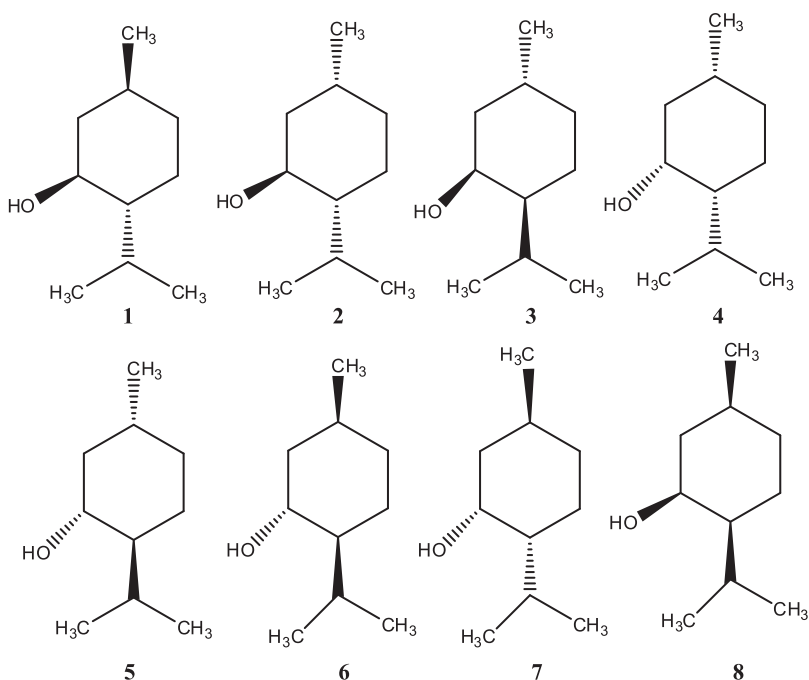
Andersson i in. (2004) stwierdzili, że aktywacja receptora zimna TRPM8 zachodzi w obecności iciliny i niskiej temperatury, ale nie w obecności mentolu i jest raczej modulowana przez pH wewnątrzkomórkowe, w granicach fizjologicznych. To pokazuje, że aktywacja iciliną i niską temperaturą ma inny mechanizm niż aktywacja przez mentol [9]. W 2005 roku McKemy publikuje artykuł przeglądowy na temat receptorów zimna [10]. Mechanizm działania składników chłodzących obszernie omawia w swojej publikacji Leffingell [11].

2. SUBSTANCJE O WŁASNOŚCIACH CHŁODZĄCYCH

W przemyśle kosmetycznym mają zastosowanie związki generujące uczucie zimna bez faktycznego obniżenia temperatury otoczenia. Ich obecność nadaje skórze przyjemną świeżość. Związki chłodzące znajdują się w recepturach preparatów po goleniu, opalaniu, środkach do pielęgnacji stóp, także są składnikami toników, żelów do mycia, balsamów do ciała, szamponów, past do zębów, preparatów do płukania ust oraz preparatów antycellulitowych [1–3]. Substancje chłodzące mogą być podzielone na dwie zasadnicze grupy: pochodzenia naturalnego i syntetycznego.

2.1. MENTOL I JEGO NATURALNE POCHODNE

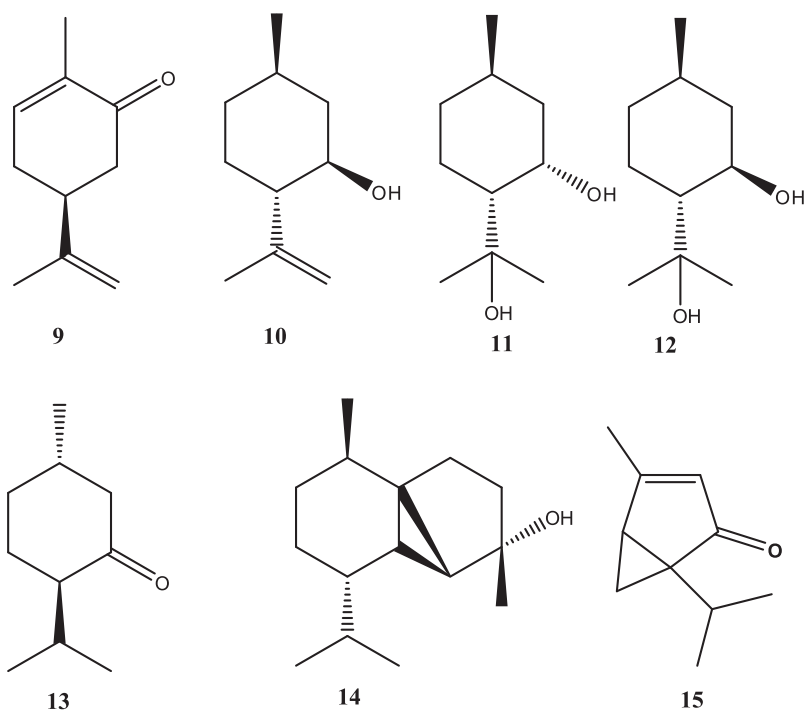
Mentol, w grupie związków naturalnych jest powszechnie stosowany w preparatach kosmetycznych jako środek chłodzący. Działa on chłodząco, znieczulająco, dezynfekująco i pilomotorycznie [3, 4, 11]. Mentol należy do grupy terpenoidów, może być pozyskiwany ze źródeł naturalnych, a także za pomocą syntez chemicznych i biochemicznych [12–16]. Należy do alkoholi terpenowych, posiada trzy centra stereogeniczne, osiem izomerów optycznych (+)-mentol (1), (+)-izomentol (2), (+)-neomentol (3), (+)-neoizomentol (4), (–)-mentol (5), (–)-izomentol (6), (–)-neomentol (7), (–)-neoizomentol (8), z których cztery otrzymane zostały na drodze syntezy, lecz tylko jeden z ośmiu izomerów, (–)-mentol czyli forma (1*R*,3*R*,4*S*) wykazuje efekt chłodzenia na skórze (Rys. 1) [2, 17].



Rysunek 1. Stereoizomery mentolu
Figure 1. Stereoisomers of menthol

Naturalny mentol posiada czystość od 99,0 do 99,6% z pozostałościami innych składników. W syntetycznym (–)-mentolu czystość wzrasta do 99,8% i posiada on mniej zanieczyszczeń. Mentol jest związkiem lotnym, z tego powodu uzyskany efekt chłodzenia jest krótkotrwały i nie trwa dłużej niż dwadzieścia pięć minut dla roztworu 100 ppm. Należy do związków drażniących, dlatego należy stosować go w odpowiednich stężeniach, na ogół nie przekraczających 0,02%. Jedną z wad mentolu jest jego charakterystyczny zapach, co uniemożliwia uzyskanie w preparatach kosmetycznych innych zapachów. Z tego powodu poszukiwano innych związków

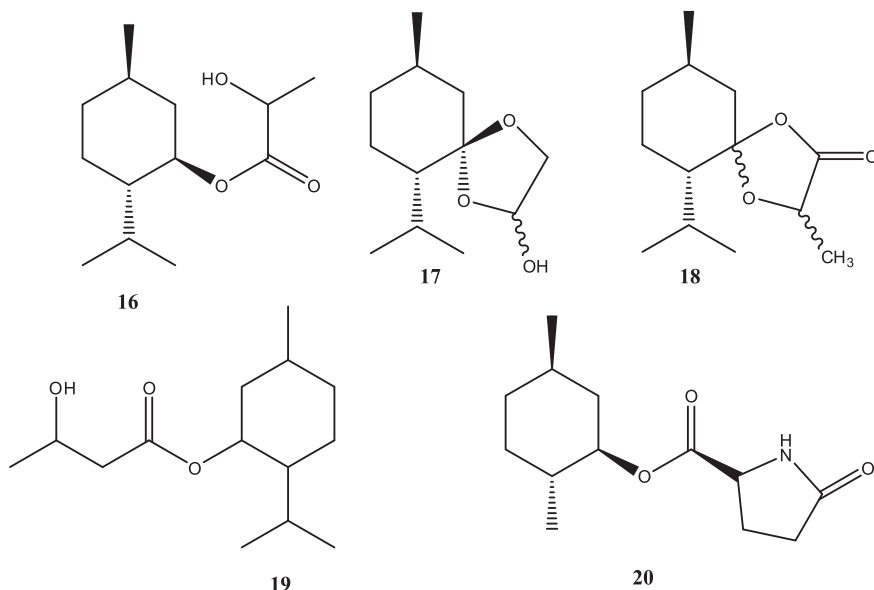
o właściwościach chłodzących, często z pochodnych mentolu. Przykładami związków o właściwościach chłodzących są mleczan i octan mentylu, które stosuje się w kosmetykach w stężeniu około 0,4–1,2%, czyli znacznie wyższym, niż w przypadku czystego mentolu. Działanie chłodzące może być wywołane przez inne substancje, głównie z grup monoterpenu, seskwiterpenu oraz ich pochodnych [3, 11]. Obecnie największe zapotrzebowanie, w przemyśle kosmetycznym, spośród związków terpenoidowych, mają (-) mentol i *R*(-)-karwon (**9**) (Rys. 2).



Rysunek 2. Naturalne pochodne mentolu wykazujące własności chłodzące
Figure 2. Natural menthol derivatives having cooling properties

Innymi substancjami naturalnymi są analogi mentolu (estry, etery, ketale), np.: (-)izopulegol (**10**), (+)-*cis*- i (-)-*trans*-*p*-mentan-3,8-diol (**11**, **12**), menton (**13**) (Rys. 2) [1]. Menton (**13**) – keton terpenowy jest cieczą o przyjemnym, orzeźwiająjącym zapachu mięty. Produkt Takasago International (Coolact P, FEMA 2962) czyli (-)izopulegol (**10**) w połączeniu z mięcią wykazuje odczucie zimna. Odkryto, że związek ten o wysokiej czystości (99,7%) jest bezzapachowy i posiada optycznie aktywną formę oraz powoduje poczucie świeżości, orzeźwienia i chłodzenia. Jego siła chłodzenia jest od 20 do 30% większa niż mentolu [18]. Z grupy seskwiterpenów opatentowany został kubebol (**14**) (FEMA 4497) jako substancja chłodząca i orzeźwiająca [19]. Otrzymywany jest z oleju kubebowego, w którym występuje w ilości od 10% do 30% [20]. Badania wykonane przez analizę czuciową pokazały, iż umbellulon (**15**) oraz (1*R*,2*R*,4*S*)-dihydroumbellulol wykazują znaczne uczucie

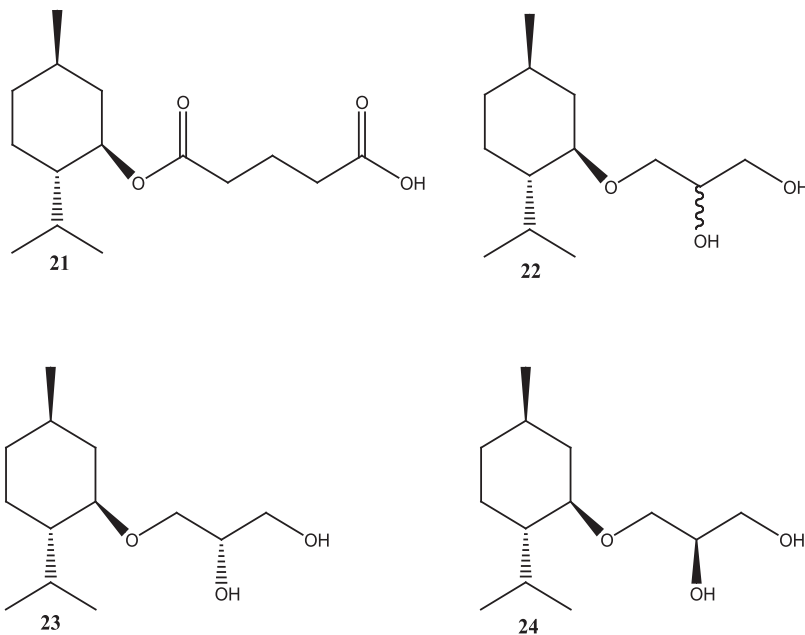
chłodzenia, lecz dwa–trzy razy mniejsze niż (–)-mentol [17, 21–23]. Inne pochodne mentolu posiadające własności chłodzące a występujące w handlu, przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Handlowe substancje chłodzące – pochodne (–)-mentolu
Figure 3. Commercial cooling substances – derivatives of (–)-menthol

Mieszanina zawierająca (–)-izopulegol (**10**), mleczan (–)-mentylu (**16**) (Frescolat ML) i (–)-mentoksypropano-1,2-diol (**22**) została opatentowana dla przemysłu kosmetycznego jako MPD, Coolact®, [24]. Z tej samej firmy pochodzi substancja chłodząca będąca mieszaniną dwóch izomerów *cis*- i *trans-p*-mentan-3,8-diol (**11**, **12**) (FEMA 4053), w stosunku około 62:38, pod nazwą Coolact 38D®, PMD38. Mieszanina ta posiada około 11% większą moc chłodzenia niż mentol [24, 25]. Występuje w olejkach eterycznych bogatych w citronellal, np. *Litsea cubeba*, *Eucalyptus citriodora*, oprócz tego jest efektywnym repelentem insektycydowym [25, 26]. Spośród substancji chłodzących na uwagę zasługuje bursztynian monomentylu (MMS, FEMA 3810) [27], który został opatentowany przez Mane [28], jako substancja chłodząca o szerokim spektrum zastosowania. Związek ten został wyizolowany z *Lycium barbarum* i *M. piperita* [29]. Z pochodnych mentolu dostępny jest również w handlu ketal 1,2-glicerolomentonu (Frescolat MGA) firmy Haarmann i Reimer, w dwóch formach (leavo FEMA 3807 (**17**) i racemat FEMA 3808) [30]. W firmie Firmenich odkryto, że mieszanina diastereoizomerów 6-izopropyl-3,9-dimetylo-1,4-dioskospiro-[4,5]dekan-2-on (**18**), otrzymana w reakcji kwasu mlekowego z *cis*- i *trans*-mentonem, która prowadzi do otrzymania miętowego, świeżego zapachu typu piperita. Stwierdzono synergistyczny efekt, zwiększający siłę chłodzenia, w kombinacji z innymi substancjami chłodzącymi (np. bursztynianem men-

tylu czy mentolem). Te właściwości miały, w szczególności, izomery (3*S*,5*R*,6*S*,9*R*) i (3*S*,5*S*,6*S*,9*R*) [31]. 3-Hydroksybutenian (–)-mentyl (MHB, FEMA 4308) (**19**), według firmy Takasago, posiada długo trwający efekt chłodzenia, jest bezwonny i bezsmakowy, wykazuje około 0,45 razy silniejszy efekt od mentolu. Posiada więc szerokie zastosowanie, nie tylko w kosmetykach, lecz także w żywności, napojach, lekach czy papierosach [32, 33]. Podobne własności ujawniają inne związki chemiczne pochodne mentolu, np. 1-hydroksy-2,9-cineol, 3-alkilo-*p*-mentan-3-ol czy pirolidyno-2-on-5-karboksymentyl (Questice®, FEMA 4155) (**20**). Ten ostatni związek ma duże zastosowanie w różnych kosmetykach, lotionach i jako składnik pasty do zębów, a jego właściwości chłodzące są wynikiem hydrolityczno-enzymatycznego uwalniania mentolu. Erman ostatnio wykazał, że forma ciekła Questice jest mieszaniną diastereoizomerów pirolidyno-2-on-5-karboksymentylu, w stosunku konfiguracji 5*S*:5*R* jak 91:8, podczas gdy forma stała ma stosunek 46:53 [34]. (–)-Glutaran monometrylowy (**21**) (Physcool 2, MMG, FEMA 4006) jest następną naturalną substancją chłodzącą, którą wykryto w *Litchi sinensis*, w obecności (–)-dimentyloglutaranu [29]. Prawdopodobnie jest to substancja chłodząca o najdłuższym efekcie chłodzenia [35]. Inną substancją chłodzącą jest (–)-mentoksypropano-1,2-diol (**22**), występująca jako MPD, Coolant Agent 10, firmy Takasago International (FEMA 3784). Zawiera dwa izomery (**23**, **24**) 2*S* i 2*R* (Rys. 4). Stwierdzono, że właściwości chłodzące izomeru 2*S* są od dwóch do trzech razy silniejsze niż dla izomeru 2*R* i od półtora do dwu razy od tego racematu [36–38].

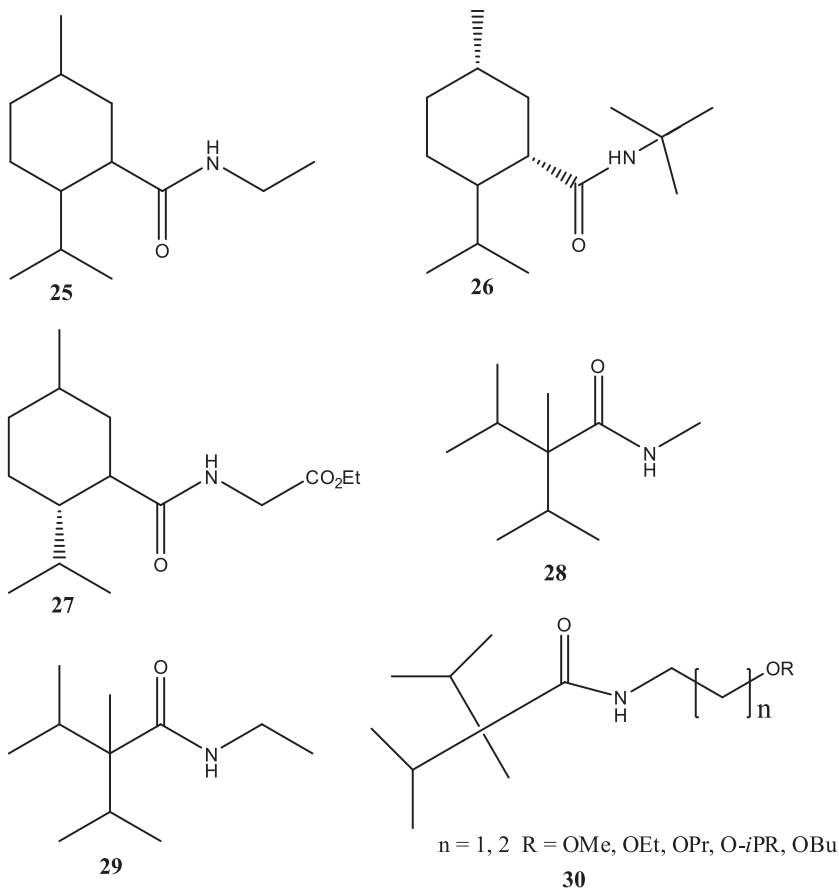


Rysunek 4. Struktury chemiczne pochodnych 3-karboksyamido-*p*-mentanu jako handlowe substancje chłodzące

Figure 4. The chemical structures of *p*-menthane-3-carboxamide derivatives as commercial coolants

2.2. AMIDOWE POCHODNE MENTOLU

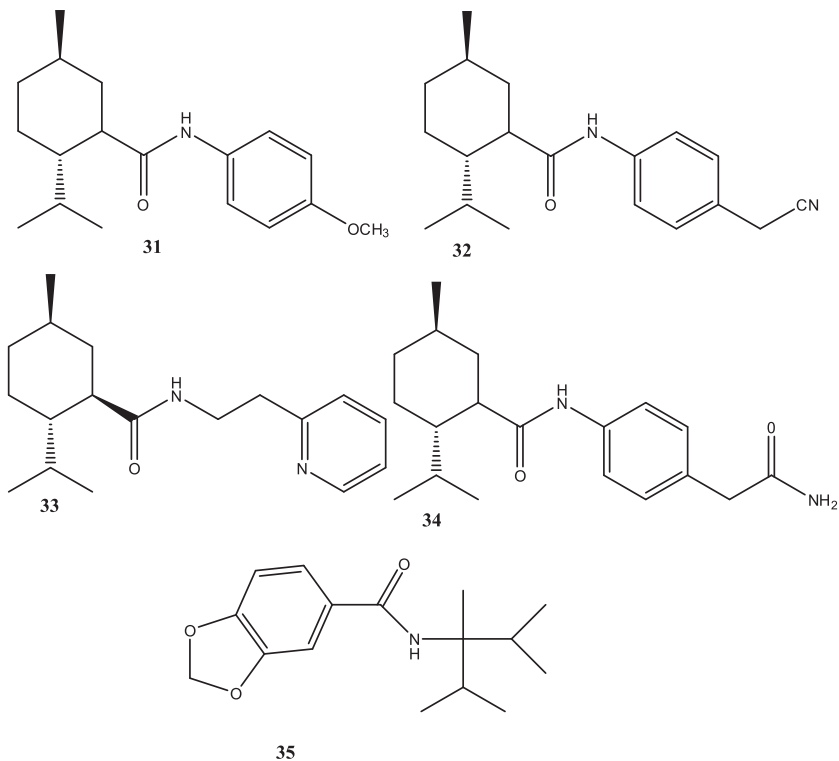
W latach 70. ubiegłego wieku firma Wilkinson Sword Ltd. prowadziła intensywne badania, które doprowadziły do odkrycia około 1200 związków chemicznych wykazujących aktywność chłodzącą [39]. Przykładami takich związków (Rys. 5) są syntetyczne pochodne mentolu zawierające w swej cząsteczce fragment 3-karboksyamido-*p*-mentanu [11, 40, 41].



Rysunek 5. Struktury chemiczne pochodnych 3-karboksyamido-*p*-mentanu
Figure 5. The chemical structures of *p*-menthane-3-carboxamide derivatives

Na Rysunku 5 przedstawiono *N*-etylo-3-karboksyamido-*p*-mentan, (**25**) który nosi nazwę handlową WS-3 lub FEMA 3455. Erman i in. (2004, 2007) stwierdzili, że wyodrębnienie czystego izomeru (1*R*,3*R*,4*S*) z powyższego związku powoduje zwiększenie działania chłodzącego o około trzy razy w porównaniu do WS-3 [42, 43]. Struktura chemiczna (**26**) to *N*-1,1-dimetyloetylo -3-karboksyamido-*p*-mentan. Związek ten występuje w handlu jako WS-14 [44]. *N*-[(etoksykarbonylo)

metylo]-3-karboksyamido-*p*-mentan (**27**) występuje w handlu pod symbolem WS-5 lub FEMA 4309, jest obecnie jednym z najsilniejszych komercyjnych preparatów chłodzących [45]. Stwierdzono również, że na własności chłodzące ma duży wpływ wysoka czystość związku [46]. Struktura chemiczna (**28**) to WS-23 lub FEMA 3804 (amid kwasu 2-izopropylu-*N*-2,3-trimetylobutenowego) i wraz z WS-3 należą do dwóch najczęściej produkowanych obecnie związków [11]. Mają one szerokie zastosowanie jako dodatki do przypraw, a specjalnie w gumach do żucia, w preparatach odświeżających oddech, w wyrobach cukierniczych czy w preparatach pielęgnacyjnych. Stosowane są też w kosmetykach, np. lotionach po goleniu. Pochodną WS-23 przedstawia struktura chemiczna (**29**), czyli amid kwasu *N*-etylo-2,2-diizopropyllobutenowego, FEMA 4557. Inny przykład nowo odkrytych pochodnych amidowych to analog WS-23, taki jak amid kwasu *N*-(2-etoksyetylo)-2-izopropylu-2,3-dimetylobutenowego (**30**), opatentowany przez Qaroma [50]. Rysunek 6 przedstawia dalsze pochodne 3-karboksyamido-*p*-mentanu, z z pierścieniami aromatycznym lub heterocyklicznym, które występują w handlu.



Rysunek 6. Nowe pochodne karboksamidu *p*-mentanu
 Figure 6. New derivatives of *p*-menthane carboxamide

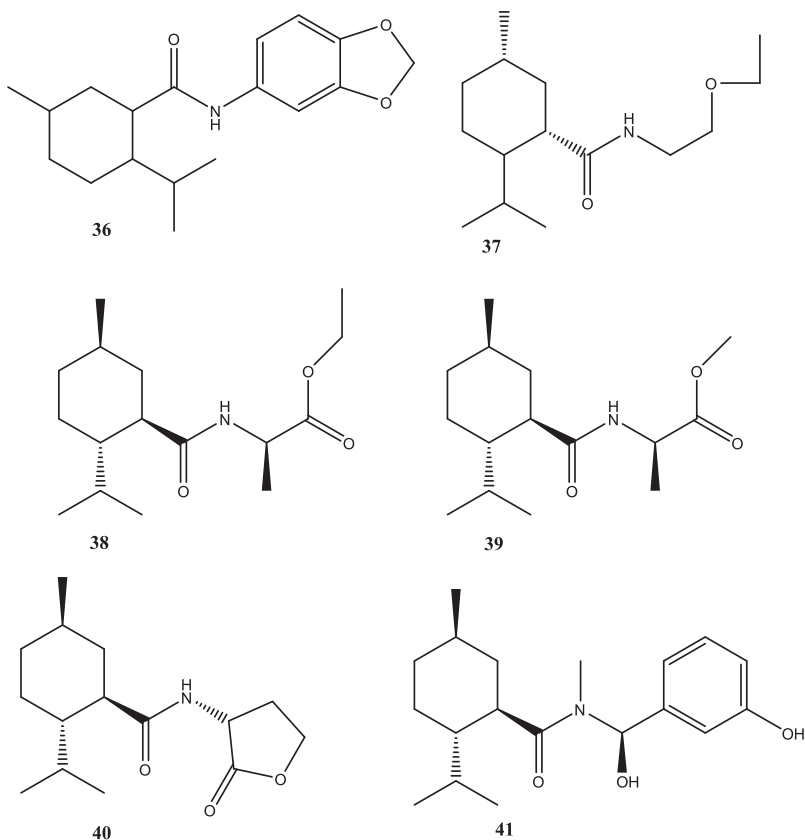
N-(4-metoksyfenilo)-3-karboksyamido-*p*-mentan występuje pod nazwami WS-12 lub FEMA 4681 jako struktura chemiczna (31). Stwierdzono, że związek ten posiada półtora razy silniejsze działanie chłodzące w porównaniu do (-)-mentolu [47].

Struktura chemiczna (32) to *N*-(4-cyjanometylofenilo)-3-karboksyamido-*p*-mentan (FEMA 4496, G-180). Związek ten posiada próg zimna doustny na poziomie 0,5 µg, w porównaniu do 0,25 µg (-)-mentolu. Wskazuje to, że związek ten posiada około 50% większą siłę chłodzącą niż mentol [48]. Własności chłodzące ujawnia izomer *N*-(4-cyjanometylofenilo)-3-karboksyamido-*p*-mentanu, występujący w handlu pod nazwą Neo-G-180. Mieszanina dwóch izomerów G-180 i Neo G-180 daje lepsze efekty chłodzenia niż sam izomer (32). Struktura chemiczna (33) to *N*-[2-(pirydino-2-yl)etylo]-3-karboksyamido-*p*-mentan (FEMA 4549). Struktura chemiczna (34) to (2*S*,5*R*)-*N*-[4-(2-amino-2-oksoetylo)fenilo]-3-karboksyamido-*p*-mentan (FEMA 4684). Związki chemiczne z tej grupy zostały opatentowane w 2010 roku przez Bardsleya i in. [49] w USA. Firma Givaudan w 2006 roku opatentowała następną serię pochodnych karboksamidów *p*-mentanu, a przykładem jest struktura chemiczna (35) czyli *N*-(1-izopropyl-1,2-dimetylopropyl)-5-karboksyamido-1,3-benzodioksol, który posiada dwukrotnie silniejsze działanie niż 2 ppm mentol [51].

Szczególnie interesujące okazały się arylo-pochodne 3-karboksamidów-*p*-mentanu, takich jak *N*-benzo[1,3]dioksol-5-yl-3-karboksyamido-*p*-mentan (36) czy *N*-(benzooksazol-4-yl)-3-karboksyamido-*p*-mentan, które wykazywały sto razy większą intensywność chłodzenia od mentolu [52], którą przedstawiono na Rysunku 7 jako nową pochodną.

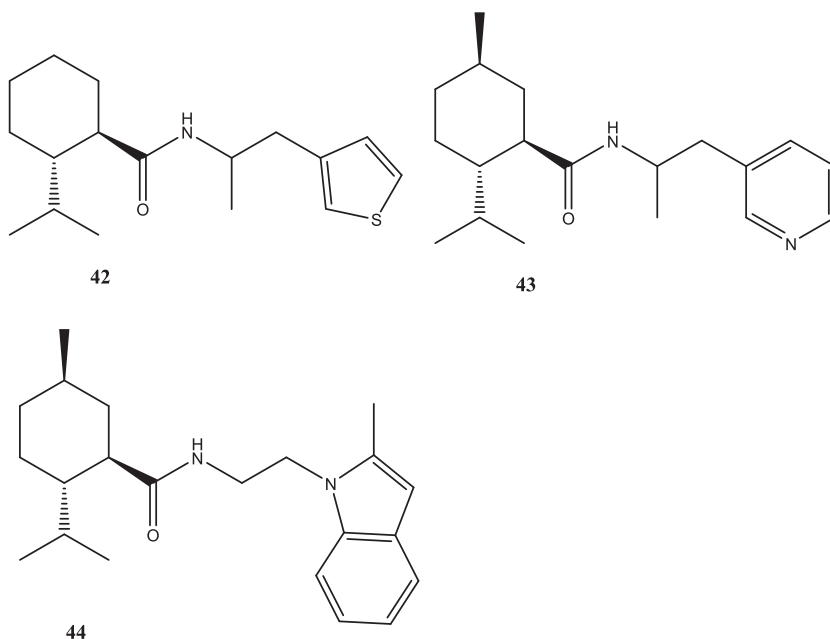
Firma T. Hasegawa Co. Ltd. opatentowała nową serię silnych związków chłodzących na bazie amidów alkiloksowych pochodnych *p*-mentanu, gdzie przykładem jest struktura chemiczna (37) (Rys. 7) [53].

Wei (2006, 2007) przedstawił cztery substancje (38-41) pochodne do WS-5 (27). Substancje (38, 39) otrzymano z D-alaniny i nazwano odpowiednio D-ALA-O-ME i D-Ala-O-Et. Podobnie z D-homoseryny otrzymano *N*-(*R*)-2-okso-tetrahydrofuran-3-yl-(1*R*,2*S*,5*R*), struktura chemiczna (40), którą nazwano D-HSL będącym mocnym, długotrwałym czynnikiem chłodzącym. Te same własności posiadał związek z pochodnych *p*-mentano-3-karboksamidów, struktura chemiczna (41) to L-fenylo-efiryna *p*-mentano-3-karboksamid nazwana CPS-195 [54, 55].



Rysunek 7. Nowe pochodne karboksamido-*p*-mentanu wykazujące efekt chłodzenia skóry
Figure 7. New derivatives of *p*-menthane carboxamide as active cooling

Furrer (2010) przedstawił nową serię pochodnych karboksamidu *p*-mentanu zawierającymi pierścienie heterocykliczne, struktury chemiczne (42–44) (Rys. 8), które wykazują silne własności chłodzące, od 200 do 1000 razy silniejsze od mentolu [56].

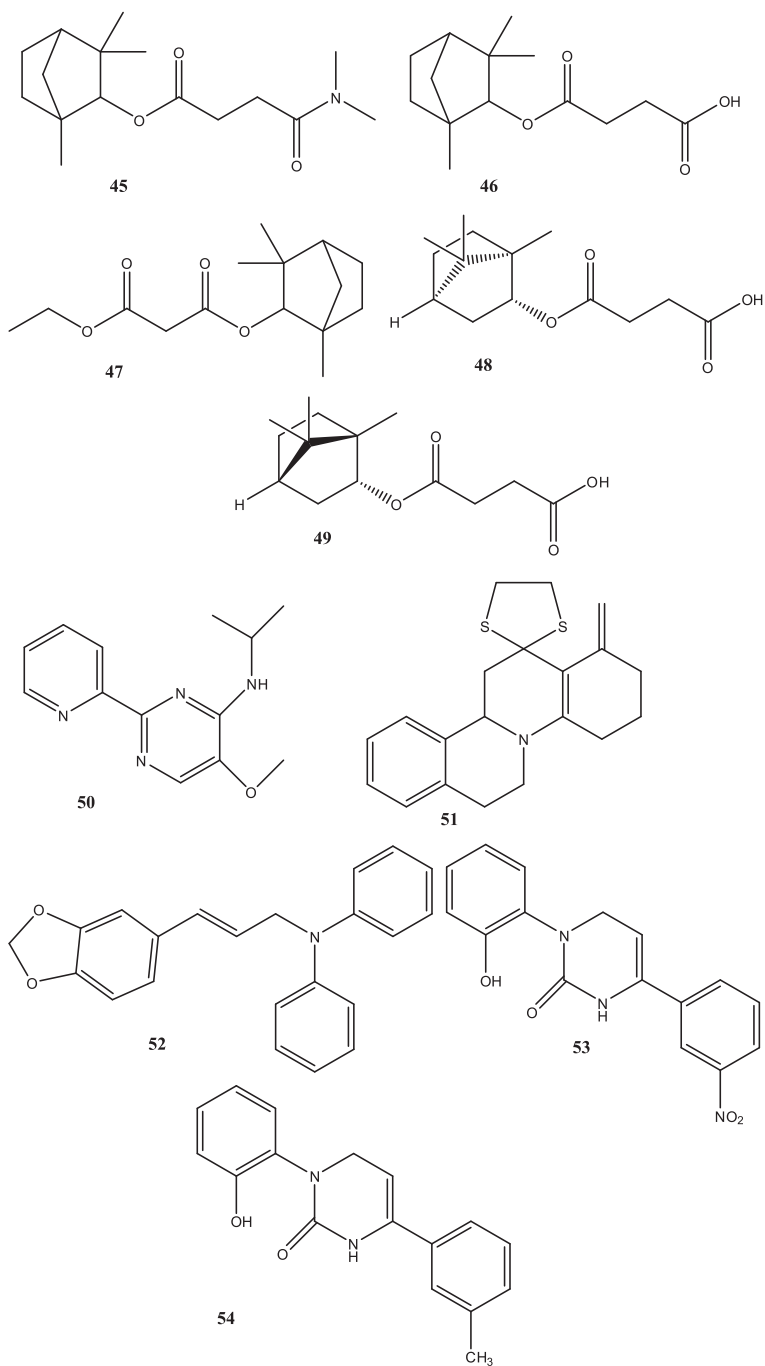


Rysunek 8. Związki chemiczne o różnej strukturze mające własności chłodzące
 Figure 8. Cooling agents with various chemical structures

2.3. NOWE SYNTETYCZNE SUBSTANCJE CHŁODZĄCE

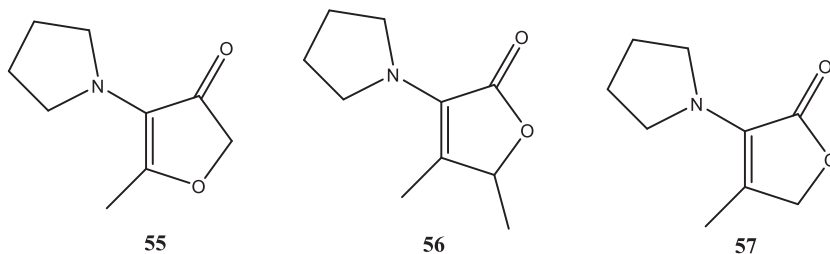
Własności chłodzące posiadają również inne struktury chemiczne, co przedstawiono na Rysunku 9. Struktury chemiczne (45–49) zostały opatentowane w 2008 roku jako seria pochodnych: fenchylu, D-bornylu, L-bornylu, eksonbornylu, 2-metyloizobornylu, 2-etylofenchylu, 2-metylobornylu, *cis*-pinanu-2-ylu, werbanylu i izobornylu posiadających do 2000 razy silniejsze własności chłodzące od mentolu. Związek chemiczny (45) wykazuje 1000 razy silniejsze działanie chłodzące od mentolu, a związki chemiczne (46, 47) 20-krotne.

Najsilniejsze własności chłodzące wykazywał bursztynian izobornylu (48), – 2000 razy większe od mentolu [11, 47], a bursztynian bornylu (49) już tylko 670 razy większe. W 2009 roku Surburg i in. opatentowali pochodne oksomentanu [57]. Schoening i Wiedwald w Symrise opisali zastosowanie pochodnych estrów 3-okso-karboksyłowych *p*-mentanu [58]. W 2010 roku opatentowano nowe mieszaniny pochodnych karboksamidów *p*-mentanu i analogów WS-23 jako czynników chłodzących [56]. Trzy z nich przedstawiono na Rysunku 9, jako struktury chemiczne (50–52). W 2004 roku firma Unilever Home i Personal Care USA, A Division of Conopco, Inc., wprowadziła na rynek pochodne iciliny, struktury chemiczne (53, 54), które wykazywały podobne własności chłodzące jak mentol [59].



Rysunek 9. Nowe związki chemiczne o własnościach chłodzących
Figure 9. New chemicals as cooling agents

W ostatnim czasie pojawiły się interesujące publikacje Furrer i in. (2008), czy Leffingwell (2009) [11, 47] dotyczące substancji o własnościach chłodzących. Ottinger i in. (2001) ogłosili, że pochodne furanonu, np. 4-metylo-3-(1-pirolidyno)-2[5H]-furanon (**55**), posiadają silniejsze działanie chłodzące niż mentol [61, 62]. Trzy struktury chemiczne (**55**, **56**, **57**) otrzymane na drodze syntezy przedstawiono na Rysunku 10. Jednak Erman (2003) prezentował odmienne wyniki badań struktury chemicznej (**55**), stwierdzając małą przydatność tego związku dla kosmetyków z uwagi na słaby efekt chłodzenia [63].



Rysunek 10. Struktury chemiczne pochodnych furanonu
Figure 10. The chemical structures of furanone derivatives

PODSUMOWANIE

Zastosowanie „oczyszczonych” substancji chłodzących w farmaceutykach i kosmetykach pochodzenia naturalnego datowane jest od lat osiemdziesiątych XIX wieku w Japonii, gdzie mentol produkowano na skalę przemysłową z olejku miętowego (*Mentha arvensis*) [64]. Przed II Wojną Światową produkcja mentolu była kontrolowana przez dwa kraje: Japonię i Chiny. Podczas wojny dołączyła do tej grupy Brazylia, a po wojnie Indie. Do lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku syntetyczny mentol produkowany był przez półsyntezy na mniejszą skalę [3, 65]. Następnie rozwinięto wielostopniowe procesy otrzymywania tego związku zaczynając od (+)-karenu, (-)- α -fellandrenu czy β -pinenu. Żadne z tych procesów nie były dopracowane i wykazywały wiele niedociągnięć. Przełom w produkcji syntetycznego mentolu nastąpił, kiedy producenci: Haarman i Reimer oraz Takasago International Co. i AG Bayer-Levercusen znacząco zainwestowali w produkcję na szeroką skalę stosując różne technologie. Jedną z najważniejszych metod syntezy mentolu jest metoda Noyori, który za nią otrzymał nagrodę Nobla w 2001 roku [16]. Z drugiej strony, można zauważyć dynamiczny rozwój przemysłu kosmetycznego w kierunku poszukiwania nowych syntetycznych związków chemicznych mających znaczenie aplikacyjne [66]. Na zainteresowanie odkrywaniem nowych substancji chemicznych posiadających własności chłodzące wskazuje liczba patentów, w ostatnich dziesięciu latach. I tak, pomiędzy 1998 a 2007 rokiem ukazało się ponad 280 patentów, a od stycznia 2005 do grudnia 2007 zgłoszono ponad 300 patentów [11]. Oprócz poszu-

kiwania pojedynczych substancji, uwaga badaczy zwrócona jest na badania mieszanin oraz określenie siły efektu chłodzenia [67, 68, 70]. Tabela 3 przedstawia wyniki badań nad efektem chłodzenia wybranych substancji, w stosunku do mentolu [69, 70].

Tabela 3. Przybliżony efekt chłodzenia substancji w stosunku do mentolu (jako 100) [69, 70]
Table 3. Estimated cooling effect of different substances compared to menthol (as 100) [69, 70]

Lp	Substancja chłodząca	Relatywny efekt chłodzenia
1	WS-5	400
2	WS-3	150
3	(-)-mentol	100
4	WS-14	75
5	WS-23	75
6	MHB	48
7	Frescolat ML	43
8	Frescolat MGA	41
9	(2S)-MPD	40
10	Coolact P	25
11	(2RS)-MPD	23
12	WS-30	23
13	PMD 38	11

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Kolski, *Chemia Piękna*, PWN, Warszawa, 2009.
- [2] M.M. Claude, *Kosmetologia i farmakologia skóry*, PZWL, Warszawa, 2008.
- [3] R. Eccles, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, **46**, 618.
- [4] W.Z. Traczyk, A. Trzebski, *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, PZWL, Warszawa, 1990.
- [5] D. Zoe, *Kosmeciutyki. Dermatologia kosmetyczna*, Elsevier Inc., 2005.
- [6] C. Zucker, *Nature*, 2002, **416**, 27.
- [7] A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden A.J.Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, *Cell*, 2002, **108**, 705.
- [8] H.J. Behrendt, T. Germann, C. Gillen, H. Hatt, R. Jostock, *Br. J. Pharm.*, 2004, **141**, 737.
- [9] D.A. Andersson, H. Chase, S. Bevan, *J. Neuroscience*, 2004, **24**, 5364.
- [10] D.D. McKemy, *Molecular Pain*, 2005, **1**, 16.
- [11] J.C. Leffingwell, [w:] *Handbook of cosmetic science and technology*, A. Barel, M. Paye, H. Maibach (Eds.), Informa Healthcare, New York, 2009, 661.
- [12] R. Hopp, B.M. Lawrence, [w:] *Mint: The Genus Mentha*, B.M. Lawrence (Ed.), Boca Raton, FL, CRC Press, 2006, 371.
- [13] J. Fleischer, K. Bauer, R. Hopp, patent USA 3 943 181, 9.03.19676.
- [14] S. Akutagawa, *Top Catal*, 1997, **4**, 271.
- [15] T. Tani, T. Yamagata, S. Akutagawa, T. Kumobayashi, H. Taketomi, H. Takaya, A. Miyashita, R. Noyori, S. Otsuka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 5208.

- [16] R. Noyori, *Asymmetric catalysis: science and opportunities*. Dostęp w Internecie: <http://nobelprize.org/nobelprizes/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf>.
- [17] Ch. Starkenmann, I. Cayeux, R. Brauchli, F. Maynezet, J. Agric. Food Chem., 2011, **59**, 677.
- [18] H. Oertling, A. Reckziegel, H. Surburg, H. Bertram, Chem. Rev., 2007, **107**, 2136.
- [19] T. Yamamoto, patent USA 5 773 410, 30.06.1998.
- [20] M.I. Velazco, L. Wuensche, P. Deladoey, patent USA 6 214 788, 1.03.1999.
- [21] C. Fuganti, D. Joulain, F. Maggloni, L. Malpezzi, S. Serra, A. Vecchione, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 2425.
- [22] S. Serra, C. Fuganti, F.G. Gatti, Eur. J. Org. Chem., 2008, **6**, 1031.
- [23] K.F. Gassenmeier, *Flavour Fragrance J.*, 2006, **2**, 725.
- [24] K. Shiroyama, K. Sawano, H. Ohta, patent USA 6 328 982, 30.12. 2001.
- [25] H. Kenmochi, T. Akiyama, Y. Yuasa, patent USA 5 959 161, 28.08.1999.
- [26] D.T. Beldock, J.A. Beldock, G. Mudge, patent USA 5 621 013, kwiecień 15.04.1997.
- [27] C.H. Jarboe, patent USA 3 111 127, 19.11.1963.
- [28] J.M. Mane, patent USA 5 725 865, 19.03.1998.
- [29] R. Hiserodt, J. Adedeji, T. John, M.L. Dewis, J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 3536.
- [30] H. Grub, R. Pelzer, R. Hopp, patent USA 5 266 592, 30.11.1993.
- [31] W. K. Giersch, C.L.A. Vanrietvelde, zgłoszony patent USA 2006/0249167, 9.11. 2006.
- [32] T. Yamamoto, A. Amano, T. Kobayashi, patent japoński 6 119 4049, 1986.
- [33] S. Pringle, D. Brassington, *Perfumer & Flavorist*, 2007, **32**, 38.
- [34] M. Erman, *Perfumer & Flavorist*, 2007, **32**, 20.
- [35] M.L. Dewis [w:] *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, D.J. Dowe (Ed.) Oxford, Blackwell Pub. Ltd., 2004, 199.
- [36] A. Amano, M. Moroe, T. Yoshida, patent USA 4 459 425, 10.06. 1984.
- [37] A. Amano, K.Tokoro, patent USA 5 608 119, 4.03.1997.
- [38] K. Shiroyama, K. Sawano, H. Ohta, patent USA 6 328 982, 11.12.2011.
- [39] H.R. Watson, R.Hems, D.Roswell, D.J. Spring, J. Soc. Cosmet. Chem., 1978, **29**, 185.
- [40] U. Bornscheuer, I. Gatfield, E. Hilmer, patent UE, EP 1 223223 A1, 2002.
- [41] J. Crosby [w:] *Chirality in Industry – an Overview*, A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby (Eds.), Wiley, Chichester, New York, 1992, 1–66.
- [42] S.M. Furrer, G.L. Yep, E. Flamme, zgłoszenie patentowe USA 2008/0311232, 18.12. 2008.
- [43] S.M. Furrer, G.L. Yep, E. Flamme, patent USA 7 959 958, 14.06. 2011.
- [44] H. Watson, D. Rowsell, D. Spring, patent USA 4 178 459, 11.12.1979.
- [45] W.J. Waddell, S.M. Cohen, V.J. Feron, L.J. Marnett, P.S. Portoghese, *Food Technol.*, 2007, **61** (8), 22.
- [46] M.B. Erman, P. Whelan, patent USA 7 189 760, marzec 13, 2007.
- [47] S.M. Furrer, J.P. Slack, T. Scott, S.T. McCluskey, I.M. Ungureanu, A.T. Daniher, G. Blancher, K. Bel, *Chem. Percept.*, 2008, **1**, 119.
- [48] H. Watson, D. Rowsell, D. Spring, patent USA 4 150 052, 17.04.1979.
- [49] K. Bardsley, zgłoszenie patentowe USA 2010/00272655, 29.10.2010.
- [50] H. Sun, patent USA 7 030 273, 18.04. 2007.
- [51] L. Cole, S. Furrer, C. Galopin, patent PCT WO 2006/099762, 28.08.2006.
- [52] L. Cole, S. Furrer, C. Galopin, patent PCT WO 2006/092074, 8.09. 2006.
- [53] O.Takazawa, H.Wanatabe, M. Iso, patent japoński 2004/4059474, 26.02. 2004.
- [54] E.T. Wei, patent PCT WO 2006/103401, 5.10. 2006.
- [55] E.T. Wei, zgłoszenie patentowe USA 2007/0155755, 5.07. 2007.
- [56] S.M. Furrer, zgłoszenie patentowe WIPO WO/2010/128026.

- [57] H. Surburg, J. Looft, H. Oertling, T. Vessing, zgłoszenie patentowe USA 2009/0054520, 26.02.2009.
- [58] A. Schoening, B. Wiedwald, zgłoszenie patentowe USA 2008/0175800, 24.07.2008.
- [59] A.J. Foster, C.P.E. Van Der Logt, E.W. Tareilus, zgłoszenie patentowe USA 2004/0067970, 8.04.2004.
- [60] S.M. Furrer, J.P. Slack, S.T. McCluskey, *Chem. Percept*, 2006, **2**, 128.
- [61] H. Ottinger, T. Soldo, T. Hoffmann, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5383.
- [62] T. Hofmann, H. Ottinger, O. Frank, patent USA 6 592 884, 15.07.2003.
- [63] M. Erman, *Meeting of the Society of Flavor Chemists*. Millennium Specialty Chemicals, the December 4, 2003.
- [64] E. Guenther, [w:] *The essential oils*, N.Y. Huntington (Ed.), R.E. Krieger Pub. Co., 1974, 640.
- [65] H.R. Watson, R. Hems, D. Roswell, D.J. Spring, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1978, **29**, 185.
- [66] J.C. Leffingwel, R.E. Shackelford, *Cosmetics and Perfumery*, 1974, **89**, 169.
- [67] J. Kiefer, J.E. Harvey, zgłoszenie patentowe USA 2007/70077331, 5.04.2007.
- [68] S.S. Johnson, B.Z. Stawski, G.T. Sheldon, zgłoszenie patentowe USA 2007/70248717, 25.10.2007.
- [69] M. Erman, *Perfumer & Flavorist*, 2004, **29**, 34.
- [70] J.C. Leffingwel, *Cool without menthol and cooler than menthol and cooling compounds as insect repellents*. 2011. Dostęp w Internecie: www.leffingwell.com/cooler_than_menthol.htm

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lutego 2012

SUBSTANCJE BIOLOGICZNIE AKTYWNE W WINIE
BIOACTIVE COMPOUNDS IN WINE

Jan Małyшко*, Monika Karbarz

*Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Instytut Chemii,
ul. Świętokrzyska 15, 25-408 Kielce
e-mail: malyszko@ujk.edu.pl

Abstract
Wstęp
1. Flawonoidy
2. Resweratrol
3. Inne substancje bioaktywne
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane

dr hab. Jan Małyszko jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1958). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskał na Uniwersytecie Warszawskim (1966), a doktora habilitowanego na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej (1978). Obecnie jest emerytowanym profesorem chemii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego (UJK) w Kielcach. Jego zainteresowania skupiają się wokół mechanizmu i kinetyki procesów elektrodowych oraz elektrochemii i elektroanalitycznego oznaczania związków o znaczeniu biologicznym.

dr Monika Karbarz ukończyła w 2002 r. studia chemiczne na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Akademii Świętokrzyskiej (obecnie UJK). Jest zatrudniona w Instytucie Chemii UJK w Kielcach. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół elektrochemicznych właściwości naturalnych i syntetycznych antyoksydantów. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej (2008) za rozprawę na temat mechanizmu anodowego utleniania antyoksydantów: troloksu i α -tokoferolu w środowiskach o zróżnicowanej aktywności protonów.

ABSTRACT

Wines are the subject of an increasing number of investigations. The benefits of red wine became widely recognized after the observation of “French paradox” [8–10]. It has been found that there is a low mortality rate from ischemic heart disease among French people despite their high consumption of saturated fatty acids and the prevalence of other risk factors. The health-protective properties of wine are attributed to their antioxidant activity, i.e. the capability to scavenge reactive oxygen species, ROS. An imbalance between antioxidants and oxygen species results in oxidative stress leading to cellular damage. The phenolic compounds present in wine show beneficial physiological properties including protection against coronary heart disease, as well as anti-inflammatory and anti-carcinogenic activity. Most of the beneficial effects of wine are attributed to the presence of flavonoids, resveratrol, phenolic acids and other antioxidants. This paper reviews the significance of different compounds present in wine and their effect on human health.

Chapter 1 focuses on flavonoids: flavonols, flavan-3-ols and anthocyanidins (Fig. 1) [14–29]. This class of compounds can exist both in a simple form, as aglycones, and bounded with sugars, as glycosides. The presence of phenolic hydroxyl group in these compounds is essential for their antioxidant activity and enables to scavenge free radicals *in vivo*.

Chapter 2 describes chemical and physicochemical properties of resveratrol (Fig. 2) [30–41] which is the main antioxidant in wine. Moreover, this compound has been shown to inhibit the oxidation of low density lipoproteins and the aggregation of platelets [44–47]. Resveratrol also exhibits anti-inflammatory and anticancer properties [48, 49].

Chapter 3 reveals that wines are also a good source of other antioxidants [50–55] as phenolic acids (Fig. 3), tyrosol and hydroxytyrosol (Fig. 4), and also melatonin (Fig. 5).

Unfortunately, some wines can include mycotoxins, mainly ochratoxin A [59, 60] (Fig. 6), which is produced by the phytopatogenic fungi, *Aspergillus carbonarius*.

All types of red wine contain different amounts of ethanol and phenolic antioxidants, and therefore it is probable that the cardioprotective effect of red wine is caused by both these kinds of components [57–58]. Epidemiological observations, clinical and experimental *in vitro* research prove that regular and moderate intake of wine, particularly red wine, reduces cardiovascular morbidity and mortality [66–70].

Keywords: antioxidant activity, flavonoids, melatonin, phenolic acids, red wine, resveratrol,

Słowa kluczowe: aktywność antyoksydacyjna, flawonoidy, kwasy fenolowe, melatonina, resweratrol, wino czerwone

WSTĘP

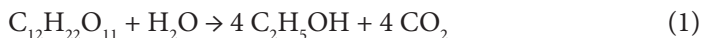
Tradycyjne wino jest napojem otrzymanym przez fermentację alkoholową owoców winorośli właściwej, zwanej również latoroślą winną (*Vitis vinifera* L.). Uprawna winorośl została prawdopodobnie wyhodowana z dzikiego euroazjatyckiego podgatunku winorośli leśnej, występującego do dzisiaj m.in. na Krymie, Kaukazie i Zakaukaziu [1]. Uprawę winorośli prowadzono już kilka tysięcy lat p.n.e., początkowo na Bliskim Wschodzie, skąd przedostała się do Grecji, a następnie do Italii. Od Rzymian przejęli ją Galowie zamieszkujący południową Francję. W czasach nowożytnych odmiany europejskiej winorośli uprawnej przewieziono do Ameryki, a później do południowej Afryki i Australii. W średniowieczu i na początku czasów nowożytnych uprawa winorośli rozpowszechniła się również w Polsce, czego dowodem mogą być dawne nazwy ulic i dzielnic w wielu miastach, takie jak „Winnice” lub „Winogrady”. Podobnym reliktem jest herb Lublina przedstawiający koziołka skaczącego na krzew winny. Ostre zmiany klimatyczne w XVII wieku (nadejście tzw. małej epoki lodowej) doprowadziły do upadku winnic i winiarstwa w naszym kraju. Obecne złagodzenie klimatu przyczynia się do odrodzenia uprawy winorośli na Podkarpaciu [2]. Co więcej, Uniwersytet Jagielloński oferuje ostatnio studia podyplomowe w zakresie enologii (winiarstwa) [3].

W skład świeżych owoców winorośli, czyli winogron wchodzi cukry (do 20%), pektyny, garbniki oraz kwasy organiczne: jabłkowy, winowy, cytrynowy i glukuronowy, jak również niektóre aminokwasy. Zawierają one również flawonoidy i inne związki fenolowe, witaminy A, B₁, B₂ i C, jak i antocyjanidyny (tylko ciemne odmiany) [4]. Największą ilość winogron wykorzystuje się jako surowiec do wyrobu wina. W krajach śródziemnomorskich wino stało się już w starożytności powszechnie używanym napojem. Nie dziwi zatem, że wiele odniesień do wina zawiera Biblia. We wczesnym chrześcijaństwie chleb i wino uchodziły za symbole jedzenia i picia. Wino często mieszano w różnych proporcjach z wodą.

W starożytności i średniowieczu wino znajdowało zastosowanie jako środek leczniczy, zarówno do leczenia ran (właściwości ściągające i antyseptyczne), o czym donosi Biblia w przypowieści o dobrym Samarytaninie, jak i do leczenia chorób wewnętrznych. Do używania wina jako lekarstwa zachęcał również św. Paweł pisząc w Pierwszym Liście do Tymoteusza: „Samej wody już nie pij, używaj natomiast po trosze wina ze względu na żołądek i częste twe słabości!” [5].

Do produkcji wina wykorzystuje się zarówno białe, jak i czerwone winogrona. Wina białe otrzymuje się przez fermentację soku wyciśniętego za pomocą prasy (również z czerwonych winogron) i oddzielonego od miazgi. Wina czerwone uzyskuje się z czerwonych winogron poddawanych wstępnej maceracji. Zmiażdżone jagody pozostają w kontakcie z sokiem przez ponad osiem dni. Wskutek tego barwniki i substancje biologicznie aktywne zawarte w skórce przechodzą do moszczu stając się składnikami wina. Skracając czas pozostawania moszczu razem z miazgą, np. do jednej doby, można otrzymać wino różowe. Fermentacja wina trwa dosyć długo, do kilku tygodni. W zależności od potrzeb prowadzi się ją do końca lub przerywa

w odpowiednim momencie, np. przez podgrzanie moszczu. Fermentacja alkoholowa jest procesem anaerobowym polegającym na przetworzeniu cukrów, w tym głównie glukozy i fruktozy, w alkohol etylowy i ditlenek węgla według prostego równania



W rzeczywistości proces ten jest bardziej skomplikowany, gdyż składa się z wielu reakcji, z których część prowadzi do wytworzenia produktów ubocznych. Zestawienie reakcji można znaleźć w artykule Churcha [6]. Obecność produktów ubocznych jest bardzo istotna, gdyż wpływa na tzw. bukiet wina, a więc jego barwę, smak i zapach.

Przed rozpoczęciem fermentacji (dodaniem drożdży winiarskich) wprowadza się do moszczu słabo zakwaszony roztwór disiarczuanu(IV) potasu ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) lub wodorosiarczuanu(IV) potasu (KHSO_3). Substancje (oznaczone odpowiednio symbolami E224 i E228) pełnią funkcję konserwantów i służą do wyzwalania SO_2 [7]. Dodatek siarczuanu(IV) służy przy produkcji wina do zniszczenia niepożądanego flory bakteryjnej i dzikich szczepów drożdży. Po zakończeniu dojrzewania wina a przed jego butelkowaniem wprowadza się ponownie SO_2 aby zapobiec utlenianiu zawartych w nim antyoksydantów tlenem powietrza.

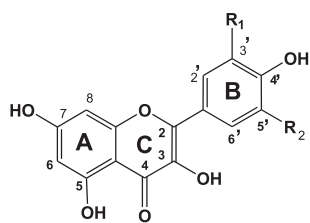
Winami nazywane są również napoje alkoholowe otrzymywane w wyniku fermentacji innych owoców, tzw. wina owocowe, np. jabłkowe. W poniższym artykule będziemy zajmowali się wyłącznie winami tradycyjnymi, tzw. gronowymi.

Mimo wytwarzania i spożywania wina od tysięcy lat nauka o jego wartościach zdrowotnych jest stosunkowo młoda. Przełomowym momentem stało się odkrycie pewnego zjawiska zwanego francuskim paradoksem (ang. *French paradox*). Polega ono na tym, że sposób odżywiania mieszkańców południowo-zachodniej Francji oraz Włoch pozostaje w zupełnej niezgodzie z tym, co zalecała do niedawna oficjalna medycyna, zwłaszcza amerykańska. Mimo spożywania dużej ilości tłuszczów nasyconych wskaźnik zachorowalności na chorobę wieńcową serca jest w tym regionie wielokrotnie niższy niż w krajach północnej Europy [8], nie wspominając już o Stanach Zjednoczonych Ameryki i Kanadzie. Kiedy w latach 90. ubiegłego stulecia zauważono to zjawisko, zaczęto doszukiwać się jego przyczyny nie tylko w jadłospisie bogatym w warzywa i owoce, lecz również w regularnym spożywaniu znacznych ilości czerwonego wina [9, 10].

1. FLAWONOIDY

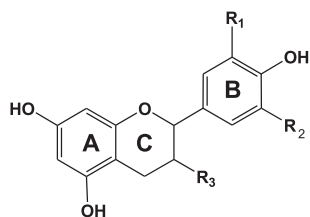
Podstawowymi składnikami wina są: woda i etanol. Oprócz nich każde wino zawiera nawet do kilkudziesięciu innych składników, które warunkują właściwości organoleptyczne, a przede wszystkim smak. Są wśród nich nie tylko produkty uboczne fermentacji alkoholowej, jak glicerol i inne alkohole, lecz również substancje biologicznie aktywne pochodzące ze skórki winogron. W większości są to naturalne fenole i polifenole o właściwości antyoksydantów (przeciwutleniaczy).

Antyoksydanty są związkami chroniącymi komórki zwierzęce przed nadmiarem reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak tlen singletowy $^1\text{O}_2$ oraz wolne rodniki: anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^- i rodnik hydroksylowy $\cdot\text{OH}$. Wynikiem braku równowagi między RFT i antyoksydantami jest stres oksydacyjny, prowadzący do uszkodzenia komórek przez niekorzystne oddziaływanie z DNA, białkami i lipidami [11]. Ze stresem oksydacyjnym wiąże się proces starzenia oraz szereg chorób, jak miażdżyca, choroby reumatoidalne, choroby zwyrodnieniowe systemu nerwowego (Parkinsona i Alzheimera) oraz choroby nowotworowe. Przed szkodliwym nadmiarem RFT bronią organizm enzymy antyoksydacyjne oraz substancje niskocząsteczkowe nazywane antyoksydantami. Te ostatnie są reduktorami, które wchodzi w reakcje z czynnikami utleniającymi (ang. *preventive antioxidants*) lub przejściowymi produktami utlenienia, zwykle wolnymi rodnikami (ang. *chain-breaking antioxidants*). Niektóre antyoksydanty, nazywane endogennymi, są wytwarzane przez organizm ludzki. Są to m.in. glutation, koenzym Q_{10} , estron, estradiol, melatonina oraz kwas moczowy. Większość antyoksydantów jest dostarczana z pożywieniem, a więc ma charakter egzogenny. Opis metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej można znaleźć w dostępnych opracowaniach monograficznych [12, 13].



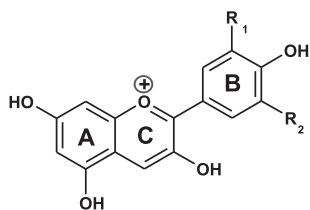
Flawonole

Flawonoid	R ₁	R ₂
kwercetyna	OH	H
mirycetyna	OH	OH



Flawan-3-ole (katechiny)

Flawonoid	R ₁	R ₂	R ₃
katechina (+)C	OH	H	OH
epikatechina (-)EC	OH	H	OH



Antocyjanidyny

Flawonoid	R ₁	R ₂
cyjanidyna	OH	H
delfinidyna	OH	OH
malwidyna	OCH ₃	OCH ₃
petunidyna	OCH ₃	OH

Rysunek 1. Struktury cząsteczkowe flawonoidów: flawonoli, flawan-3-oli i antocyjanidyn
 Figure 1. Molecular structures of flavonoids: flavonols, flavan-3-ols and anthocyanidins

Najliczniejszą grupę antyoksydantów o charakterze polifenoli tworzą flawonoidy. Związki te występują licznie w różnych częściach większości roślin, zwłaszcza w owocach i nasionach, a stąd też znajdują się w produktach spożywczych. Struktura cząsteczek wszystkich flawonoidów opiera się na szkielecie 2-fenylochromanu. Flawonoidy różnią się między sobą rodzajem, liczbą i położeniem podstawników. W winach występują flawonoidy należące do trzech grup: flawonoli, flawan-3-oli oraz antocyjanidyn [14]. Struktury tych związków wraz z przykładami są przedstawione na Rysunku 1. Najbardziej interesującą grupę stanowią antocyjanidyny, których obecność warunkuje barwę wina. Cechą odróżniającą je od innych flawonoidów jest dodatni ładunek cząsteczki, zwykle równoważony przez jony chlorkowe. W środowisku kwaśnym i obojętnym barwa antocyjanidyn zależy od pH, natomiast w środowisku zasadowym tracą zabarwienie w wyniku przemian w formy chalkonowe. Podczas dojrzewania barwa młodego czerwonego wina następuje zmiana barwy jako wynik reakcji kondensacji z udziałem antocyjanidyn oraz tworzenie się adduktów antocyjanidyn i flawan-3-oli [15].

Część flawonoidów znajduje się w winach jako glikozydy, w których są związane przez grupę hydroksylową za pomocą wiązania β -glikozydowego z monosacharydami (glukozą lub galaktozą) [16]. Antocyjanidyny tworzą oprócz 3-O-glikozydów, nazywanych antocyjanami, również 3,5-O-diglikozydy. W większej jeszcze proporcji w stosunku do aglikonów występują glikozydy w soku winogronowym. Flawonoidy są w tej postaci lepiej rozpuszczalne w wodzie od aglikonów. Przyłączone cząsteczki monosacharydów są zdolne do tworzenia licznych wiązań wodorowych, a to prowadzi w konsekwencji do lepszego uwodnienia i zwiększonej rozpuszczalności w porównaniu z wyjściowym aglikonem. Jak wykazali Shimizu i in. [17] na przykładzie galaktozydów mirecetyny, dołączenie kolejnych jednostek piranozowych (do czterech) powoduje zwiększenie rozpuszczalności ponad 1000 razy. Glikozydy są trwałe w środowisku obojętnym, ale w środowisku kwaśnym wiązanie glikozydowe łatwo ulega hydrolizie. Dlatego część aglikonów jest uwalniana podczas fermentacji alkoholowej, a wytwarzany etanol ułatwia ich rozpuszczanie. Flawan-3-ole mogą występować w winie również w postaci estrów z kwasem galusowym.

Aktywność antyoksydacyjna flawonoidów jest uzależniona od ich struktury oraz od potencjału redoks powstających rodników [18–23]. Podsumowując wnioski zawarte w cytowanej literaturze Makris i in. [24] stwierdzili, że największy wpływ na aktywność antyoksydacyjną flawonoidów mają trzy następujące czynniki strukturalne: (a) obecność struktury katecholu (3',4'-dihydroksy) w pierścieniu B; (b) wiązanie podwójne w pozycji 2,3 w zestawieniu z grupą karbonylową w pozycji 4, powodujące delokalizację ładunku ujemnego w pierścieniach A i C; (c) dodatkowa obecność grup OH w pozycjach 3 i 5. Obecność grup metoksylowych powoduje niekorzystne efekty steryczne i zwiększa hydrofobowość cząsteczki. Według wcześniejszej opinii Amicia i in. [25], opartej na badaniu 29 flawonoidów należących do różnych grup, obecność wiązania podwójnego C2-C3 nie jest konieczna do osiągnięcia wysokiej aktywności antyoksydacyjnej. Omawiany model wyjaśnia, dlaczego flawonole (np. kwercetyna) są skuteczniejszymi antyoksydantami niż flawan-3-ole (np. katechina).

Badania kwantowo-mechaniczne nad gęstością elektronową oraz geometrią cząsteczek flawonoidów prowadzili van Acker i in. [26]. Podstawy molekularne mechanizmu działania antyoksydantów o charakterze fenoli omówili Leopoldini i in. w artykule przeglądowym [27].

Flawonoidy wykazują również zdolności do tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali, np. z Fe^{2+} oraz z Cu^{2+} [28, 29]. Z cytowanej literatury wynika, że do flawonoidów najsilniej kompleksujących jony Fe^{2+} należą te, które zawierają układ 6,7-dihydroksy (w pierścieniu A), podczas gdy układ 5-hydroksy-4-keto jest pod tym względem mniej aktywny. Zgodnie z zaobserwowaną regułą kwercetyna i rutyna, występujące w winach, tworzą chelaty o średniej trwałości. Należy podkreślić, że chelatowanie żelaza(II) może zapobiegać powstawaniu rodników hydroksylowych w wyniku ich udziału w reakcji Fentona.

2. RESWERATROL

Wśród antyoksydantów zawartych w winie za najbardziej aktywny uważany jest resweratrol (3,5,4'-trihydroksystilben), polifenol należący do grupy stilbenów. Substancja ta występuje w kilkudziesięciu roślinach, w tym również jadalnych. Najbardziej obfitym jej źródłem jest rdest japoński (łac. *Polygonum cuspidatum*) rosnący głównie na Dalekim Wschodzie, lecz rozprzestrzeniający się w ostatnich latach również w Europie jako uporczywy chwast. W świecie roślin resweratrol spełnia rolę substancji obronnej (fitoaleksyna), która wytwarzana jest po uszkodzeniu tkanki, a zwłaszcza po ataku patogennych grzybów, np. szarej pleśni. Przeciwdziała on również skutkom innych czynników stresowych, jak nadmiar promieniowania UV. W medycynie Dalekiego Wschodu resweratrol był stosowany od dawna jako substancja przeciwgrzybicza (fungicyd).

Resweratrol rozpuszcza się dobrze w etanolu, DMSO i innych rozpuszczalnikach organicznych, natomiast wykazuje słabą rozpuszczalność w wodzie. W wodnych roztworach zawierających 10% etanolu jego rozpuszczalność wynosi 40 mg/l ($1,8 \cdot 10^{-4}$ M) w temperaturze 20°C [30]. Resweratrol tworzy dwa izomery geometryczne: *cis* i *trans* (Rys. 2), które różnią się właściwościami chemicznymi i fizykochemicznymi. Trela i Waterhouse [31] zarejestrowali widma absorpcyjne etanolowych roztworów obydwu izomerów w zakresie UV i wyznaczyli molowe współczynniki absorpcji jako $\epsilon_{\text{max}} = 1,26 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ przy $\lambda = 288 \text{ nm}$ oraz $\epsilon_{\text{max}} = 3,0 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ przy $\lambda = 308 \text{ nm}$, odpowiednio dla *cis*- i *trans*-resweratrolu. Widma absorpcyjne obydwu izomerów, zarówno w postaci aglikonów jak i glikozydów, w mieszanym rozpuszczalniku woda-acetonitryl-metanol (90:5:5 v/v) badali Goldberg i in. [32].

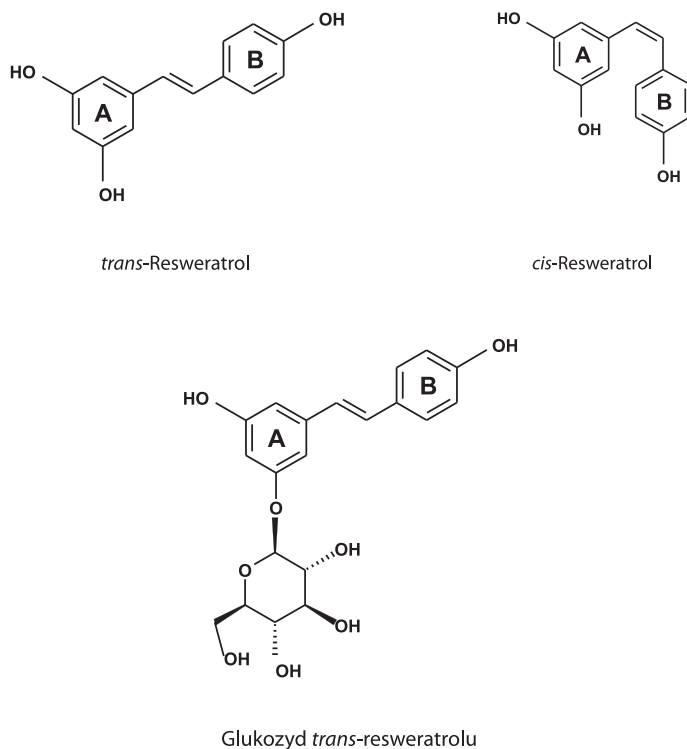
W materiale roślinnym mamy zwykle do czynienia z mieszaniną obu izomerów, jednak ze znaczną przewagą formy *trans*. Przejawia on większą aktywność biologiczną od izomeru *cis* i dlatego stanowi przedmiot zainteresowania chemików. Teoretyczne obliczenia gęstości elektronowej *trans*-resweratrolu przeprowadzili Cao i in.

[33]. Autorzy stwierdzili, że największą reaktywność powinna przejawiać grupa OH w pozycji 4' w pierścieniu B, a mniejszą grupy hydroksylowe w pozycji *meta* w pierścieniu A. Caruso i in. [34] przedstawili strukturę molekularną *trans*-resweratrolu na podstawie wyników badań krystalograficznych i obliczeń teoretycznych metodą *ab initio*. Autorzy wykazali, że obydwa pierścienie szkieletu stilbenowego znajdują się prawie w tej samej płaszczyźnie. Struktura ta została potwierdzona przez Billea i in. [35] na podstawie zarejestrowanych widm absorpcyjnych w podczerwieni oraz widm ramanowskich. Przewidywaniem właściwości spektralnych resweratrolu na podstawie obliczeń kwantowych zajmowali się Del Nero i de Melo [36]. Według Deaka i Falka [37] *trans*-resweratrol przejawia w roztworze wodnym słabe właściwości kwasowe, charakterystyczne dla fenoli, i wykazuje trzy skoki na krzywej miareczkowania mocną zasadą. Na podstawie ich położenia autorzy wyznaczyli stałą dysocjacji kwasowej jako $pK_{a1} = 9,3$, $pK_{a2} = 10,0$ oraz $pK_{a3} = 10,6$. Największą stałą dysocjacji autorzy przypisali dysocjacji protonu z grupy OH w pozycji 4' w pierścieniu B, co jest zgodne z przewidywaniami teoretycznymi. Nieco inne wartości stałych ($pK_{a1} = 8,8$, $pK_{a2} = 9,8$ oraz $pK_{a3} = 11,4$) zostały podane przez López-Nikolása i in. [38], którzy oparli się na analizie widm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS oraz widm fluorescencyjnych.

Trans-resweratrol ujawnia w roztworach dużą wrażliwość na promieniowanie nadfioletowe przekształcając się w izomer *cis*. Trela i Waterhouse [31] wykazali, że izomer *trans* jest trwały bez dostępu światła w roztworach o pH 1–7. Przy pH 1 zachodzi samorzutne przekształcanie izomeru *cis* w *trans*, który jest bardziej stabilny pod względem sterycznym. Szybkość przemiany formy *cis* w *trans* w metanolu zbadali Bernard i in. [39] używając promieniowania o długości fali 350 nm. Postęp reakcji był monitorowany niezależnie za pomocą trzech metod doświadczalnych: spektrofotometrii absorpcyjnej UV, ^1H NMR i HPLC. Autorzy wykazali, że przemiana jest I rzędu ze stałą szybkości $k_1 = 7,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ i czasem połowicznej przemiany $t_{1/2} = (14,7 \pm 0,7) \text{ min}$. Dosyć zaskakujący jest fakt, że zarówno aglikon, jak i glikozyd *trans*-resweratrolu w stanie stałym (krystalicznym) nie ulegają izomeryzacji nawet przy długotrwałym naświetlaniu promieniami UV [40].

W owocach winorośli (winogronach) resweratrol występuje głównie w postaci glikozydów, zwanych piceidami (Rys. 2). Zwiększa to ich rozpuszczalność w wodzie, podobnie jak jest w przypadku flawonoidów. Romero-Pérez i in. [41] oznaczyli zawartość *cis*- i *trans*-resweratrolu oraz odpowiadających im glikozydów w sokach z 36 odmian winogron pochodzących z Hiszpanii. Okazało się, że w tym środowisku resweratrol tworzy głównie glikozydy. W sokach z czerwonych winogron przeciętna zawartość izomeru *trans* w postaci glikozydu wynosiła 14,8 μM , a izomeru *cis* w tejże postaci 3,46 μM . Przeciętne stężenie odpowiednich aglikonów oznaczono jako 2,2 i 0,26 μM . Stężenie obydwu izomerów resweratrolu w postaci glikozydów było znacznie mniejsze w sokach z białych winogron i wynosiło odpowiednio 0,79 i 1,14 μM . Skrajnie małe było stężenie aglikonu *trans*-resweratrolu (średnio 0,05 mg/l, czyli 0,22 μM), natomiast nigdy nie stwierdzono obecności izomeru *cis* w tej postaci. Autorzy zbadali wcześniej zawartość izomerów resweratrolu oraz ich glikozydów

w różnych gatunkach czerwonych win hiszpańskich [42]. Średnia wartość ogólnego stężenia resweratrolu wyniosła w nich 5,65 mg/l (24,8 μ M). Podobnie jak w soku winogronowym stwierdzono przewagę zawartości izomeru *trans* nad *cis*, zarówno w postaci aglikonów (stosunek jak 4,43:1), jak i glikozydów (stosunek jak 2,43:1). Ten sam zespół [43] oznaczył też izomery resweratrolu w białych i różowych winach hiszpańskich. Całkowita zawartość resweratrolu wynosiła w białych winach średnio 0,48 mg/l (2,10 μ M). Stosunek stężeń izomeru *trans* do *cis* był w przypadku aglikonów jak 2,41:1, a w przypadku glikozydów 1,33:1. W porównaniu z sokiem winogronowym większa jest w winach względna zawartość aglikonów, które powstały w wyniku hydrolizy odpowiednich glikozydów w trakcie fermentacji alkoholowej. Resweratrol może również tworzyć oligomery, a przede wszystkim dimery.



Rysunek 2. Wzory strukturalne diastereoizomerów resweratrolu (aglikonów) oraz glukozydu *trans*-resweratrolu

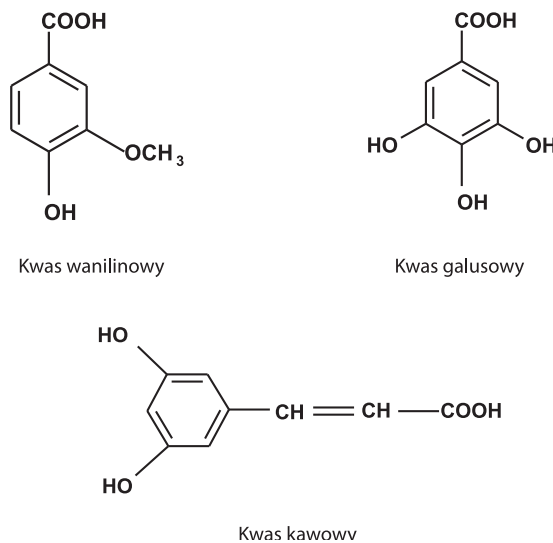
Figure 2. Molecular structures of resveratrol diastereoisomers (aglycones) and *trans*-resveratrol-glucoside

Jedną z najlepiej opisanych właściwości fizjologicznych resweratrolu jest kardioprotekcja. Resweratrol wykazuje działanie ochronne śródbłonna wyściełającego tętnice od wewnątrz. Jest to związane z hamowaniem utleniania lipoprotein, zwłaszcza frakcji LDL cholesterolu oraz apolipoproteiny A1 (ApoA1), która jest główną proteiną frakcji HDL. Tym samym obecność resweratrolu wpływa na wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu w tkankach [44, 45].

Resweratrol hamuje agregację trombocytów (płytek krwi) przez co skutecznie zapobiega powstawaniu skrzepów w naczyniach wieńcowych i zmniejszeniu światła naczyń [46]. Wykazano również, że poza działaniem ochronnym przed chorobami układu sercowo-naczyniowego resweratrol przejawia działanie przeciwzapalne oraz hamuje inicjację i rozwój nowotworów [47, 48]. Mechanizmy biochemiczne oddziaływania resweratrolu na organizm ludzki zostały szczegółowo omówione w artykule Pervaiza [49].

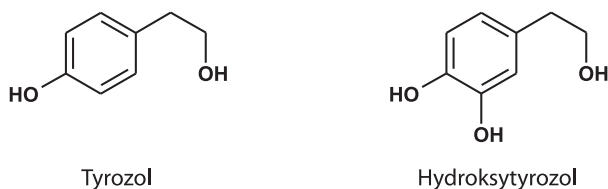
3. INNE SUBSTANCJE BIOAKTYWNE

Do naturalnych antyoksydantów zawartych w różnych składnikach żywności, w tym również w winie, należą kwasy fenolowe. Związkom tym, mimo ich skutecznego działania antyoksydacyjnego, poświęcono w literaturze znacznie mniej uwagi niż flawonoidom. Można je podzielić zasadniczo na dwie grupy, z których jedna pochodzi od kwasu benzoowego, a druga od kwasu cynamonowego. Z substancji należących do pierwszej grupy znajdują się w winach kwasy: galusowy (3,4,5-trihydroksybenzoowy) i wanilinowy (4-hydroksy-3-metoksybenzoowy). Do grupy drugiej należą kwasy: ferulowy (4-hydroksy-5-metoksycynamonowy), kawowy (3,4-dihydroksycynamonowy) i *p*-kumarynowy (4-hydroksycynamonowy), również obecne w winach. Dla przykładu przedstawiono na Rysunku 3 wzory strukturalne kilku z omawianych związków. Zależność aktywności antyoksydacyjnej kwasów fenolowych od ich struktury badali Rice-Evans i in. [19] oraz Natella i in. [50]. Stałe dysocjacji kwasowej tych związków w środowisku wodnym wyznaczyli Beltrán i in. [51]. Z uwagi na strukturę fenolową lub polifenolową ich oddziaływanie z wolnymi rodnikami jest podobne jak w przypadku flawonoidów oraz resweratrolu.



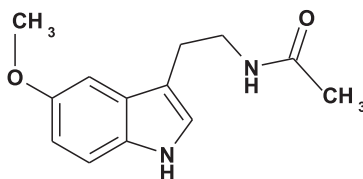
Rysunek 3. Wzory strukturalne wybranych kwasów fenolowych
Figure 3. Molecular structures of some selected phenolic acids

Znanymi substancjami występującymi w winie, a wykazującymi silne działanie antyoksydacyjne, antybiotyczne i przeciwzapalne, są tyrozol (4-(2-hydroksyetylo)fenol) i hydroksytyrozol (4-(2-hydroksyetylo)-1,2-benzenodiol) (Rys. 4). Głównym źródłem tych związków w żywności jest olej z oliwek [52]. Hydroksytyrozol może tam być obecny również w postaci estru z kwasem eleonowym, zwanego oleuropeiną. Hydroksytyrozol jest efektywnym zmiataczem RFT, przerywającym łańcuch peroksydacji lipidów. Fernández-Mar i in. [53] podkreślają, że hydroksytyrozol może również pośrednio wpływać na zwiększenie aktywności układu immunologicznego. Dudley i in. [54] wyrazili pogląd, że gatunki białego wina zawierające duże ilości tyrozolu i hydroksytyrozolu mogą wykazywać tak znaczne działanie kardio-protektywne, jak wino czerwone.



Rysunek 4. Struktury cząsteczkowe tyrozolu i hydroksytyrozolu
Figure 4. Molecular structures of tyrosol and hydroksytyrozol

Kolejnym bioaktywnym związkiem chemicznym, którego obecność została niedawno odkryta w winie, jest melatonina [55]. Jest to znany hormon (wzór strukturalny na Rysunku 5) wytwarzany przez szyszynkę, która stanowi część centralnego systemu nerwowego. Hormon ten odgrywa ważną rolę w regulacji zegara biologicznego i normowaniu okresów snu i czuwania. W medycynie stosowana jest jako środek ułatwiający zasypianie. W przeciwieństwie do środków uspokajających, usmierzających lub nasennych melatonina nie wywołuje uzależnienia i nie powoduje skutków ubocznych. Dzięki obecności melatoniny wino może działać jako lekki środek uspokajający i ułatwiający zasypianie.



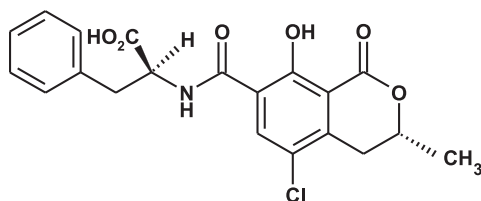
Melatonina

Rysunek 5. Wzór strukturalny melatoniny
Figure 5. Molecular structure of melatonin

Do substancji biologicznie aktywnych zawartych w winie trzeba zaliczyć również jego podstawowy składnik – alkohol etylowy, który użyty w dużej dawce jest środkiem odurzającym. Ponadto powszechnie wiadomo, że przewlekłe używanie

etanolu, zwłaszcza w dużych ilościach, może być bardzo niebezpieczne, prowadząc do uszkodzenia wątroby, trzustki, nerek i mózgu [56]. Nie powinno to przesłaniać faktu, że alkohol etylowy spożywany w umiarkowanych ilościach, chociażby właśnie w postaci wina lub piwa, ma również korzystne działanie zdrowotne. Z danych zebranych przez Klatskyego i Udaltsovą [57, 58] wynika, że alkohol zmniejsza zagrożenie chorobą niedokrwinną serca, gdyż poprawia metabolizm lipidów (obniża stężenie frakcji LDL, zwanego potocznie złym cholesterolem, w osoczu krwi). W konsekwencji ogranicza to odkładanie się złogów cholesterolu, czyli blaszek miażdżycowych w tętnicach. Według cytowanych autorów alkohol działa również przeciwwązkowo przez zakłócenie złożonego cyklu reakcji biochemicznych warunkujących agregację płytek krwi. Umiarkowane spożycie alkoholu może też obniżyć ryzyko choroby naczyń wieńcowych w sposób pośredni – przez zmniejszenie zagrożenia cukrzycą typu II. Należy podkreślić, że picie dużych ilości alkoholu nie zabezpiecza przed chorobami krążenia w stopniu większym niż picie umiarkowane. Częste spożywanie dużych jego ilości może mieć zgubne skutki wywołując choroby niezwiązane z układem krążenia, o czym wspominaliśmy wcześniej. Sprawdza się tutaj znana reguła Paracelsusa: „Tylko dawka odróżnia truciznę od lekarstwa”.

Obok omówionych substancji korzystnych dla zdrowia wina mogą zawierać również takie, które są niepożądane, a nawet wręcz szkodliwe. W pierwszym rzędzie należy zaliczyć do nich mykotoksyny wytwarzane przez niektóre gatunki pleśni z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* namnażających się na powierzchni skórki winogron [59]. Do najczęściej występujących w winie należy ochratoksyna A (OTA), której struktura jest przedstawiona na Rysunku 6. Substancja ta, wytwarzana przez głównie przez pleśń *Aspergillus carbonarius*, zakłóca działanie układu odpornościowego, jest potencjalnie rakotwórcza dla ludzi i prawdopodobnie wywiera słabe działanie mutagenne. Jej obecność w winie jest uwarunkowana przez czynniki klimatyczne i kulturę uprawy winorośli. OTA jest wytwarzana przede wszystkim w warunkach dużej wilgotności i małego nasłonecznienia. Interesujące są wyniki badań porównawczych, które przeprowadzili Brera i in. [60] nad zawartością OTA w 267 gatunkach win, głównie czerwonych i białych, pochodzących z Węgier i z Włoch. Okazało się, że żadne z win węgierskich nie było zanieczyszczone tą toksyną, co zapewne wynika z uprawy winorośli suchym klimacie, który nie sprzyja rozwojowi pleśni. W przeciwieństwie do tego w większości win włoskich stwierdzono obecność OTA w stężeniu zawartym w przedziale od 0,01 do 4,00 µg/l, przy czym najbardziej skażone były wina z południowych regionów. Wina czerwone zawierały znacznie większe ilości toksyny niż wina białe. Przyczyna tych różnic tkwi w technologii produkcji.



Ochratoksyna A

Rysunek 6. Wzór strukturalny ochratoksyny A
Figure 6. Molecular structure of ochratoxin A

Do substancji szkodliwych dla zdrowia zalicza się też siarczany(IV). Jak wykazaliśmy we wstępie, są one celowo wprowadzane do wina. Dopuszczalna ich ilość w przeliczeniu na SO_2 wynosi 160 mg/l w czerwonym wytrawnym winie i 210 mg/l w białym. Wina słodkie mogą zawierać je w znacznie większym stężeniu. Należy wspomnieć, że pewna ilość siarczanów(IV) powstaje też w sposób naturalny w czasie fermentacji przez przemiany aminokwasów zawierających siarkę, a zawartych w winogronach.

UWAGI KOŃCOWE

Z powyższego przeglądu wynika, że wina zawierają nawet do kilkudziesięciu substancji w niewielkich stężeniach, które jednak mogą wywierać istotny wpływ na zdrowie człowieka. Identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie tych substancji stało się możliwe dzięki ogromnemu postępowi w rozwoju technik analitycznych, zwłaszcza chromatograficznych, który obserwujemy w ostatnich latach. Należy również wskazać na znaczenie metod elektroanalitycznych przy ocenie właściwości antyoksydacyjnych wina i jego składników [61–64].

Podczas przechowywania wina bardzo istotne jest zachowanie odpowiedniego poziomu kwasowości. W większości win wartość pH zawarta jest w granicach od 2,8 do 3,8, przy czym bogatsze w kwasy są owoce winorośli uprawianych w bardziej północnych regionach. Zbyt kwaśne wina nie nadają się do picia. Z drugiej strony, przy wyższych wartościach pH wino staje się nietrwałe, gdyż zawarte w nim antyoksydanty (w tym również barwniki antocyjaninowe) łatwiej ulegają utlenieniu tlenem powietrza. Stąd też w celu zwiększenia trwałości win wprowadza się do nich dodatki kwasu winowego lub cytrynowego. Podczas dojrzewania wina zachodzą również reakcje estryfikacji, nie tylko z udziałem etanolu, lecz także substancji fenolowych. Z kolei długotrwałe przechowywanie wina przy bardzo nawet ograniczonym dostępie powietrza, np. w korkowanych butelkach, prowadzi do powolnego brunatnienia, które jest szczególnie dobrze widoczne w przypadku win białych. Przyczyną jest utlenianie związków fenolowych do chinonów [65].

W poprzednich rozdziałach tego przeglądu wskazaliśmy na to, że liczne fenole i polifenole pełniące funkcję antyoksydantów, które są obecne w winie, zwłaszcza czerwonym, wpływają korzystnie na stan zdrowia. Obserwacje epidemiologiczne i kliniczne badania eksperymentalne dowiodły, że regularne i długoterminowe spożywanie umiarkowanych ilości czerwonego wina zapobiega ischemii (niedokrwieniu) i niewydolności serca [66]. Dominuje pogląd, że działanie kardioprotekcyjne wywiera zarówno etanol, jak i fenole zawarte w winie, lecz każdy z tych składników na inny sposób [67]. Na synergetyczne działanie tych składników wskazuje fakt, że ani systematyczne picie umiarkowanych ilości napojów alkoholowych pozbawionych antyoksydantów, ani znacznych ilości samego soku winogronowego nie przynosi tak znacznych skutków zdrowotnych jak spożywanie czerwonego wina [68, 69]. Warto przypomnieć na podstawie informacji zawartych w poprzednich rozdziałach, że antyoksydanty znajdujące się w winie mogą zapobiegać również innym chorobom degeneracyjnym. W ostatnich latach zwrócono też uwagę na antyseptyczne właściwości wina, które były przecież wykorzystywane w starożytnej i średniowiecznej medycynie [30, 70].

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] P. Czikiw, J. Łąptiew, *Rośliny lecznicze i bogate w witaminy*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1987, ss. 361–365.
- [2] T. Tarko, A. Duda-Chodak, P. Sroka, P. Satora, E. Jurasz, *J. Food Comp. Anal.*, 2010, **23**, 463.
- [3] E. Łosińska, *Rzeczpospolita*, Nr 262 z 10.11.2011, s. A10.
- [4] *Lecznicze właściwości roślin uprawnych*, praca zbiorowa, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1991, ss. 218–220.
- [5] *Pismo Święte Starego i Nowego Testamentu*, Wydawnictwo Pallotinum, Poznań 1996, s. 1350.
- [6] L.B. Church, *J. Chem. Educ.*, 1972, **49**, 174.
- [7] Z.P. Zagórski, *Czy wiesz co jesz. Przewodnik po dodatkach do żywności*, Wiedza i Życie, Warszawa 1995, ss. 64–65.
- [8] M. Law, N. Wald, *Brit. Med. J.*, 1999, **318**, 1471.
- [9] D.M. Goldberg, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 14.
- [10] A. Howard, M. Chopra, D.I. Thurnham, J.J. Strain, B. Fuhrman, M. Aviram, *Med. Hypoth.*, 2002, **59**, 101.
- [11] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [12] *Przeciwutleniacze w żywności*, praca zbiorowa pod red. W. Grajka, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007, rozdz. 10.
- [13] J. Małyżko, M. Karbarz, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 17.
- [14] B. Dimitrios, *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 505.
- [15] B. Sun, I. Spranger, J. Yang, C. Leandro, L. Guo, S. Canáriot, Y. Zhao, Ch. Wu, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 8623.
- [16] I.B. Jaganath, A. Crozier, [w:] *Plant Phenolics and Human Health. Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, red. C.G. Fraga, John Wiley, Hoboken 2010, s. 1.
- [17] R. Shimizu, H. Shimabayashi, M. Moriwaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70**, 940.

- [18] N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, C. Rice-Evans, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **322**, 339.
- [19] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **20**, 933.
- [20] C. Rice-Evans, *Curr. Med. Chem.* 2001, **8**, 797.
- [21] A.S. Pannala, T.S. Chan, P.J. O'Brien, C.A. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **282**, 1161.
- [22] S. Burda, W. Oleszek, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2774.
- [23] K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **13**, 572.
- [24] D.P. Makris, S. Kallithraka, P. Kefalas, *J. Food Comp. Anal.*, 2006, **19**, 396.
- [25] D. Amić, D. Davidović-Amić, D. Bešlo, N. Trinajstić, *Croat. Chem. Acta*, 2003, **76**, 55.
- [26] S.A.B.E. van Acker, M.J. de Groot, D.-J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, G. Donné-Op den Kelder, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **9**, 1305.
- [27] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.*, 2011, **125**, 288.
- [28] M.T. Fernandez, M.L. Mira, M.H. Florêncio, K.R. Jennings, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 105.
- [29] P. Mladěnka, K. Macáková, T. Filipický, L. Zatloukalová, L. Jahodář, P. Bovicelli, I.P. Silvestri, R. Hrdina, L. Saso, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 693.
- [30] V. Filip, M. Plocková, J. Šmidrkal, Z. Špičková, K. Melzoch, Š. Schmidt, *Food Chem.*, 2003, **83**, 585.
- [31] B.C. Trela, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1253.
- [32] D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, *J. Chromatogr. A*, 1995, **708**, 89.
- [33] H. Cao, X. Pan, C. Li, Ch. Zhou, F. Deng, T. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1869.
- [34] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 7279.
- [35] F. Billes, I. Mohamed-Ziegler, H. Mikosch, E. Tyihák, *Spectrochim. Acta A*, 2007, **68**, 669.
- [36] J. Del Nero, C.P. de Melo, *Opt. Mater.*, 2002, **21**, 455.
- [37] M. Deak, H. Falk, *Monatsh. Chem.*, 2003, **134**, 883.
- [38] J.M. López-Nicolás, F. García-Carmona, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7600.
- [39] E. Bernard, P. Britz-McKibbin, N. Gernigon, *J. Chem. Educ.*, 2007, **84**, 1159.
- [40] J.S. Jensen, Ch.F. Wertz, V.A. O'Neill, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 1685.
- [41] A.I. Romero-Pérez, M. Ibern-Gómez, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1533.
- [42] R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Romero-Pérez, A.I. Waterhouse, M.C. de la Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 281.
- [43] A.I. Romero-Pérez, R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Waterhouse, M.C. de la Torre-Boronat, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2124.
- [44] B. Olas, *Kosmos*, 2006, **55**, 277.
- [45] P. Gresele, Ch. Cerletti, G. Gugliemini, P. Pignaletti, G. de Gaetano, F. Violi, *J. Nutr. Biochem.*, 2011, **22**, 201.
- [46] B. Olas, B. Wachowicz, *Thromb. Res.*, 2002, **106**, 143.
- [47] L. Frémont, *Life Sci.*, 2000, **66**, 663.
- [48] P. Signorelli, R. Ghidoni, *J. Nutr. Biochem.*, 2005, **16**, 449.
- [49] S. Pervaiz, *FASEB J.*, 2003, **17**, 1975.
- [50] F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice, C. Scaccini, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1453.
- [51] J.L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 253.
- [52] J. Małyszko, S. Michałkiewicz, *Wiad. Chem.*, 2010, **64**, 467.
- [53] M.I. Fernández-Mar, R. Mateos, M.C. García-Parilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, *Food Chem.*, 2012, **130**, 797.

- [54] J.I. Dudley, I. Lekli, S. Mukherjee, M. Das, A.A.A. Bertelli, D.K. Das, J. Agric. Food Chem., 2008, **56**, 9362.
- [55] M.I. Rodriguez-Naranjo, A. Gil-Izquierdo, A.M. Troncoso, E. Cantos, M.C. Garcia-Parrilla, J. Food Comp. Anal., 2011, **24**, 603.
- [56] J. Timbrell, *Paradoks trucizn. Substancje chemiczne przyjazne i wrogie*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008, ss. 201–215.
- [57] A.L. Klatsky, Świat Nauki, **2003**(4), 73.
- [58] A.L. Klatsky, N. Udaltsova, Ann. Epidemiol., 2007, **17**, S63.
- [59] N. Delage, A. d'Harlingue, B. Colonna Ceccaldi, G. Bompreix, Food Control, 2003, **14**, 225.
- [60] C. Brera, J.M. Soriano, F. Debegnach, M. Miraglia, Microchem. J., 2005, **79**, 109.
- [61] M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, Food Chem., 2011, **124**, 1208.
- [62] D. Zhang, L. Chut, Y. Liu, A. Wang, B. Ji, W. Wu, F. Zhou, Y. Wie, Q. Cheng, S. Cai, L. Xie, G. Jia, J. Agric. Food Chem., 2011, **59**, 10277.
- [63] S. Mu, J. Phys Chem. C, 2012, **116**, 3065.
- [64] A.S. Arribas, M. Martínez-Fernández, M. Chicharro, Trends Anal. Chem., 2012, **34**, 78.
- [65] N. Sioumis, S. Kallithraka, E. Tsoutsouras, D.P. Makris, P. Kefalas, Eur. Food Res. Technol., 2005, **220**, 326.
- [66] B. Buemann, J. Dyeberg, A. Astrup, Nutr. Res. Rev., 2002, **15**, 91.
- [67] S. Das, D.D. Santani, N.S. Dhalla, Exp. Clin. Cardiol., 2007, **12**, 5.
- [68] D.M. Goldberg, V. Garovic-Kocic, E.P. Diamandis, C.R. Pace-Asciak, Clin. Chim. Acta, 1996, **246**, 183.
- [69] R. Estruch, E. Sacanella, F. Mota, G. Chiva-Blanch, E. Artúnez, E. Casals, R. Deulofeu, D. Rotilio, C. Andres-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventos, G. de Gaetano, A. Urbano-Marquez, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2011, **21**, 46.
- [70] M.J. Rodríguez Vaquero, M.R. Alberto, M.C Manca de Nadra, Food Control, 2007, **18**, 93.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 marca 2012

**POSZUKIWANIA RAPORTU
JĘDRZEJA ŚNIADECKIEGO
O VESTIUM/RUTENIE Z ROKU 1808**

Roman Edmund Sioda

Warszawa
e-mail: rsioda@tlen.pl



Dr hab. Roman Sioda urodził się w 1937, chemik absolwent Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu; stopień doktora uzyskał w Polskiej Akademii Nauk a stopień doktora habilitowanego na Uniwersytecie Warszawskim. Obecnie pozostaje na emeryturze. Był profesorem nadzwyczajnym oraz kierownikiem Zakładu Chemii Analitycznej i Elektrochemii, Akademii Podlaskiej w Siedlcach – obecny Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny. Był wykładowcą chemii nieorganicznej oraz historii chemii w Instytucie Chemii WAT w Warszawie. Autor trzech skryptów z historii chemii, przeszło stu dwudziestu publikacji naukowych i popularno-naukowych, recenzent wielu podręczników. Odbił liczne podróże i staże naukowe: USA, Wielka Brytania, Szwajcaria, Japonia, Francja i Nigeria. Wygłosił blisko 50 wykładów naukowych na zaproszenia.

Według opublikowanych protokołów Akademii Francuskiej w Paryżu raport Jędrzeja Śniadeckiego profesora chemii z Imperialnego Uniwersytetu w Wilnie o odkryciu nowego metalu w surowej platynie, który nazwał Vestium od odkrytej rok wcześniej planetoidy Vesta, dotarł do Akademii. Był zgłoszony na posiedzeniu Akademii w dn. 11 lipca 1808 r. przez starszego brata chemika, astronoma i Rektora Uniwersytetu Wileńskiego, Jana Śniadeckiego, który także przedstawił na tymże posiedzeniu swoje obserwacje astronomiczne. Przewodniczącym posiedzenia klasy nauk matematyczno-fizycznych był wybitny matematyk i astronom francuski Jean-Baptiste Joseph Chevalier Delambre (1749–1822), wybrany na to stanowisko przez Napoleona Bonaparte. Tydzień później, na posiedzeniu w dn. 18 lipca 1808 r., przewodniczący Delambre zarządził odczytanie raportu Jędrzeja Śniadeckiego oraz wybrano 4-osobową komisję do oceny naukowej odkrycia zgłoszonego przez Jędrzeja Śniadeckiego. W skład komisji weszło czterech wybitnych chemików paryskich: Claude Louis Berthollet, Antoine Francois comte de Fourcroy, Louis-Bernard Guyton de Morveau i Louis Nicolas Vauquelin, uczeń de Fourcroya [1].

Tym działaniom na terenie Akademii towarzyszyły dwie publikacje w znanym czasopiśmie popularno-naukowym, mianowicie w wydaniu z lipca 1808 r. – notatka o odkryciu nowego metalu w surowej platynie nazwanego Vestium oraz krótsza notatka w edycji ze stycznia 1809 r. – o braku potwierdzenia odkrycia Vestium i konieczności dalszych badań [2, 3].

Opisana sytuacja sprzed dwu wieków pozostawia istotne znaki zapytania, które pobudzają ciekawość badacza. Przede wszystkim wydaje się interesujące ustalenie, jaką drogą raport naukowy Profesora Jędrzeja Śniadeckiego znalazł się w Paryżu w rękach Przewodniczącego Delambre na posiedzeniu klasy matematyczno-fizycznej Instytutu Narodowego. Przecież Paryż od Wilna dzieli około 1700 km, a tak dalekie podróże były bardzo kosztowne i długotrwałe. Nie ma żadnych podstaw sądzić, że Profesor Jędrzej Śniadecki przyjechał do Paryża i przywiózł swój raport. Z tekstu zapisu protokołów Akademii Francuskiej nie jest wykluczone, że może raport przywiózł osobiście Rektor Uniwersytetu, Profesor Jan Śniadecki? W protokołach zanotowano jedynie, że przedstawił wyniki swoich obserwacji astronomicznych. Nie jest wiadomo, czy wybrana czteroosobowa komisja podjęła jakąś pracę nad weryfikacją doświadczalną wyników umieszczonych w raporcie Jędrzeja Śniadeckiego. Mianowicie, w protokołach Akademii Francuskiej nie ukazały się żadne doniesienia w tej sprawie w terminie późniejszym niż lipiec 1808 roku, kiedy najpierw zgłoszono, a później odczytano raport Jędrzeja Śniadeckiego. I wreszcie nadal nurtuje pytanie zasadnicze, czy Profesor Jędrzej Śniadecki przesłał do Paryża próbkę swojego nowego metalu do zbadania przez chemików francuskich?

Są to pytania, których nie stawiali sobie zwykle liczni komentatorzy faktu zgłoszenia odkrycia nowego metalu przez Jędrzeja Śniadeckiego na przestrzeni dwóch wieków, a które to od ogłoszenia odkrycia na Uniwersytecie Wileńskim wg obecnego kalendarza w dniu 10 lipca 1808 roku upłynęły [4]. Zatem warto się zastanowić, dlaczego pytań tych nie poruszano. Być może nie uważano je za istotne? Albo sądzono, że nie ma możliwości odpowiedzi na nie? Czy też uważano, że odpowiedź jest trywialnie prosta? Bądź uważano, że są dziesiątki, a nawet setki pytań ważniejszych, na które należy najpierw odpowiedzieć? Albo... itd., itd.??

Jednakże dla współczesnego, z początku 21-ego wieku, badacza historii chemii, takie pytania są jak najbardziej zasadne. Jest też nadzieja na znalezienie odpowiedzi, biorąc pod uwagę nowe możliwości zdobywania informacji chociażby poprzez ogromne zasoby informacji dostępnej w sieci połączeń internetowych.

Autor niniejszego artykułu stawiał sobie podobne pytania mniej więcej od około jednego roku, kiedy pracował nad swoją pierwszym listem poświęconym tej tematyce, opublikowanym we wrześniu 2010 r. [5]. Poszukiwał odpowiedzi w źródłach dostępnych w bibliotekach w Kraju, a kiedy ta droga zdawała się wyczerpywać z powodu braku nowych informacji, stało się naturalne, aby spróbować uzyskać informację u samego „źródła” czyli w bibliotekach paryskich, a szczególnie w bibliotece Akademii Nauk w Paryżu.

Działając w tym kierunku, Autor zwrócił się o pomoc do swojego korespondencyjnego znajomego w Paryżu, prof. Christiana Amatore na wybitnej uczelni paryskiej, École Normale Supérieure. Profesor Amatore był przez kilka ostatnich lat redaktorem ważnego czasopisma naukowego, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, wydawanego przez Elseviera. W tym czasopiśmie Autor wiele publikował, począwszy od roku 1964 – wspólnie ze śp. profesorem Wiktorem Kemulą, wybitnym polskim chemikiem analitykiem, według niektórych porównań, jednym z 10-ciu najwybitniejszych chemików polskich w historii. Łącznie, Autor opublikował w tym czasopiśmie 16 publikacji w ciągu czterdziestu pięciu lat (1963–2008) i uzyskał 46 cytowań, w kolejnym czasopiśmie, *Electrochimica Acta* – 12 publikacji w okresie 36 lat (1968–2004), 58 cytowań i następnym – *Journal of Applied Electrochemistry* – 7 publikacji w okresie 30 lat (1975–2005), 11 cytowań w ciągu ostatnich 5 lat.

Profesor Amatore zaproponował jako wsparcie w zajęciu się ciekawą tematyką poszukiwań śladów działalności profesora Jędrzeja Śniadeckiego w naukowych archiwach paryskich – emerytowanego profesora chemii nieorganicznej, w szczególności chemii związków kompleksowych na Uniwersytecie Piotra i Marii Curie w Paryżu, członka Francuskiej Akademii Nauk, Pana Yves Jeannin.

Po wstępnej wymianie korespondencji, przedstawieniu tematyki poszukiwań i przesłaniu opracowań na ten temat przez Autora, prof. Jeannin odwiedził Archiwa Akademii Nauk w Paryżu, znajdujące się w Instytucie Francuskim (Institut de France) na 23 quai de Conti w centrum Paryża (lewy brzegu Sekwany w pobliżu mostu Pont des Arts). Już pierwsze wizyty doprowadziły do ciekawego efektu poszukiwań, mianowicie odnalazły się oryginalne protokoły posiedzeń Akademii Nauk z 1808 r. oraz dwa listy Rektora Imperialnego Uniwersytetu Wileńskiego, Profesora

Jana Śniadeckiego, wysłane z Wilna (Wilna). Oba listy były pisane odręcznie po francusku. Pierwszy list, cztero-stronnicowy, był datowany w Wilnie dn. 5 czerwca 1808 (nowego stylu, czyli obecnego kalendarza), natomiast drugi, dwu-stronnicowy – dn. 6 października 1808 roku. Fotokopię pierwszej strony pierwszego listu przedstawia Ilustracja 1. Oba listy skierowane są do przewodniczącego klasy nauk matematyczno-fizycznych Akademii Francuskiej, profesora Delambre.

Séance du lundi 11 juillet 1808. Wilna le 5 Juin 1808. n.s.
 Monsieur!
 J'ai l'honneur de Vous annoncer, que l'Université Impériale d'ici dans sa séance
 tenue le 15 Avril. v. s. Vous a élu son membre honoraire. Vous voudrez bien agréer ce témoignage
 de considération et de justice, que l'Université se plaît de manifester et de rendre à Vostres
 et à Vos mérites. En qualité de Collègue ayez la bonté de présenter à l'Institut le Mémoire
 joint de mon frère, élève de célèbre Black d'Edimbourg. C'est le précis des résultats obtenus par un
 long travail sur l'analyse du Platine, où il trouve encore un nouveau métal dont il décrit les
 caractères distinctifs, et qui il nomme Vestium de la nouvelle Planète Vesta. L'auteur invite les chimistes
 français à vérifier les faits consignés dans ce mémoire. Il en a encore d'autres exposés fort en
 détail dans un écrit polonois. Il se peut que quelques uns soient déjà connus et publiés dans
 les annales de chimie, mais depuis plus de deux ans nous n'avons pas cet ouvrage ici, la
 circulation des livres et papiers étrangers entravée pendant la guerre, ne s'est pas encore
 rétablie. Je n'ai appris que depuis deux mois la mort de Notre Ami Lalande en lisant son
 obituaire fait par Vous dans le journal de Millon. Après avoir quitté Paris en 1804, j'ai passé
 un an dans le Sud de la France et en Italie. Revenu en Pologne, je ne pouvais pas visiter avec
 sollicitations des personnes très respectables pour examiner les travaux de l'Observatoire, et la
 place de M. Boscovich affaibli par l'âge et les infirmités. Je suis ici depuis 15 mois, j'en
 été plus tôt, si l'on ne m'avait pas tourmenté d'accepter en même temps le Rectorat de l'Univer-
 sité, charge extrêmement laborieuse par les rapports avec les premières autorités de Pologne, et par
 la voie de tous les établissements de l'Instruction publique dans toutes les provinces ci-dessus
 polonoises, les occupations m'absorbent le temps que je voudrais consacrer aux travaux astronomiques
 avec des instruments aussi beaux, que possède l'Observatoire d'ici. En attendant que je puisse mettre en
 œuvre une série de observations pour la professionnement des Tables et du Catalogue des étoiles
 voisines voisines Oppositions des Planètes, que j'ai l'honneur de Vous communiquer. Une belle Lunette méridienne
 de Ramsden dont l'objet à triple verre a quatre pouces d'ouverture. Un quart de cercle mural de même artiste
 de 8 pieds de rayon, et un excellent pendule de Millon sont les Instruments dont je me suis servi.

Ilustracja 1. Fotokopia pierwszej strony listu Rektora Imperialnego Uniwersytetu w Wilnie, Profesora Jana Śniadeckiego, datowanego dn. 5 czerwca 1808 r., skierowanego do Profesora Delambre w Paryżu. Reprodukowane za zgodą Archiwum Académie des sciences – Institut de France w Paryżu.

Pierwszy, dłuższy, list porusza szereg istotnych spraw. Na pierwszej stronie, Rektor oświadcza, że Uniwersytet Imperialny w Wilnie na posiedzeniu dn. 15 kwietnia (starego stylu), tj. 27 kwietnia (obecnego kalendarza) 1808 r. uchwalił, aby uhonorować profesora Delambre członkostwem honorowym. Następnie, Rektor prosi o przyjęcie do Instytutu Francuskiego raportu swojego brata, ucznia sławnego profesora Blacka z Edynburga. Jak pisze Rektor (w tłumaczeniu) na współczesny

polski: „jest to streszczenie rezultatów otrzymanych dzięki długiej pracy nad analizą Platyny, gdzie Brat znajduje jeszcze jeden nowy metal, którego opisał wyróżniające właściwości i nazwał *Vestium* od nowej planety *Vesta*” – a w oryginale: *C'est le précis des résultats obtenus par un long travail sur l'analyse du Platine, où il trouve encore un nouveau metal, dont il décrit les caractères distinctifs, et qu'il nomme Vestium de la nouvelle Planète Vesta*. Dalej pisze Rektor (w tłumaczeniu): „Autor zaprasza chemików francuskich, aby sprawdzili fakty zawarte w tym raporcie” (*Lauteur invite les chymistes françois à verifier les faits consignés dans ce mémoire*) i kolejno „Istnieją dalsze fakty wyłożone szczegółowo w piśmie w języku polskim” (*Il en a encore d'autres exposés fort en detail dans un écrit polonaise*) oraz dalej „Jest możliwe, że fakty te są już znane kilka lat i opublikowane w rocznikach chemicznych, jednakże od więcej niż dwóch lat nie mamy tych roczników tutaj. Obrót książkami i czasopismami zagranicznymi wstrzymany podczas wojny, nie został jeszcze wznowiony” (*Il se peut que quelques uns soient déjà connus et publiés dans les annals de chymie, mais depuis plus de deux ans nous n'avons pas cet ouvrage ici. La circulatin des livres et papiers etrangers entrouvée pendant la guerre, ne s'était pas encore retablie*). Następnie, Rektor Śniadecki przechodzi do opisu swoich spraw związanych z astronomią [6].

Niestety, raport Profesora Jędrzeja Śniadeckiego zaginął i nie znajduje się w Archiwach Akademii Nauk w Paryżu [7].

Zdając sobie sprawę z wagi odkrycia tego dokumentu, wspomniałem o nim na wykładzie seminaryjnym, który wygłosiłem w Instytucie Historii Nauki PAN w Pałacu Staszica w Warszawie w dn. 30 czerwca 2011 r. Temat wykładu był następujący: „Jan i Jędrzej Śniadecy i odkrycie nowego metalu *Vestium/Rutenu* na Imperialnym Uniwersytecie Wileńskim w 1808 r.”. Było to seminarium doktoranckie sekcji historii oświaty, któremu przewodniczyła pani prof. dr hab. Kalina Bartnicka. W seminarium wziął udział zespół doktorantów, tj. około 30 osób. Specjalnie na seminarium przyjechała pani dr Birute Railienė z Biblioteki Litewskiej Akademii Nauk w Wilnie, autorka licznych artykułów oraz książki na temat Jędrzeja Śniadeckiego [8]. Po wykładzie Autora, pani dr Railienė przedstawiła koreferat złożony z pokazu slajdów fotograficznych obrazujących miejsca, budynki i kościoły, pomieszczenia, związane z działalnością profesora Jędrzeja Śniadeckiego. Następnie miała miejsce dyskusja, w której padły liczne zapytania. Wykład został zapisany przez Autora na CD [9].

PODZIĘKOWANIE

Panu prof. Christian Amatore oraz panu prof. Yves Jeannin (Paryż) jestem bardzo wdzięczny za okazaną uprzejmość i pomoc w odnalezieniu w Archiwach Akademii Nauk w Paryżu listu Rektora Imperialnego Uniwersytetu Wileńskiego, istotnego dla badań dorobku naukowego Jędrzeja Śniadeckiego. Jednocześnie serdecznie dziękuję Archiwum Académie des sciences – Institut de France w Paryżu za zgodę na opublikowanie tego listu. Ponadto jestem zobowiązany za dyskusję panu

dr Zbigniewowi Wielogórskiemu oraz prof. Yves Jeannin za obszerną korespondencję w tym temacie.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Institut de France, Académie des sciences, Procès-verbaux des Séances de l'académie tenues depuis la fondation de l'Institut jusqu'au mois d'août 1835, Tome IV, an 1808–1811, Hendaye (Basses-Pyrénées), 1913; <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3297q.r=.langFR>.
- [2] Anonim, Journal de Physique, de Chimie, D'histoire Naturelle et des Arts, tom 67, str. 71 (juillet 1808) oraz tom 68, str. 29 (janvier 1809). <http://biodiversitylibrary.org/OLBookReader/Viewer/print.aspx?id=29676&file=32&...>
- [3] R.E. Sioda, Wiedza i Życie, **nr 914**, 42–45 (luty 2011).
- [4] J. Śniadecki, *Rosprawa o nowym metalu w surowey platynie odkrytym*, wyd. Józefa Zawadzkiego, Wilno, 1808.
- [5] R.E. Sioda, Przemysł Chemiczny, 2010, **89**, 1158.
- [6] Tekst listu Rektora Jana Śniadeckiego udostępniony przez Instytut Francuski w Paryżu (Académie des sciences – Institut de France) i opublikowany za jego zgodą.
- [7] Informacja z Archiwum Akademii Nauk – Instytutu Francuskiego w Paryżu z dn. 6 lipca 2011 r.
- [8] B. Railienė, „Andrius Sniadeckis”, Vilnius universiteto leidykla, Vilnius, 2005.
- [9] R.E. Sioda, nagranie wykładu w Instytucie Historii Nauki PAN w dn. 30 czerwca 2011 r. (40 min na CD).

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2012

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2012 r. będzie wynosiła **180 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2012 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*,
cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I, cena 17,50 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II, cena 17,50 zł.

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej. Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją.

W ramach nowej serii wydawniczej pod nazwą „Habilitatione” mogą być publikowane prace habilitacyjne z szeroko pojmowanego obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku bliskotematycznych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie (również w kolorach) obydwu tych wariantów. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa lub w przypadku specjalnych wymagań Autorów, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z Autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną na adres: bstran@wchuwr.pl lub wchem@wchuwr.pl.

Tekst powinien być przygotowany w edytorze **Word** lub innym kompatybilnym z MS Office. Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać nadmiaru szczegółów, odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które powinno uwzględniać najnowsze prace z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Plik z pracą nie powinien przekraczać 25 stron, wliczając wykaz piśmiennictwa w przypadku krótkiego przeglądu, lub 100 stron, w przypadku monografii przeznaczonej do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Strona powinna zawierać **1800** znaków (razem ze spacjami), co przy interlinii 1,5 oznacza 30 wierszy po 60 znaków oraz margines z prawej strony ok. 5 cm.

Na pierwszej stronie, pod tytułem polskim, należy umieścić tytuł w języku angielskim, nazwisko(a) i adres autora(ów) oraz spis rozdziałów. Dalej powinno się znaleźć obszerne streszczenie pracy w języku angielskim (do 2700 znaków, z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście) oraz wykaz słów kluczowych, osobno w języku polskim i osobno w angielskim. Redakcja prosi o przysyłanie tekstów angielskich adjustowanych.

W oddzielnym pliku prosimy dołączyć krótką (do 150 wyrazów) **notkę biograficzną**, zawierającą tytuły naukowe i miejsca pracy oraz inne informacje wg uznania Autora/Autorów, w tym aktualne zdjęcie. Nadesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Rysunki mogą być kolorowe, ale wówczas należy liczyć się z dopłatą do druku. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. W osobnym pliku prosimy dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołączyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi, a ich tytuły w języku polskim i angielskim zapisać nad tabelami.

Piśmiennictwo należy zestawiać w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy, przykład: J. Kowalski, *Wiad. Chem.*, 2007, **61**, 473. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przysyłane recenzentom.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.