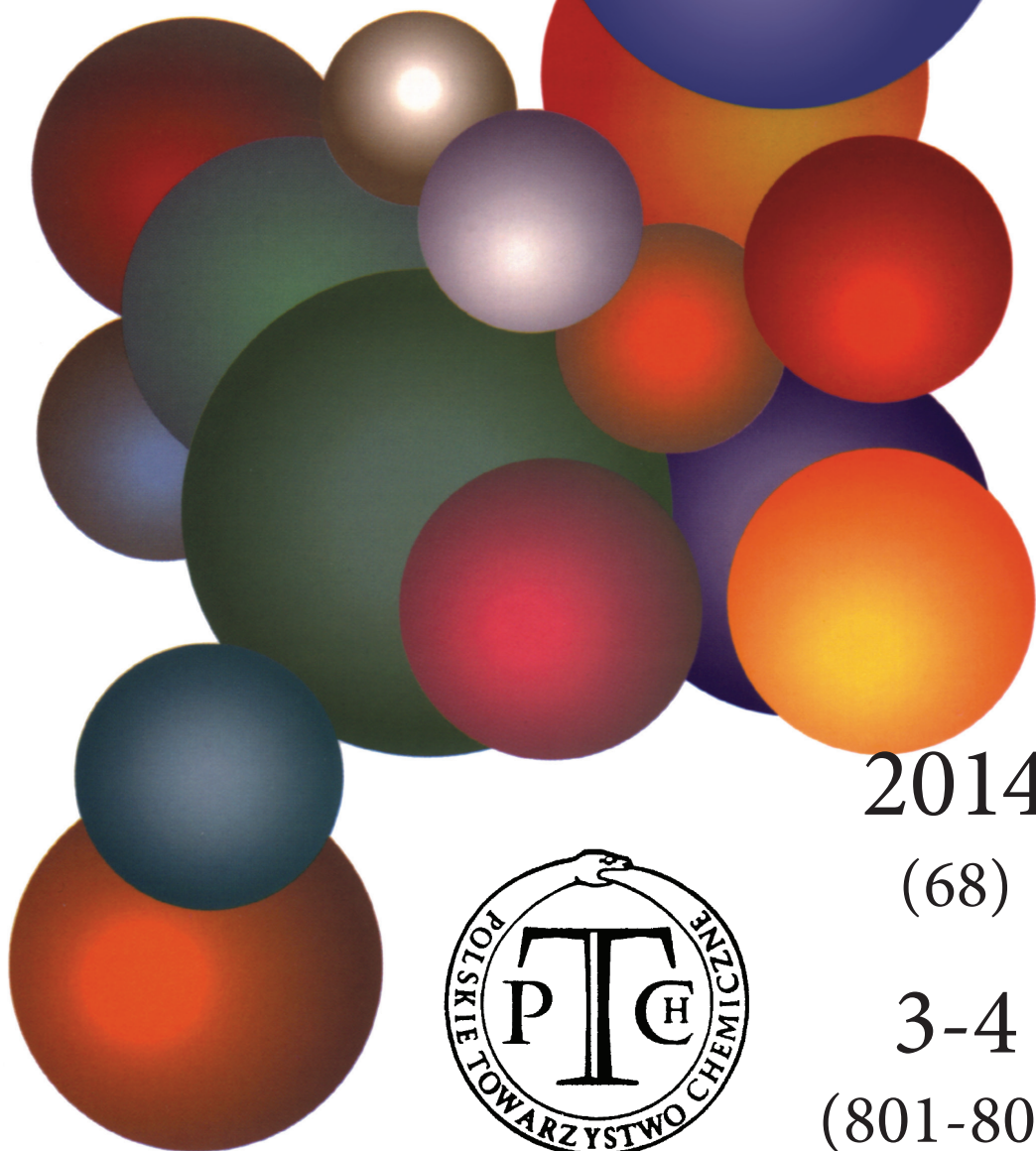


WIADOMOŚCI *chemiczne*

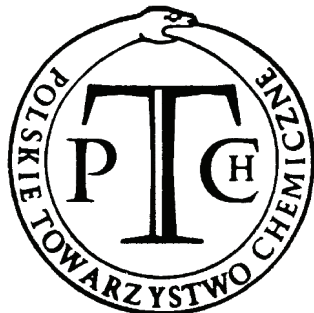


2014

(68)

3-4

(801-802)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
JERZY BŁAŻEJOWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSŁAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN
BARBARA LATKO (FINANSE)
KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)
<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2014
pISSN 0043-5104
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy: marzec-kwiecień 2014

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

**SYNTEZY WYBRANYCH ZASAD MANNICHA
O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ
I PRZECIWGRZYBICZEJ *IN VITRO***

SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL AND
ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN VITRO* OF SELECTED
MANNICH BASES

**Anna Nowicka*, Hanna Liszkiewicz,
Wanda Paulina Nawrocka**

*Katedra i Zakład Technologii Leków
Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław
e-mail: anna.nowicka@umed.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

Zasady Mannicha o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Wanda Paulina Nawrocka jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i pracuje na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych i doktora habilitowanego w zakresie chemii i technologii środków leczniczych uzyskała na tutejszym Wydziale. W 2009 roku Prezydent RP Lech Kaczyński nadał jej tytuł naukowy profesora dr hab. w zakresie chemii i technologii środków leczniczych. Od 2009 jest kierownikiem Katedry i Zakładu Technologii Leków. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

Mgr inż. Anna Nowicka ukończyła Inżynierię Materiałową na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest również absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Od 2010 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2-aminobenzimidazolu o potencjalnej aktywności biologicznej.

Dr n. farm. Hanna Liszkiewicz ukończyła Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracuje w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała na tutejszym Wydziale. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, imidazo[4,5-*b*]pirydyny, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

ABSTRACT

The Mannich reaction is a three-component condensation reaction involving an active hydrogen containing compound, formaldehyde and a primary or a secondary amine. The Mannich reaction is one of the most important basic reaction types in organic chemistry. This kind of aminoalkylation is important for the synthesis and modification of biologically active compounds.

Many studies have shown that Mannich bases possesses potent biological activities: antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and antimalarial properties. Mannich bases – substituted products containing different heterocyclic moiety in their structures seem to be suitable candidates for further chemical modifications and might be of interest as pharmacologically active compounds.

The main goal of this article is to present synthesis and antimicrobial activity of selected Mannich bases. The Mannich reaction is known to be very useful for the synthesis of antibacterial compounds. The Mannich bases, containing various heterocyclic systems were identified as potent antimicrobial agents. Obtained in Mannich reaction derivatives of antibacterial drugs: ciprofloxacin, norfloxacin demonstrate higher antibacterial activity than used drugs, while derivatives of drugs: ibuprofen or phenytoin changed the profile of action of new synthesized compounds.

Keywords: Mannich bases, antibacterial activity, antifungal activity

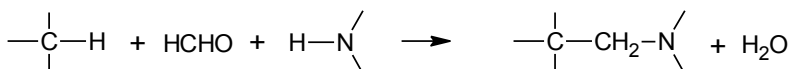
Słowa kluczowe: zasady Mannicha, aktywność przeciwbakteryjna, aktywność przeciwgrzybicza

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

MIC	- minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
Me	- metyl (ang. <i>methyl</i>)
Et	- etyl (ang. <i>ethyl</i>)
Ac	- acetyl (ang. <i>acetyl</i>)
Ph	- fenyl (ang. <i>phenyl</i>)
RNA	- kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)

WPROWADZENIE

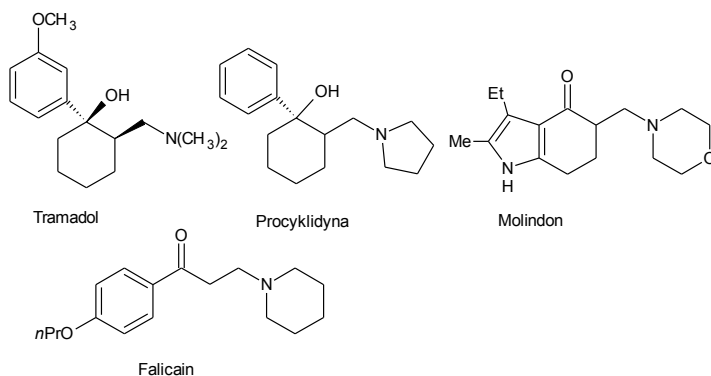
Syntezy Mannicha należą do reakcji trójskładnikowych, w których dochodzi do kondensacji trzech składników: aldehydu mrówkowego, amin (najczęściej II-rzędowych) ze związkami zawierającymi reaktywne atomy wodoru. Substratami kondensacji Mannicha mogą być np. aceton, formalina lub alifatyczny związek nitrowy, iminy, bogate w elektrony heterocykle np. tiofen, furan czy pirol. Ze względu na rodzaj wprowadzanego podstawnika reakcję można nazwać aminometylowaniem [1]. Zasady Mannicha w piśmiennictwie chemicznym są licznie reprezentowane, a w pracach przeglądowych zaprezentowano m.in. ich syntezy, mechanizm i reakcje a także syntezy substancji naturalnych m.in. toksyn, alkaloidów itp. [2, 3].



Schemat 1. Mechanizm reakcji Mannicha

Scheme 1. The mechanism of the Mannich reaction

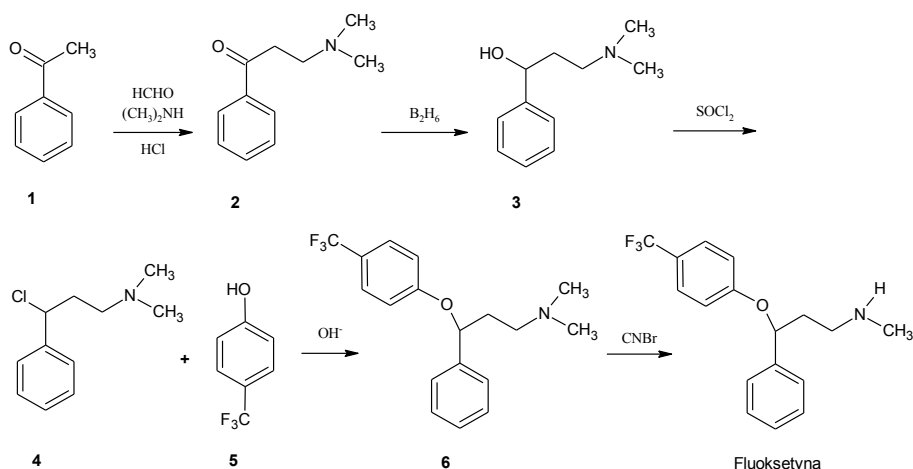
W wyniku kondensacji Mannicha otrzymuje się obecnie stosowane leki o różnorodnym działaniu farmakologicznym: Tramadol – opioidowy lek przeciwbólowy, Procyklidyna – stosowana w chorobie Parkinsona, Molindon – neuroleptyk, Falicain – stosowany do miejscowego znieczulenia w laryngologii [3].



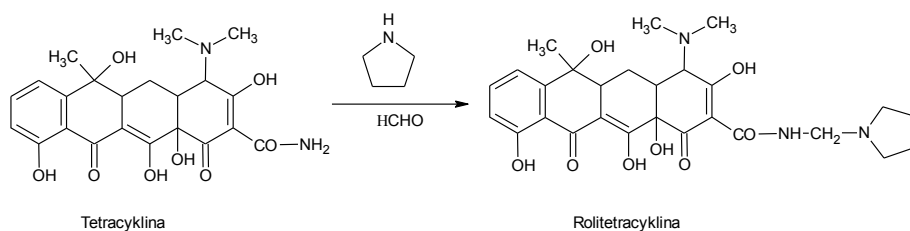
Rysunek 1. Wybrane leki – Zasady Mannicha

Figure 1. Selected drugs – Mannich bases

Poniżej przedstawiono syntezy wybranych leków (Schemat 2 i 3) – otrzymanych w wyniku kondensacji Mannicha: Fluoksetyny (*Prozac*) – leku o działaniu przeciwdepresyjnym [4] oraz Rolitetrazykliny (*Tetraverinum*) antybiotyku z grupy tetracyklin [5].



Schemat 2. Synteza Fluoksetyny
Scheme 2. Synthesis of Fluoxetine



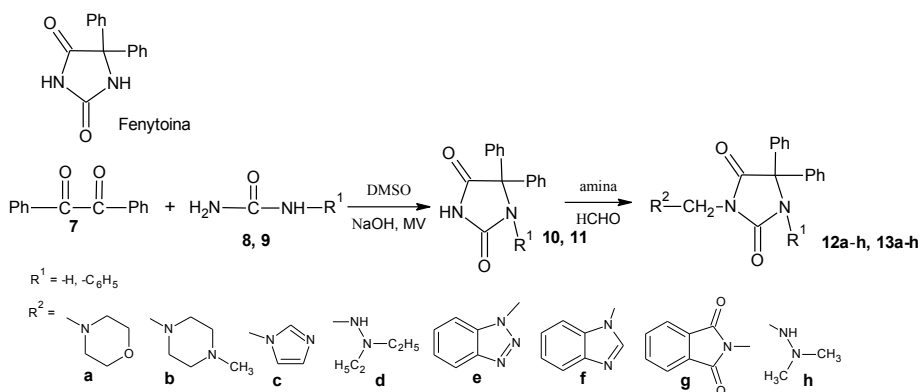
Schemat 3. Synteza Rolitetracykliny
Scheme 3. Synthesis of Rolitetracycline

Zaprezentowane w piśmiennictwie zasady Mannicha wykazują różnorodną aktywność biologiczną: przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą [11–30], przeciwdrgawkową [6], przeciwwirusową [7], przeciwnowotworową [8], przeciwmalaryczną [9], przeciwbólową i przeciwzapalną [10].

W artykule opisano, ostatnio opublikowane, wybrane syntezy zasad Mannicha, pochodnych różnych układów heterocyklicznych o aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej. W przedstawionych syntezach Mannicha często substratami są leki o różnorodnej aktywności farmakologicznej: Fenytoina (lek przeciwpadaczkowy i przeciwarytmiczny), Ibuprofen (lek przeciwzapalny i przeciwbólowy), Ciprofloksacyna, Norfloksacyna, Kwas nalidyksowy (leki o aktywności przeciwbakteryjnej) czy pochodne adamantanu (leki przeciwwirusowe) [5]. Po modyfikacji ich struktury chemicznej, otrzymane związki zmieniły profil działania na przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy, a w przypadku chinolonów działanie było silniejsze.

ZASADY MANNICHA O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ I PRZECIWGRZYBICZEJ

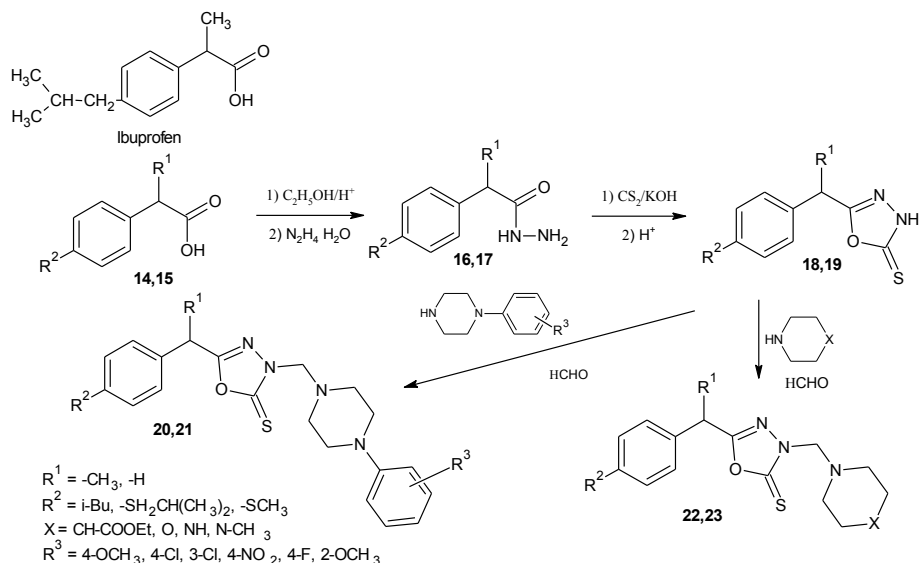
Bapna i in. [11] w reakcji 2-difenylo diketonu (difenylglioksalu) (7) z mocznikiem (8) lub fenylomocznikiem (9) otrzymali 5,5-difenyloimidazolidyno-2,4-dion (10) – Fenytoinę i 1,5,5-trifenyloimidazolidyno-2,4-dion (11). Pochodne hydantoiny 10 i 11 poddali kondensacjom Mannicha z formaliną i wybranymi aminami (Schemat 4). Reakcje były prowadzone w reaktorze mikrofalowym. Otrzymane związki 12a-h, 13a-h testowano na aktywność przeciwbakteryjną wobec czterech szczepów bakterii: Gram dodatnich *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* oraz Gram ujemnych *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Stopień zahamowania wzrostu bakterii był porównywalny do leku referencyjnego – Ampicyliny [5]. Wykazywały one również umiarkowaną aktywność przeciwgrzybiczą przeciwko *Candida albicans* i *Aspergillus niger*. Lekiem referencyjnym w testach była Gryzeofulwina [5].



Schemat 4. Synteza pochodnych fenytoiny

Scheme 4. Synthesis of phenytoin derivatives

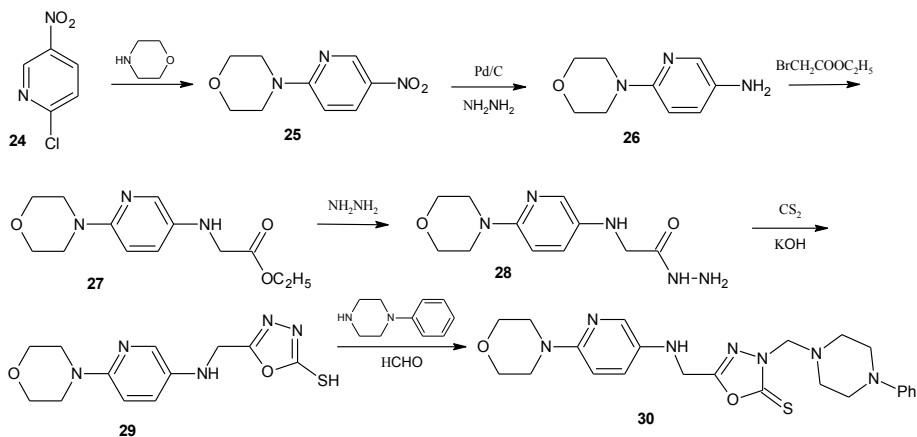
W wyniku dwuetapowej syntezy z kwasów (metylopropylo)fenylenopropionowego (14) – Ibuprofen lub 4-metylotiofenylokarboksylowego (15) otrzymano pochodne 2-tioksa-1,3,4-oksadiazolu 18, 19. W kolejnym etapie poddano je kondensacjom Mannicha z wybranymi aminami II-rzędowymi w obecności formaliny (Schemat 5) uzyskując związki 20–23. Były one aktywne przeciwbakteryjnie i przeciwgrzybiczo (MIC 1,56–25 $\mu\text{g/ml}$) [12]. W testach użyto przeciwbakteryjnych leków wzorcowych – Ciprofloksacyny i Cyklopiroksolaminy [5]. Związki wykazały dodatkowo aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną wyższą niż lek referencyjny – Diklofenak [5].



Schemat 5. Synteza pochodnych 5-podstawionych-2-tiokso-1,3,4-oksadiazolu

Scheme 5. Synthesis of 5-substituted-2-tioxo-1,3,4-oxadiazole derivatives

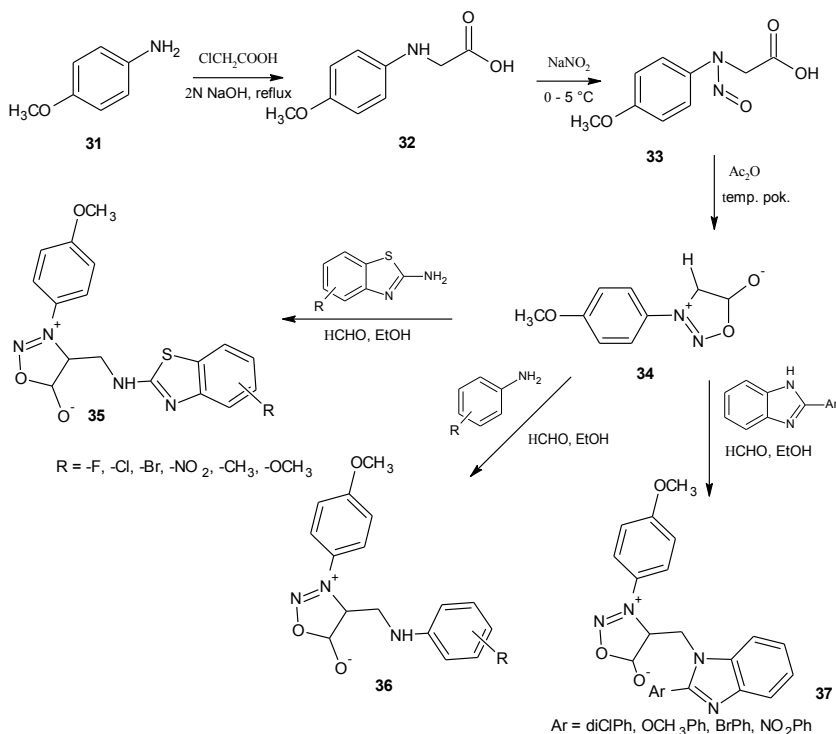
Zsyntetyzowana według schematu 6 przez tureckich naukowców [13] pochodna 1,3,4-oksadiazolu **30** wykazywała najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec wszystkich testowanych szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Dodatkowe badania potwierdziły jej zdolność hamowania enzymu ureazy – produkowanego przez bakterie przy zakażeniach dróg moczowych.



Schemat 6. Synteza 5-[[[(morfolin-4-yl-pirydyn-3-yl)amino]metylo]-3-[(4-fenylpiperazyn-1-yl) metylo]-2-tiokso-1,3,4-oksadiazolu

Scheme 6. Synthesis of 5-[[[(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)amino]methyl]-3-[(4-phenylpiperazin-1-yl) methyl]-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione

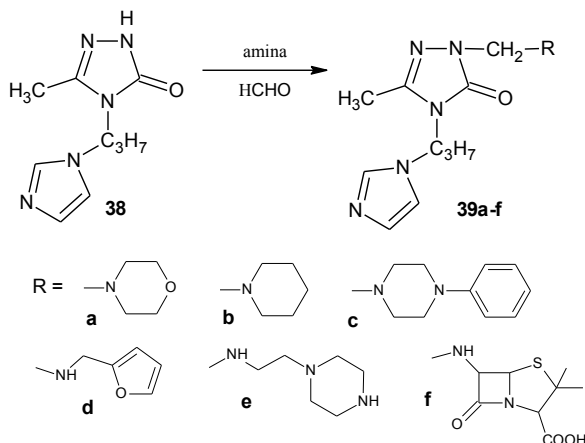
Z serii zasad Mannicha **35–37**, pochodnych 1,2,3-oksadiazolu (sydnonu) [14] przedstawionych na schemacie 7, najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i przeciwgrzybiczą wobec *Candida albicans* wykazał 4-(((6-fluorobenzod[tiazo]l-2-yl)amino)metylo)-3-(4-metoksyfenylo)sydnon (**35**). Substancjami referencyjnymi w testach przeciwbakteryjnych były: Ciprofloksacyna, Ampicylina, Streptomycyna, Penicylina G, natomiast w testach przeciwgrzybiczych: Flukonazol oraz Nystatyna [5].



Schemat 7. Synteza pochodnych sydnonu
Scheme 7. Synthesis of sydnone derivatives

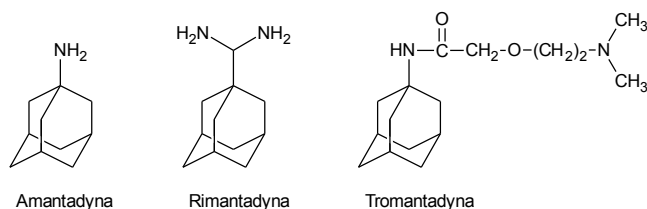
W kilku pracach, pochodzących z różnych ośrodków naukowych, zaprezentowano syntezy zasad Mannicha, zawierające w swojej strukturze 1,2,4-triazol, o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej.

Zasady Mannicha – pochodne 3-okso-5-metylo-1,2,4-triazolu **39a-f** (Schemat 8) hamowały wzrost szczepów bakterii chorobotwórczych *Mycobacterium smegmatis* i grzybów z gatunku *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. Najwyższą aktywność w testach *in vitro* wykazały pochodne **39a-b** (MIC = 0,12–62,5 µg/ml). Lekami referencyjnym w testach przeciwbakteryjnych była Ampicylina i Streptomycyna, natomiast w testach przeciwgrzybiczych Flukonazol [15].



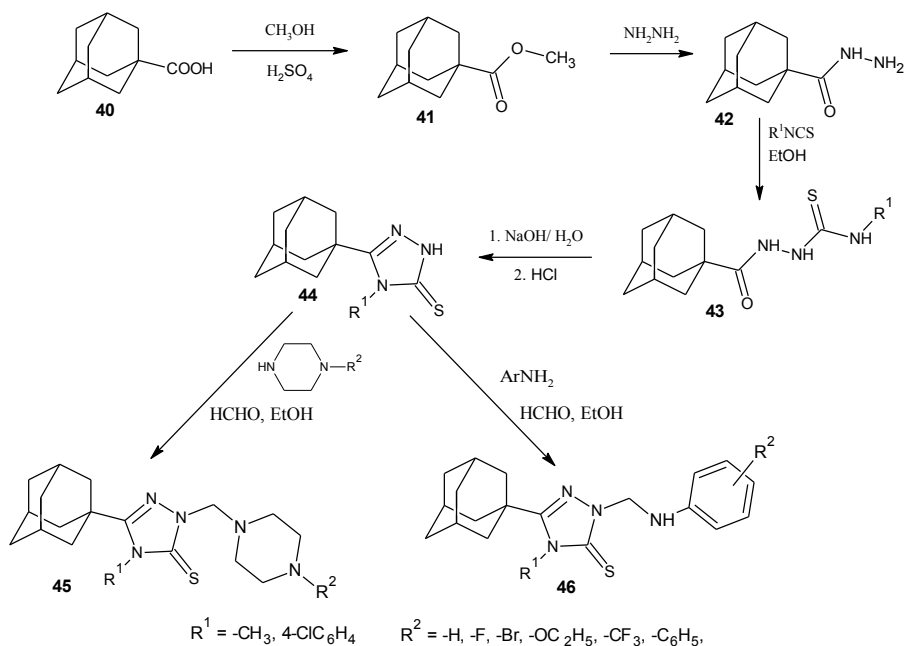
Schemat 8. Synteza pochodnych 3-okso-5-metylo-1,2,4-triazolu
 Scheme 8. Synthesis of 3-oxo-5-methyl-1,2,4-triazole derivatives

Leki – pochodne adamantanu: Amantadyna, Rimantadyna, Tromantadyna wyjązują aktywność przeciwwirusową. Są stosowane w profilaktyce, jak i leczeniu grypy typu A. Amantadyna stosowana jest również jako lek przeciwparkinsonowy [5].



Rysunek 2. Leki przeciwwirusowe, pochodne adamantanu
 Figure 2. Antiviral drugs, adamantane derivatives

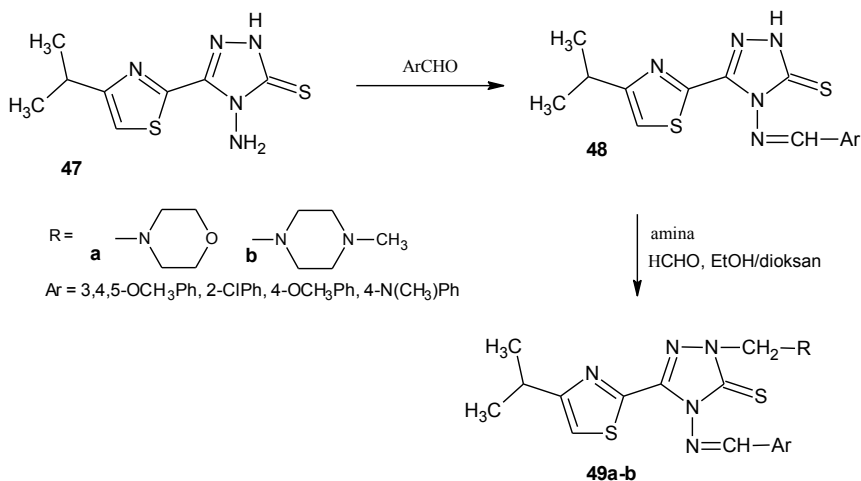
Arabscy naukowcy [16] zsyntezowali pochodne 3-tio-1,2,4-triazolu z podstawnikiem adamantylovym, które poddali kondensacjom Mannicha (Schemat 9). Otrzymane związki **45,46** wykazały aktywność przeciwko szczepom bakterii Gram dodatnich: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* oraz Gram ujemnych: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, porównywalną do aktywności znanych antybiotyków: Gentamycyny, Ampicyliny. Dodatkowo działały przeciwgrzybiczo wobec szczepów *Candida albicans*, a stosowanym wzorcem był Klotrimazol [5].



Schemat 9. Synteza pochodnych 5-adamantyl-3-tio-1,2,4-triazolu

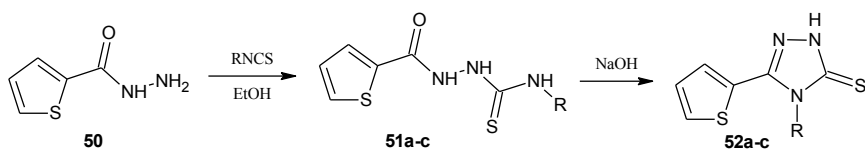
Scheme 9. Synthesis of 5-adamantyl-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives

Kumar i in. [17] otrzymali serię zasad Mannicha pochodnych 3-tio-1,2,4-triazolu **49a-b** (Schemat 10) o umiarkowanej aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Lekami referencyjnymi były Ciprofloksacyna i Norfloksacyna. Aktywność przeciwgrzybiczą wobec szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger* badano stosując Flukonazol [5] jako lek wzorcowy. Otrzymane związki wykazywały aktywność przeciwgruźliczą (*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv) w porównaniu do Isoniazydu (MIC 4–8 µg/ml).

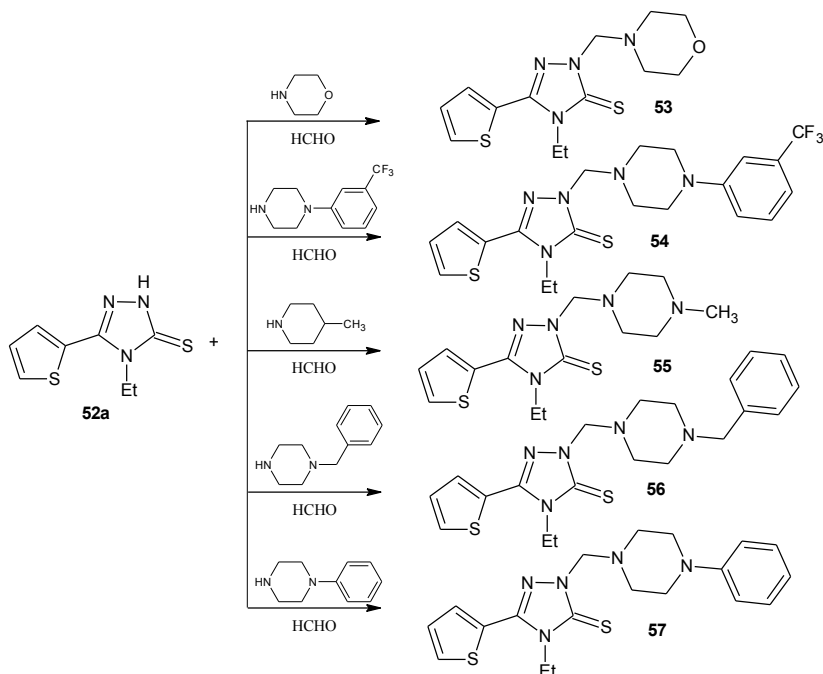


Schemat 10. Synteza pochodnych 4-arylidenoamino-5-(tiazol-2-ylo)-3-tiokso-1,2,4-triazolu
 Scheme 10. Synthesis of 4-arylideneamino-5-(thiazol-2-yl)-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives

W wyniku zasadowej hydrolizy połączonej z cyklizacją produktów kondensacji 2-karbazoilotiofenu (**50**) z izotiocjanianami otrzymano pochodne 5-(2-tienylo)-3-tiokso-1,2,4-triazolu **52a-c**. W reakcjach Mannicha utworzyły związki **53–63** (Schematy 11-14), które wykazywały w testach *in vitro* wysoką aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą (MIC 1,56–25 µg/ml). Badania przeprowadzono na patogennych szczepach: bakterii Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus*), bakterii Gram ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) i czterech szczepach grzybów (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Panicillium marneffeii*, *Trichophyton mentagrophytes*). Dodatkowe testy potwierdziły ich aktywność antyoksydacyjną [18].

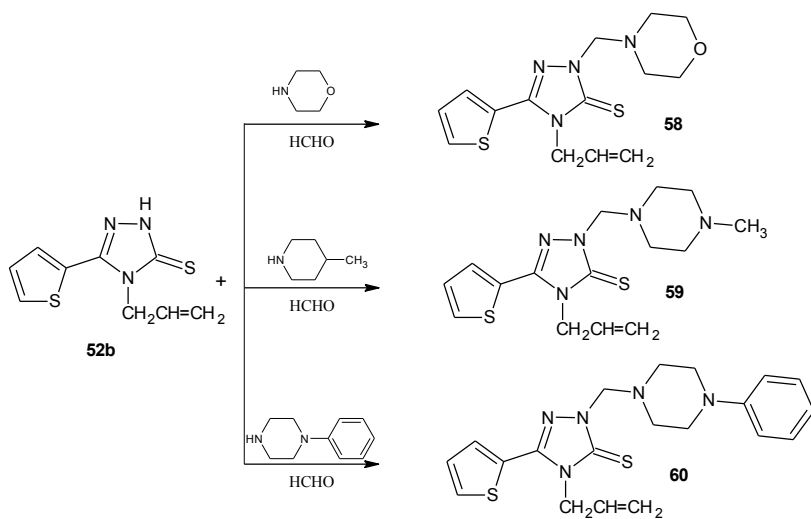


Schemat 11. Synteza ogólna pochodnych 5-(2-tienylo)-3-tiokso-1,2,4-triazolu
 Scheme 11. General synthesis of 5-(2-thienyl)-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives



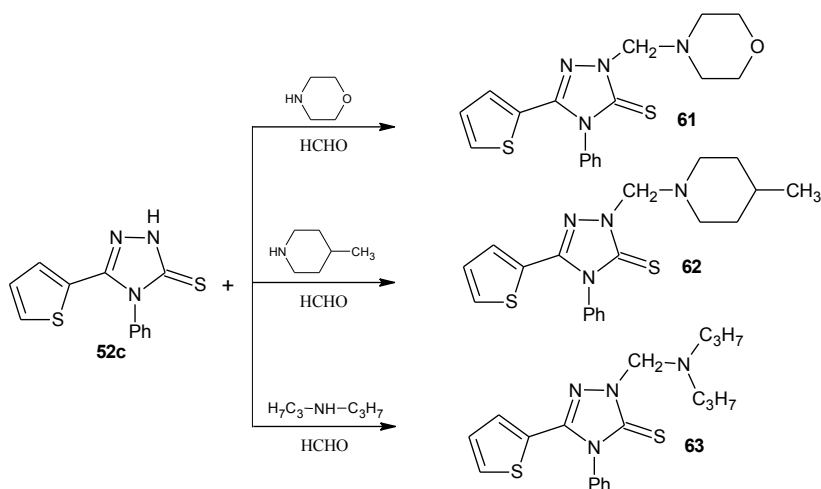
Schemat 12. Synteza pochodnych 4-etylo-5-(2-tienylo)-3-tiokso-1,2,4-triazolu

Scheme 12. Synthesis of 4-ethyl-5-(2-thienyl)-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives



Schemat 13. Synteza pochodnych 4-allilo-5-(2-tienylo)-3-tiokso-1,2,4-triazolu

Scheme 13. Synthesis of 4-allyl-5-(2-thienyl)-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives

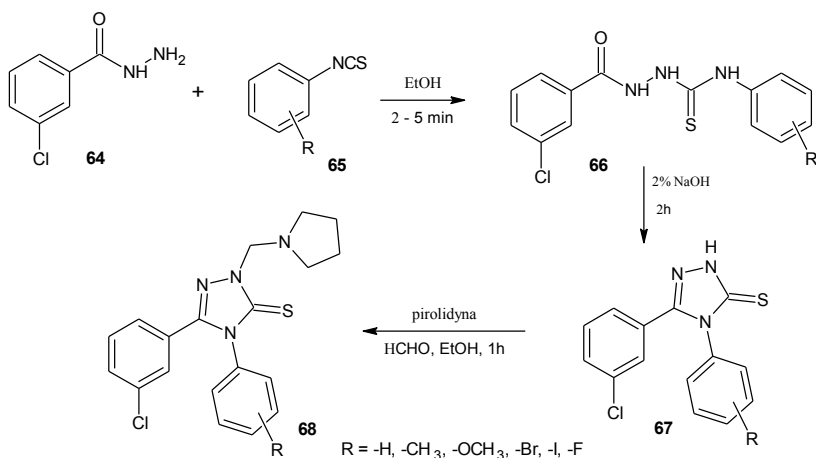


Schemat 14. Synteza pochodnych 4-fenyl-5-(2-tienylo)-3-tioxo-1,2,4-triazolu

Scheme 14. Synthesis of 4-phenyl-5-(2-thienyl)-3-tioxo-1,2,4-triazole derivatives

Polscy uczeni Plech i in. w trzech pracach [19–21] zaprezentowali syntezę zasad Mannicha, pochodnych 3-tioxo-4,5-diarylo-1,2,4-triazolu (Schematy 15–17), które następnie były testowane na aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* wobec standardowych szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych.

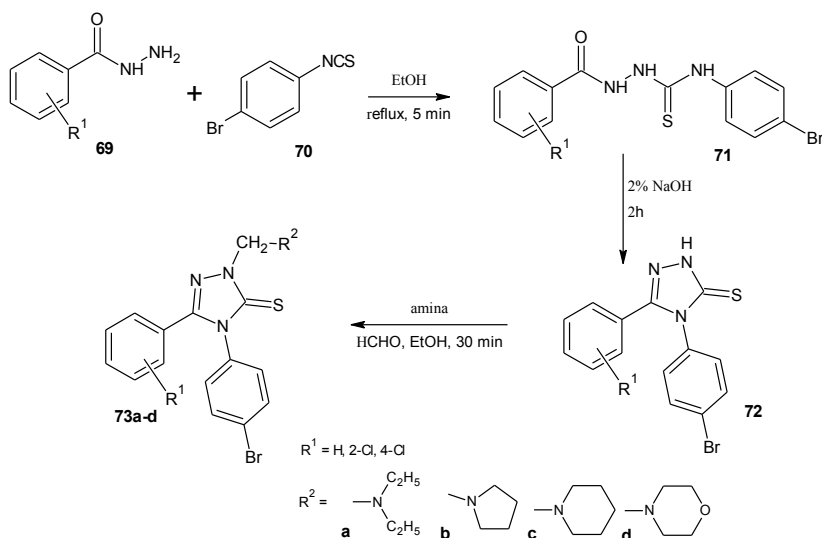
Wyselekcjonowane, najbardziej aktywne związki zostały przebadane przeciwko 12 wyizolowanym szczepom *Staphylococcus aureus*. Aktywność przeciwbakteryjna związków **68** była 4-krotnie wyższa wobec *B. cereus* niż Amipicyliny – leku referencyjnego [19].



Schemat 15. Synteza pochodnych 3-tioxo-4,5-diarylo-1,2,4-triazolu

Scheme 15. Synthesis of 3-tioxo-4,5-diaryl-1,2,4-triazole derivatives

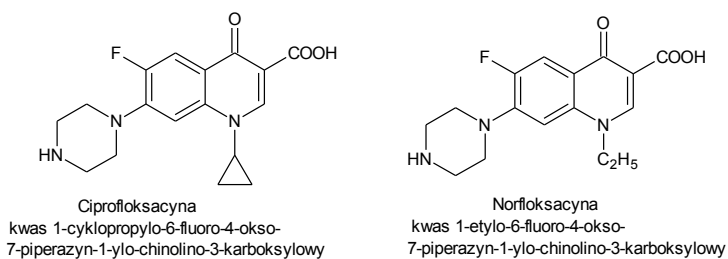
Z kolei otrzymane według Schematu 16 zasady Mannicha **73a-d** zostały przebadane na aktywność przeciwbakteryjną wobec wybranych szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Związki hamowały wzrost pięciu opornych szczepów bakterii Gram dodatnich: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus*. Ich aktywność była porównywalna lub wyższa od stosowanych antybiotyków: Ampicyliny czy Cefuroksimu. W przeprowadzonych testach związki te nie były aktywne wobec szczepów bakterii Gram ujemnych [20].



Schemat 16. Synteza pochodnych 3-tioxo-4,5-diarylo-1,2,4-triazolu
 Scheme 16. Synthesis of 3-tioxo-4,5-diaryl-1,2,4-triazole derivatives

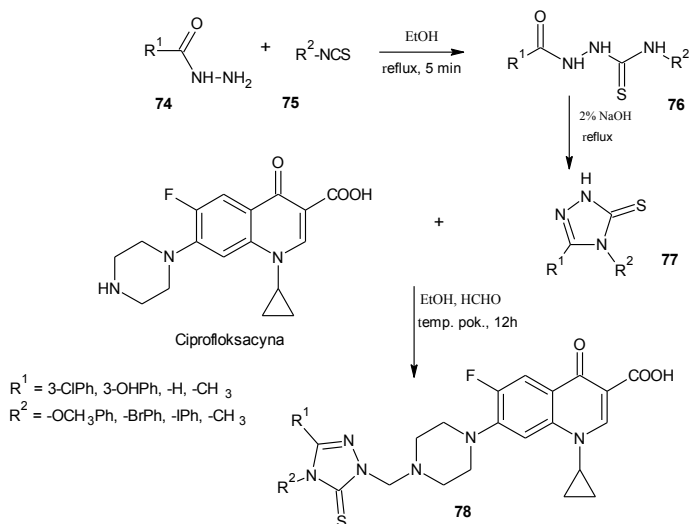
Poszukując związków aktywnych przeciwbakteryjnie, niezależnie od siebie dwa zespoły naukowców Plecha [21] i Emami [22] podjęły modyfikacje struktury stosowanych fluorochinolonów.

Fluorochinolony są stosowane powszechnie w zakażeniach bakteryjnych nerek i dróg moczowych, a także zakażeniach układu oddechowego, infekcjach jelitowych, dermatologii i okulistyce [5]. Chemioterapeutyki: Ciprofloksacyna, Norfloksacyna (Rys. 3), Ofloksacyna, Pefloksacyna, należą do drugiej generacji chinolonów. Zawierają one w swojej strukturze w pozycji 6 podstawnik fluorowy. Ich mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy DNA w komórkach bakteryjnych, poprzez hamowanie gyrazy DNA, enzymu z grupy topoisomerasz.



Rysunek 3. Fluorochinolony
Figure 3. Fluorochinolones

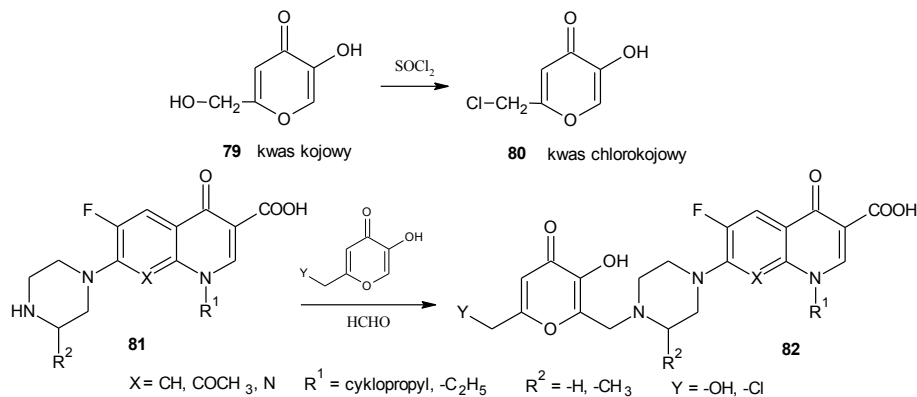
Polski zespół Plecha i in. [21] poddał modyfikacji chemicznej Ciprofloksacyne. W jej wyniku otrzymano serię nowych związków, zawierających w swej strukturze oprócz Ciprofloksacyny 3-tioksa-1,2,4-triazol **78** (Schemat 17). Były one testowane na aktywność przeciwbakteryjną wobec lekoopornych szczepów bakterii. Znaczna część tych związków wykazała wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż Ciprofloksacyna, wobec szczepów bakterii Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* i *Micrococcus luteus*) i Gram ujemnych (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*).



Schemat 17. Modyfikacja chemiczna struktury Ciprofloksacyny
Scheme 17. Chemical modification of structure of Ciprofloxacin

Z kolei modyfikacje chemiczne struktury Norfloksacyny i jej pochodnych, przeprowadził zespół indyjskich naukowców (Schemat 18). W badaniach *in vitro* i *in silico* nowe zasady Mannicha – zawierające w swej strukturze 5-hydroksy-2-(hydroksymetylo)-4-piran-4-on (**79**) - kwas kojowy (stosowany w leczeniu przebarwień skóry) i chlorokojowy **80** wykazały znaczącą aktywność przeciwbakteryjną

wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Związki **82** wykazały 4–8 razy wyższą zdolność hamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, w porównaniu do Norfloksacyny, standardowo używanego chemioterapeutyku [22].



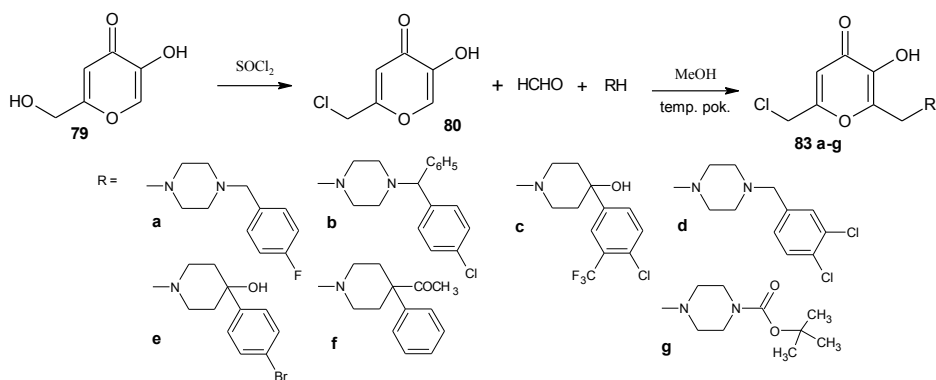
Schemat 18. Modyfikacja chemiczna struktury Norfloksacyny i jej pochodnych

Scheme 18. Chemical modification of structure of Norfloxacin and its derivatives

Uzyskane przez oba zespoły wyniki badań przeciwbakteryjnych potwierdziły celowość przeprowadzonych modyfikacji struktury chemicznej Ciprofloksacyny i Norfloksacyny.

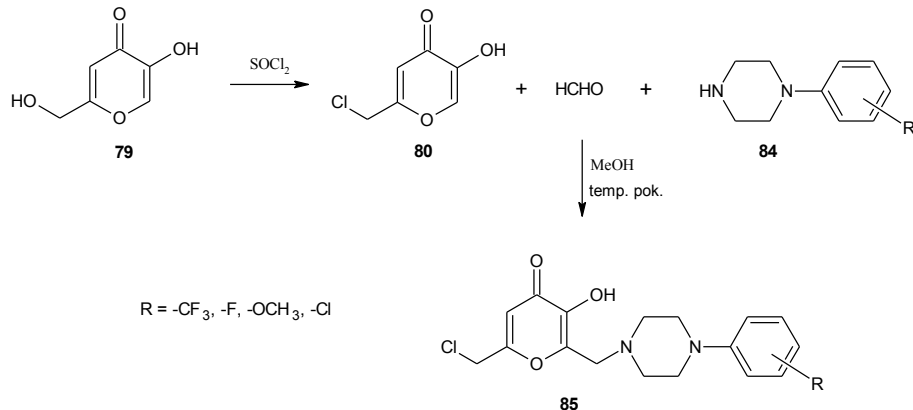
Zasady Manniccha pochodne kwasów: kojowego **79** i chlorokojowego **80** zaprezentowali w dwóch kolejnych pracach [23, 24] tureccy naukowcy (Schematy 19 i 20). Związki te w badaniach *in vitro* wykazały aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz przeciwwirusową.

Pochodne **83a-g** (MIC 1–2 $\mu\text{g/ml}$) były najbardziej aktywne wobec szczepów *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Dodatkowo pochodne **83b,c,e** znacząco hamowały wzrost bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii*. Wykazywały one również aktywność przeciwgrzybiczą wobec grzybów z rodzaju *Candida* (MIC 4–8 $\mu\text{g/ml}$), natomiast aktywność przeciwwirusową wobec wirusa RNA PI-3 wykazywała pochodna **83d** [23].



Schemat 19. Synteza pochodnych kwasu kojowego
Scheme 19. Synthesis of kojic acid derivatives

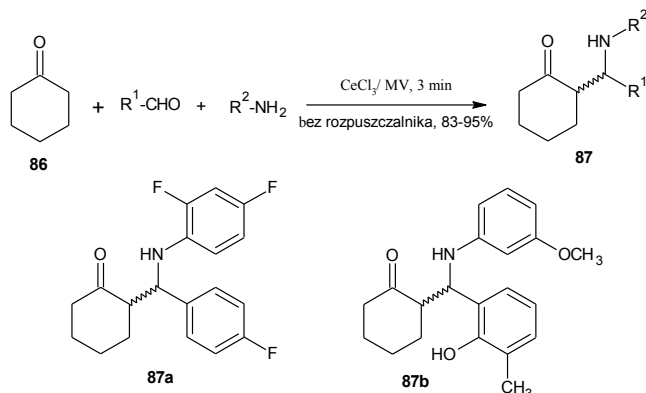
Związki **85** wykazywały dominującą zdolność hamowania wzrostu szczepów bakterii Gram dodatnich *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* niż bakterii Gram ujemnych (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$). Dodatkowo działały silniej przeciwgrzybiczo, w porównywalną do Flukonazolu, wobec grzybów *Candida albicans* i *Candida parapsilosis* przy MIC równym 8 $\mu\text{g/ml}$. Z kolei działanie przeciwwirusowe wobec wirusa RNA P1-3 wykazał związek **85**, zawierający w swojej strukturze podstawnik 3-chlorofenylowy, a lekiem referencyjnym użytym w badaniach był Acyklowir [24].



Schemat 20. Synteza pochodnych kwasu kojowego
Scheme 20. Synthesis of kojic acid derivatives

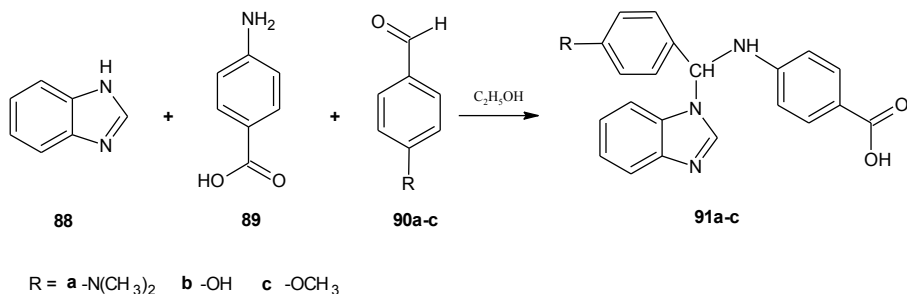
Syntezy zasad Mannicha w reaktorze mikrofalowym, bez użycia rozpuszczalników przeprowadził zespół Sankappa Rai [25]. Substratami tych reakcji były: cykloheksanon (**86**), benzaldehyd i jego podstawione pochodne oraz anilina i jej podstawione pochodne (Schemat 21). Reakcje katalizował CeCl_3 . Otrzymane związki **87** wykazały znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* w porównaniu

do Ceftriaksonu [5] – wzorcowego antybiotyku, w tym samym stężeniu. Najsilniej działały związki **87a** i **b**.



Schemat 21. Synteza pochodnych cykloheksanonu
 Scheme 21. Synthesis of cyclohexanone derivatives

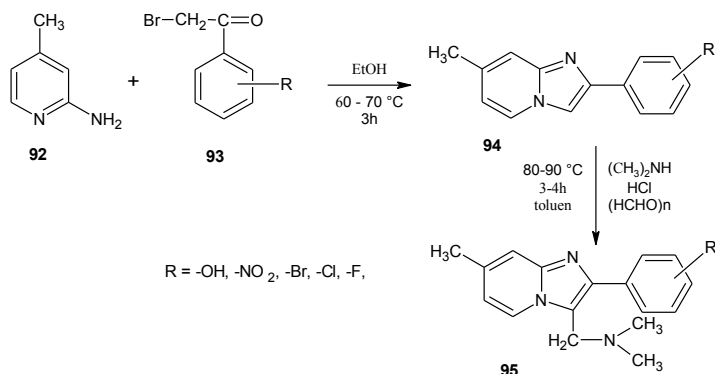
Indyjscy naukowcy [26] w reakcjach benzimidazolu (**88**) z kwasem 4-aminobenzoesowym (**89**) i aromatycznymi aldehydami **90a-c** uzyskali związki **91a-c** (Schemat 22). W badaniach *in vitro* wykazały one wyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* i *Escherichia coli* w porównaniu z Ciprofloksacyną, stosowaną jako wzorzec. Kwas 4-[(1*H*-benzimidazolo-*p*-dimetyloamino)fenylo]metyloamino]benzoesowy (**91a**) działał przeciwgrzybiczo wobec szczepów *Aspergillus niger* i *Candida albicans*. W badaniach Ketokonazol był związkiem referencyjnym.



Schemat 22. Synteza 1-podstawionych pochodnych benzimidazolu
 Scheme 22. Synthesis of 1-substituted benzimidazole derivatives

W wyniku cykloalkilowania 2-amino-4-metylopirydyny (**92**) bromometylofenyloketonem i jego pochodnymi **93** uzyskano pochodne imidazo[1,2-*a*]pirydyny **94** [27]. Stanowiły one substraty do kondensacji Mannicha (Schemat 23). Otrzymane związki **95** zostały poddane testom *in vitro* na aktywność przeciwbakteryjną (MIC 50–250 µg/ml) i przeciwgrzybiczą (MIC 50–500 µg/ml). Związki, zawierające

w swej strukturze podstawnik halogenowyfenylowy, wykazały porównywalną lub wyższą zdolność hamowania wzrostu szczepów bakterii Gram ujemnych: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, Gram dodatnich: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzybów: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* w porównaniu ze stosowanymi lekami Ampicyliną i Gryzeofulwiną [5].



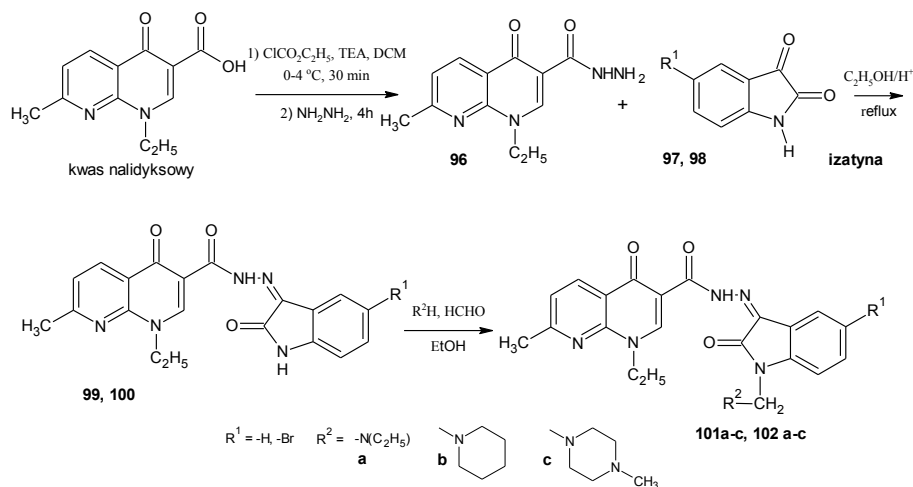
Schemat 23. Synteza pochodnych imidazo[1,2-a]pirydyny

Scheme 23. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives

Aboul-Fadl i in. [28] zastosowali do syntez znany lek przeciwbakteryjny Kwas nalidyksowy oraz izatynę **97** (indolo-2,3-dion) lub jej bromopochodną **98**.

Izatyna stanowi produkt utleniania indygo jest m.in. naturalnie wytwarzana przez *Altermones* i wykazuje właściwości przeciwgrzybicze [29], służy również do wykrywania tiofenu oraz identyfikacji aminokwasów.

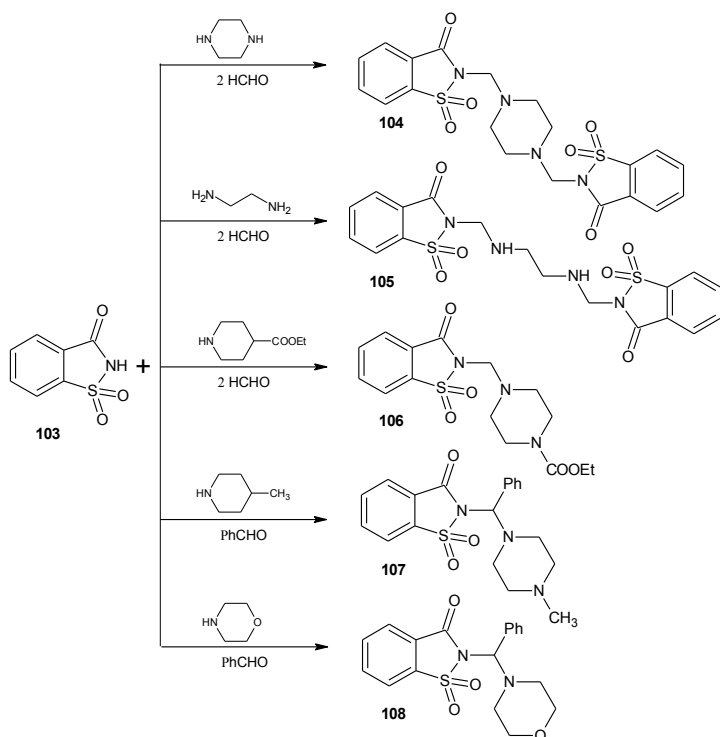
Kwas nalidyksowy w wyniku dwuetapowej syntezy został przeprowadzony w hydrazyd **96**, który w reakcji z izatyną **97** lub jej bromopochodną **98** utworzył odpowiednio związki **99** i **100**. Stanowiły one substraty do kondensacji Mannicha (Schemat 24). Słabą aktywność tuberkulostatyczną wobec prątków: *Mycobacterium intercellulari*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium cheleneo* i *Mycobacterium smegmatis* wykazywały związki **101a-c**, **102a-c**.



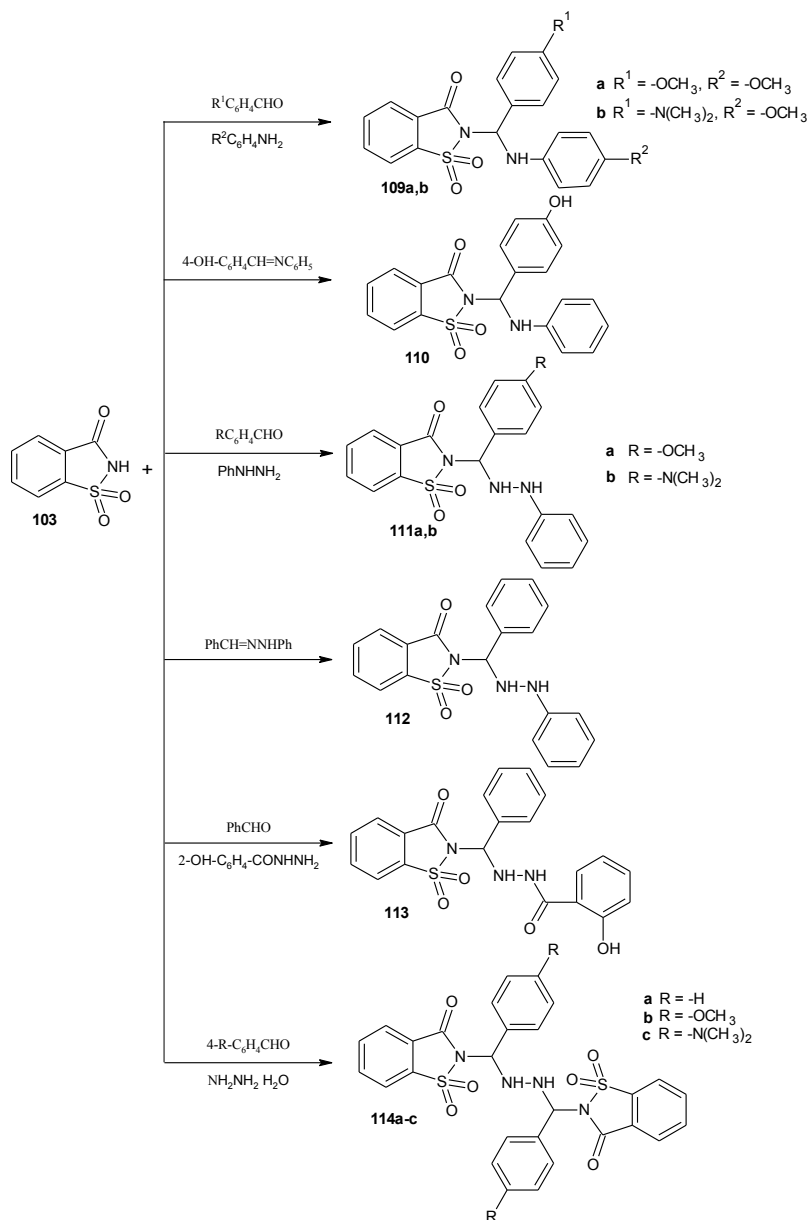
Schemat 24. Modyfikacja chemiczna struktury kwasu nalidyksowego

Scheme 24. Chemical modification of structure of nalidixic acid

Zespół Hamama i in. [30] użył jako substratu do syntezy zasad Mannicha (Schematy 25 i 26), 1,1-dioksy-1,2-benzotiazol-3-onu (**103**) – sacharynę, znaną substancję słodzącą. W reakcjach zastosowano formalinę lub podstawione aldehydy benzoesowe oraz aminy I- i II-rzędowe. Pochodne **104**, **110** i **114a** wykazały działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów *Fusarium oxysporium* i *Staphylococcus aureus*. Testy potwierdziły także aktywność antyoksydacyjną związków **110a,b** i **111a,b** porównywalną z Kwasem askorbowym. Pochodne te wykazały najsilniejszy efekt ochronny na uszkodzenie DNA indukowane lekiem przeciwnowotworowym – Bleomycyną.



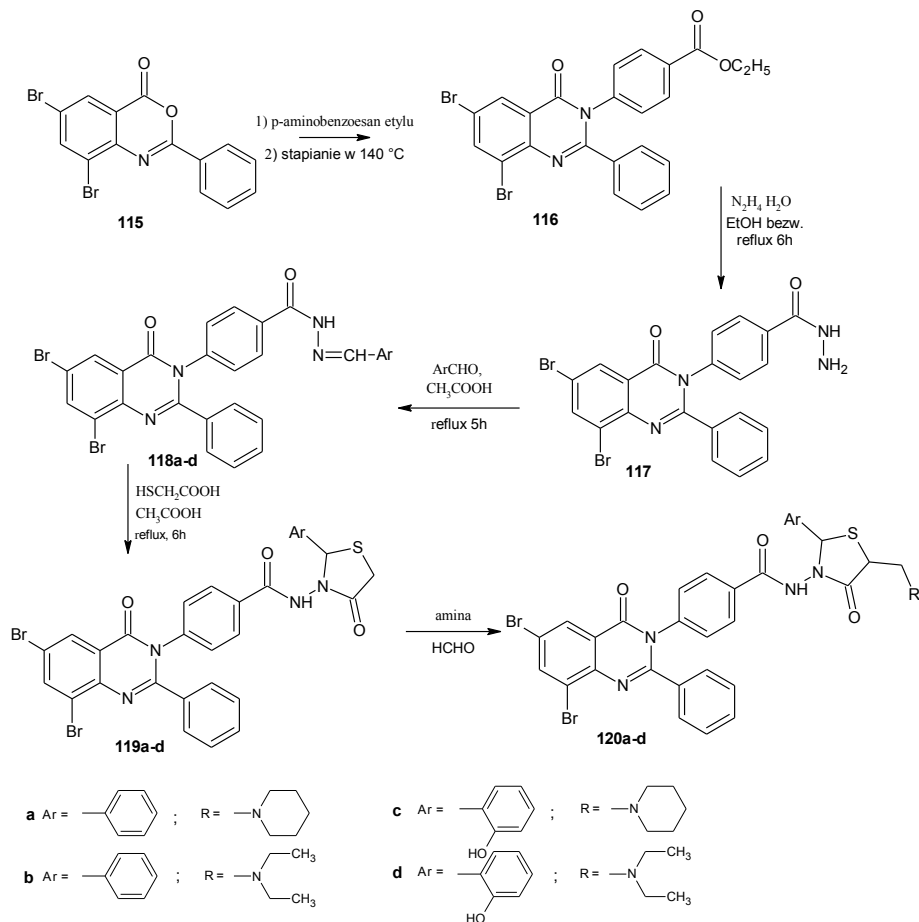
Schemat 25. Synteza pochodnych sacharyny
Scheme 25. Synthesis of saccharin derivatives



Schemat 26. Synteza pochodnych sacharyny
 Scheme 26. Synthesis of saccharin derivatives

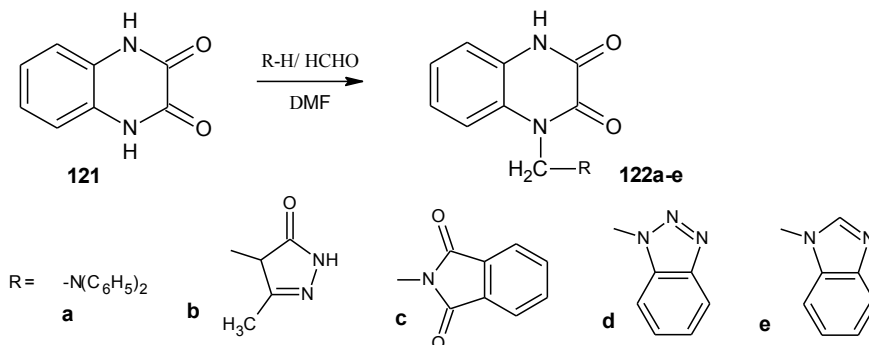
Zasady Mannicha – pochodne 6,8-dibromo-4(3*H*)-chinazolinonu **120a-d** (Schemat 27) otrzymane przez egipskich naukowców [31] wykazywały aktywność przeciwbakteryjną (MIC 0,78–12,5 $\mu\text{g/ml}$) wobec sześciu szczepów bakterii: Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Legionella monocytogenes*, *Bacillus cereus*) i Gram

ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*). Aktywność przeciwwgrzybiczą (MIC 1,56–12,5 µg/ml) otrzymanych związków testowano na dwóch szczepach grzybów chorobotwórczych *Candida albicans* i *Aspergillus flavus*.



Schemat 27. Synteza 6,8-dibromo-2-fenyl-3-podstawionych pochodnych chinazolin-4-onu
 Scheme 27. Synthesis of 6,8-dibromo-2-phenyl-3-substituted quinazolin-4-one derivatives

W wyniku kondensacji Mannicha (Schemat 28) [33], z otrzymanego wcześniej chinokaslin-2,3-onu (**121**) [32] uzyskano pochodne **122a-e**, które wykazały w testach *in vitro* aktywność przeciwgrzybiczą, przeciwbakteryjną wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Lekami wzorcowymi użytymi w testach były: Kwas nalidyksowy [5] i Klotrimazol [5]. 1-((3-Metylo-5-okso-4,5-dihydro-1H-pirazol-4-yl)-metylochinoksalin-2,3-dion (**122b**) wykazał najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą przy wartości MIC 8,012 µg/ml.



Schemat 28. Synteza pochodnych chinokaslin-2,3-dionu

Scheme 28. Synthesis of chinoxalin-2,3-dione derivatives

PODSUMOWANIE

W pracy zaprezentowano syntezy wybranych zasad Mannicha pochodnych różnych układów heterocyklicznych o aktywności przeciwbakteryjnej, w tym przeciwprątkowej oraz przeciwgrzybiczej.

Autorzy prac jako substratów do kondensacji użyli m.in. stosowane leki o różnorodnej aktywności farmakologicznej: Fenytoinę, Ibuprofen, pochodne adamantanu, Ciprofloksacyne, Norfloksacyne i Kwas nalidyksowy. Wyniki uzyskanych badań potwierdziły wysoką aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą otrzymanych zasad Mannicha w porównaniu do stosowanych leków referencyjnych, a także celowość przeprowadzonych modyfikacji struktury leków.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Mastalerz, *Chemia organiczna*, PWN, Warszawa 1986.
- [2] M. Tramontini, L. Angiolini, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 1791.
- [3] M. Arend, B. Westermann, N. Risch, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 1044.
- [4] D.M. Perrine, N.R. Sabanayagam, J.K. Reynolds, *J. Chem. Educ.*, 1998, **75**, 1266.
- [5] *The Merck Index*, 14th edition, Whitehouse Station, USA, 2006.
- [6] A.S. Raja, S.N. Pandeya, S.S. Panda, J.P. Stables, *Pharm. Chem. J.*, 2007, **41**, 15.
- [7] O.M Abdelhafez, N.A. Abedelatif, F.A. Badria, *Arch. Pharm. Res.*, 2011, **34**, 1623.
- [8] A.T. Taher, N.A. Khalil, E.M. Ahmed, *Arch. Pharm. Res.*, 2011, **34**, 1615.
- [9] B. Singh, D. Chetia, S.K. Puri, K. Srivastava, A. Prakash, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 1523.
- [10] R. Babbar, D.P. Pathak, N. Jain, S. Jain, *Der. Phar. Chem.*, 2012, **4**, 2024.
- [11] M. Bapna, B. Parashar, V. K. Sharma, L.S. Chouhan, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 1098.
- [12] K. Manjunatha, B. Poojary, P.L. Lobo, J. Fernandes, N.S. Kumari, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5225.
- [13] H. Bektas, S. Ceylan, N. Demirbas, S.A. Karaoglu, B.B. Sokmen, *Med Chem Res*, 2013, **22**, 3629.
- [14] P.P. Savaliya, V.K. Akbari, J.A. Modi, K.C. Patel, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 5789.

- [15] S. Demirci, S. Basoglu, A. Bozdereci, N. Demirbas, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 4930.
- [16] A.A. El-Emam, A.M.S. Al-Tamimi, M.A. Al-Omar, K.A. Alrashood, E.E. Habib, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **68**, 96.
- [17] G.V.S. Kumar, Y.R. Prasad, B.P. Mallikarjuna, S.M. Chandrashekar, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5120.
- [18] M. Koparir, C. Orek, A.E. Parlak, A. Söylemez, P. Koparir, M. Karatepe, S.D. Dastan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **63**, 340.
- [19] T. Plech, M. Wujec, A. Siwek, U. Kosikowska, A. Malm, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 241.
- [20] T. Plech, M. Wujec, M. Majewska, U. Kosikowska, A. Malm, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 2531.
- [21] T. Plech, M. Wujec, U. Kosikowska, A. Malm, B. Rajtar, M. Polz-Dacewicz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **60**, 128.
- [22] S. Emami, E. Ghafouri, M.A. Faramarzi, N. Samadi, H. Irannejad, A. Foroumadi, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **68**, 185.
- [23] M.D. Aytimir, B. Özçelik, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 4089.
- [24] M.D. Aytimir, B. Özçelik, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 443.
- [25] U.S. Rai, A.M. Isloor, P. Shetty, N. Isloor, S. Malladi, H.K. Fun, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 6090.
- [26] M.V. Aanandhi, A.K. Verma, R. Sujatha, R.K. Raj, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2013, **5**, 295.
- [27] N.C. Desai, M.R. Pandya, K.M. Rajpara, V.V. Joshi, H.V. Vaghani, H.M. Satodiya, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 4437.
- [28] T. Aboul-Fadl, F.A.S. Bin-Jubair, O. Aboul-Wafa, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 4578.
- [29] M.S. Gil-Turners, M.E. Hay, W. Fenical, *Science*, 1989, 116.
- [30] W.S. Hamama, H.H. Zoorob, M.A. Gouda, E.M. Afsah, *Pharm. Chem. J.*, 2011, **45**, 118.
- [31] M.S. Mohamed, M.M. Kamel, E.M.M. Kassem, N. Abotaleb, S.I. Abd El-moez, M.F. Ahmeda, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3311.
- [32] V.S.H. Krishnan, K.S. Chowdary, *Ind. J. Chem.* 1999, **38B**, 45.
- [33] P. Ramalingam, S. Ganapaty, Ch. Babu Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 406.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 stycznia 2014

ZASADY SCHIFFA – WYBRANE SYNTEZY, REAKCJE I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

SCHIFF BASES – SELECTED SYNTHESSES,
REACTIONS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Anna Nowicka*, **Hanna Liszkiewicz**,
Wanda Paulina Nawrocka

*Katedra i Zakład Technologii Leków
Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław
e-mail: anna.nowicka@umed.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

1. Wprowadzenie
2. Wybrane metody syntez zasad Schiffa
3. Zasady Schiffa – uniwersalne substraty w syntezie organicznej oraz aktywność biologiczna wybranych związków

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Wanda Paulina Nawrocka jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i pracuje na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych i doktora habilitowanego w zakresie chemii i technologii środków leczniczych uzyskała na tutejszym Wydziale. W 2009 roku Prezydent RP Lech Kaczyński nadał jej tytuł naukowy profesora dr hab. w zakresie chemii i technologii środków leczniczych. Od 2009 jest kierownikiem Katedry i Zakładu Technologii Leków. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

Mgr inż. Anna Nowicka ukończyła Inżynierię Materiałową na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest również absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Od 2010 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2-aminobenzimidazolu o potencjalnej aktywności biologicznej.

Dr n. farm. Hanna Liszkiewicz ukończyła Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracuje w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała na tutejszym Wydziale. Kierunki badań naukowych: synteza i struktura związków heterocyklicznych w tym 1,5-benzo- i 1,5-pirydodiazepin, chinazolinonu-4, 2-aminobenzimidazolu, imidazo[4,5-*b*]pirydyny, o potencjalnej aktywności biologicznej: psychotropowej, immunotropowej i przeciwnowotworowej.

ABSTRACT

Schiff bases are compounds with a functional group that contains a carbon-nitrogen double bond with the nitrogen atom connected to an aryl or alkyl group.

Schiff bases are condensation products of primary amines with carbonyl compound. Several studies showed that the presence of a lone pair of electrons on the nitrogen atom of the azomethine determine biological and chemical properties of imines. Schiff bases are generally excellent chelating agents, because of the special properties of C=N bond. Their metal complexes have been widely studied because they possess anticancer *in vitro* and herbicidal applications.

Imines also have biological importance. Schiff bases are common enzymatic intermediates where an amine reacts with an aldehyde or ketone of a cofactor or a substrate.

Imines have been reported for their biological properties such as antibacterial (*E. coli*, *S. aureus*), antifungal (*C. albicans*) activities. A large number of different Schiff bases are active against a wide range of protozoan (*T. gypseum*, *P. viticola*).

Keywords: Schiff bases, imines, biological activity, synthesis, structures

Słowa kluczowe: zasady Schiffa, iminy, aktywność biologiczna, syntezy, struktury

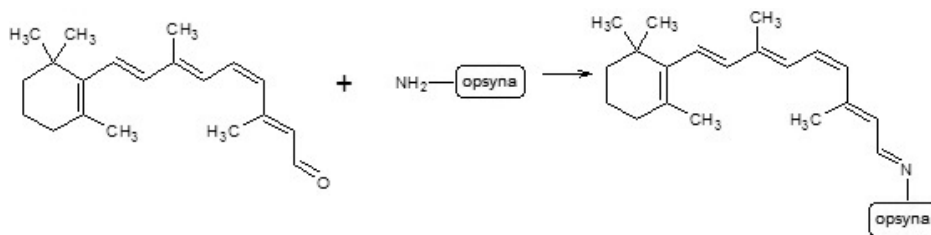
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Me	- metyl (ang. <i>methyl</i>)
Et	- etyl (ang. <i>ethyl</i>)
Bu	- butyl (ang. <i>buthyl</i>)
Ac	- acetyl (ang. <i>acetyl</i>)
Ph	- fenyl (ang. <i>phenyl</i>)
Bn	- benzyl (ang. <i>benzyl</i>)
Triflate	- trifluorometylosulfonian indu (ang. <i>trifluoromethane-sulfonate indium</i>)
LPO	- peroksydacja lipidów (ang. <i>lipid peroxidation</i>)
LDA	- dizopropylamidek litu (ang. <i>lithium diisopropylamide</i>)
TBAF	- fluorek tetra <i>n</i> -butyloamoniowy (ang. <i>tetra-n-butylammonium fluoride</i>)
THF	- tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i>)
TEA	- trietyloamina (ang. <i>triethylamine</i>)
DCM	- chlorek metylenu (ang. <i>dichloromethane</i>)
NMM	- <i>N</i> -metylomorfolina (ang. <i>N-methylmorpholine</i>)
MW	- promieniowanie mikrofalowe (ang. <i>microwave</i>)
DMSO	- dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)

1. WPROWADZENIE

Zasady Schiffa są grupą związków licznie reprezentowaną w piśmiennictwie chemicznym. Zawierają w swojej strukturze aktywne chemicznie ugrupowanie azometinowe (C=N). Jest to ugrupowanie chromoforowe, dzięki któremu iminy posiadają intensywną barwę żółtą, pomarańczową lub czerwoną i dlatego znajdują zastosowanie m.in. w analizie kolorymetrycznej [1]. Wykazują także zdolność do luminescencji [2].

Iminy pełnią ważną rolę w procesach biochemicznych w organizmach żywych, np. biorą udział w procesie widzenia (Rys. 1) czy przenoszeniu energii [3], tworzą się w procesie glikacji białek [4].



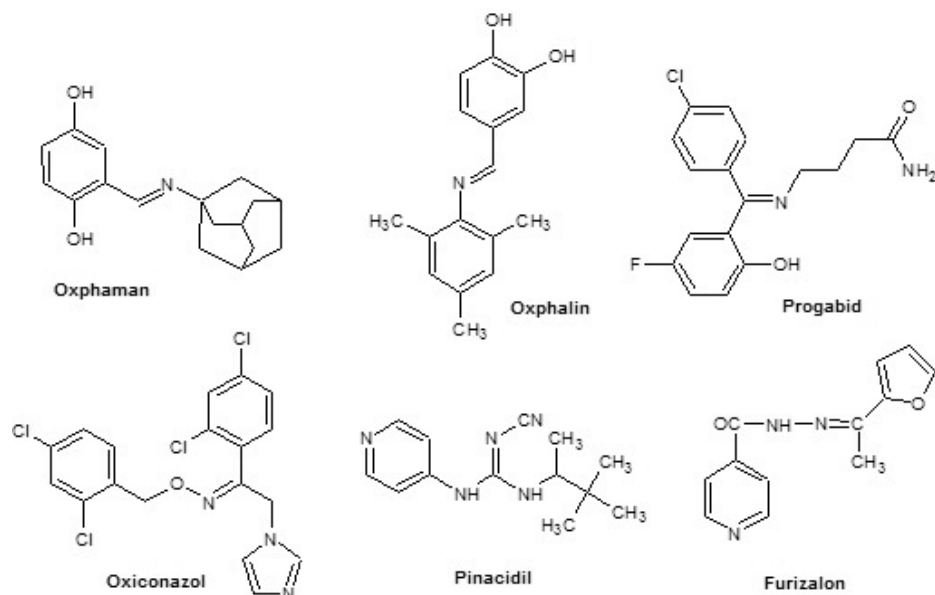
Rysunek 1. Rola zasad Schiffa w procesie widzenia
Figure 1. A role of Schiff base in vision process

Wiązanie azometinowe występuje także w szeregu leków o różnorodnej strukturze chemicznej i aktywności farmakologicznej. Przykładami leków, zawierających w swojej strukturze ugrupowanie iminowe są: Oxphaman i Oxphalin – leki przeciwzapalne, Progabid – lek przeciwpadaczkowy, Oxiconazol – lek przeciwgrzybiczy, Pinacidil – antagonistą kanałów potasowych oraz Furizalon – lek przeciwgruźliczy (Rys 2.) [5].

Zasady Schiffa wykazują różnorodną aktywność biologiczną: przeciwbakteryjną, przeciwwirusową, przeciwzapalną [6–8]. Właściwości przeciwnowotworowe i mechanizmy działania syntetycznych oraz bio-zasad Schiffa, pochodnych różnych układów heterocyklicznych, zostały zaprezentowane w pracy przeglądowej polskich naukowców Sztanke i in. [9].

Iminy znalazły zastosowanie w technice jako materiały elektrodowe, są stosowane jako utwardzacze gumy [10], mogą pełnić rolę fotodetektorów czy filtrów słonecznych [11]. Są również inhibitorami korozji np. aluminium [12], miedzi [13].

Zasady Schiffa wykazują zdolność m.in. do kompleksowania metali, a powstałe kompleksy są różnorodnie aktywne biologicznie: przeciwnowotworowo [14], przeciwgrzybiczo [15], przeciwbakteryjnie [16]. Są również ważnymi katalizatorami m.in. w układach biologicznych [17], w syntezie czy przy produkcji polimerów oraz barwników [18].



Rysunek 2. Leki – zasady Schiffa
Figure 2. Drugs – Schiff bases

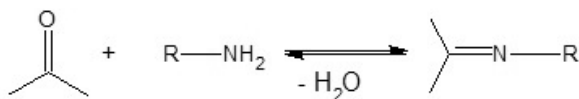
W pracach przeglądowych [19, 20] opisano zastosowanie w leczeniu, inżynierii materiałowej i technice zasad Schiffa oraz ich kompleksów z metalami.

Z kolei w swojej rozprawie doktorskiej doktor B. Kołodziej na podstawie ponad 130 pozycji piśmiennictwa szczegółowo przedstawiła znaczenie biologiczne, zastosowanie w medycynie oraz w technice zasad Schiffa [21].

W naszej pracy zaprezentujemy wybrane metody syntezy zasad Schiffa oraz ich zastosowanie jako uniwersalnych substratów w syntezie związków o różnorodnej aktywności biologicznej.

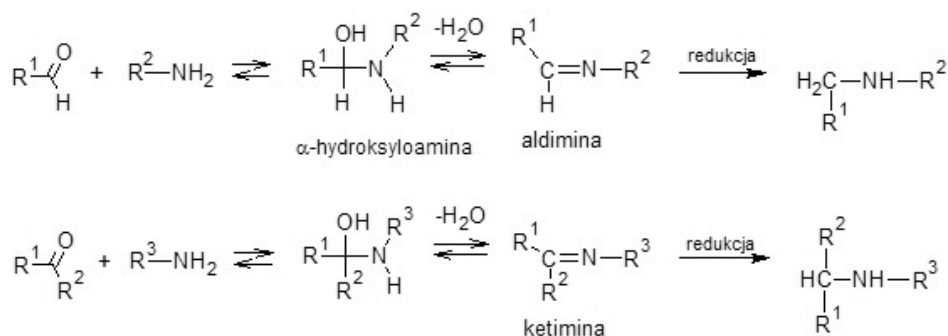
2. WYBRANE METODY SYNTEZ ZASAD SCHIFFA

Iminy, czyli zasady Schiffa powstają w wyniku reakcji aldehydów lub ketonów z pierwszorzędowymi aminami (Schemat 1). Mechanizm tych reakcji polega na nukleofilowym przyłączeniu aminy do grupy karbonylowej aldehydów lub ketonów i eliminacji cząsteczki wody.



Schemat 1. Otrzymywanie zasad Schiffa
Scheme 1. Synthesis of Schiff bases

Reakcja jest katalizowana przez kwasy protonowe, kwasy Lewis'a, a szybkość reakcji zależy od pH środowiska. Wysokie, jak i niskie pH spowalniają reakcję. Przy zbyt wysokim pH nie dochodzi do protonowania powstałej pośrednio karbinoloaminy i przekształcenia grupy $-OH$ w grupę opuszczającą. Przy niskim pH reakcja zostaje zahamowana na etapie addycji nukleofilowej, a pH 4–5 jest optymalnym środowiskiem reakcji (Schemat 2) [22, 23].

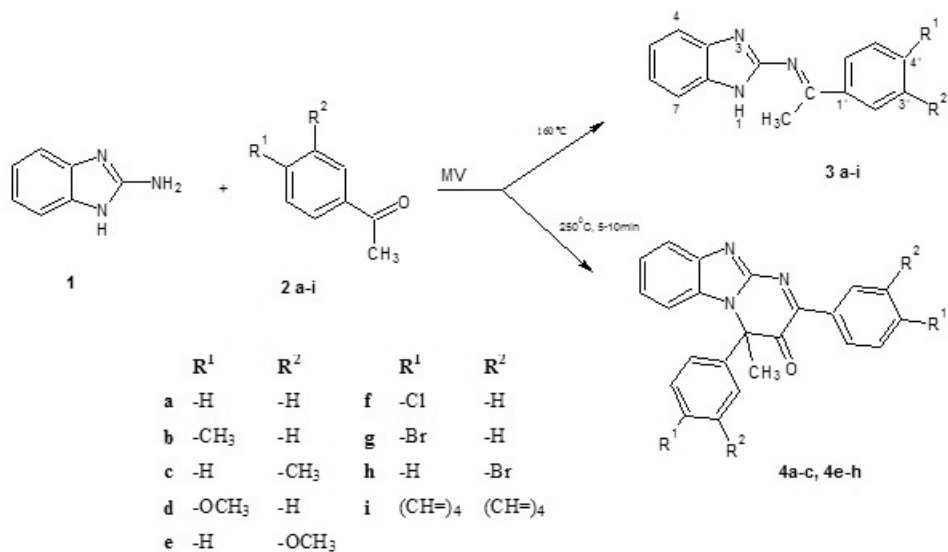


Schemat 2. Mechanizm syntezy zasad Schiffa
Scheme 2. Mechanism of Schiff bases synthesis

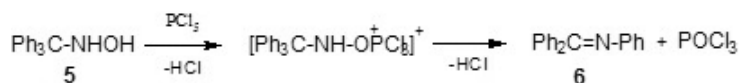
Równowagę tych reakcji można przesunąć w kierunku tworzenia produktu usuwając wodę. Możliwe jest to np. przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej sit molekularnych lub azeotropowe jej oddestylowanie.

Serię zasad Schiffa o aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* zsyntezowano z 2-aminobenzimidazolu (**1**) i wybranych aldehydów aromatycznych. Zastosowanie do tej syntezy katalizatora Triflate znacznie skróciło czas przebiegu reakcji. Powstały produkty o dużej czystości i z wysoką wydajnością ok. 86–90%. Możliwe było nawet 8-krotne wykorzystanie do syntezy imin tej samej porcji katalizatora [24]. Szczegółowa synteza zostanie zaprezentowane w rozdziale 3 (Schemat 14).

W reakcjach 2-amino-1*H*-benzimidazolu (**1**) z podstawionymi pochodnymi acetofenonu **2a-i**, prowadzonej zgodnie z zasadami zielonej chemii i w reaktorze mikrofalowym, w zależności od warunków powstały zasady Schiffa **3a-i** lub pochodne pirymido[1,2-*a*]benzimidazolu (Schemat 3). W badaniach *in vitro* hamowały one peroksydację lipidów (LPO) [25]. W wyniku utleniania lipidów powstają ich nadtlenki, co w konsekwencji może skutkować utratą integralności błon: wewnątrzkomórkowych plazmatycznych [3]. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały związki **3e**, **3h** i **3i**.

Schemat 3. Synteza zasad Schiffa, pochodnych 2-amino-1*H*-benzimidazoluScheme 3. Synthesis of a series of 2-amino-1*H*-benzimidazole Schiff bases

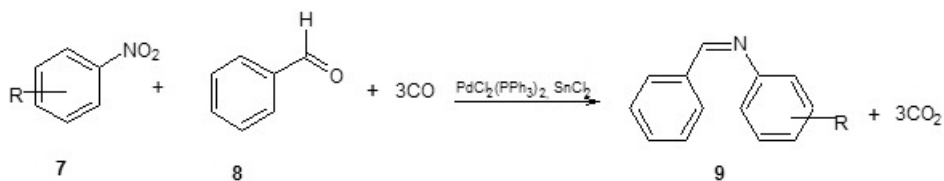
Zasady Schiffa powstają także w wyniku przegrupowania Stieglitza np. w reakcji trifenylometylohydroksyloaminy (5) z pentachlorkiem fosforu. Katalizator przekształca grupę OH hydroksyloaminy w grupę łatwo odchodzącą. Następuje jednoczesne rozerwanie wiązania N–O, utworzenie wiązania C=N i przegrupowanie jednego z podstawników od węgla do azotu (Schemat 4). Budowę otrzymanej zasady Schiffa 6 potwierdzono hydrolizą uzyskując anilinę i benzofenon [26].



Schemat 4. Przegrupowanie Stieglitza

Scheme 4. Stieglitz rearrangement

Z kolei w reakcji, nitroarenów 7 z benzaldehydem (8) i tlenkiem węgla, katalizowanej kompleksami metali, otrzymano serię zasad Schiffa 9 (Schemat 5) [27].



Schemat 5. Synteza zasad Schiffa, pochodnych aniliny

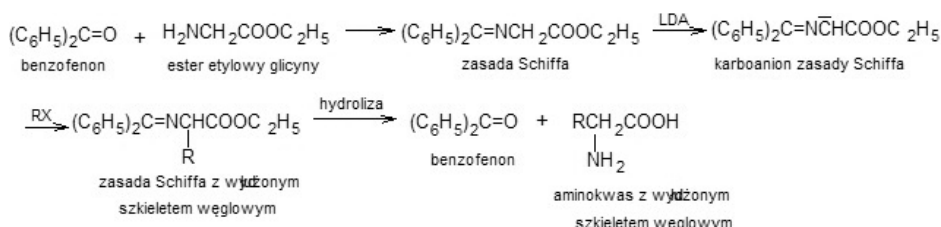
Scheme 5. Synthesis of Schiff bases, aniline derivatives

3. ZASADY SCHIFFA – UNIWERSALNE SUBSTRATY W SYNTEZIE ORGANICZNEJ ORAZ AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW

Obecność w zasadach Schiffa aktywnego chemicznie wiązania azometinowego CH=N stwarza możliwość syntezy związków o różnej strukturze chemicznej.

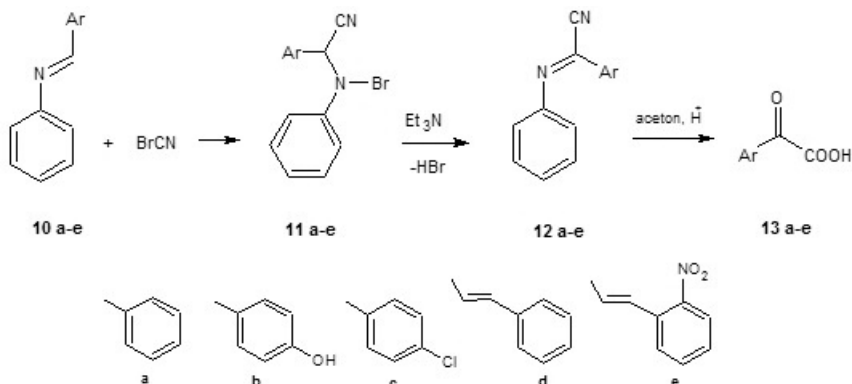
Poniżej zostaną zaprezentowane wybrane reakcje, w których zasady Schiffa pełnią rolę substratów. Często uzyskane w tych reakcjach pochodne wykazują aktywność biologiczną.

W wyniku reakcji benzofenonu z estrem etylowym glicyny otrzymano iminę, która pod wpływem mocnej zasady – LDA utworzyła karboanion. Jego alkilowanie dało zasadę Schiffa o wydłużonym szkieletie węglowym. Hydroliza powstałej iminy doprowadziła do powstania aminokwasu, o wydłużonym łańcuchu węglowym. Odtworzony został również benzofenon (Schemat 6) [22].



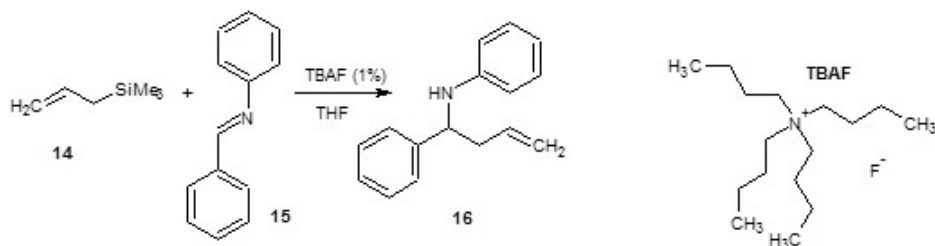
Schemat 6. Synteza aminokwasów
Scheme 6. Synthesis of aminoacids

α -Ketokwasy można otrzymać z zasad Schiffa w wyniku dwuetapowej syntezy. W pierwszym etapie reakcji addycji bromocyjanu do wiązania azometinowego w iminach **10a-e**, powstają związki **11a-e**. Z nich po eliminacji HBr oraz aniliny otrzymano α -ketokwasy **13a-e** (Schemat 7) [28].



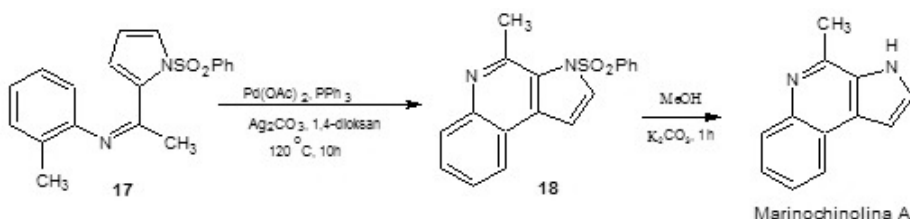
Schemat 7. Synteza α -ketokwasów
Scheme 7. Synthesis of α -ketoacids

W reakcji allilowania benzylidenoaniliny (**15**) alliltrimetylosilanem (**14**), w łagodnych warunkach i przy udziale katalitycznych ilości TBAF powstaje allilopochodna **16** (Schemat 8) [29].



Schemat 8. Allilowanie benzylidenoaniliny
Scheme 8. Allylation of benzylideneaniline

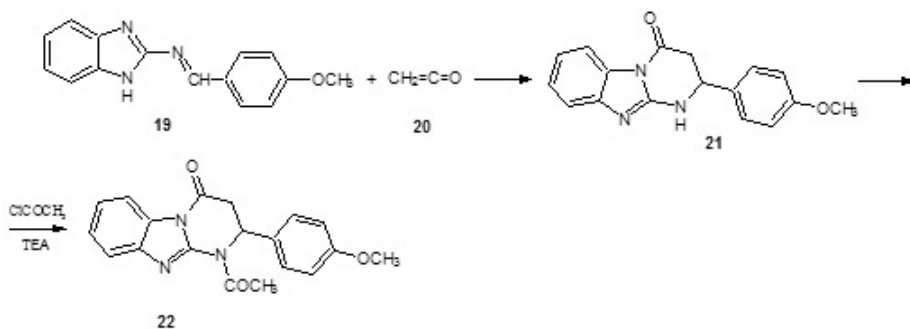
Zasada Schiffa **17** ogrzewana do temperatury ok. 120°C wobec katalitycznych ilości octanu palladu(II) uległa wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dając związek tricykliczny **18** (Schemat 9). Po jego zasadowej hydrolizie w metanolu powstał lek – Marinochinolina A. Wykazuje on wysoką aktywność przeciwko zarodźcom malarii [30].



Schemat 9. Synteza leku przeciwmalarycznego
Scheme 9. Synthesis of antimalarial drug

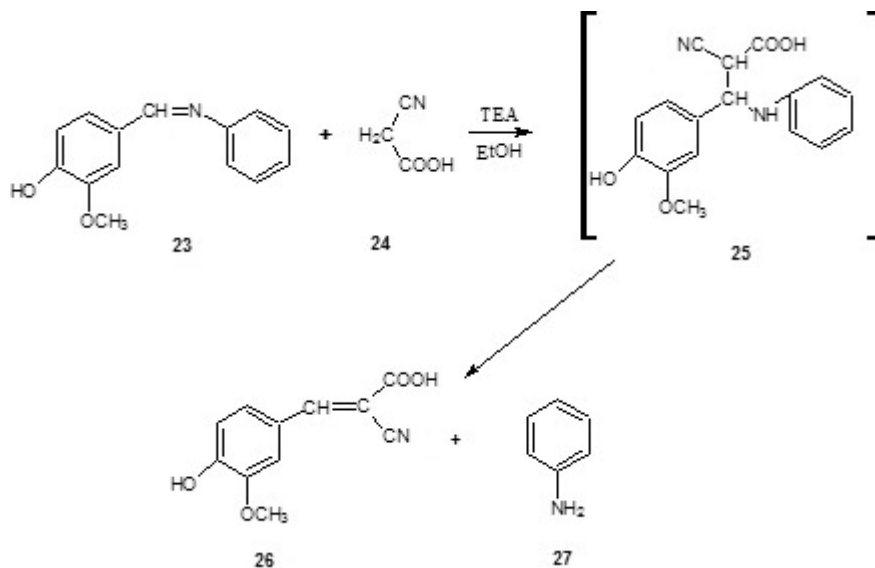
Zasady Schiffa mogą reagować np. z ketenami, ze związkami zawierającymi aktywną grupę metylenową m.in.: 1,3-diketonami, β -ketoestrami, pochodnymi kwasu malonowego itp.

2-(4-Metoksybenzylideno)benzimidazol (**19**) z ketenem (**20**) utworzył pochodną pirymido[1,2-*a*]benzimidazolu **21** o aktywności przeciwalergiczej (Schemat 10). Jej acylowanie chlorkiem chloroacetylę dało produkt **22** o aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* – inhibitor tymidyny wobec komórek ludzkiej białaczki K562 [31].



Schemat 10. Synteza 1-acetylo-2-(4-metoksyfenyleno)-1,2,3,4-tetrahydropirymido[1,2-a]benzimidazol-4-on
 Scheme 10. Synthesis of 1-acetyl-2-(4-methoxyphenylene)-1,2,3,4-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazol-4-one

W reakcji addycji kwasu cyjanooctowego **24** do wiązania azometinowego zasady Schiffa **23** – pochodnej aniliny i waniliny powstaje w pierwszym etapie niestabilny addukt **25**. Eliminacja z niego aniliny (**27**) prowadzi do powstania stabilnego produktu – kwasu α -cyjano- β -(4-hydrokso-3-metoksyfenylo)cynamonowego (**26**) (Schemat 11) [32]. Reakcja przebiega według mechanizmu addycja-eliminacja i jest jedną z metod otrzymywania pochodnych kwasu cynamonowego [33].

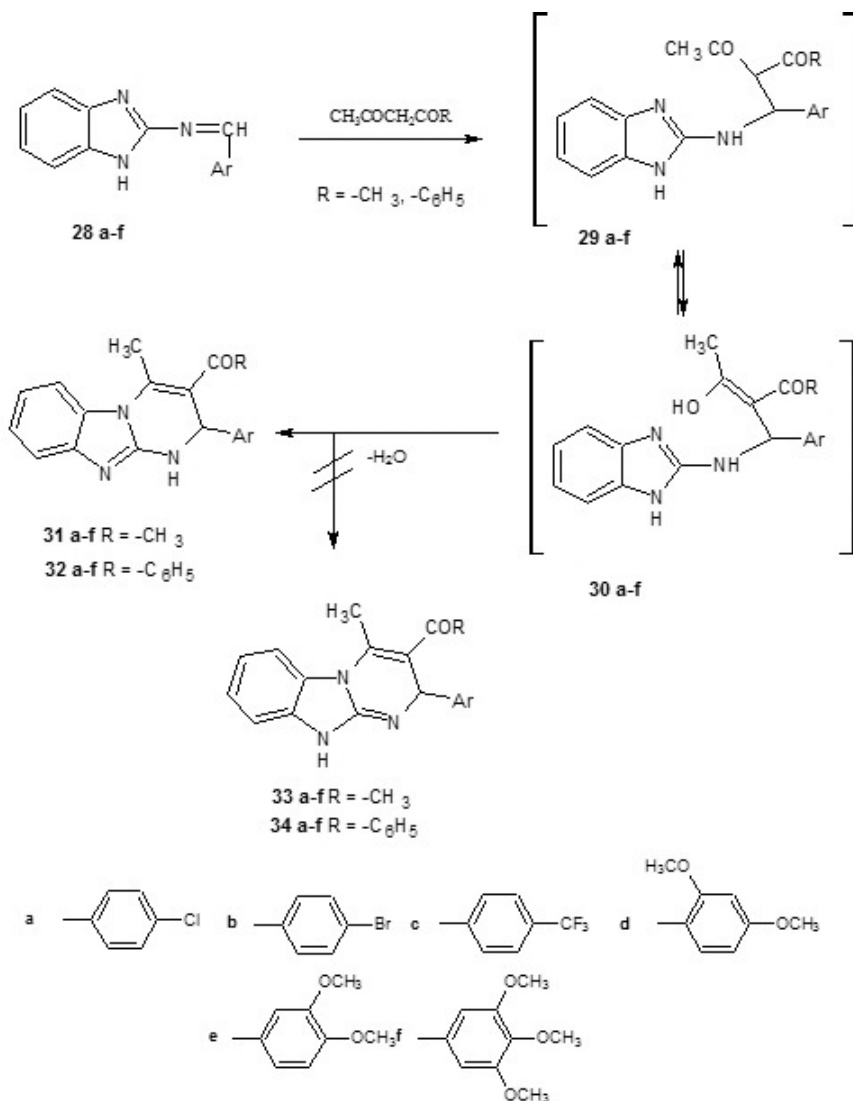


Schemat 11. Synteza kwasu α -cyjano- β -(4-hydrokso-3-metoksyfenylo)cynamonowego
 Scheme 11. Synthesis of α -cyano- β -(4-hydroxy-3-methoxyphenyle)cinnamic acid

W tych samych warunkach reakcji, pochodne 2-arylidenoaminobenzimidazolu **28a-f** ze związkami z aktywną grupą metylenową: 1,3-diketonami, β -ketoestrami, pochodnymi kwasu malonowego itp. zachowują się odmiennie. Powstałe w pierwszym etapie reakcji niestabilne addukty, po eliminacji cząsteczki wody, alkoholu ule-

gają cyklizacji, dając pochodne tricykliczne pirymido[1,2-*a*]benzimidazolu (Schemat 12–14).

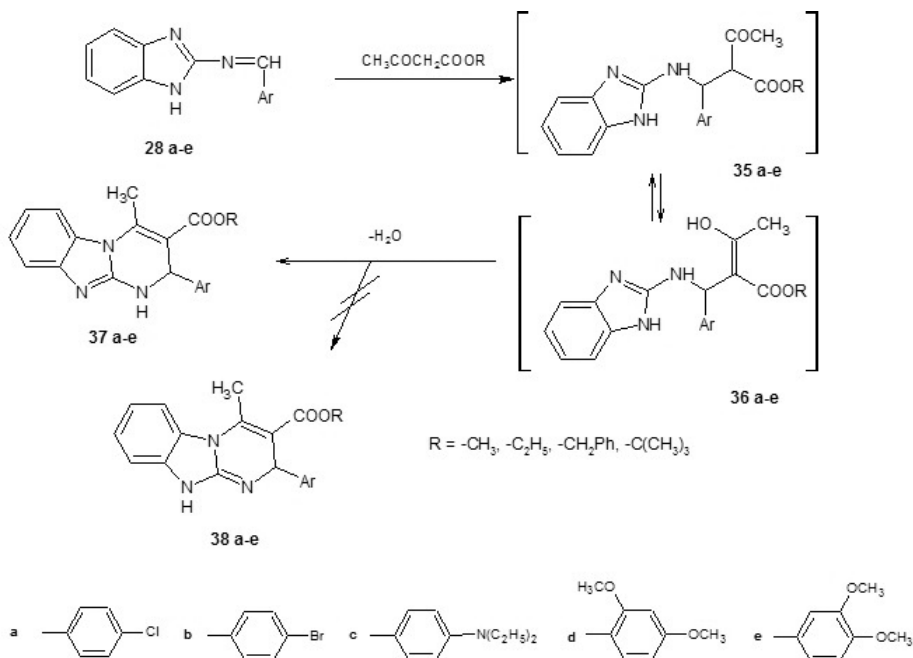
Pochodne pirymido[1,2-*a*]benzimidazolu **31a-f**, **32a-f** uzyskane w reakcjach 2-arylidenoaminobenzimidazoli **28a-f** z wybranymi diketonami: acetyloacetonem, benzoliloacetonem, wykazywały w testach biologicznych aktywność antyproliferacyjną *in vitro* wobec linii komórkowych: białaczki myszy P338, gruczolakoraka odbytnicy SW707 oraz niedrobnokomórkowego raka płuc A549 [34]. Najbardziej aktywne były związki **32b** i **32d**.



Schemat 12. Synteza pochodnych 2-arylo-3-metoksy-4-metylpirymido[1,2-*a*]benzimidazolu

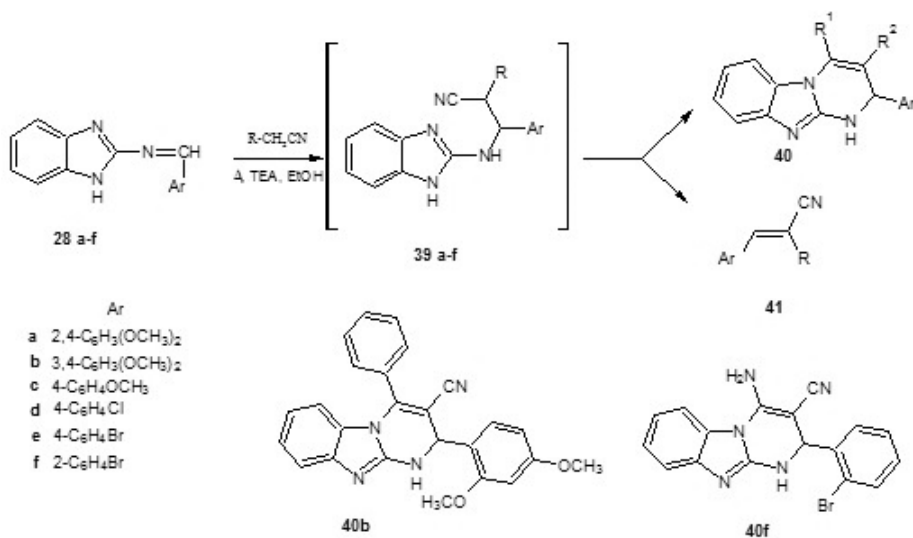
Scheme 12. Synthesis of 2-arylo-3-methoxy-4-methylpyrimido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives

Z kolei związki **37a-e**, otrzymane w reakcji 2-arylidenoamino-1*H*-benzimidazolu z wybranymi α -ketoestrami: metylo-, etylo-, benzylo- i *t*-butyloacetylooctanem, wykazały aktywność antyproliferacyjną *in vitro* w stosunku do linii komórkowych raka płuc A549 [35].



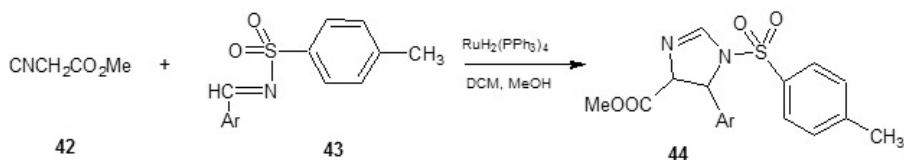
Schemat 13. Synteza pochodnych 3-alkoksykarbonylo-2-arylo-4-metylopyrimido[1,2-*a*]benzimidazolu
Scheme 13. Synthesis of 3-alkoxycarbonyl-2-arylo-4-methylpyrimido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives

Kontynuując prace, w reakcjach 2-arylidenoaminobenzimidazoli **28a-f** z wybranymi nitrylami z aktywną grupą metylenową: malonitrylem, amidem kwasu cyjanooctowego, cyjankiem benzylu i benziloacetonitrylem otrzymano pochodne tricykliczne **40**, gdy reakcje przebiegały według mechanizmu addycja-cyklizacja. Pochodne kwasu α -cyjanocynamonowego **41** otrzymano, gdy reakcje przebiegały według mechanizmu addycja-eliminacja (Schemat 14). Najwyższą aktywność antyproliferacyjną *in vitro* wobec ludzkich linii komórkowych raka: płuc A549, piersi MCF-7 i białaczki HL-60 wykazały 3-cyano-4-fenyl-2-(2,4-dimetoksyfenyl)-1,2-dihdropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol (**40b**) i 2-(*o*-bromofenyl)-3-cyano-4-fenyl-1,2-dihdropyrimido[1,2-*a*]benzimidazol (**40f**) [36].



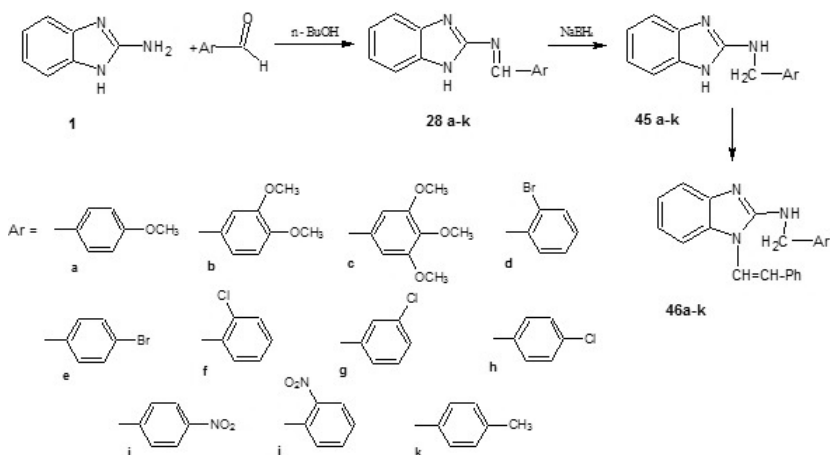
Schemat 14. Synteza pochodnych pirymido[1,2-*a*]benzimidazolu i/lub kwasu α -cyjanocynamonowego
 Scheme 14. Synthesis of pyrimido[1,2-*a*]benzimidazole and/or α -cyanocinnamic acid derivatives

Zasada Schiffa **43** z cyjanooctanem metylo (**42**) utworzyła pochodną imidazolu **44** (Schemat 15) [37].



Schemat 15. Synteza pochodnej imidazolu
 Scheme 15. Synthesis of imidazole derivative

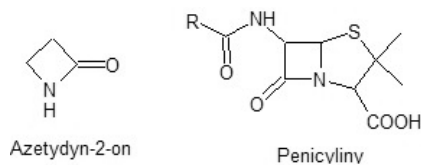
Selektywna redukcja wiązania azometinowego w zasadach Schiffa za pomocą NaBH₄ daje aminy II-rzędowe (Schemat 16). W badaniach *in vitro* wykazano, że zasady Schiffa **28a-k** i uzyskane bezynylo pochodne **45e,h,i,k** były aktywne antyproliferacyjnie *in vitro* wobec komórek nowotworowych raka odbyticy, płuc, piersi i pęcherza moczowego [24, 38]. Acylowanie chlorkiem cynamoilu 2-(2-bromobenzyl)-amino-1*H*-benzimidazolu (**45d**) dało 1-cynamoilo-2-(2-bromobenzyl)-amino-1*H*-benzimidazol (**46d**) o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej [39].



Schemat 16. Redukcja wiązania azometinowego w pochodnych 2-arylidenoamino-1H-benzimidazolu
 Scheme 16. Hydrogenation of azamethine bond in 2-arylideneamino-1H-benzimidazole derivatives

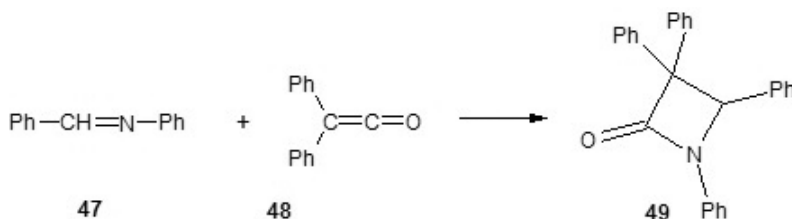
Zasady Schiffa w reakcji z chlorkiem chloroacetylu, lub α -halogenoestrami mogą ulegać cyklokondensacji tworząc czteroczłonowy pierścień β -laktamowy – azetydyn-2-onu.

Pierścień azetydyn-2-onu występuje w szeregu leków o różnorodnym działaniu farmakologicznym m.in. w antybiotykach β -laktamowych: w penicylinach, cefalosporynach, karbapenemach, a także w monobaktamach (Rys. 3) [40]. Z jego obecnością w strukturze antybiotyków wiąże się ich aktywność przeciwbakteryjną.



Rysunek 3. Azetydyn-2-on
 Figure 3. Azetidin-2-one

Pierwszy syntetyczny β -laktam **49** otrzymał Hermann Staudinger w 1907 roku w reakcji benzylidenoaniliny **47** z difenyloketenem (**48**) (Schemat 17) [41].



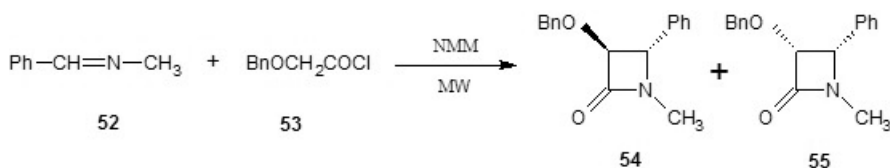
Schemat 17. Synteza Staudingera
 Scheme 17. Staudinger synthesis

W reakcji Reformatskiego, typu *one-pot*, imina **50** z bromooctanem etylu wobec katalitycznych ilości metalicznego cynku utworzyła pochodną azetydyn-2-onu **51** (Schemat 18) [42].



Schemat 18. Synteza układu azetydyn-2-onu w reakcji Reformatskiego
Scheme 18. Synthesis of azetidin-2-one ring in Reformatski reaction

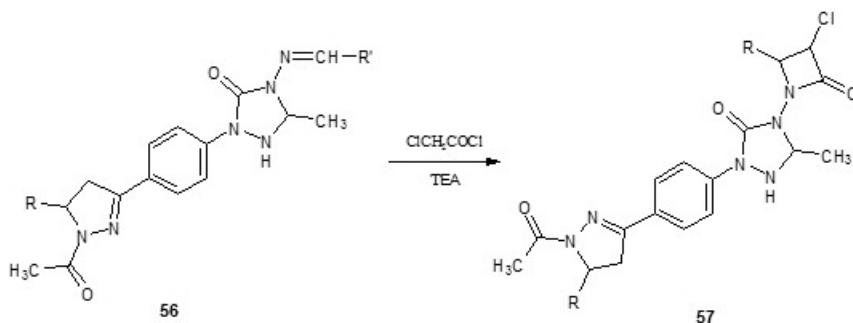
Trans-**54** lub *cis*- β -laktamy **55** otrzymano z wydajnością ponad 80% z zasady Schiffa **52** i chlorku kwasowego **53**. Reakcje prowadzono wobec *N*-metylomorfoliny w reaktorze mikrofalowym (Schemat 19) [43].



Schemat 19. Synteza *trans* lub *cis*- β -laktamów
Scheme 19. Synthesis of *trans* or *cis*- β -lactames

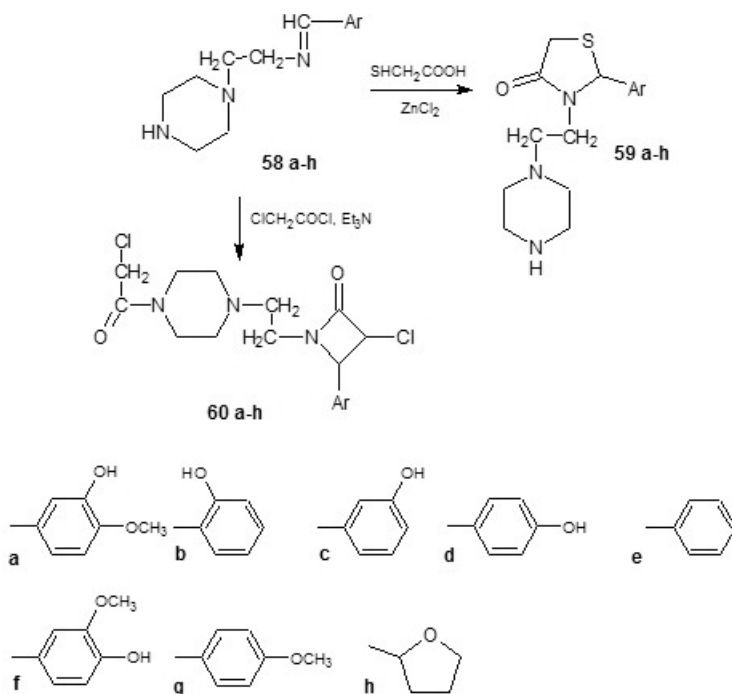
Syntezy związków heterocyklicznych, o aktywności przeciwbakteryjnej, zawierające w swojej strukturze pierścien azetydynonu zostaną przedstawione poniżej.

W reakcjach zasad Schiffa **56**, pochodnych 1,2,4-triazol-3-onu, z chlorkiem chloroacetylu otrzymano azetydynony **57**, które hamowały rozwój bakterii *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* oraz *K. pneumoniae* (MIC = 12–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), porównywalnie z lekiem referencyjnym – Ampicyliną (MIC 24–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dodatkowo wykazały one obiecującą aktywność przeciwprątkową wobec szczepów *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (Schemat 20) [44].



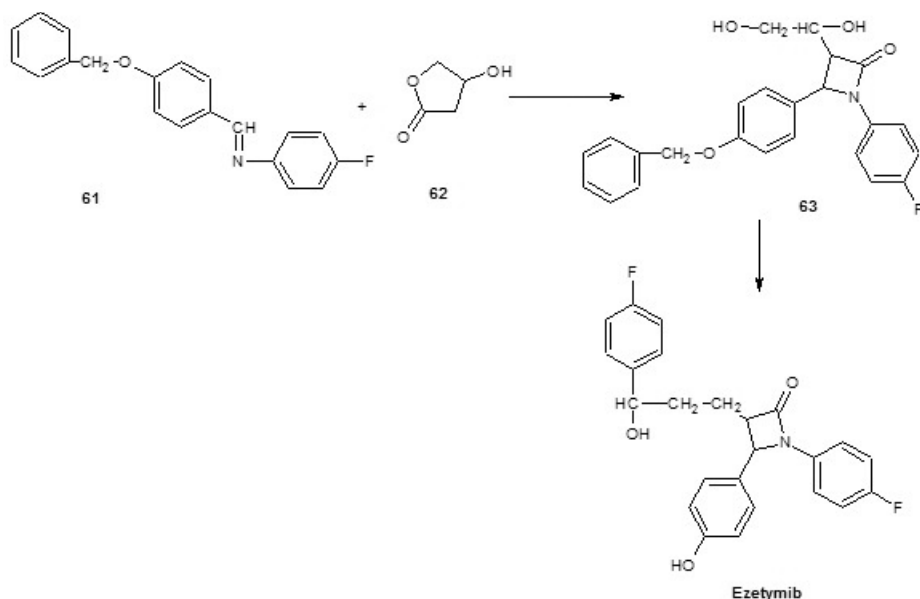
Schemat 20. Synteza pochodnych 4-(1-azytydyn-2-on)-1,2,4-triazol-3-onu
Scheme 20. Synthesis of 4-(1-azetidin-2-one)-1,2,4-triazol-3-one derivatives

W reakcjach zasad Schiffa **58a-h** z kwasem tioglikolowym prowadzonych wobec bezwodnego chlorku cynku(II) powstawały 3-[2-(piperazyn-1-ylo)etylo]-2-arylo-1,3-tiazolidyn-4-ony **59**. Natomiast w reakcji imin **58a-h** z chlorkiem chloroacetylu otrzymano 3-chloro-1-[2[4-(chloroacetylo)piperazyn-1-ylo]etylo]-4-aryloazetydyn-2-on **60** (Schemat 21). Związki **59a-h** i **60a-h** wykazały umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram ujemnych oraz Gram dodatnich (MIC 4,68–150 µg/mL), a także przeciwgrzybiczą, m.in. wobec grzybów *A. niger*, *A. awamori*, *C. albicans*, *A. alternate*, *M. canis*, *R. solani* oraz *T. longiformis* [45]. Związkami referencyjnymi w testach przeciwbakteryjnych była Ciprofloksacyna, a w badaniach przeciwgrzybiczych Klotrimazol.



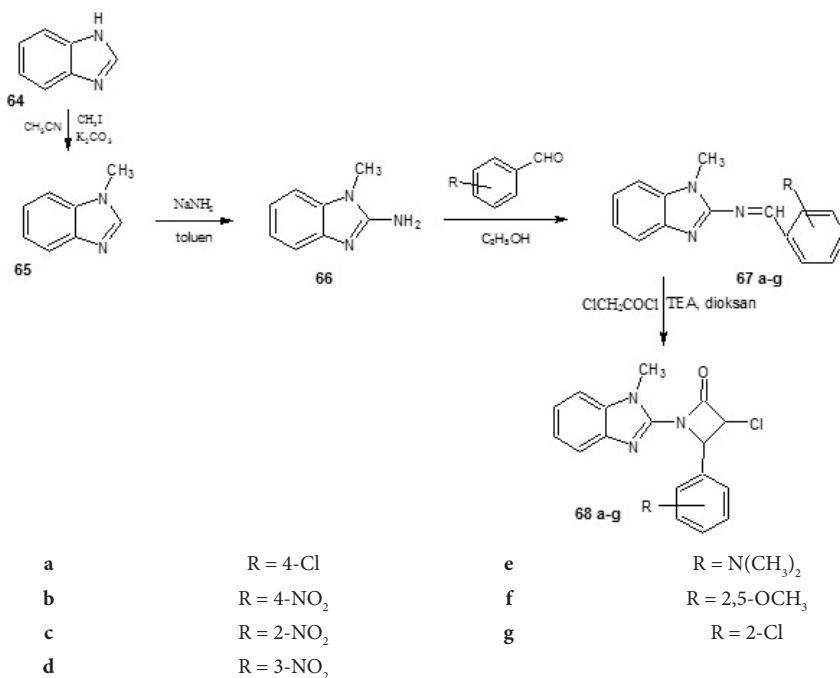
Schemat 21. Reakcje 2-arylidenoamino-1-(1-piperidynylo)-etanu
 Scheme 21. Reaction of 2-arylideneamino-1-(piperidin-1-ylo)ethan

Pochodna benzylidenoaniliny **61** w reakcji z 2-hydroksytetrafuran-2-onem (**55**) daje 1-(4-fluorofenyleno)-3-(etanodi-1-olo)-4-((4-benzyloksi)fenyleno)azetydyn-2-on (**63**) (Schemat 22). Stanowił on substrat do syntezy leku hipolipemicznego Ezetymibu – 1-(4-fluorofenyleno)-3-[3-(4-fluorofenyleno)-3-hydroksypropylo]-4-(4-hydroksyfenyleno)azetydyn-2-onu [46].

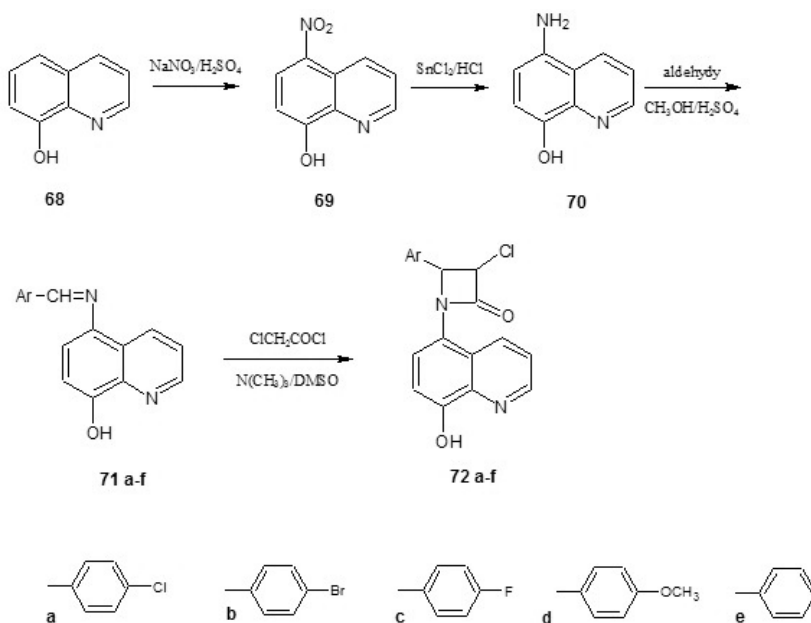


Schemat 22. Synteza leku – Ezetymibu
 Scheme 22. Synthesis of drug – Ezetymib

Wysoką aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* wobec szczepów *S. aureus*, *B. pumilus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* oraz cytotoksyczną wykazały dwie pochodne: 3-chloro-1-(1-metylo-1*H*-benzimidazol-2-yl)-4-(2,5-dimetoksy-fenyl)azetydyn-2-on (**68f**) oraz 3-chloro-1-(1-metylo-1*H*-benzimidazol-2-yl)-4-(2-chlorofenyl)azetydyn-2-on (**68g**). Wartości MIC wynosiły 25–75 µg/mL, i była porównywalna ze związkiem referencyjnym Ampicyliną (MIC 6,5–25 µg/mL). Zostały one otrzymane według Schematu 23 przedstawionego poniżej. W pierwszym etapie reakcji 1*H*-benzimidazol (**64**) poddano alkilowaniu jodkiem metylu wobec bezwodnego K₂CO₃ w acetonitrylu uzyskując 1-metylo-1*H*-benzimidazol (**65**). Jego aminowanie amidkiem sodu w toluenie dało 1-metylo-2-amino-1*H*-benzimidazol (**66**). Związek **66** w reakcjach z aldehydami benzoesowymi utworzył serię zasad Schiffa **67a-g**, które w reakcjach z chlorkiem chloroacetylu, wobec trietyloaminy w dioksanie utworzyły pochodne azetydyn-2-onu **68a-g** [47].

Schemat 23. Synteza pochodnych 2-azytydno-1-metylo-1*H*-benzimidazoluScheme 23. Synthesis of 2-azetidino-1methyl-1*H*-benzimidazole derivatives

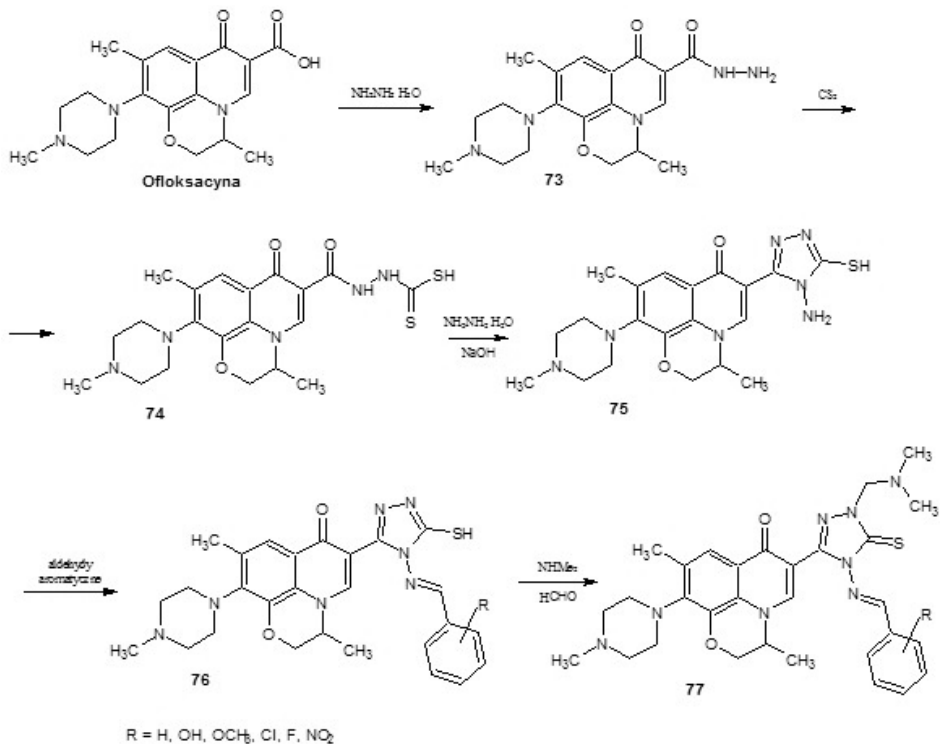
Z kolei aktywność przeciwoznaczą wobec filarii *Brugia malayi* w badaniach *in vitro* wykazały pochodne 8-hydroksychinoliny **72a-f** (Schemat 24). Hamowały one enzym – transferazę S-glutationu (GST) zmniejszając zdolność obrony pasożyta przed stresem oksydacyjnym [48]. Najwyższą aktywność przeciwoznaczą wykazały: 3-chloro-4-(*p*-bromofenylo)-1-(8-hydroksychinolin-5-ylo)azytydyn-2-on (**72e**) i 3-chloro-4-(*p*-metoksyfenylo)-1-(8-hydroksychinolin-5-ylo)azytydyn-2-on (**72f**).



Schemat 24. Synteza pochodnych 5-(1-azetydy-2-on)-7-hydroksychinolini

Scheme 24. Synthesis of 5-(1-azetidin-2-one)-7-hydroxyquinoline derivatives

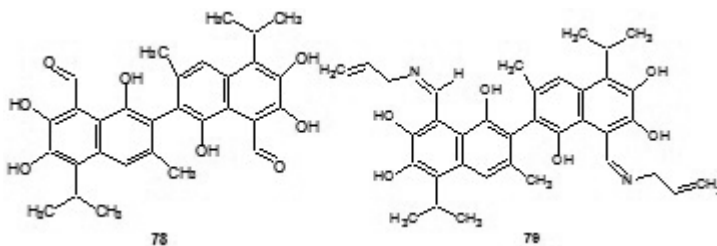
Chińscy naukowcy jako substratu do syntezy zasad Schiffa, a następnie Mannicha zastosowali fluorochinolon – Ofloksacynę, [11] (Schemat 25). Kwas 6-fluoro-7-(4-metylopiperazyn-1-ylo)1,8-(2,1-oksopropilo)chinolin-4(1*H*)-on-3-karboksylowy w reakcji z hydrazyną utworzył hydrazyd **73**, który z disiarczkiem węgla daje związek **74**. Związek **74** po amonolizie połączonej z cyklizacją dał 4-aminotiazolo pochodną **75**. Serię zasad Schiffa **76** otrzymano w reakcji związku **75** z wybranymi aldehydami aromatycznymi. W kolejnym etapie syntezy poddano je kondensacjom Mannicha uzyskując związki **77**. Zasady: Schiffa **76** i Mannicha **77** w testach przeciwnowotworowych wykazywały działanie antyproliferacyjne *in vitro* wobec linii komórkowych: mysiej białaczki (L1210), ludzkiej białaczki (CHO) i komórek raka jajnika chińskiego chomika (HL60) [49]. Modyfikacje struktury Ofloksacyny zmieniły profil działania otrzymanych związków **76** i **77** z przeciwbakteryjnego na przeciwnowotworowy.



Schemat 25. Modyfikacja chemiczna struktury leku Ofloksacyny

Scheme 25. Chemical modification of structure of drug Ofloxacin

Wyizolowany z nasion bawełny roślinny pigment Gossypol **78** jest polifenolem. Wykazuje różnorodną aktywność biologiczną: przeciwnowotworową *in vitro*, antyoksydacyjną, przeciwwirusową, antybakteryjną i przeciwmalaryczną. [50] Wysoka toksyczność Gossypolu, związana prawdopodobnie z obecnością w jego strukturze dwóch grup formylowych, była główną przeszkodą w zastosowaniu go w leczeniu. Modyfikacja chemiczna jego struktury, polegająca na utworzeniu zasady Schiffa **79** dała związek o niższej toksyczności z zachowaniem biologicznej aktywności [51].



Rysunek 4. Gossypol

Figure 4. Gossypol

PODSUMOWANIE

Zasady Schiffa ze względu na swoje właściwości chemiczne i fizyczne są ważną grupą związków w chemii, biochemii, farmacji i mają również zastosowanie pozamedyczne. W pracy przedstawiono niektóre metody otrzymywania zasad Schiffa. Zaprezentowano wybrane reakcje wiązania azometinowego imin np. selektywną redukcję, reakcje ze związkami z aktywną grupą metylenową, syntezy związków zawierających w swojej strukturze pierścieni azetydynonu oraz właściwości biologiczne niektórych zsyntezowanych zasad Schiffa i produktów modyfikacji chemicznej ich struktury.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Rozwadowski, E. Majewski, T. Dziembowa, P.E. Hansen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1999, **2**, 2809.
- [2] M. Ziółek, J. Kubicki, A. Maciejewski, R. Naskręcki, A. Grabowska, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **369**, 80.
- [3] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, 2008.
- [4] M.P. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **419**, 25.
- [5] *The Merck Index*, 14th edition, Whitehouse Station, USA, 2006.
- [6] P. Anand, V.M. Patil, V.K. Sharma, R.L. Khosa, N. Masand, *Int. J. Drug Design Discovery*, 2012, **60**, 851.
- [7] P. Przybylski, A. Huczynski, K. Pyta, B. Brzeziński, F. Bartl, *Curr. Org. Chem.*, 2009, **13**, 124.
- [8] C.M. da Silva, D.L. da Silva, L.V. Modolo, R.B. Alves, M.A. de Resende, C.V.B. Martins, A. de Fatima, *Journal of Advanced research*, 2011, **2**, 1.
- [9] K. Sztanke, A. Maziarka, A. Osinka, M. Sztanke, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 3648.
- [10] J. Młochowski, *Chemia związków heterocyklicznych*, PWN, 1994.
- [11] R.M. Issa, S.A. El-Daly, N.A. El-Wakiel *Spectrochim. Acta Part A*, 2003, **59**, 723.
- [12] S. Safak, B. Duran, A. Yurt, G. Turkoglu, *Corros. Sci.*, 2012, **54**, 251.
- [13] H. Ashassi-Sorkhabi, B. Shaabani, D. Seifzadeh, *Electrochim. Acta*, 2005, **50**, 3446.
- [14] E. Szyk, A. Wojtczak, A. Surdykowski, M. Goździkiewicz, *Inorg. Chim. Acta*, 2005, **358**, 467.
- [15] D.M. Boghaei, E. Askarizadeh, A. Bezaatpour *Spectrochim. Acta Part A*, 2008, **69**, 642.
- [16] F. Yakuphanoglu, A. Cukurovali, Đ. Yilmaz *Optical Materials*, 2005, **27**, 1363.
- [17] Y. Özcan, S. Đde, Đ. Sakıyan, E. Logoglu *J. Mol. Struct.*, 2003, **658**, 207.
- [18] W. Jiang, B. Xu, Q. Lin, J. Li, F. Liu, X. Zeng, H. Chen *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **315**, 103.
- [19] S. Kumar, D.N. Dhar, P.N. Saxena, *J. Sci. Ind. Res.*, 2009, **68**, 181.
- [20] A. Prakash, D. Adhikari, *Int J ChemTech Res*, 2011, **3**, 1891.
- [21] B. Kołodziej, Rozprawa doktorska, zbc.ksiaznica.szczecin.pl/Content/2129/
- [22] P. Mastalerz, *Chemia Organiczna*, PWN, 1986.
- [23] J. McMurry, *Chemia Organiczna*, Wydawnicwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007.
- [24] W. Nawrocka, B. Sztuba, M.W. Kowalska, H. Liszkiewicz, J. Wietrzyk, A. Nasulewicz, M. Pełczyńska, A. Opolski, *Il Farmaco*, 2004, **59**, 83.
- [25] C.G. Neochoritis, T. Zarganes-Tzitzikas, C.A. Tsoleridis, J. Stephanidou-Stephanatou, C.A. Kontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina, T. Choli-Papadopoulou, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 297.
- [26] J. Stieglitz, P.N. Leech, *J. Americ. Chem. Soc.*, 1914, **36**, 272.

- [27] F. Regaini, S. Cenini, *J. Mol. Cat. A: Chem.*, 1999, **144**, 405.
- [28] M. Rai, A. Singh, *Indian J. Chem.*, 1979, **17B**, 169.
- [29] D.K. Wang, Y.G. Zhou, Y. Tang, X.L. Hou, L.X. Dai, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 4233.
- [30] J.P. Mahajan, Y.R. Suryawanshi, S.B. Mhaske, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 5804.
- [31] N. Tatsushi, K. Shinya, K. Tetsuzo, *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 1986, **61**, 63680.
- [32] A. Singh, M. Rai, K.K. Singal, *Indian J. Chem. Soc.*, 1975, **13**, 991.
- [33] R. Blank, *Ber.*, 1895, **28**, 145.
- [34] W. Nawrocka, B. Sztuba, A. Dryś, J. Wietrzyk, J. Kosendiak, A. Opolski, *Polish J. Chem.*, 2006, **80**, 279.
- [35] W.P. Nawrocka, M.W. Kowalska, B. Sztuba, A. Dryś, J. Wietrzyk, B. Filip, *Pol. J. Chem.*, 2007, **81**, 1753.
- [36] A. Nowicka, H. Liszkiewicz, W.P. Nawrocka, J. Wietrzyk, K. Kempieńska, A. Dryś, *Cent. Eur. J. Chem.* 2014, DOI: 10.2478/s11532-014-0533-3.
- [37] L.X. Dai, Y.R. Lin, X.L. Hou, Y.G. Zhou, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71**, 1033.
- [38] W. Nawrocka, H. Liszkiewicz, *PL* 195864/2007.
- [39] W. Nawrocka, H. Liszkiewicz, *PL* 197203/2007.
- [40] R. Southgate, S. Elson, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1985, **47**, 106.
- [41] T.T. Tidwell, *Ang. Chem. Int. Edit.*, 2008, **47**, 1016.
- [42] J. Rajput, B. Singh, K.K. Singal, *Ind. J. Chem.*, 2007, **46B**, 643.
- [43] M.S. Manhas, B.K. Banik, A. Mathur, J.E. Vincent, A.K. Bose, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 5587.
- [44] T. Taj, R.R. Kamble, T. Gireesh, B. Badami, *J. Chem. Sci.*, 2011, **123**, 657.
- [45] S.G. Shingade, B.S. Bari, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 699.
- [46] G.Z. Wu, X. Chen., Z. Ding, Y.S. Wong, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 3714.
- [47] M. Noolvi, S. Agrawal, H. Patel, A. Badiger, M. Gaba, A. Zambre, *Arabian J. Chem.*, 2014, **7**, 219.
- [48] S.S. Chhajed, P. Manisha, V.A. Bastikar, H. Animeshchandra, V.N. Ingle, Ch.D. Upasani, S.S. Wazalwar, *Bioorg. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 3640.
- [49] G. Hu, G. Wang, N. Duan, X. Wen, T. Cao, S. Xie, W. Huang, *Acta Pharm Sinic B*, 2012, **2**, 312.
- [50] M. Zbidah, A. Lupescu, N. Shaik, F. Lang, *Toxicology*, 2012, **302**, 101.
- [51] P.Przybylski, M. Małuszyńska, B. Brzezinski, *J. Mol. Struct.*, 2005, **750**, 152.

Praca wpływająca do Redakcji 18 września 2013

**ZASTOSOWANIE SOLI CHINOLINIOWYCH
I PIRYDINIOWYCH DO OZNACZANIA
WYBRANYCH ZWIĄZKÓW SIARKI
W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH**

APPLICATION OF QUINOLINIUM AND PYRIDINIUM
SALTS FOR DETERMINATION OF SELECTED SULFUR
COMPOUNDS IN BIOLOGICAL SAMPLES

**Paulina Furmaniak, Monika Wyszczelska-Rokiel,
Paweł Kubalczyk, Rafał Głowacki***

*Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki
e-mail: glowar@uni.lodz.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka soli oniowych
2. Sole pirydyniowe i chinoliniowe jako odczynniki derywatyzujące
 - 2.1. Reaktywność soli oniowych względem wybranych związków siarki
 - 2.2. Właściwości fizykochemiczne pochodnych
3. Wykorzystanie soli oniowych w analityce próbek biologicznych
 - 3.1. Zastosowanie do próbek osocza
 - 3.2. Zastosowanie do próbek moczu
 - 3.3. Ślina, homogenaty tkanek roślinnych i produkty spożywcze

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Paulina Furmaniak studiowała w latach 2007–2012 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego na kierunku chemia. W 2012 roku ukończyła studia chemiczne broniąc pracę magisterską w Katedrze Chemii Organicznej na temat „Supramolekularne agregaty polilaktydów gwiaździstych poprzez oddziaływanie grup końcowych”. Obecnie jest słuchaczką drugiego roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Chemii UŁ. Zainteresowania naukowe mgr Furmaniak dotyczą opracowywania nowych metod analitycznych z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej i umożliwiających badania związków aktywnych biologicznie.



Mgr Monika Wyszczelska ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Łódzkim w roku 2011. Pracę magisterską na temat „Badanie właściwości tri-biologicznych pochodnych kwasów dialkilo(arylo)ditiofosforowych w układach kompozytowych” obroniła w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów. W tym samym roku rozpoczęła czteroletnie studia doktoranckie na Wydziale Chemii UŁ. Zainteresowania naukowe mgr Wyszczelskiej-Rokiel obejmują opracowywanie nowych metod wykrywania i oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych.



Dr Paweł Kubalczyk studia chemiczne na Uniwersytecie Łódzkim ukończył w 1996 roku. Jest pracownikiem Uniwersytetu Łódzkiego od 1996 r. Początkowo był zatrudniony na stanowisku asystenta, a od czerwca 2003 roku na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii UŁ. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2003 roku po przedstawieniu rozprawy na temat: „Wysokosprawna elektroforeza kapilarna 2-S-pirydyniowych pochodnych hydrofilowych tioli”. Zainteresowania naukowe dr. Pawła Kubalczyka od początku jego działalności badawczej dotyczyły analizy chemicznej zanieczyszczeń środowiska, roli związków siarki w organizmie człowieka oraz rozwijania nowych metod wykrywania i oznaczania biologicznie

ważnych związków siarki w próbkach biologicznych z zastosowaniem techniki wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej. W ostatnich latach jego badania naukowe ukierunkowane są na problematykę dotyczącą wyrafinowanych metod zateżania analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym kapilarnej elektroforezy.



Dr hab. Rafał Głowacki ukończył studia na Uniwersytecie Łódzkim w roku 1996. W tym samym roku podjął pracę w ówczesnym Zakładzie Chemii Środowiska Katedry Technologii Chemicznej i Ochrony Środowiska UŁ. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2001. W latach 2002–2003 odbył staż podoktorski w University of Medicine and Dentistry of New Jersey (USA), związany z biochemicznymi aspektami roli homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny w schorzeniach sercowo-naczyniowych. Wiosną 2011 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badanie mechanizmu homocysteinylacji białek z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii

cieczowej”. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora nadzwyczajnego w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii UŁ. Jego aktualne zainteresowania naukowe dotyczą m.in. chemii i biochemii aminotiolu, ich oddziaływań z białkami, analityki próbek biologicznych, analizy chemicznej zanieczyszczeń środowiska z wykorzystaniem technik separacyjnych w fazie ciekłej, a także możliwości zwiększenia czułości CE z wykorzystaniem zateżania analitów w kapilarze.

ABSTRACT

Quinolinium and pyridinium salts belong to the group of onium compounds and are widely used in organic, structural and analytical chemistry. Their synthesis is mainly based on quaternization of the nitrogen atom in a heterocyclic ring [4, 13, 23]. In analytical chemistry quinolinium and pyridinium salts such as 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT) or 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide (BCPB) perform very well as thiol specific derivatization reagents in terms of derivatization reaction velocity, stability, chromatographic properties of the derivatives, and thus, amenability to automatization [18–22, 32–42]. Analytical procedures for thiol determination usually involve reduction of disulfide bonds with tris(2-carboxyethyl)phosphine, tri-*n*-butylphosphine or mercaptoethanol, chemical derivatization of the sulfur compound with the use of 2-halopyridinium or 2-haloquinolinium salts and then deproteinization, followed by ion-pair reversed-phase HPLC or CE separation and spectrophotometric detection. Derivatization reaction takes advantage of great susceptibility of quinolinium or pyridinium molecules at 2-position to nucleophilic displacement, and a high nucleophilicity of the thiol group. Derivatization reaction mixture is usually ready to be analyzed just after mixing of the substrates. CMQT and BCPB exhibit very high reactivity toward thiols [44, 45], sulfides [63] as well as thiosulfates [40, 54]. 2-S-quinolinium and 2-S-pyridinium derivatives possess advantageous spectrophotometric and chromatographic properties. They are stable and more hydrophobic than thiols themselves, possessing a well-defined absorption maximum in the UV region. The reaction is accompanied by an analytically advantageous bathochromic shift from reagent maximum to the maximum of the derivative. Thanks to this phenomenon it is possible to use a large excess of derivatization reagent in order to drive the reaction to completion and avoid a huge signal of unreacted compound on the chromatogram [26]. Elaborated with the use of onium salts methods have proven to be useful in quantitative HPLC and CE analysis of endogenous and exogenous low-molecular-weight biological thiols in human body fluids, plant extracts and some groceries [44, 45].

Keywords: pyridinium salts, quinolinium salts, thiol aminoacids, chemical derivatization, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis

Słowa kluczowe: sole pirydyniowe, sole chinoliniowe, aminokwasy tiolowe, derywatywacja chemiczna, wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna

WYKAZ STOSOWANYCH SKROTÓW

BCPB	- bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy
CMLT	- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy
CMPI	- jodek-2-chloro-1-metylopirydyniowy
CMQT	- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy
CPPI	- jodek 2-chloro-1-propylopirydyniowy
Cys	- cysteina
Cys-Gly	- cysteinyloglicyna
DNPH	- 2,4-dinitrofenylohydrazyna
DTT	- ditiotreitol
FLD	- detektor spektrofotometryczny
GSH	- glutation
γ -Glu-Cys	- γ -glutamylcysteina
Hcy	- homocysteina
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
MTE	- merkaptoetanol
<i>N</i> -acetylo-Cys	- <i>N</i> -acetylocysteina
$N\epsilon$ -Hcy-Lys	- $N\epsilon$ -homocysteinylo-lizyna
OPA	- aldehyd <i>o</i> -ftalowy
PCA	- kwas chlorowy (VII)
RP-HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
TBF	- tri- <i>n</i> -butylofosfina
TCEP	- tris(2-karboksyetylo)fosfina
TMSH	- wodorotlenek trimetylosulfoniowy
UV-Vis	- spektrofotometria z zakresu promieniowania ultrafioletowego i widzialnego

WPROWADZENIE

Sole pirydyniowe i chinoliniowe należą do grupy związków szeroko wykorzystywanych w przemyśle, a także różnych dziedzinach nauki, włączając chemię organiczną, strukturalną i analityczną. Najczęstszą metodą ich syntezy jest czwartorzędowanie atomu azotu w pierścieniu aromatycznym. Sole takie jak bromek 1-benzylo-2-chloropirydiniowy oraz tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy są od lat z powodzeniem wykorzystywane w analityce związków siarki. Ich duża reaktywność oraz selektywność względem aminokwasów tiolowych, jonów tiosiarczanowych i siarczkowych oraz możliwość tworzenia stabilnych, aktywnych spektrofotometrycznie pochodnych sprawiły, że znalazły one zastosowanie podczas opracowywania wielu metod analitycznych, wykorzystujących techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, elektroforezy kapilarnej i spektrofotometrii. Opracowane z ich udziałem metodyki oznaczania biologicznie ważnych aminokwasów tiolowych obejmują zazwyczaj etap redukcji wiązań disiarczkowych, po czym następuje etap derywatyzacji, deproteinizacji i końcowa analiza jedną z wyżej wymienionych technik. Mechanizm reakcji z tiolami polega na podstawieniu nukleofilowym atomu halogenu w pozycji 2 pierścienia heterocyklicznego przez silnie nukleofilową grupę tiolową. Cechą charakterystyczną jest możliwość prowadzenia reakcji w łagodnych warunkach, tj. w roztworze wodnym i temperaturze pokojowej. Czas reakcji nie przekracza wówczas kilku, a tylko w niektórych przypadkach kilkunastu minut. Otrzymywane pochodne – stabilne tioetery, wykazują bardzo korzystne właściwości spektroskopowe i chromatograficzne. Obserwowane zjawisko przesunięcia batochromowego pozwala na stosowanie znacznych nadmiarów molowych odczynnika derywatyzującego w stosunku do analitu, co przyspiesza reakcję, nie powodując jednocześnie utrudnienia w interpretacji chromatogramu. Wykorzystując sole oniowe opracowano szereg chromatograficznych i elektroforetycznych metod oznaczania hydrofilowych związków siarki w różnych matrycach, włączając osocze, moczu, ślinę oraz homogenaty tkanek roślinnych i zwierzęcych, a ich przydatność została potwierdzona w badaniach populacyjnych.

1. CHARAKTERYSTYKA SOLI ONIOWYCH

Związkiem oniowym nazywamy kation otrzymywany w wyniku protonowania cząsteczki posiadającej w swojej budowie atom z 15, 16 lub 17 grupy układu okresowego. Najbardziej znanym jonem oniowym jest jon amoniowy NH_4^+ , będący sprotonowaną pochodną amoniaku (NH_3). Nazwa „związki oniowe” może być również używana w stosunku do kationów powstałych w wyniku podstawienia atomów wodoru w tych jonach, przez halogenki czy rodniki organiczne, np. kation tetrafenylofosfoniowy $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{P}^+$. Jony oniowe w większości przypadków posiadają pojedynczy ładunek dodatni (PH_4^+ , H_3S^+ , NH_3OH^+), zdarzają się jednak związki

z dwoma lub większą liczbą ładunków, o których mówi się, że są dwukrotnymi lub trójkrotnymi jonami oniovymi (np. ${}^+\text{H}_2\text{N}=\text{NH}_2^+$) [1].

Związki kationu oniowego i jonu o ładunku ujemnym są nazywane solami oniovymi. Wspomniane sole są jonowymi związkami chemicznymi o wzorze ogólnym $(\text{R}_{n+1}\text{M})^+\text{X}^-$, gdzie **R** - oznacza atom wodoru lub rodnik organiczny, **M** - atom azotu, fosforu, siarki, tlenu, itp., **X** - określony anion, a **n** - wartościowość pierwiastka M w związku organicznym [2]. Wśród soli oniowych wyróżnić można m.in. sole amoniowe, sulfoniowe, pirydyniowe, chinoliniowe czy fosfoniowe.

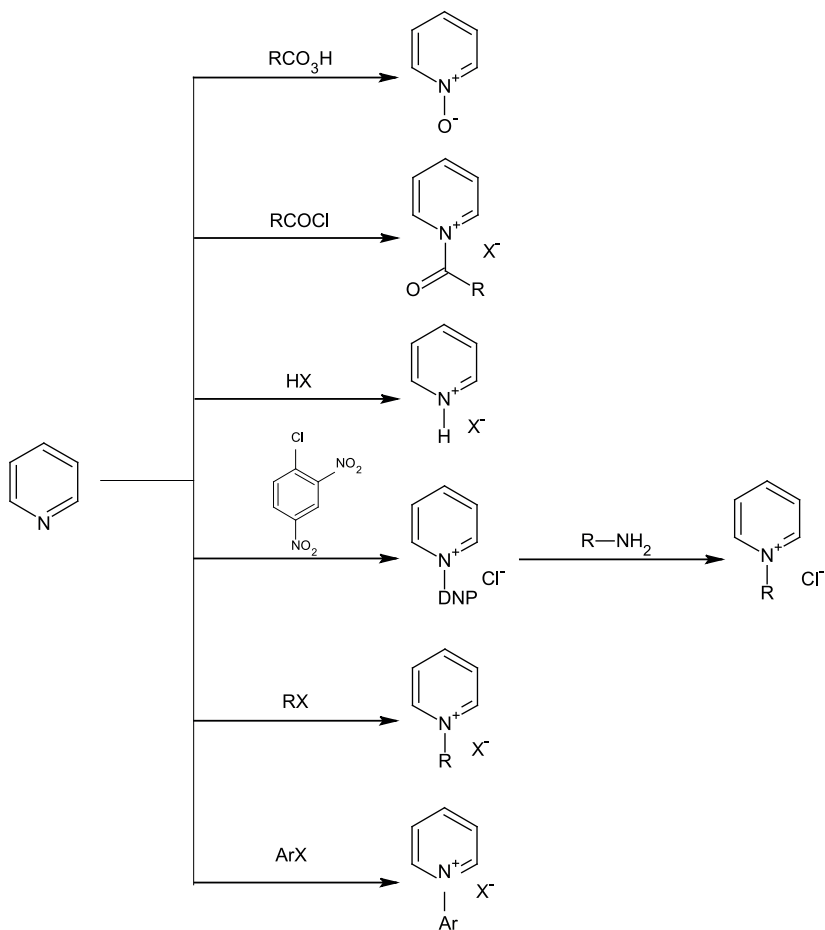
Syntezę organiczną soli oniowych zapoczątkowali w 1894 r. Hartmann oraz Meyer przygotowując wodorosiarczany 4-jododifenyloniowy, sugerując tym samym zakończenie oniowe jako właściwe dla tego rodzaju związków [3]. Najczęściej wykorzystywanym sposobem syntezy soli oniowych, takich jak sole amoniowe są reakcje czwartorzędowania, czyli otrzymywania amin czwartorzędowych lub reakcje wymiany halogenku w innej soli [4]. Przykładem tego typu reakcji może być synteza fenacylowych soli oniowych, wykorzystująca reakcję halogenku fenacylu z nukleofilowym związkiem heteroatomowym [5].

Specyficzna budowa oraz unikatowe właściwości soli oniowych umożliwiają ich wykorzystanie, m.in. jako katalizatorów w asymetrycznej katalizie przeniesienia fazowego środków acylujących, biocydów, kationowych środków powierzchniowo czynnych, czy też do produkcji barwników i wskaźników pH [6–8]. Są również szczególną klasą związków wykorzystywanych jako inicjatory kationowych fotopolimeryzacji [9,10]. Wszystkie sole oniowe, a zwłaszcza sole diazoniowe i jodoniowe są użytecznymi reagentami w asymetrycznej syntezie organicznej. Specyficzne związki tego typu są wykorzystywane do syntezy peptydów [11] oraz katalizowania reakcji metali przejściowych i reakcji wieloskładnikowych [12].

Spśród wielu metod syntezy soli pirydyniowych fundament stanowią reakcje podstawienia elektrofilowego na azocie w pierścieniu pirydyny (Rys. 1) [13, 14].

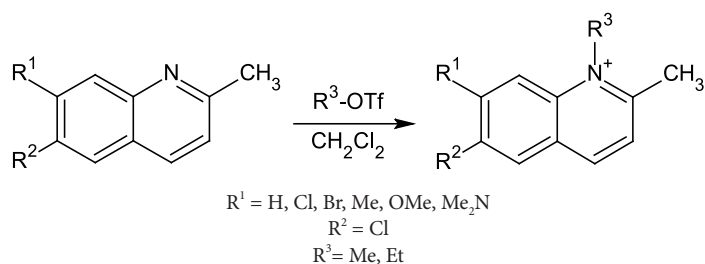
Wybór warunków reakcji czwartorzędowania pirydyny, zachodzącej zwykle wg mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$, jest zależny od przewidywanej końcowej struktury soli pirydyniowej [15].

Czwartorzędowe sole pirydyniowe są nienasyconymi związkami heterocyklicznymi zaliczanymi do grupy kationowych związków powierzchniowo czynnych. Obecność różnych grup, zarówno w pierścieniu pirydynowym jak i na atomie azotu w pierścieniu sprawia, że sole pirydyniowe są często wykorzystywane np. w przemyśle farmaceutycznym jak i w badaniach naukowych. Mogą być stosowane jako środki antyseptyczne, antybiotyki czy jako środki dezynfekujące [16]. Pochodne tych soli wykazują również aktywność hemolityczną w stosunku do erytrocytów oraz aktywność w stosunku do bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych [17]. Sole pirydyniowe znalazły ponadto zastosowanie w analizie chemicznej jako odczynniki derywatyzujące [18–22].



Rysunek 1. Otrzymywanie soli pirydyniowych
Figure 1. Preparation of pyridinium salts

Spośród wielu soli oniowych dużą uwagę, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, zwracają sole chinoliniowe. Generalną metodą ich syntezy, podobnie jak w przypadku soli pirydyniowych, jest czwartorzędowanie cząsteczki chinoliny lub jej pochodnych (Rys. 2), a także reakcje alkilowania i cyklizacji [23].



Rysunek 2. Synteza soli chinoliniowych
 Figure 2. Synthesis of quinolinium salts

Meth-Cohn i Taylor opracowali jedną z pierwszych metod syntezy soli chinoliniowych, która opierała się na reakcji chlorku fosforylu i *N*-metyloacetanilidu. Fischer i Vilsmeier wykorzystywali opisywaną reakcję do otrzymywania barwników [24, 25]. Dla potrzeb derywatywacji związków tiolowych opracowano prostą metodę syntezy soli chinoliniowych polegającą na alkiłowaniu atomu azotu w pierścieniu chinoliny tetrafluoroboranem trimetylooksoniowym [26].

Wiele soli chinoliniowych jest uważanych za potencjalne leki przeciwnowotworowe, które posiadają w strukturze dodatnie ładunki, umożliwiające interakcje z organelami komórkowymi. Podczas badań na ludzkich komórkach naskórka wykazano zahamowanie wzrostu zmutowanych komórek po zaaplikowaniu niektórych *N*-podstawionych soli chinoliniowych, a stopień toksyczności badanych związków w stosunku do komórek rakowych jest porównywalny z antykancerogenną eliptycyną [27]. Sole chinoliniowe mogą być ponadto wykorzystywane w jednoetapowych reakcjach syntezy benzoxazocyn posiadających interesujące właściwości biologiczne umożliwiające ich wykorzystanie do produkcji leków antydepresyjnych, przeciwpsychotycznych czy przeciwzakrzepowych [28]. Niektóre sole chinoliniowe posiadają właściwości zahamujące naturalny proces apoptozy limfocytów w organizmach wielokomórkowych, jednak aktywność opisywanych struktur silnie zależy od struktury soli, a badania nad nimi wciąż trwają [29]. Interesującą grupą soli oniowych są czwartorzędowe sole chinoliniowe z długim łańcuchem alkiłowym w strukturze, wykazujące znaczne aktywności przeciwbakteryjne w szczególności względem Gram dodatnich ziarniaków, a także względem grzybów *Candida Albicans* [30]. Sole chinoliniowe takie jak sole styrylochinoliniowe są wykorzystywane również jako sondy do monitorowania przebiegu procesu polimeryzacji rodnikowej, a także jako związki pośrednie w syntezie równoległej [31]. Podobnie jak sole pirydyniowe także sole chinoliniowe są z powodzeniem stosowane w analizie chemicznej do selektywnej derywatywacji związków tiolowych [26, 32–42].

2. SOLE CHINOLINIOWE I PIRYDINIOWE JAKO ODCZYNNIKI DERYWATYZUJĄCE

Próbki biologiczne ze względu na różnorodność występujących w nich składników stanowią bardzo skomplikowany materiał do badań. Bardzo często podczas oznaczania niezbędnym etapem pracy jest modyfikacja właściwości fizykochemicznych analitów. Jeżeli do analiz wykorzystywana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa lub elektroforeza kapilarna, otrzymane pochodne powinny posiadać w swojej strukturze chromofor albo fluorofor, aby umożliwić detekcję związku za pomocą klasycznych detektorów UV-Vis i FLD [43].

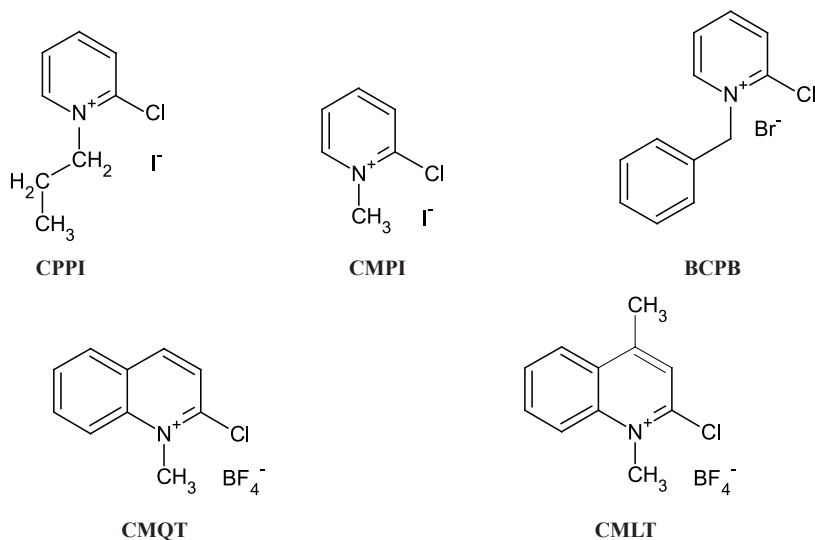
Odczynniki derywatyzujące można podzielić na kilka grup z uwzględnieniem budowy chemicznej odczynnika, a także spektroskopowych właściwości otrzymanych pochodnych. Biorąc pod uwagę klasy związków, do których należą dane odczynniki możemy wyróżnić enony, maleimidy, dialdehydy, chinony, aziridyny, disiarczki oraz związki posiadające aktywny halogen [43].

Jednymi z częściej stosowanych do derywatywacji aminokwasów tiolowych związków są halogenosulfonylobenzofurazany (SBD-F, ABD-F) oraz bromobimany [43]. Ich wadą jest stosunkowo długi czas reakcji oraz duża skłonność do rozkładu w warunkach prowadzenia reakcji, co utrudnia interpretację uzyskanych chromatogramów.

Wśród biologicznie ważnych aminokwasów tiolowych wyróżnić można cysteinę (Cys), homocysteinę (Hcy), glutation (GSH), cysteinyloglicynę (Cys-Gly), kwas liponowy, niektóre peptydy czy enzymy. Procedury ich oznaczania są zwykle oparte o technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC), a przygotowanie próbki obejmuje m.in. zablokowanie grupy tiolowej z jednoczesnym włączeniem w strukturę cząsteczki chromoforu lub fluoroforu [44, 45].

2.1. REAKTYWNOŚĆ SOLI ONIOWYCH WZGLĘDEM WYBRANYCH ZWIĄZKÓW SIARKI

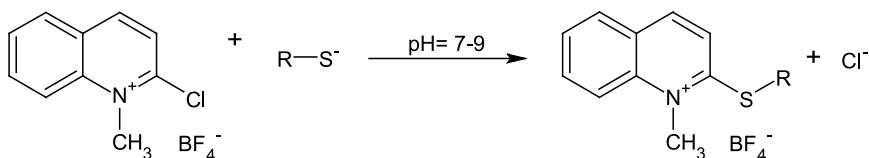
Sole pirydiniowe i chinoliniowe są powszechnie stosowanymi odczynnikami do derywatywacji, głównie podczas oznaczania endo- i egzogennych tioli w próbkach biologicznych [21, 22, 44, 46–49]. Potwierdzono także ich przydatność podczas derywatywacji tiosiarczanów [40]. Aminokwasy tiolowe można oznaczać m.in. w postaci ich 2-S-chinoliniowych, 2-S-lepidyniowych lub 2-S-pirydiniowych pochodnych, wykorzystując do derywatywacji tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT), tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy (CMLT), bromek 1-benzyl-2-chloropirydiniowy (BCPB), jodek 2-chloro-1-propylopirydyniowy (CPPI) oraz jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) (Rys. 3) [45].



Rysunek 3. Wzory soli chinoliniowych i pirydyniowych wykorzystywanych w analizie chemicznej
 Figure 3. Structures of pyridinium and quinolinium salts used in chemical analysis

Cechą charakterystyczną tej grupy odczynników jest obecność w strukturze aktywnego halogenu. Dzięki prowadzeniu reakcji w łagodnych warunkach możliwa jest pełna automatyzacja procedur analitycznych [36]. Wykorzystując wspomniane sole można oznaczać tiole zarówno w roztworach wodnych jak i płynach biologicznych, a zwłaszcza w płynach ustrojowych człowieka i zwierząt, homogenatach tkanek roślinnych oraz w produktach żywnościowych [39, 40, 46, 47, 49, 50].

Ze względu na obecność w strukturze biologicznie ważnych aminotiolei innych niż $-SH$ reaktywnych grup, takich jak $-COOH$ czy $-NH_2$ istotne jest, że w warunkach prowadzenia reakcji nie reagują one ze wspomnianymi solami [26]. Selektyność soli polega na tym, że w środowisku wodnym, wyłącznie podczas reakcji z grupą tiolową, następuje podstawienie atomu chlorowca atomem siarki w pozycji 2 pierścienia, w wyniku czego powstaje trwałe wiązanie tioeterowe (Rys. 4).



Rysunek 4. Schemat reakcji derywatywacji tiole za pomocą CMQT
 Figure 4. General chemical derivatization reaction of thiols with the use of CMQT

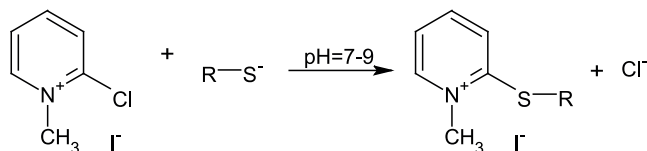
Stosowanie soli chinoliniowych i pirydyniowych jako odczynników derywatyzujących pozwala na prowadzenie reakcji w łagodnych warunkach, tzn. w środowisku wodnym, pH 7–8, w temperaturze pokojowej, w czasie nieprzekraczającym

kilku minut. Duża reaktywność CMQT w stosunku do tioli spowodowała, że zastosowano go do derywatywacji związków tiolowych w analizie przepływowej [41], a uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania odczynnika nie tylko do derywatywacji przedkolumnowej ale również w trybach kolumnowym i pokolumnowym. Powstałe pochodne wykazują dużą trwałość w kwaśnym środowisku, toteż zakwaszenie mieszaniny po zakończeniu reakcji umożliwia gromadzenie próbek i ich późniejszą analizę [32, 37, 44, 45]. W temperaturze pokojowej próbki mogą być przechowywane przez kilkanaście godzin, natomiast w temperaturze -18°C nawet do kilku tygodni. Wykazano, że w środowisku wodnym CMQT ulega również reakcji z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi [26, 40], a produktem reakcji jest w tym przypadku tiochinolon.

Zastosowanie homologu CMQT, tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidyniowego (CMLT) do derywatywacji tioli skutkuje otrzymaniem trwałych pochodnych w temperaturze pokojowej już po czasie 3 min. [42]. Mechanizm reakcji jest analogiczny do opisanego powyżej.

Podjęto udaną próbę syntezy tetrafluoroboranu 2-metoksy-1-metylocholininiowego oraz zbadano jego właściwości spektroskopowe w kontekście wykorzystania jako alternatywnego do CMQT odczynnika derywatyżującego tiole [51]. Stwierdzono, że odczynnik ten wykazuje czterokrotnie większą w porównaniu z CMQT fluorescencję, jednakże uzyskane z jego udziałem tiolowe pochodne nie posiadają korzystniejszych właściwości spektroskopowych i chromatograficznych.

Do grupy odczynników derywatyżujących, zawierających aktywny halogen należą również CMPI, BCPB oraz CPPI. Mechanizm reakcji z tiolami jest analogiczny jak w przypadku soli chinoliniowych i polega na nukleofilowym podstawieniu atomu chloru atomem siarki grupy tiolowej. Wykorzystywanie soli halopirydyniowych wymaga zastosowania dłuższego czasu reakcji niż w przypadku ich odpowiedników chinoliniowych [44, 45]. Na Rysunku 5 przedstawiono schemat reakcji tioli z CMPI.



Rysunek 5. Schemat reakcji derywatywacji tioli za pomocą CMPI

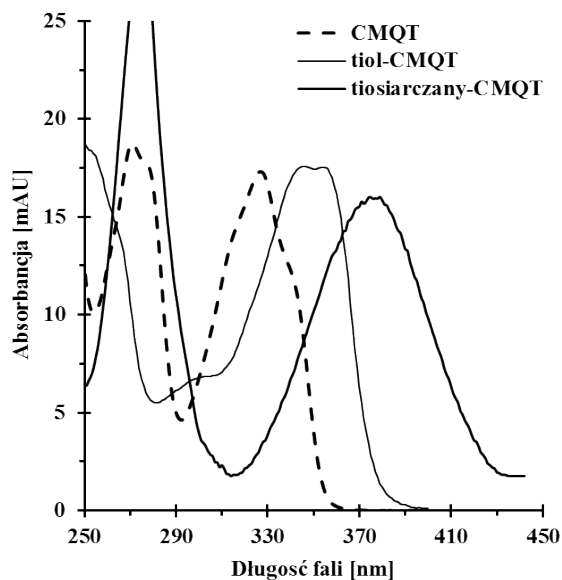
Figure 5. General chemical derivatization reaction of thiols with the use of CMPI

BCPB był wykorzystany m.in. do oznaczania kaptoprylu w moczu i krwi człowieka [21, 52]. Podobnie jak w przypadku innych soli pirydyniowych reakcja derywatywacji chemicznej prowadzona była w środowisku lekko alkalicznym, a uzyskane pochodne rozdzielano w odwróconym układzie faz i monitorowano w zakresie promieniowania UV.

Podczas stosowania wspomnianych soli do redukcji wiązań disiarczkowych nie należy używać 2-merkaptoetanolu (MTE) czy ditioneitolu (DTT). Związki te reagują z odczynnikiem zużywając go, a jego pozostała ilość może nie być wystarczająca do całkowitej derywatywacji analitu. Dodatkowo powstałe pochodne są widoczne na chromatogramie i mogą zakłócać sygnały analizowanych związków tiolowych. Innym odczynnikiem z tej grupy, wykorzystywanym do derywatywacji tioli w środowisku wodnym, w pH 8,2 i temperaturze pokojowej jest CPPI. Czas reakcji derywatywacji wynosi w tym przypadku około 30 min, a otrzymane pirydyniowe pochodne wykazują znaczącą absorpcję w zakresie promieniowania UV [18, 19].

2.2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE POCHODNYCH

Do grupy odczynników chinoliniowych stosowanych najczęściej podczas derywatywacji aminokwasów tiolowych można zaliczyć CMQT i CMLT (Rys 3). Z analitycznego punktu widzenia 2-S-chinoliniowe pochodne tioli posiadają bardziej korzystne, w porównaniu z tiolami właściwości spektroskopowe i chromatograficzne [26, 32, 35–37]. Maksimum absorpcji pochodnych jest przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych o ok. 20 nm (Rys. 6).



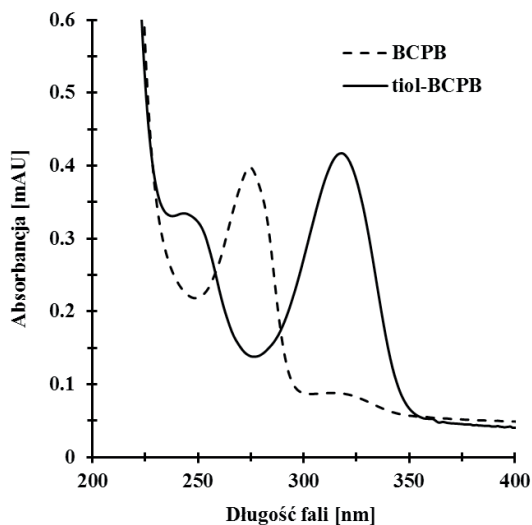
Rysunek 6. Widma UV CMQT oraz jego pochodnych
Figure 6. UV spectra of CMQT and its derivatives

Cechuje je również wysoki molowy współczynnik absorpcji, który wynosi ok. 20.000 L/mol·cm. [26]. Występujące zjawisko przesunięcia batochromowego jest w tym przypadku bardzo korzystne ponieważ umożliwia stosowanie znacznych

nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, nie utrudniając jednocześnie interpretacji chromatogramu. W przypadku soli lepidyniowej sytuacja jest analogiczna i pozwala na otrzymanie tiolowych pochodnych aktywnych spektrofotometrycznie, które mogą być oznaczane przy długości fali 350 nm [42].

Produktem reakcji CMQT z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi jest tiochinolon, którego maksimum absorpcji wynosi 375 nm [40]. Tak silne przesunięcie batochromowe umożliwia stosowanie dużych nadmiarów odczynnika w stosunku do analitu, co skraca czas reakcji derywatyzacji do ok. 1 min, a na chromatogramie pik CMQT jest praktycznie niewidoczny.

Uzyskiwane techniką RP-HPLC chromatogramy próbek moczu i osocza krwi, zawierające piki pochodzące od 2-S-pirydyniowych pochodnych tioli, są dość złożone, ale umożliwiają uzyskanie porównywalnych z pochodnymi chinolinowymi granic oznaczalności. Molowy współczynnik absorpcji 2-S-pirydyniowych pochodnych jest dwukrotnie mniejszy niż w przypadku CMQT i wynosi ok. 10 000 L/mol·cm [26, 30]. Porównywalne z CMQT właściwości spektroskopowe posiada BCPB, co umożliwiło opracowanie prostej metody oznaczania sumy związków tiolowych w moczu [21]. Produkty reakcji tioli z odczynnikami pirydyniowymi są również stabilnymi tioeterami z dobrze wykształconym maksimum absorpcji przy długości fali 316 nm (Rys. 7).

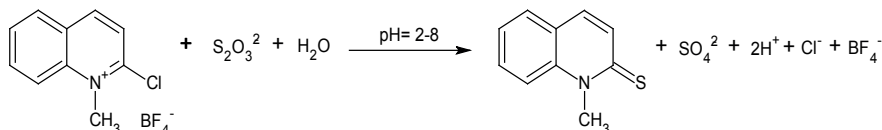


Rysunek 7. Widma UV BCPB oraz jego tiolowej pochodnej
Figure 7. UV spectra of BCPB and its thiol derivative

Przeprowadzenie tioli w pochodne za pomocą soli oniowych powoduje zmianę ich właściwości chromatograficznych. 2-S-chinoliniowe pochodne wykazują znacznie większą hydrofobowość w stosunku do tioli, co umożliwia ich wydajną retencję w odwróconym układzie faz [26, 42, 44, 45]. Ze względu na obecność dodatkowej grupy metylowej położonej w pozycji 4 pierścienia chinoliny, CMLT wykazuje nieco

większą hydrofobowość aniżeli CMQT. Powstałe, w wyniku reakcji z udziałem soli chinoliniowych, lepidyniowych i pirydyniowych pochodne tioli mogą być z powodzeniem rozdzielane nie tylko techniką RP-HPLC, ale również przy pomocy technik elektromigracyjnych, w tym kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE) [46, 50, 53]. Jest to możliwe dzięki obecności stałego dodatniego ładunku na czwartorzędowym atomie azotu powstałej pochodnej.

Z odmienną sytuacją mamy do czynienia w przypadku tiochinolonu, produktu reakcji CMQT z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi (Rys. 8).



Rysunek 8. Schemat reakcji derywatyzacji tiosiarczanów za pomocą CMQT

Figure 8. General chemical derivatization reaction of thiosulfate with the use of CMQT

Cechą odróżniającą tiochinolon od 2-S-chinoliniowych pochodnych tioli jest brak ładunku na atomie azotu i wynikająca z tego znacznie większa hydrofobowość. Powoduje to, że w odwróconym układzie faz tiochinolon jest eluowany znacznie później niż S-chinoliniowe pochodne tioli, co umożliwia zastosowanie faz ruchomych o dużej mocy elucyjnej w przypadku oznaczania w próbce jedynie siarczków lub tiosiarczanów i skrócenie analizy do kilku minut [40, 54]. Ponieważ w reakcji jonów siarczkowych i tiosiarczanów z CMQT powstaje ten sam produkt ważne jest różnicowanie obydwu związków w trakcie analizy. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu różnych warunków pH podczas derywatyzacji. Tiosiarczany, w przeciwieństwie do siarczków, ulegają reakcji z CMQT w środowisku kwaśnym, co pozwala na oznaczenie zawartości obydwu związków w dwóch kolejnych analizach, wykonanych dla próbek „derywatyzowanych” w różnych warunkach pH [40].

3. WYKORZYSTANIE SOLI ONIOWYCH W ANALITYCE PRÓBEK BIOLOGICZNYCH

Oznaczanie w próbkach biologicznych endogennych aminokwasów tiolowych, takich jak Cys, Hcy, Cys-Gly, γ -Glu-Cys czy GSH jest ważne, ze względu na rolę jaką związki te odgrywają w organizmach żywych. W wielu przypadkach równie istotna jest możliwość oznaczania leków tiolowych. Związki te są obecne w osoczu, moczu, ślinie, a także w częściach roślin i narządach wewnętrznych zwierząt, w tym również człowieka. Opracowanie metod oznaczania w tak złożonych matrycach jest pracochłonne, ale tylko jakościowe i ilościowe oznaczenie może pomóc w zrozumieniu złożonych szlaków metabolicznych, diagnozie niektórych chorób czy stresu abiotycznego.

Ze względu na słabą absorpcję w zakresie UV-Vis i brak fluorescencji, podczas oznaczania tioli poddawane są zazwyczaj derywatywacji chemicznej. Szerokie zastosowanie znalazły tutaj sole pirydyniowe i chinoliniowe. Technika najczęściej stosowaną w procedurach oznaczania tioli, wykorzystującymi derywatyzację solami oniovymi jest HPLC w odwróconym układzie faz oraz elektroforeza kapilarna (CE) (Tab. 1).

Tabela 1. Zastosowanie soli oniovych w analizie próbek biologicznych
Table 1. Application of onium salts for biological sample analysis

Lp.	Odczynnik	Analit	Matryca	Technika	Odośnik
1	CMQT	Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze	HPLC	[32]
2		Mesna	Mocz		[33]
3		Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Ślina		[34]
4		Hcy, Cys, Cys-Gly	Mocz		[35]
5		Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[36]
6		N-acetylo-Cys, Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[37]
7		Nε-Hcy-Lys, Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[38]
8		Hcy, Cys, GSH, γ-Glu-Cys	Tkanki roślinne		[39]
9		Tiosiarczany	Mocz		[40, 54]
10		Cys zredukowana, Cys całkowita	Mocz		[57]
11		Metimazol	Embriony kurze, białko i żółtko jaja kurzego		[48]
12		Hcy zredukowana, Hcy całkowita, Hcy związana z proteinami	Osocze		[55]
13		Cys, GSH	Sok pomarańczowy		[62]
14		Cysteamina	Osocze	CE	[53]
15		Cys, GSH	Sok pomarańczowy		[50]
16		Hcy	Osocze		[56]
17	BCPB	Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze	HPLC	[52]
18		Hcy, Cys, Cys-Gly	Mocz		[21]
19		Kwas liponowy	Mocz		[22]
20	CMPI	Cys, Hcy	Mocz	HPLC	[18]
21		Hcy	Osocze		[19]
22		Cys	Osocze		[20]
23		Siarkowodór	Osady denne		[63]

3.1. ZASTOSOWANIE DO PRÓBEK OSOCZA

Osocze to bardzo skomplikowana, a jednocześnie najczęściej wykorzystywana matryca do badań analitycznych. W jego skład wchodzi białka, a także produkty ich metabolizmu, witaminy, kwasy tłuszczowe, lipoproteiny, liczne sole mineralne, produkty metabolizmu hemu i wiele innych substancji. Stężenie biologicznie ważnych tioli w osoczu człowieka jest niskie (wyjątkiem jest Cys) i zależy od diety, stylu życia, uwarunkowań genetycznych oraz stanu zdrowia.

Metody oznaczania niskocząsteczkowych tioli w osoczu z wykorzystaniem soli onionych składają się zazwyczaj z kilku etapów, obejmujących przygotowanie próbki i końcowe rozdzielanie na kolumnie chromatograficznej lub w kapilarze. Etapami tymi są redukcja wiązań disiarczkowych, derywatywacja wolnych tioli i usunięcie białek. Zmieniając kolejność wykonywania tych etapów możemy oznaczyć całkowitą zawartość tioli, tiole zredukowane lub związane z białkami. Ze względu na to, że w organizmach żywych tiole występują najczęściej w postaci utlenionej, pierwszym etapem przygotowania próbki podczas oznaczania tzw. tioli całkowitych jest redukcja wiązań disiarczkowych. Etap ten możemy pominąć jeśli chcemy oznaczyć tylko stężenie zredukowanych form tioli. Jeśli etap deproteinizacji wykonamy jako pierwszy, w wytrąconym białku możemy oznaczyć tiole z nim związane.

Opisano kilka metod oznaczania tioli w osoczu, wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, z detekcją UV i derywatyzacją przedkolumnową CMQT [45]. CMQT wykorzystywany jest m.in. do oznaczania w osoczu Cys, Hcy, GSH, Cys-Gly, Nε-Hcy-Lys czy γ-Glu-Cys [32, 36, 42]. W celu oznaczenia zredukowanych form tych tioli bezpośrednio do osocza dodawany jest roztwór buforu fosforanowego o pH = 7,6, zawierający 0,01 M CMQT [32, 36]. Czas reakcji jest stosunkowo krótki i wynosi ok. 2 min. Następnie próbka jest deproteinizowana PCA. Zakwaszenie próbki przedłuża trwałość powstałych pochodnych. W przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli w osoczu etap derywatywacji poprzedzony jest redukcją z użyciem tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) [36]. Powstałe pochodne rozdzielane są chromatograficznie z wykorzystaniem elucji gradientowej. Co istotne, metoda ta pozwala na oznaczenie obok siebie, w stosunkowo krótkim czasie (12 min.) i w trakcie jednej analizy, kilku ważnych z biologicznego punktu widzenia związków tiolowych.

Wykazano, że TCEP może zostać zastąpiona borowodorkiem sodu [32]. Wówczas do próbki osocza dodawane są kolejno EDTA, 6 M NaBH₄ w 0,1 M wodorotlenku sodu, 3 M kwas solny oraz *n*-oktanol, którego zadaniem jest zapobieganie nadmiernemu pienieniu się próbki na skutek wydzielanego w trakcie reakcji wodoru. Kiedy nadmiar NaBH₄ ulegnie rozkładowi do roztworu dodawany jest bufor fosforanowy o pH = 7,6, w celu zapewnienia odpowiedniego środowiska dla reakcji tioli z CMQT. Zakres liniowości metody dla Cys i Cys-Gly wynosi 0,5–10 μM, dla GSH 0,3–5 μM, a dla Hcy 0,2–2 μM.

Wyżej opisane procedury przygotowania próbki są uniwersalne i można je zastosować chcąc oznaczyć tylko jeden związek. W celu skrócenia czasu analizy

należy zmodyfikować warunki chromatograficzne. Opracowano metodę oznaczania Hcy z zastosowaniem elucji izokratycznej [55]. Fazę ruchomą stanowił 0,05 M kwas trichlorooctowy doprowadzony do pH = 3,2 wodorotlenkiem litu (88%) oraz acetonitryl (12%). Granica wykrywalności tej metody, dla zredukowanej formy Hcy i tzw. Hcy wolnej (pula Hcy niezwiązana z białkami) wynosi odpowiednio 0,1 i 0,3 μM , a granica oznaczalności 0,2 i 0,5 μM .

Dzięki temu, że pochodne jakie tworzy CMQT z tiolami posiadają ładunek dodatni w prawie całym zakresie pH, odczynnik ten z powodzeniem może być wykorzystywany do oznaczania Hcy techniką elektroforezy kapilarnej [56]. W celu zredukowania wiązań disiarczkowych do osocza dodawana jest TCEP. Częsteczki Hcy poddawane są następnie derywatacji odczynnikiem CMQT. Po deproteinizacji 3 M kwasem solnym otrzymany supernatant mieszany jest z acetonitrylem w stosunku objętościowym 1:2, co w odpowiednich warunkach elektroforetycznych pozwala na zatężenie analitu w kapilarze. Zakres liniowości dla tej metody mieści się w przedziale 8–50 μM , a granica wykrywalności to 1 μM . W podobny sposób wykorzystano CMQT podczas opracowywania elektroforetycznej metody oznaczania cysteaminy w próbkach osocza [53].

Bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (BCPB) to sól, która także może być stosowana jako odczynnik derywatazujący obecne w osoczu aminokwasy tiolowe. W 2008 r. opracowano metodę, w której etap derywatacji z BCPB poprzedzony jest redukcją wiązań disiarczkowych TCEP w buforze Tris [52]. Derywatacja z 0,1 M BCPB przebiega dość szybko (10 min.), a separacja analitów prowadzona jest z wykorzystaniem elucji gradientowej w odwróconym układzie faz. Metoda ta pozwala na oznaczenie Cys, Hcy, GSH i Cys-Gly w trakcie jednej analizy w czasie 8 minut. Granica wykrywalności dla wszystkich analitów wynosi 0,2 μM , natomiast limit oznaczalności 0,5 μM .

Oznaczenia Cys w osoczu można wykonać używając jako reduktora MTE, a jako odczynnika derywatazującego CMPI [20]. Reakcja redukcji disiarczków MTE zachodzi całkowicie po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej. Pomimo tego, że MTE reaguje z CMPI, przesunięcie batochromowe maksimum absorpcji z 293 nm dla samego odczynnika do 312 nm dla pochodnej oraz różnica w czasach retencji pochodnych Cys-CMPI i MTE-CMPI pozwalają na oznaczenie całkowitej zawartości Cys w osoczu. Zakres liniowości dla tej metody mieści się w przedziale 20–300 μM .

3.2. ZASTOSOWANIE DO PRÓBEK MOCZU

Z analitycznego punktu widzenia mocz jest bardzo atrakcyjną, choć złożoną matrycą do badań. Pomimo, że nie zawiera białek czy lipidów znajdują się w nim inne substancje będące produktami metabolizmu leków, degradacji białek i produktów ubocznych wielu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie.

Pozyskiwanie próbek w przypadku moczu nie jest skomplikowane, co wpływa na wybór tej matrycy podczas badań analitycznych.

Tiole endogenne występujące w moczu to głównie Cys, Cys-Gly, Hcy oraz *N*-acetylo-Cys. W przypadku przyjmowania leków tiolowych ich pozostałości lub metabolity są również obecne w moczu. Podobnie jak w przypadku osocza etapy przygotowania próbki do analizy różnią się w zależności od tego czy oznaczane jest całkowite stężenie aminokwasów tiolowych czy tylko ich formy zredukowanej. W przypadku moczu otrzymane stężenia tioli są zazwyczaj normalizowane względem kreatyniny, substancji bezprogowej, której wydzielanie dla danej osoby w ciągu doby pozostaje na stałym poziomie [35]. Przyczyną jest trudność w otrzymaniu reprezentatywnych próbek moczu, bowiem ich skład i rozcieńczenie jest zależne od różnic w metabolizmie, diety oraz stylu życia.

Opracowano kilka metod oznaczania związków tiolowych w moczu z wykorzystaniem soli oniowych jako odczynników derywatyzujących. Jedna z nich pozwala na stosunkowo szybkie i dokładne oznaczenie zawartości tzw. Cys zredukowanej i całkowitej [57]. Większość Cys występuje w moczu w postaci disiarczku – cystyny, toteż w celu redukcji wiązań disiarczkowych próbki moczu były w pierwszym etapie inkubowane w 60°C, przez 30 min. z dodatkiem TBF. Dodatkowo do próbki został wprowadzony standard wewnętrzny w postaci kwasu 3-merkaptopropionowego. Po derywatyzacji z CMQT próbki nanoszono na kolumnę i eluowano izokratycznie. Granica wykrywalności i oznaczalności na poziomie 0,09 μM i 0,28 μM oraz krótki czas analizy (6 min.) powodują, że metoda ta może być stosowana do rutynowego oznaczania Cys w moczu.

Inna metoda oparta o derywatyzację z CMQT pozwala na oznaczenie w moczu Cys, Hcy i Cys-Gly [35]. Pierwszym etapem jest redukcja wiązań disiarczkowych borowodorkiem sodu, a następnie derywatyzacja otrzymanych tioli. Zastosowanie techniki HPLC z detekcją UV i elucją gradientową pozwala na oznaczenie pochodnych tiol-CMQT w trakcie jednej analizy. Zakres liniowości metody mieści się w przedziale 50–500 μM dla Cys, 2–14 μM dla Hcy i 2,5–25 μM dla Cys-Gly. Istotny jest fakt, że dzięki opracowaniu i zastosowaniu tej metody do próbek rzeczywistych pochodzących od 91 potencjalnie zdrowych dawców, po raz pierwszy w literaturze pojawiła się informacja o znormalizowanym na kreatyninę stężeniu Cys-Gly w moczu.

Kolejna metoda, w której wykorzystano CMQT do derywatyzacji biologicznie ważnych tioli, pozwoliła na wyznaczenie ich statusu redoks w moczu [58]. Przeanalizowano próbki pochodzące od 45 ochotników, których usystematyzowano według różnych grup wiekowych. Wyznaczone stężenia zredukowanej i utlenionej formy Cys pozwoliły stwierdzić, że jej status redoks nie zależy od wieku. W przypadku Cys-Gly stwierdzono natomiast, że status redoks tego tiolu u dzieci różni się od statusu redoks dorosłych.

Opublikowano procedurę, w której wykorzystano CMQT do derywatyzacji tiosiarczanów obecnych w moczu człowieka [40]. W przeprowadzonych badaniach

wykazano m.in., że CMQT reaguje z tiosiarczanami w środowisku kwaśnym, co pozwala na ich różnicowanie w próbce od jonów siarczkowych, dających w środowisku alkalicznym taką samą pochodną – tiochinolon. Granica oznaczalności metody wynosi $0,5 \mu\text{M}$, a zakres liniowości mieści się w przedziale $0,5\text{--}50 \mu\text{M}$.

CMPI oraz BCPB również znalazły zastosowanie do oznaczania ważnych z biologicznego punktu widzenia aminokwasów tiolowych. Ze względu na fakt, że CMPI reaguje z takimi reduktorami jak MTE czy DTT, zaproponowano metodę oznaczania Cys i Hcy z wykorzystaniem TBF jako reduktora [18]. Po redukcji następuje etap derywatyzacji z CMPI, który w buforze o $\text{pH} = 8,2$ i temperaturze pokojowej trwa 10 min. Zakres liniowości metody dla Cys mieści się w przedziale $20\text{--}200 \mu\text{M}$, a dla Hcy w przedziale $5\text{--}150 \mu\text{M}$. Metoda ta została zastosowana do oznaczania stężenia wydalanej z moczem Cys i Hcy. BBCP wykorzystano do spektrofotometrycznego oznaczania sumy tioli w próbkach moczu [21]. Jako analityczną długość fali przyjęto 316 nm . Kalibracji dokonano w zakresie $50\text{--}500 \mu\text{M}$, a metodę aplikowano do 37 próbek moczu pochodzących od zdrowych ochotników.

3.3. ŚLINA, HOMOGENATY TKANEK ROŚLINNYCH I PRODUKTY SPOŻYWCZE

Obecność związków siarki w organizmach roślinnych i zwierzęcych oraz funkcje jakie pełnią sprawiają, że istnieje konieczność ich oznaczania nie tylko w osoczu, moczu ale również w ślinie, tkankach roślin i osadach dennych. Także w tym przypadku wykazano przydatność soli onioowych jako odczynników derywatyzujących. Przykładem jest ślina, której próbki są łatwo dostępne i ich pobieranie nie stwarza większych trudności. W ponad 90% składa się ona z wody, ale zawiera też wiele istotnych z analitycznego punktu widzenia substancji. Obecne są w niej aminotiole, takie jak Cys, Hcy, Cys-Gly, a także GSH. W ślinie występuje też wiele elementów przeciwdziałających czynnikom szkodliwym, takim jak bakterie, dym tytoniowy czy komórki rakowe [59]. Ponadto, w niektórych przypadkach ślina wykorzystywana jest do celów diagnostycznych [60, 61].

Metoda oznaczania związków tiolowych w ślinie z wykorzystaniem CMQT obejmuje trzy etapy [34]. Pierwszym, tak jak w przypadku osocza i moczu, jest redukcja wiązań disiarczkowych, do której wykorzystano TBF. Po 30 min. inkubacji w 60°C do próbki dodano bufor fosforanowy z CMQT. Ostatni etap to deproteinizacja z użyciem 3 M kwasu chlorowego(VII). Na kolumnę nanoszono $20 \mu\text{l}$ supernatantu i prowadzono separację z wykorzystaniem elucji gradientowej. Przeprowadzono również walidację metody i zastosowano ją do oznaczania aminokwasów tiolowych w próbkach pochodzących od kilku dawców. Metoda pozwala, w ciągu 10 min., oznaczyć obok siebie cztery biologicznie ważne związki tiolowe występujące w ślinie.

CMQT został zastosowany do oznaczania niskocząsteczkowych związków tiolowych w korzeniach pszenicy podczas badania wpływu na ich rozwój metali, takich jak miedź, kadm i nikiel [39]. Korzenie pszenicy zostały zhomogenizowane w bufo-

rze fosforanowym. Do otrzymanego po odwirowaniu supernatantu dodano TCEP w celu redukcji wiązań disiarczkowych, a następnie CMQT w celu derywatywacji wolnych tioli. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że poszczególne metale wywierają znaczny wpływ na zawartość oznaczanych związków tiolowych w tej części rośliny. Wyżej wspomniana metoda została także wykorzystana do oznaczenia GSH i Cys-Gly w liściach przypołudnika kryształkowego (łac. *Mesembryanthemum Crystallinum*) [49]. Na podstawie wyznaczonej zawartości zredukowanej formy GSH i GSH związanego z białkami stwierdzono, że stres oksydacyjny wywołany infekcją powoduje zwiększenie S-glutationylacji białek. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku Cys-Gly.

Związki tiolowe są obecne nie tylko w liściach czy korzeniach roślin ale również w owocach i wytworzonych z nich produktach. Wykorzystując techniki separacyjne oraz derywatyzację z użyciem CMQT opracowano procedury umożliwiające oznaczanie niektórych aminotiolei w sokach owocowych. Do oznaczania Cys i GSH w soku pomarańczowym wykorzystano techniki elektroforezy kapilarnej i chromatografii cieczowej z detekcją UV [50, 62]. W przypadku metody elektroforetycznej próbkę soku rozcieńczono w pierwszym etapie buforem Tris i poddano redukcji z użyciem TCEP. Następnie przeprowadzono reakcję derywatywacji odczynnikiem CMQT, deproteinizację 3 M PCA i dodano acetonitryl w stosunku 1:2. Do kapilary hydrodynamicznie wprowadzono 60 nL próbki. Zakres liniowości metody określono w przedziale 2,5–30 μM . Przygotowanie próbki w metodzie chromatograficznej wyglądało w sposób analogiczny do opisanych wcześniej dla próbek osocza i moczu [22, 36, 46, 52, 58]. Uzyskano podobne zakresy liniowości i granice oznaczalności.

CMPI wykorzystano podczas oznaczania siarkowodoru w próbkach wodnych, uzyskanych po sedymentacji osadów dennych [63]. Przygotowanie próbki obejmowało sączenie i derywatyzację w lekko alkalicznym środowisku. Powstały po reakcji jonów siarczkowych z CMPI tiopirydon był rozdzielany od innych składników mieszaniny na kolumnie C18, w warunkach elucji izokratycznej, z dodatkiem oktylo-sulfonianu sodu jako odczynnika par jonowych. Zakres liniowości metody mieścił się w przedziale 5–600 μM .

PODSUMOWANIE

Zastosowanie derywatywacji chemicznej wykorzystującej sole oniowe, w przypadku oznaczania biologicznie ważnych tioli, siarkowodoru oraz tiosiarczanów, pozwala na uzyskanie granic oznaczalności na poziomie nmol na ml próbki, podczas gdy ich zawartości w materiale biologicznym wynoszą średnio kilka lub kilkadziesiąt nmol na ml próbki. Korzystne właściwości fizykochemiczne wspomnianych soli, jak i uzyskanych pochodnych umożliwiły opracowanie wielu prostych, tanich i szybkich metod analitycznych, pozwalających na efektywne oznaczanie endogennych aminokwasów tiolowych takich jak Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly, γ -Glu-Cys i niektórych leków tiolowych w płynach fizjologicznych oraz tkankach roślinnych

i zwierzęcych. Stosując wspomniane metody można oznaczać w/w związki z dobrą czułością i precyzją, w szerokim zakresie stężeń, charakterystycznych zarówno dla stanów patologicznych jak i normalnych. Metody te są konkurencyjne w stosunku do innych, wykorzystujących np. derywatyzację dającą pochodne fluoryzujące, czy też pochodne aktywne elektrochemicznie.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G.A. Olah, *Onium Ions*, John Wiley & Sons, Kanada, 1998.
- [2] A. Kunze, U. Müller, K. Tittes, J.-P. Fouassier, F. Morrlet-Savary, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1997, **110**, 115.
- [3] N.V. Tsarevsky, V. Slaveykova, S. Manev, D. Lazarov, *J. Chem. Educ.*, 1997, **74**, 734.
- [4] J. Zaltewicz, L. Deady, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 1978, **22**, 71.
- [5] Y. Yagci, Y.Y. Durmaz, B. Aydoğan, *Chem. Rec.*, 2007, **7**, 78.
- [6] E.F.V. Scriven, *Chem. Soc. Rev.*, 1983, **12**, 129.
- [7] R. Azzouz, C. Fruit, L. Bischoff, F. Marsais, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1154.
- [8] J. Pernak, J. Rogoża, *ARKIVOC*, 2000, **6**, 889.
- [9] J.V. Crivello, *J. Polym. Sci. part A: Polym. Chem.*, 1999, **37**, 4241.
- [10] Y. Yagci, Y. Y. Durmaz, B. Aydoğan, *Chem. Rec.*, 2007, **7**, 78.
- [11] C. Roche, M. Pucheault, M. Vaultier, A. Commerçon, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 8325.
- [12] L. Cuifen, Z. Li, Y. Guichun, C. Zuxing, *Chin. J. Chem.*, 2010, **28**, 2469.
- [13] J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, Malden, MA, 2000.
- [14] T. Eicher, S. Hauptmann, *The Chemistry Heterocycles*, Wiley-VCH, New York, 1995.
- [15] P. Madaan, V.K. Tyagi, *J. Oleo Sci.*, 2008, **57**, 197.
- [16] M. Kratky, J. Vinsova, *Curr. Pharm. Design*, 2013, **19**, 1343.
- [17] A. Ilangovan, P. Venkatesan, M. Sundararaman, R. Rajesh Kuma, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 694.
- [18] E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *J. Chromatogr. A*, 1998, **798**, 27.
- [19] E. Bald, E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Głowacki, *Talanta*, 2000, **50**, 1233.
- [20] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2000, **52**, 509.
- [21] G. Chwatko, *Ann. Clin. Lab. Science*, 2013, **43**, 4.
- [22] G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.* 2014, DOI: 10.2174/1573411010999131219 101340.
- [23] A.R. Katritzky, D. Semenzin, B. Yang, D.P.M. Pleynt, *J. Heterocycl. Chem.*, 1998, **35**, 467.
- [24] O. Meth-Cohn, D. Taylor, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 12869.
- [25] V.J. Minkin, B.J. Ardashev, *Russ. J. Gen. Chem.*, 1958, **29**, 1099.
- [26] E. Bald, R. Głowacki, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 2001, **24**, 1323.
- [27] C. Vélez, O. Cox, C.A. Rosado-Berrios, D. Molina, L. Arroyo, S. Carro, A. Filikov, V. Kumar, S.V. Malhotra, M. Cordero, B. Zayas, *O. J. Apo.*, 2013, **2**, 13.
- [28] F.M. Moghaddam, H. Saeidian, M. Kiamehr, Z. Mirjafary, S. Taheri, *ARKIVOC*, 2010, **6**, 91.
- [29] S.D. Barchechath, R.I. Tawatao, M. Corr, D.A. Carson, H.B. Cottam, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 1785.
- [30] J. Marek, P. Stodulka, J. Cabal, O. Soukup, M. Pohanka, J. Korabecny, K. Musilek, K. Kuca, *Molecules*, 2010, **15**, 1967.
- [31] M. Bazin, C. Kuhn, *J. Comb. Chem.*, 2005, **7**, 302.
- [32] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierk, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1032**, 109.
- [33] R. Głowacki, D. Gryglik, K. Kuśmierk, E. Bald, *Talanta*, 2005, **66**, 534.

- [34] E. Bald, R. Głowacki, *Amino Acids*, 2005, **28**, 431.
- [35] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 855.
- [36] R. Głowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 3400.
- [37] R. Głowacki, E. Bald, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 2009, **32**, 2530.
- [38] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, *Amino Acids*, 2010, **39**, 1563.
- [39] E. Gajewska, R. Głowacki, J. Mazur, M. Skłodowska, *Plant. Growth. Regul.*, 2013, **71**, 13.
- [40] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2009, **79**, 229.
- [41] P.D. Tzanavaras, M. Aristeridou, E. Bald, R. Głowacki, *Anal. Lett.*, 2014, **47**, 331.
- [42] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, *J. Anal. Chem.*, 2014, **69**, 583.
- [43] R. Głowacki, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 1049.
- [44] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2011, **879**, 1290
- [45] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 3300.
- [46] P. Kubalczyk, G. Chwatko, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.* 2014, DOI: 10.2174/1573411010999131219 101552.
- [47] D. Kowalczyk-Pachel, G. Chwatko, M. Iciek, J. Czyżyk, M. Filip, L. Włodek, E. Lorenc-Koci, *Neurotox. Res.*, 2013, **24**, 377.
- [48] S.L. an Herck, S. Geysens, E. Bald, G. Chwatko, E. Delezic, E. Dianati, A. Ahmed, V.M. Darras, *J. Endocrinol.*, 2013, **218**, 105.
- [49] E. Kuźniak, A. Kaźmierczak, M. Wielanek, R. Głowacki, A. Kornaś, *Plant Physiol. Bioch.*, 2013, **63**, 30.
- [50] P. Kubalczyk, E. Bald, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2280.
- [51] B. McCaughan, G. Kay, A. Di Salvo, P. J. Cox, D. Cairns, *J. Chem. Crystallogr.*, 2010, **40**, 417.
- [52] K. Kuśmierk, E. Bald, *Biomed. Chromatogr.*, 2009, **23**, 770.
- [53] P. Kubalczyk, E. Bald, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 3636.
- [54] G. Chwatko, E. Forma, J. Wilkosz, R. Głowacki, P. Józwiak, W. Różański, M. Bryś, A. Krześlak, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, **51**, 1825.
- [55] G. Chwatko, E. Bald, *J. Chromatogr. A*, 2002, **949**, 141.
- [56] P. Kubalczyk, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 1181.
- [57] E. Bald, R. Głowacki, J. Drzewoski, *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 319.
- [58] K. Kuśmierk, G. Chwatko, E. Bald, *Chromatographia*, 2008, **68**, S91.
- [59] B. Zappacosta, A. Mannic, S. Persichillia, D. Scribanoa, A. Minuccia, D. Lazzarola, P. De Solea, B. Giardinaa, *Clin. Chim. Acta*, 2003, **338**, 57.
- [60] J. Liu, Y. Duan, *Oral Oncology*, 2012, **48**, 569.
- [61] S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, E.F. De Palo, *Clin. Chim. Acta*, 2007, **383**, 30.
- [62] K. Kusmierk, E. Bald, *Food Chem.*, 2008, **106**, 340.
- [63] E. Kaniowska, R. Głowacki, G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Determination of reduced sulfur compounds in the aquatic environment by high - performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*, [w:] *Chemistry for the Protection of the Environment 3*, L. Pawłowski, M.A. Gonzales, M.R. Dudzińska, W.J. Lacy (Red.), Plenum Publishing Corporation, New York, 1998.

BIWALENTNE LIGANDY RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH

BIVALENT LIGANDS OF OPIOID RECEPTORS

Oliwia Frączak, Aleksandra Olma*

*Institut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Biwalentne ligandy

1.1. Podział

1.2. Projektowanie

1.3. Uproszczony model oddziaływania heterobiwalentnych ligandów z receptorami

2. Biwalentne ligandy opioidowe

2.1. Biwalentne ligandy niepeptydowe

2.2. Biwalentne ligandy peptydowo-niepeptydowe

2.3. Biwalentne ligandy peptydowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Oliwia Frączak ukończyła studia w 2011 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Chemia i technologia środków leczniczych. Obecnie kontynuuje naukę na Studiach Doktoranckich na Wydziale Chemicznym PŁ, pod opieką prof. dr hab. inż. Aleksandry Olmy. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się syntezą biwalentnych ligandów o potencjalnym działaniu przeciwbólowym modyfikowanych niebiałkowymi aminokwasami. Jest współautorką jednej publikacji oraz wielu komunikatów konferencyjnych.

Prof. dr hab. Aleksandra Olma – Po ukończeniu studiów na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej (1972), rozpoczęła pracę w Instytucie Chemii Organicznej. Pracę doktorską obroniła w 1980 r., a stopień doktora habilitowanego uzyskała w roku 2000. Na stanowisku profesora pracuje od 2006 roku. W latach 1980–1982 odbyła staż naukowy w laboratorium prof. Maurice Manninga (Department of Biochemistry and Cancer Biology, University of Toledo, USA). Przebywała wielokrotnie na 1–3 miesięcznych pobytach naukowych u prof. Garlanda R. Marshalla (Washington University, School of Medicine, Department of Molecular Biology and Pharmacology, St. Louis, USA) oraz w laboratorium prof. M. Manninga. Jej zainteresowania naukowe skupiają się na chemii i biologii peptydów zawierających niekodowane aminokwasy (α,α -dipodstawione glicyny, β^3 -*h*-aminokwasy). Zajmuje się badaniami zależności pomiędzy strukturą a aktywnością peptydów bioaktywnych oraz chemią medyczną. Współpracuje z wieloma krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Jej dorobek naukowy obejmuje 64 publikacje w renomowanych czasopismach naukowych oraz ponad 90 komunikatów i posterów prezentowanych na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych. Jest współautorką 6 patentów. Wypromowała 2 doktorantów, obecnie jest promotorem dwóch.

ABSTRACT

Opioids are the oldest drugs known to humanity, which have been and continue to be used for the treatment of chronic pain. Unfortunately they have a large number of side effects [1–6]. Three main types of opioid receptors μ (MOR), δ (DOR) and κ (KOR) are known [8]. The ORL1 receptor was classified as the fourth member of opioid receptor family [9]. Opioid receptors can form homodimers and the following heterodimers: DOR-KOR, DOR-MOR and KOR-MOR [13c,d,f, 14].

Specially designed ligands which are able to penetrate the BBB are used to study physiological consequences of opioid receptor homo- and heterodimerization, and as new analgesics.

Bivalent ligands are defined as compounds that contain two pharmacophoric units, an appropriately designed spacer to separate and define the two pharmacophores, and a linker unit to connect the pharmacophores, to the spacer (Fig. 1) [16].

The affinity of a ligand to its target depends on its fundamental kinetic association and dissociation rate constants (Scheme 1) [24]. Bivalent ligands interacting with the opioid receptors have been divided into three groups: nonpeptide, peptide-nonpeptide and peptide homo- or heterodimers. Nonpeptide bivalent ligands (**4–21**, **27–41** and **44–45**) containing different pharmacophores (selective opioid agonists or/and antagonists) connected with designed linkers have potent analgesic properties [25–34]. Compound **35** may be useful in the treatment of opioid dependence.

Studies of peptide-nonpeptide ligands, which are a combination of “address” segments of endogenous opioid peptides and selective alkaloid ligand (**47–50**) indicate that peptide part of the analogues can modulate the receptor selectivity of the attached alkaloid pharmacophores [35]. Series of peptide-nonpeptide ligands containing different classes of opioid peptides and fentanyl (**52–86**) were synthesized and tested for binding affinity to μ and δ opioid receptors [38–40]. Good opioid affinity and antinociceptive activity of some of the obtained bivalent ligands (**57**, **61**, **63**) suggesting that a novel class of analgesics can be further developed utilizing this approach. Among homobivalent ligands the most important is biphalin **87** and its analogues (**88–124**) [41–53]. Analgesic potency of the most active ligand **112** is greater than parent peptide (biphalin) and morphine.

Keywords: opioid peptides, nonpeptide bivalent ligands, peptide bivalent ligands, opioid activity, homo- and heterobivalent ligands

Słowa kluczowe: peptydy opioidowe, biwaleentne ligandy niepeptydowe, biwaleentne ligandy peptydowe, aktywność opioidowa, homo- i heterobiwaleentne ligandy

WPROWADZENIE

Opioidy, jedne z najczęściej zalecanych środków przeciwbólowych, stosowane są od tysięcy lat. Wykazują one szerokie spektrum działania w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Mogą jednak powodować wiele skutków ubocznych [1]. Działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego [2] i ośrodkowego układu nerwowego [3] (nudności, wymioty, zaparcia, obrzęki, a także sedacja) są częstym powodem przerwania leczenia opioidami. Mogą wystąpić także: hiperalgezja [4], zmniejszenie libido, inne zaburzenia hormonalne [5] oraz depresja. Poza tym, przy dłuższym ich stosowaniu jako analgetyków może ulec zmianie tolerancja organizmu na dany lek, istnieje także ryzyko uzależnienia organizmu od przyjmowania opioidów [6]. Oddziałują one z receptorami opioidowymi, które należą do rodziny receptorów związanych z białkiem G (GPCR) [7] i odgrywają ważną rolę w odczuwaniu bólu. Obecnie przyjmuje się, że istnieją cztery typy receptorów: trzy typowe receptory opioidowe μ (MOP), δ (DOP) i κ (KOP) [8] oraz nieopiodowy receptor ORL1 (NOP) [9], zaliczony także do tej rodziny. Wszystkie receptory zostały sklonowane i dobrze scharakteryzowane [10]. Aktywacja MOR, DOR, KOR lub ORL1 wywołuje podobne efekty [11], m.in. zahamowanie aktywności cykazy adenylanowej (AC) i uwalnianie Ca^{2+} w kanałach typu N i typu L. Aktywacja receptorów opioidowych zwiększa także aktywność fosfolipazy C, która powoduje przejściowy wzrost stężenia jonów Ca^{2+} wewnątrz komórek, aktywowanie kanałów K^+ i kinazy białkowej (MAPK).

Dzięki rozwojowi metod badań farmakologicznych, biochemicznych oraz biofizycznych [12] udowodniono dimeryzację/oligomeryzację GPCR poprzez homo- i heterodimeryzację [13]. Wykorzystanie metod koimmunoprecypitacji i fluorescencyjnych potwierdziło występowanie homodimerów MOR, DOR i KOR, oraz heterodimerów DOR-KOR, DOR-MOR i KOR-MOR [13c-d,f, 14]. Ważnym kierunkiem badań jest opracowanie narzędzi chemicznych do farmakologicznego charakteryzowania heterodimerów receptorów opioidowych jak również poszukiwanie ich ligandów o potencjalnym zastosowaniu jako leki.

1. BIWALENTNE LIGANDY

Projektowanie biwalentnych ligandów receptorów opioidowych wymaga wyboru odpowiedniego farmakoforu, miejsca połączenia ze starannie zaprojektowanym łącznikiem, o optymalnej długości.

1.1. PODZIAŁ

Biwalentne ligandy możemy podzielić ze względu na sposób połączenia obydwu aktywnych fragmentów (Rys. 1) [15]. Konjugatem nazywamy biwalentny ligand,

w którym obydwa farmakofory połączone są ze sobą za pomocą mostka, który nie należy do żadnego z tych ligandów. Wyróżniamy dwa podtypy konjugatów: łatwo ulegające rozszczepieniu (głównie estry) i nierozszczepialne. Rozszczepialne konjugaty można traktować jak proleki, gdyż głównymi metabolitami tego typu związków są dwa pojedyncze ligandy, które indywidualnie oddziałują z docelowym miejscem w organizmie. Ligandy scalone występują wtedy, gdy oba aktywne fragmenty są ze sobą bezpośrednio połączone. W przypadku gdy oba farmakofory posiadają jakiś wspólny fragment, mamy do czynienia z ligandami nachodzącymi.



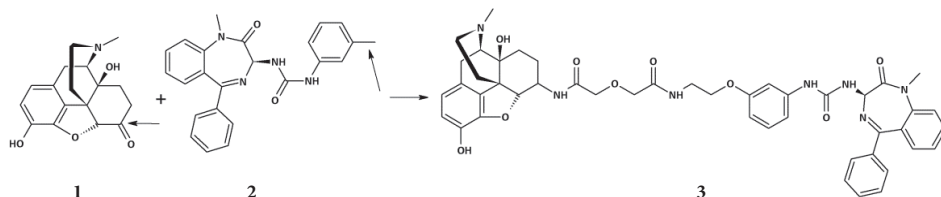
Rysunek 1. Podział biwalentnych ligandów
Figure 1. Categories of bivalent ligands

Wśród biwalentnych ligandów wyróżnić możemy ligandy homo- i heterobiwalentne, zawierające odpowiednio dwa identyczne bądź dwa różne farmakofory.

1.2. PROJEKTOWANIE

Jednym z najważniejszych aspektów w projektowaniu biwalentnych ligandów jest dobór odpowiednich farmakoforów. Przy ich poszukiwaniu należy uwzględnić następujące właściwości: zawadę przestrzenną, aktywność, możliwość sfunkcjonalizowania bez zakłócania oddziaływań ligand-receptor.

Przyjmuje się, że masy cząsteczkowe wykorzystywanych ligandów powinny być stosunkowo niewielkie (300–400 Da) [16]. Co więcej, farmakofory powinny posiadać wysokie powinowactwo do odpowiednich receptorów, ponieważ często ulega ono obniżeniu po przyłączeniu mostka. W skrajnych przypadkach powinowactwo może zostać obniżone o dwa rzędy wielkości [17]. Innym bardzo ważnym aspektem jest wybór miejsca przyłączenia. Aby właściwie dobrać pozycję, w której dołączony zostanie mostek, należy przeanalizować zależność pomiędzy strukturą a aktywnością (SAR) pojedynczych ligandów. Wykorzystuje się obecne w farmakoforze grupy funkcyjne lub po ich sfunkcjonalizowaniu. Wiadomo np. że w pozycję N⁶-adenozyny można z powodzeniem wprowadzać duże podstawniki [18], dlatego Karellas i współpracownicy wybrali tę pozycję jako miejsce przyłączenia łącznika w zaprojektowanym przez nich biwalentnym ligandzie [19]. Zheng i współpracownicy otrzymali związek **3** oddziałujący z heterodimerem μ -CCK₂ (Rys. 2) [20]. W tym celu, grupa ketonowa oksymorfonu **1** została przekształcona w funkcję aminową, a grupa metylowa L-365,260 **2** w odpowiedni eter, co miało ułatwić przyłączenie mostka między tymi ligandami.



Rysunek 2. Bivalentny ligand **3** zaprojektowany przez Zhenga i współpracowników
 Figure 2. Bivalent ligand **3** designed by Zheng and coworkers

Ogromny wpływ na aktywność bivalentnych ligandów ma także dobór łączników o odpowiedniej długości i budowie [21]. Dla wielu receptorów, zwłaszcza opioidowych, została wyznaczona optymalna odległość między farmakoforami, zapewniająca odpowiednie wiązanie ligand–receptor [22].

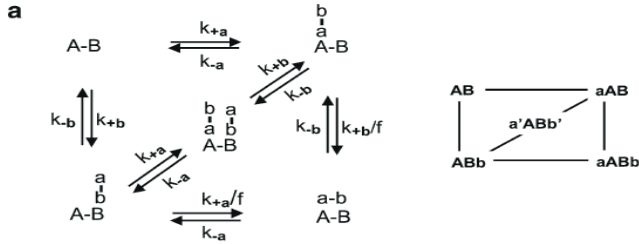
O oddziaływaniu z receptorem decyduje jednak nie tylko długość łącznika, ale także jego budowa. Shonberg i współpracownicy zaprojektowali struktury mostków wykorzystywanych w syntezie bivalentnych ligandów [16]. Łącznik powinien być odpowiednio elastyczny, aby umożliwić dopasowanie obu ligandów do kieszeni receptorów, chociaż inkorporacja łączników o małej swobodzie konformacyjnej może być pomocna przy określaniu konformacji bioaktywnych. Innym bardzo ważnym parametrem jest polarność łączników. Wpływa ona w znacznym stopniu na rozpuszczalność bivalentnych ligandów. Obecność grup hydrofilowych może w znaczny sposób poprawić rozpuszczalność związku w wodzie, dlatego wiele łączników zawiera reszty poliamidowe bądź glikolu etylenowego. Teoretycznie każdy z opisanych mostków może zostać użyty do połączenia dwóch dowolnych fragmentów. W praktyce dobór mostka należy jednak dokładnie rozważyć, gdyż w znaczący sposób wpływa on na właściwości bivalentnych ligandów.

1.3. UPROSZCZONY MODEL ODDZIAŁYWANIA HETEROBIWALENTNYCH LIGANDÓW Z RECEPTORAMI

W przypadku bivalentnych ligandów synergizm wynikający z jednoczesnego oddziaływania obu ligandów z odpowiednimi miejscami wiążącymi może wpływać na wzrost powinowactwa i czasu wiązania. W przypadku związania się jednego farmakoforu, pochodzącego od bivalentnego ligandu, prawdopodobieństwo związania drugiego jest zazwyczaj większe niż prawdopodobieństwo wiązania dwóch pojedynczych ligandów do tych samych receptorów [23].

Zazwyczaj w symulacjach dotyczących heterobivalentnych ligandów zakładano, że oba ligandy wykazują takie same kinetyczne właściwości i posiadają identyczne stałe asocjacji i dysocjacji. Taka sytuacja nie może mieć w rzeczywistości miejsca, ale założenia takie stosowano dla uproszczenia obliczeń. Uwzględnienie różnic w stałych szybkości pozwoliło na lepsze poznanie oddziaływania bivalentnych ligandów z receptorami [24]. W przypadku bardziej złożonych kompleksów,

jak biwalentne ligandy, konieczne jest uwzględnienie stałych szybkości wszystkich zachodzących procesów (Schemat 1).



Schemat 1. Oddziaływanie heterobiwalentnego ligandu a-b z receptorami A-B

Scheme 1. Heterobivalent ligand a-b interaction with A-B receptor

Oba farmakofory biwalentnego ligandu a-b mogą wiązać się z właściwymi dla nich miejscami wiążącymi receptorów A i B w kompleksie A-B. Każdy proces wiązania ligand-receptor jest odwracalny. A i B są na tyle blisko siebie, by umożliwić jednoczesne związanie dwóch farmakoforów pojedynczej cząsteczki ligandu. W pierwszej kolejności wiązaniu może ulec jeden z ligandów. Wiązanie drugiego ligandu, w celu utworzenia kompleksu a-A-B-b, jest trudniejsze i wymaga wzięcia pod uwagę czynnika f, uwzględniającego niekorzystną zmianę entropii.

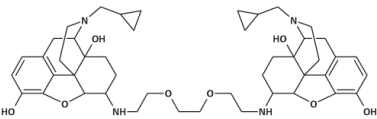
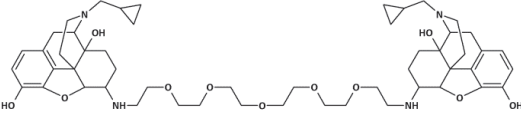
2. BIWALENTNE LIGANDY OPIOIDOWE

Biwalentne ligandy oddziałujące z receptorami opioidowymi zostały podzielone na trzy grupy: biwalentne ligandy niepeptydowe, mieszane peptydowo-niepeptydowe oraz peptydowe.

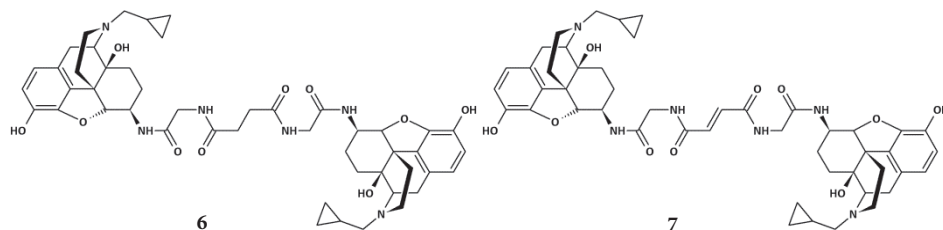
2.1. BIWALENTNE LIGANDY NIEPEPTYDOWE

Pierwsze doniesienia na temat syntezy niepeptydowych biwalentnych ligandów, selektywnie oddziałujących z receptorami opioidowymi pochodzą z wczesnych lat 80. XX wieku [25]. Portoghese i współpracownicy otrzymali związki **4**, **5** składające się z dwóch jednostek naltreksonu, połączonych za pomocą glikolu etylenowego. Oba analogi były bardziej aktywne niż ich monomeryczne ligandy (Tab. 1).

Tabela 1. Struktury i aktywność opioidowa bivalentnych ligandów wywodzących się z naltreksonu
 Table 1. Structures and opioid activities of bivalent ligands derived from naltrexon

	Związek	IC ₅₀ [nM]		
		μ	δ	κ
4		3,24 ± 0,57	7,17 ± 2,69	16,91 ± 3,07
5		5,75 ± 1,21	30,67 ± 2,98	2,61 ± 0,52

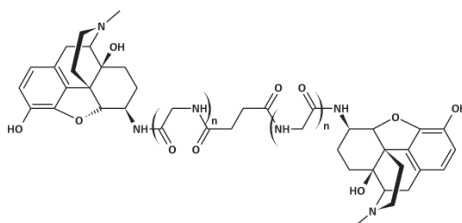
W kolejnych badaniach łączniki glikolowe zastąpiono mostkami złożonymi z reszt glicynowych. Niewątpliwą zaletą tego typu mostków jest łatwość ich wprowadzania, zmniejszenie hydrofobowości cząsteczki, a także łatwość w manipulowaniu długością łącznika. Badania SAR wykazały, że maksymalne powinowactwo do receptora μ posiada związek zawierający dwie reszty glicynowe, natomiast skrócenie łańcucha zwiększyło wiązanie z receptorem κ. Dla zachowania symetrii cząsteczki, wprowadzono jednostki sukcyńlowe i fumarylowe (Rys. 3).



Rysunek 3. Struktury bivalentnych ligandów wywodzących się z naltreksonu, zawierających mostek sukcyńlowy i fumarylowy

Figure 3. Structures of bivalent ligands derived from naltrexon containing succinyl and fumaroyl linkers

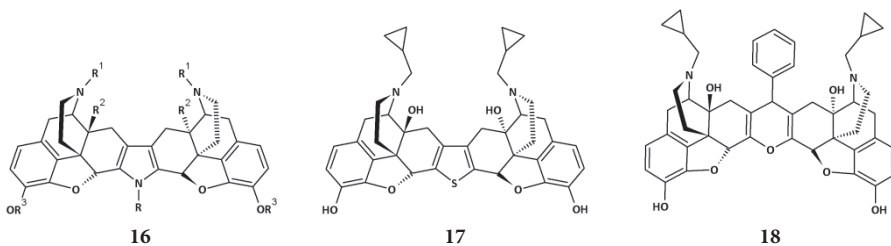
Badania SAR związków **6** i **7** również potwierdziły, że selektywnych antagonistów receptora κ można otrzymać poprzez zmniejszenie dystansu pomiędzy dwoma ligandami [26]. Natomiast selektywnych agonistów receptora μ **8–15** otrzymano przez zastąpienie reszty naltreksonu oksymorfonem [26b-c] (Rys. 4).



8-15 ($n = 0, 1, 2, 3$, konfiguracja na $C^6 - \alpha$ lub β)

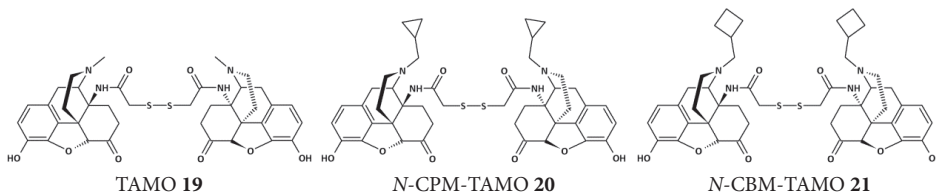
Rysunek 4. Struktury biwalentnych ligandów wywodzących się z oksymorfonu
Figure 4. Structures of bivalent ligands derived from oxycodone

Bardzo aktywne związki otrzymano przez bezpośrednie połączenie dwóch części naltreksonu za pomocą heterocyklicznych pierścieni [27] (Rys. 5). Badania SAR wykazały, że dla zachowania selektywności konieczna jest obecność wolnych grup OH w pierścieniu aromatycznym oraz występowanie podstawnika *N*-cyklopropylowego lub *N*-allilowego. Co więcej, fragment pirolu pełni tylko i wyłącznie funkcję mostka, nie wpływa na oddziaływanie z receptorem i może być z powodzeniem zastąpiony innymi łącznikami np. tiofenem.



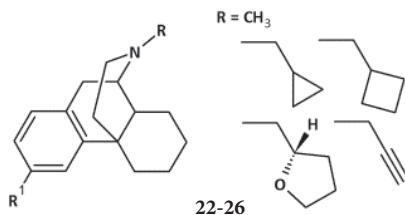
Rysunek 5. Struktury biwalentnych ligandów, pochodnych naltreksonu
Figure 5. Structures of bivalent ligands derived from naltrexone

W zespole Archera otrzymano trzy biwalentne ligandy o wywodzące się z 14β -aminomorfinonu oddziałujące z receptorami μ i κ (Rys. 6) [28].



Rysunek 6. Struktury biwalentnych ligandów, wywodzących się z 14β -aminomorfinonu
Figure 6. Structures of bivalent ligands derived from 14β -aminomorphine

Badania te dały początek syntezie całej serii biwalentnych ligandów selektywnych względem receptorów μ i κ [29]. Zsyntetyzowano różne homo- i heterodimery, pochodne morfinianów (Rys. 7), zawierające łączniki o różnej budowie i długości.

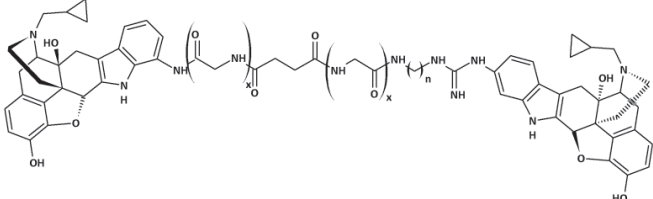
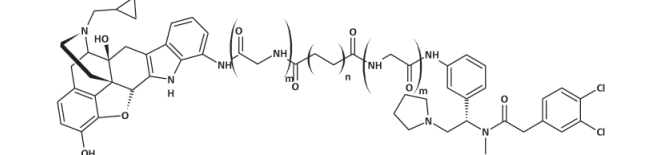
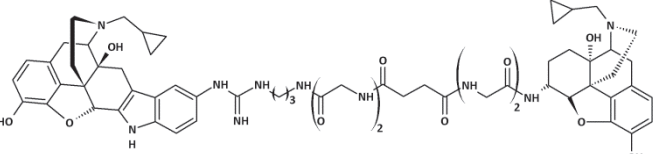


Rysunek 7. Struktury monomerycznych ligandów morfinianowych, $R^1 = \text{OH}$ lub NH_2
 Figure 7. Structures of morphinian monomeric ligands, $R^1 = \text{OH}$ or NH_2

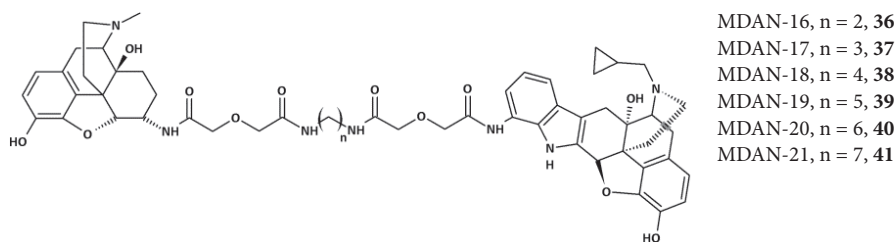
Otrzymane związki zostały poddane badaniom na wiązanie z receptorami opioidowymi, co pozwoliło określić m.in. wpływ budowy i długości łącznika na aktywność biologiczną otrzymanych analogów. Przeprowadzona optymalizacja budowy i długości mostka wykazała, że zastąpienie łącznika eterowego pomiędzy farmakoforami (np. butorfan-O-(CH_2)_n-O-butorfan) mostkiem estrowym (np. butorfan-O-CO-(CH_2)_n-CO-O-butorfan) podnosi aktywność analogów [29a]. Obiecujące wyniki powinowactwa ligandów zawierających łączniki estrowe zachęciły autorów do syntezy kolejnych związków posiadających różne ugrupowania pomiędzy dwoma resztami estrowymi.

Zespół Portoghese'a [27a, 30] wykorzystał w badaniach kombinację farmakoforów agonisty i antagonisty: 5'-*guanidynonaltrindol* (antagonista receptora κ) (5'-GnTI), β -naltreksaminę (antagonista receptora μ), naltrindol (antagonista receptora δ) oraz ICI 199,441 (agonista receptora κ), połączonych łącznikami o różnych długościach (Tab. 2). Związki te posiadały mostek zawierający jednostki glicynowe zapewniające równowagę hydrofilowo-lipofilową, jednostkę sukcyńlową zapewniającą elastyczność i korzystną interakcję z heterodimerami lub resztę alkiloaminy, która umożliwia zmianę długości łącznika o jeden atom. Zbadano aktywność antagonistyczną otrzymanych związków przez pomiar hamowania uwalniania Ca^{2+} w komórkach HEK (ang. *human embryonic kidney*), o określonym poziomie receptorów opioidowych κ i μ lub w teście cofania ogona u myszy. Wszystkie otrzymane bivalentne ligandy w serii KMN antagonizowały uwalnianie Ca^{2+} w komórkach zawierających pojedyncze receptory, ale tylko ligand KMN-21 **35** (Tab. 2) hamował uwalnianie Ca^{2+} w komórkach zawierających ko-receptor κ - μ . Dane te sugerują, że związek KMN-21 z 21-atomowym łącznikiem skuteczniej łączy się z heterodimerem receptorów opioidowych κ - μ niż z homodimerami. Dwa selektywne bivalentne ligandy KDN-21 **29** [22a] i KDAN-18 **33** [31] selektywnie łączyły się z heterodimerami receptorów opioidowych δ - κ . Ligand KDN-21 **29** był silnym antagonistą DPDPE i bromazocyny, co sugerowało że heterodimer δ - κ jest złożony z podtypów δ_1 - κ_2 . Bivalentny antagonist κ - δ KMN-21 **35** także zawiera 21-atomowy łącznik [22b], co sugeruje wspólny sposób łączenia z heterodimerycznymi receptorami κ - μ i κ - δ .

Tabela 2. Struktury biwalentnych ligandów KDN, KDAN, KMN
 Table 2. Structures of KDN, KDAN, KMN bivalent ligands

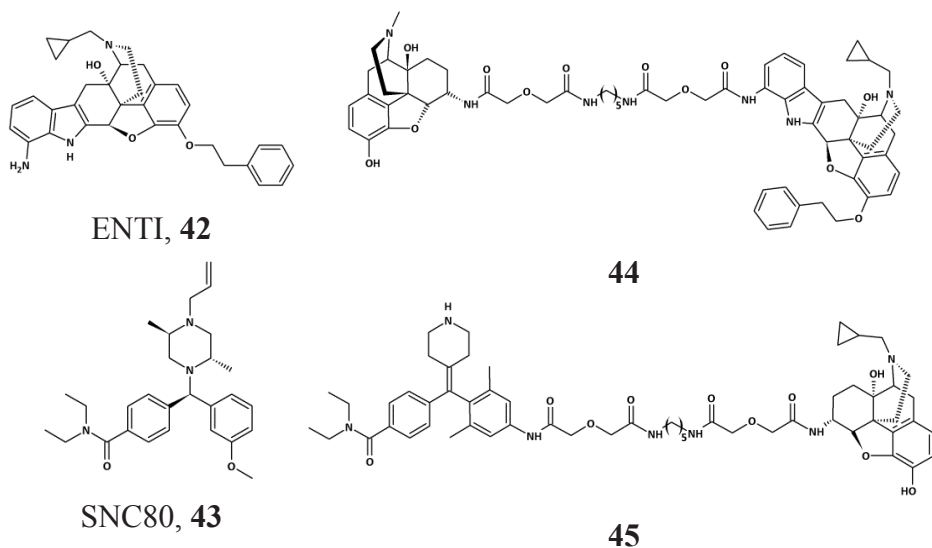
Biwalentny ligand	Łącznik
	KDN-15 $x = 1, n = 3$, 27 KDN-20 $x = 2, n = 2$, 28 KDN-21 $x = 2, n = 3$, 29 KDN-22 $x = 2, n = 4$, 30 KDN-23 $x = 2, n = 5$, 31
	KDAN-12 $m = 1, n = 2$, 32 KDAN-18 $m = 2, n = 2$, 33 KDAN-20 $m = 2, n = 4$, 34
	KMN-21 35

W tym samym zespole otrzymano i przebadano serię biwalentnych ligandów zawierających agonistę receptora μ – oksymorfon i antagonistę receptora δ – naltrindol I połączonych mostkami o różnych długościach (16–21 atomów) (Rys. 8) [32]. Otrzymano analogi o wyższej aktywności niż morfina, co potwierdzono w teście cofania ogona (np. MDAN-21 **41**, podany dożylnie, działał 50-razy silniej niż morfina). Długość łącznika okazała się kluczowa dla oddziaływania z receptorami. Ligandy o dłuższych łącznikach (19–21 atomów) jednocześnie oddziałują z dwoma receptorami opioidowymi, podczas gdy krótszy łącznik umożliwia interakcję tylko z jednym receptorem. Wiązanie z dwoma receptorami pozwoliło na otrzymanie aktywnych związków niepowodujących tolerancji i uzależnień. Co więcej, analog MDAN-21 zastosowano z powodzeniem do leczenia objawów uzależnienia od morfiny u małp.



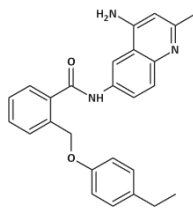
Rysunek 8. Struktury bivalentnych ligandów z serii MDAN
 Figure 8. Structures of MDAN bivalent ligands

Cząsteczki oddziałujące z heterodimerami μ - δ otrzymano także w wyniku połączenia ligandów silnie wiążących się z MOR (oksymorfon i naltrekson) i ligandów o niskim powinowactwie do DOR (ENTI **42** i SNC80 **43**) (Rys. 9) [33]. Oba ligandy **44** i **45** chętniej wiązały się z heterodimerami receptorów opioidowych niż z odpowiednimi homodimerami.



Rysunek 9. Struktury ENTI i SNC80 oraz wywodzących się z nich ligandów
 Figure 9. Structures of ENTI, SNC80 and their bivalent ligands

Zsyntezowano także bivalentne ligandy, selektywne względem receptora NOP [34]. Odpowiednie związki otrzymano przez połączenie dwóch jednostek JTC-801 **46** (Rys. 10) mostkami diiminowymi i diaminowymi o różnych długościach. JTC-801 był pierwszym antagonistą receptora NOP testowanym w badaniach klinicznych.



46

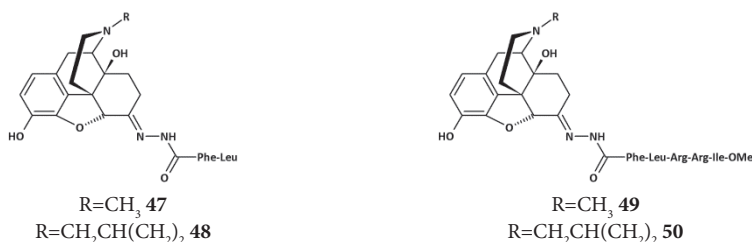
Rysunek 10. Struktura JTC-801

Figure 10. JTC-801 structure

Wszystkie związki zawierające łącznik diiminowy wykazywały niższe powinowactwo do NOP niż macierzysty ligand. Prawdopodobnie spadek aktywności wynika z obecności podwójnego wiązania *trans*-azometinowego, które wymusza na cząsteczce przyjęcie niekorzystnej, rozciągniętej konformacji. Co więcej, wraz ze wzrostem długości łącznika spadek aktywności jest bardziej widoczny. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku cząsteczek z łącznikiem diaminowym.

2.2. BIWALENTNE LIGANDY PEPTYDOWO-NIEPEPTYDOWE

W celu sprawdzenia, czy część adresowa endogennych peptydów opioidowych, odpowiedzialna za selektywność względem receptorów, może wpływać na selektywność farmakoforów alkaloidowych, Portoghese i współpracownicy [35] otrzymali analogi Leu-enkefalin i dynorfiny, w których *N*-terminalny dipeptyd (fragment odpowiedzialny za „wiadomość”) zastąpili oksymorfonem bądź naltreksonem (Rys. 11). Fragment peptydowy (odpowiedzialny za „adres”) i alkaloidowy połączyli za pomocą mostka hydrazonego.



Rysunek 11. Struktury biwalentnych ligandów 47-50

Figure 11. Bivalent ligands 47-50 structures

Tabela 3. Aktywność opioidowa biwalentnych ligandów 47-50
Table 3. Bivalent ligands 47-50 opioid activities

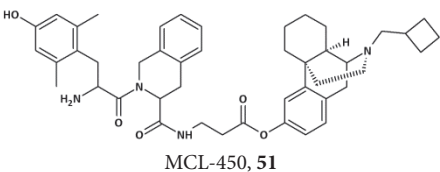
Związek	K _p , nM		
	μ	δ	κ
47	14,8 ± 1,8	6,5 ± 0,18	96 ± 13
48	0,76 ± 0,08	3,1 ± 0,10	2,8 ± 0,20
49	15,5 ± 0,94	24 ± 0,84	9,8 ± 0,21
50	2,3 ± 0,36	5,7 ± 0,60	2,2 ± 0,41

Wyniki powinowactwa otrzymanych ligandów do receptorów opioidowych wskazują na to, że fragment peptydowy silnie wpływa na selektywność całej cząsteczki (Tab. 3). Selektywność jest wynikiem stanu równowagi pomiędzy powinowactwem części adresowej i części niosącej informację. W przypadku, gdy oba komponenty wykazywały podobne powinowactwa, domena adresowa silnie wpływała na selektywność, poprzez zwiększenie powinowactwa do jednego z receptorów opioidowych, a zmniejszenie wiązania z dwoma pozostałymi. W przypadku, gdy część niosąca wiadomość silniej wiązała się z jednym z receptorów to część adresowa wpływała głównie na zmniejszenie powinowactwa do receptorów innego typu.

W tym samym zespole zaprojektowano i otrzymano biwalentne ligandy oksymorfaminy i [D-Glu]²enkefalinę [36]. Tylko jeden z dwóch otrzymanych analogów wykazywał lepsze właściwości antynocyceptywne u myszy niż odpowiedni monowalentny ligand.

Podobne podejście w swoich badaniach wykorzystali Neumeyer i współpracownicy [37]. Zaprojektowany analog MCL-450 **51**, otrzymany przez połączenie δ-selektywnego peptydowego farmakoforu Dmt-Tic i μ,κ-selektywnego butorfanu, wykazywał wysokie powinowactwo do wszystkich trzech receptorów opioidowych (Tab. 4).

Tabela 4. Struktura i aktywność opioidowa MCL-450
Table 4. Structure and opioid activities of MCL-450

Związek	K _p , nM		
	μ	δ	κ
 <p>MCL-450, 51</p>	0,69 ± 0,04	1,5 ± 0,03	0,28 ± 0,03

W literaturze opisane są także analogi fentanylu, w których grupa fenyletylowa została zastąpiona przez aminokwasy aromatyczne [38]. Otrzymano μ-selektywne analogi wykazywały różne powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ.

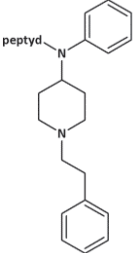
Przeprowadzono także badania pomiędzy strukturą a aktywnością konjugatów enkefalin i fentanylu [39]. Otrzymane analogi wykazywały wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ (Tab. 5), a także, w przeciwieństwie do enkefalin, charakteryzowały się dużą biodostępnością. Zastąpienie Tyr resztą Dmt **55**, **64** znacznie poprawiło powinowactwo do receptora μ , inkorporacja D-Nle w pozycję 2 zwiększyła siłę wiązania z receptorem δ **53**, **54**. Także halogenowanie pierścienia aromatycznego fenyloalaniny zwiększyło aktywność opioidową **56-63** (Tab. 5).

Tabela 5. Struktury i aktywność opioidowa koniugatów fentanylu i analogów enkefalin
Table 5. Structures and opioid activities of fentanyl-enkephalin conjugates

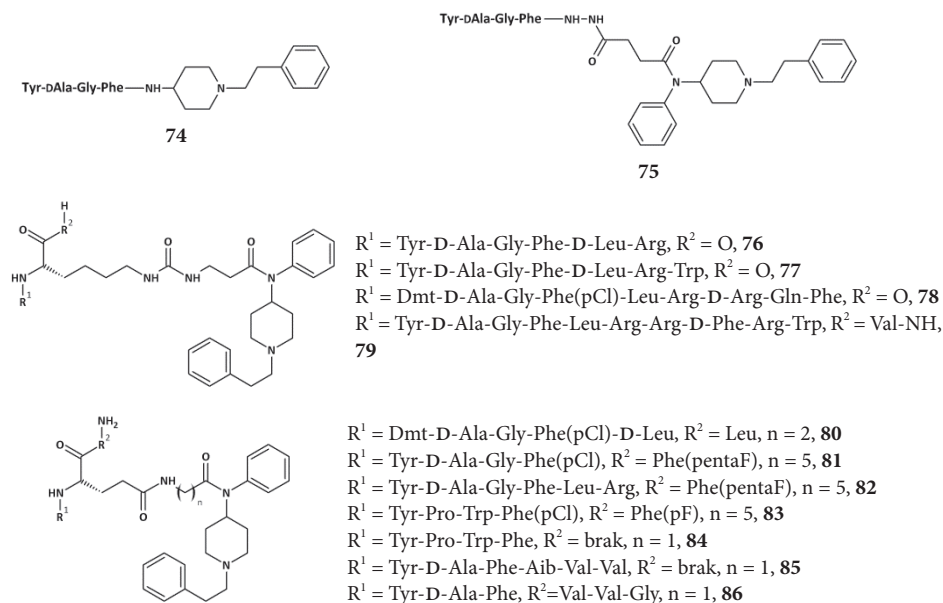
Związek	K_i , nM	
	μ	δ
Peptyd =		
Tyr-D-Ala-Gly-Phe, 52	23	0,69
Dmt-D-Nle-Gly-Phe, 53	0,39	0,18
Dmt-D-Nle-Phe, 54	0,36	1,1
Dmt-D-Ala-Phe, 55	0,15	1,7
Dmt-D-Nle-Gly-Phe(pCl), 56	0,10	0,08
Dmt-D-Nle-Gly-Phe(pF), 57	0,02	0,40
Dmt-D-Ala-Gly-Phe(pCl), 58	0,14	0,14
Dmt-D-Nle-Phe(pCl), 59	5,0	19
Dmt-D-Ala-Phe(pCl), 60	0,33	1,6
Dmt-D-Ala-Gly-Phe(pF), 61	0,01	0,03
Dmt-D-Tic-Gly-Phe(pF), 62	0,35	0,48
Dmt-D-Tic-Gly-Phe(pCl), 63	0,15	0,11
Dmt-D-Ala-Gly-Phe, 64	0,38	0,36

Zsyntezowano również analogi, w których resztę propionylową zastąpiono aminokwasami lub krótkimi peptydami. Taka modyfikacja powinna korzystnie wpływać na zmniejszenie toksyczności związku (Tab. 6) [40]. Zsyntezowane cząsteczki wykazywały wysoką μ -selektywność. Analogi zawierające jedną bądź dwie reszty aminokwasowe **65-68** posiadały bardzo słabe powinowactwo do receptorów opioidowych. Natomiast większość związków z dłuższym fragmentem peptydowym **69-71** była wysoce aktywna.

Tabela 6. Struktury i aktywność opioidowa bivalentnych ligandów fentanylu
Table 6. Structures and opioid activities of fentanyl bivalent ligands

Związek	K_i , nM		
	μ	δ	
	Peptyd =		
	FmocGly, 65	1000	1000
	PhtGly, 66	2080	13000
	Ac β Ala, 67	1030	8400
	AcPhe- β Ala, 678	2680	7600
	Tyr-D-Ala-Gly-Phe- β Ala, 69	0,90	1,1
	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Gly, 70	0,09	12
	Tyr-D-Abu-Gly-Phe-Leu-Gly, 71	0,43	2,8
	Tyr-D-Pro-Gly-Phe-Leu-Gly, 72	260	630
	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Gly, 73	13	27

Podobne modyfikacje przeprowadzono dla dynorfiny, deltorfiny oraz endomorfiny (Rys. 12) [39a, 40b].



Rysunek 12. Struktury bivalentnych ligandów fentanylu i peptydów opioidowych
Figure 12. Structures of fentanyl-opioid peptides bivalent ligands

Wszystkie analogi dynorfiny (**76-79**) oraz enkefalin (75, **80-82**) wykazywały wysokie powinowactwa do obu receptorów opioidowych. Tylko analog **74**, który nie zawierał pierścienia *N*-fenyloвого był nieznacznie mniej aktywny. Analogi endomorfiny (**83-84**) wykazywały mniejszą aktywność niż macierzysty peptyd. Analog deltorfiny **85** zachował wysoką δ -selektywność, natomiast analog **86** wykazywał nieznaczną μ -selektywność. Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność frag-

mentu anilidopiperdydny w znacznym stopniu wpływa na aktywność i funkcjonalność otrzymanych związków

2.3. BIWALENTNE LIGANDY PEPTYDOWE

Wśród homobiwalentnych ligandów na szczególną uwagę zasługuje bifalina [Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-]₂ **87**, otrzymana przez Lipkowskiego i współpracowników [41]. Bifalina zbudowana jest z dwóch aktywnych tetrapeptydów, wywodzących się z enkefalin, połączonych ze sobą w sekwencji palindromowej, ogon do ogona, za pomocą mostka hydrazynowego. Peptyd ten posiada wysoką aktywność i wiele zalet terapeutycznych (Tab. 7). W zależności od sposobu podania, bifalina może wykazywać do 257 razy wyższą aktywność niż morfina [42].

Tabela 7. Struktura i aktywność opioidowa bifaliny
Table 7. Biphalin structure and opioid activities

	Związek	IC50 (nM)	
		δ	μ
87		2,6 ± 0,3	1,4 ± 0,4

Badania wykazały, że bifalina jest obiecującym lekiem przeciwbólowym, wywołującym w przeciwieństwie do morfiny, tylko drugorzędne objawy uzależnienia [43]. Prawdopodobnie jest to wynikiem różnej selektywności tych związków względem receptorów. Morfina wykazuje duże powinowactwo do receptora μ , natomiast bifalina dobrze wiąże się zarówno z receptorem δ jak i μ [44]. Poza tym posiada ona nieznaczące, ale wystarczające powinowactwo do receptora κ . Aktywacja receptora κ zapobiega niektórym niepożądanym efektom indukowanym przez agonistów receptorów μ/δ , np. tolerancji na lek, uzależnieniu fizycznemu i psychicznemu.

W zespole Hruby'ego [45] zsyntezowano analogi bifaliny modyfikowane w pozycjach 3,3' oraz 4,4', w celu zbadania ich aktywności biologicznej (Tab. 8). Wprowadzenie reszty *p*-fluoro-feniloalaninowej w pozycję 4 i 4' (**89**) zwiększało 8-krotnie powinowactwo do receptora δ , a 2-krotnie do receptora μ . Jednak wraz ze wzrostem wielkości wprowadzanego do cząsteczki halogenu (**90** i **91**) powinowactwo do obu receptorów malało. Wbudowanie w łańcuch *p*-nitro-feniloalaniny (**92**) prowadziło do otrzymania analogu o wartościach wiązania z receptorami pośrednich między analogiem z *p*-fluoro i *p*-chloro-feniloalaniną. Wprowadzenie grupy aminowej w pozycję para feniloalaniny (**93**) powodowało 46-krotny spadek powinowactwa do receptora δ i praktycznie wyeliminowało powinowactwo do recep-

tora μ -opiodowego. Zastąpienie reszt glicyny resztami fenyloalaniny w pozycjach 3 i 3' (**88**) powodowało obniżenie powinowactwa do obydwu receptorów. Także Li i współpracownicy zaprojektowali i otrzymali analogi modyfikowane w pozycjach 4, 4' (**94-98**) [46]. Modyfikacje te doprowadziły do otrzymania wysoce μ -selektywnych analogów.

Tabela 8. Struktury i aktywność opiodowa analogów bifaliny modyfikowanych w pozycjach 3,3' i 4,4'
Table 8. Structures and opioid activities of biphalin analogs modified in positions 3,3' and 4,4'

Związek	IC ₅₀ (nM)	
	δ	μ
[Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH-] ₂ , 88	65 ± 31	6,5 ± 2,7
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(pF)-NH-] ₂ , 89	0,31 ± 0,12	0,64 ± 0,38
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(pCl)-NH-] ₂ , 90	0,54 ± 0,05	2,44 ± 1,8
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(pI)-NH-] ₂ , 91	5,20 ± 0,30	24,5 ± 5,3
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(pNO ₂)-NH-] ₂ , 92	0,63 ± 0,10	0,94 ± 0,12
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(pNH ₂)-NH-] ₂ , 93	120 ± 34	10000
[Tyr-D-Ala-Gly-(2S,3R)- β -MePhe-NH-] ₂ , 94	110 ± 13	1,3 ± 0,19
[Tyr-D-Ala-Gly-(2S,3S)- β -MePhe-NH-] ₂ , 95	11 ± 1,7	3,0 ± 1,0
[Tyr-D-Ala-Gly-1'-Nal-NH-] ₂ , 96	6,4 ± 2,6	0,79 ± 0,16
[Tyr-D-Ala-Gly-2'-Nal-NH-] ₂ , 97	7,4 ± 1,9	1,7 ± 0,52
[Tyr-D-Ala-Gly-Phe(2,3,4,5,6-F)-NH-] ₂ , 98	7,8 ± 2,5	0,91 ± 0,21

Niesymetryczne analogi bifaliny zostały zsyntezowane przez zespół Lipkowskiego (Rys. 13) [47]. Wcześniej wykazano, że obecność dwóch aktywnych farmakoforów w cząsteczce nie jest konieczna dla oddziaływań z receptorem μ . Nawet monohydryd tetrapeptydu wykazywał zadawalające powinowactwo do tego receptora.

Tyr-D-Ala-Gly-X-NH-NH-Y

(X=Trp, Y=Phe 99 ,	X=Phe, Y=D-Nle 103 ,
X=Phe, Y=Phe 100 ,	X=Phe, Y=Tyr 104 ,
X=Phe, Y=D-Phe 101 ,	X=Phe, Y=Trp 105 ,
X=Phe, Y=Nle 102 ,	X=Phe, Y=dansyl 106).

Rysunek 13. Niesymetryczne analogi bifaliny

Figure 13. Nonsymmetric biphalin analogs

Wprowadzenie do łańcucha lipofilowej norleucyny **102** i **103** zamiast aromatycznej fenyloalaniny nie zmieniło w znaczący sposób selektywności bifaliny. Także zmiana chiralności aminokwasu nie miała wyraźnego wpływu na wiązanie z receptorami **100** i **101**, **102** i **103**. Analogi **104** i **105**, w których reszta fenyloalaniny została zastąpiona innym aminokwasem aromatycznym zachowały wysokie powinowactwo do receptora μ przy obniżonym powinowactwie do receptora δ o jeden rząd wielkości. Wprowadzenie reszty dansylowej dało wysoce aktywny analog **106**. Obecność podstawnika fluorescencyjnego, umożliwiła przeprowadzenie licznych badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

Pierwsze cykliczne analogi bifaliny otrzymano w zespole Hruby'ego [48]. Reszty D-alaniny w pozycjach 2 i 2' zastąpiono D- i L-cysteiną, a następnie utwo-

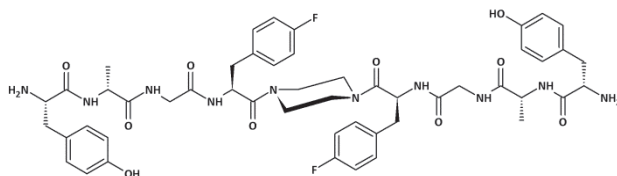
rzono mostek disulfidowy pomiędzy grupami tiolowymi. Otrzymano dwie różne struktury. Wprowadzenie dwóch reszt D-cysteiny nie zmieniało heterochiralnej struktury bifaliny, natomiast wprowadzenie dwóch reszt L-cysteiny doprowadziło do utworzenia nowego homochiralnego peptydu, składającego się wyłącznie z L-aminokwasów. Analog zawierający reszty D-cysteiny wykazał wyższą aktywność niż homochiralny analog, a nawet większą niż wykazuje sama bifalina.

Otrzymano także analogi bifaliny modyfikowane β^3 -*h*-aminokwasami (Tab. 9) [49]. Wbudowanie reszty β^3 -*h*-Tyr w pozycji 1,1' **107**, β^3 -*h*-Gly w pozycje 2,2' **108** lub 3,3' **109** prowadziło do μ -selektywnych analogów o słabym powinowactwie receptorowym. Tylko inkorporacja β^3 -*h*-Phe w pozycji 4,4' **110** dała analog o aktywności porównywalnej z bifaliną. Badania te potwierdziły znaczenie odpowiedniego dystansu pomiędzy resztami fenyloalaniny a tyrozyny. W przypadku analogu modyfikowanego β^3 -*h*-Phe zmianie uległa tylko odległość pomiędzy dwoma farmakoforami, co zwiększa elastyczność peptydu i ułatwia dopasowanie do kieszeni receptora. Już wcześniej wykazano, że odległość pomiędzy obydwoma ligandami może być zmieniana bez znacznej utraty aktywności [50].

Tabela 9. Struktury i aktywność opioidowa analogów bifaliny modyfikowanych β^3 -*h*-aminokwasami
Table 9. Structures and opioid activities of biphalin analogs modified with β^3 -*h*-amino acids

Związek	K _i [49a] (IC ₅₀) [49b] (nM)	
	δ	μ
[β^3 - <i>h</i> -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH-] ₂ , 107	480 (IC ₅₀ >10 000)	62 (IC ₅₀ >10 000)
[Tyr- β^3 - <i>h</i> -Gly-Gly-Phe-NH-] ₂ , 108	450	57
[Tyr-D-Ala- β^3 - <i>h</i> -Gly-Phe-NH-] ₂ , 109	240	172
[Tyr-D-Ala-Gly- β^3 - <i>h</i> -Phe-NH-] ₂ , 110	0,72 (1.26)	1,1 (316)
(β^3 - <i>h</i> -Tyr-D-Ala- β^3 - <i>h</i> -Phe-NH) ₂ , 111	(794)	(>10 000)

Zaprojektowano i zsyntezowano także analogi bifaliny, zawierające cykliczny alifatyczny bądź aromatyczny mostek [51]. Analogi o krótszej sekwencji peptydowej wykazywały bardzo słabe powinowactwo do receptorów opioidowych. Równoczesna modyfikacja pozycji 4 i 4' resztami *p*-fluorofenyloalaniny i modyfikacja łącznika doprowadziły do uzyskania bardzo aktywnych analogów [52]. Analog z mostkiem piperazynowym posiada wyższe powinowactwo do obydwu receptorów opioidowych, natomiast analog z mostkiem 1,2-fenyldiaminowym tylko do receptora μ . Testy MVD i GPI pokazują jednak, że oba analogi są bardziej aktywne niż sama bifalina. Najaktywniejszy analog AM-94 jest obecnie intensywnie badany (Rys. 14) [53].



112

Rysunek 14. Struktura analogu bifaliny AM-94

Figure 14. AM-94 structure

Oprócz dimerycznych analogów enkefalin, otrzymano także dimeryczne analogi dermorfin (Tab. 10) [54]. Dimeryczne tetrapeptydy **114-120** wykazują właściwości odmienne niż dermorfina. Peptydy te posiadają porównywalne powinowactwo do receptora μ i dużo wyższe do receptora δ . Co więcej, wydłużanie długości łącznika **115-117** prowadziło do spadku aktywności. Zastąpienie Gly resztami Sar, dało analogi o lepszych właściwościach, natomiast zastąpienie D-Ala resztą D-Arg prowadziło do znacznego zmniejszenia wiązania z receptorem δ . Dimeryczna dermorfina **125** wykazuje lepsze właściwości niż monomeryczny peptyd.

Tabela 10. Struktury i aktywność opioidowa dimerycznych analogów dermorfiny

Table 10. Structures and opioid activities of dermorphin bivalent ligands

Związek	IC ₅₀ [nM]	
	μ	δ
[Tyr-D-Ala-Phe-NH-] ₂ , 113	99,8 ± 7,39	402,8 ± 66,2
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-NH-] ₂ , 114	9,50 ± 1,36	101,9 ± 4,27
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-NH-CH ₂ -] ₂ , 115	9,04 ± 1,42	185,1 ± 22,2
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-NH-CH ₂ -CH ₂ -] ₂ , 116	9,68 ± 1,80	58,3 ± 0,87
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-NH-(CH ₂) ₆ -] ₂ , 117	72,3 ± 4,79	110,6 ± 10,5
[Tyr-D-Ala-Phe-Sar-NH-CH ₂ -] ₂ , 118	5,20 ± 0,46	109,6 ± 18,9
[Tyr-D-Arg-Phe-Sar-NH-CH ₂ -] ₂ , 119	1,98 ± 0,51	369,9 ± 83,2
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-NH-] ₂ , 120	0,27 ± 0,04	7,88 ± 0,07
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-NH-CH ₂ -] ₂ , 121	0,91 ± 0,15	44,7 ± 9,74
[Tyr-D-Ala-Phe-Sar-Tyr-NH-] ₂ , 122	0,38 ± 0,06	23,9 ± 5,89
[Tyr-D-Arg-Phe-Sar-Tyr-NH-] ₂ , 123	1,52 ± 0,33	27,0 ± 3,42
[Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-NH-] ₂ , 124	1,02 ± 0,22	49,6 ± 8,06
[Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH-] ₂ , 125	0,27 ± 0,03	46,2 ± 6,30

Otrzymano także całą serię bivalentnych ligandów zawierających ugrupowania Dmt i Dmt-Tic [55]. Związki zawierające resztę Dmt połączone mostkami metylenowymi o różnej długości są wysoce μ -selektywne, natomiast analogi zawierające Dmt-Tic są nieznacznie δ -selektywne. Aktywność biologiczna otrzymanych analogów silnie zależała od długości łącznika. Dimeryczne analogi Dmt-Tic, niezależnie od natury łącznika, były silnymi antagonistami obu receptorów opioidowych, przez co mogą być potencjalnie stosowane w walce z uzależnieniem od alkoholu.

PODSUMOWANIE

Dimeryzacja/oligomeryzacja GPCR poprzez homo- i heterodimeryzację może wpływać w znacznym stopniu na właściwości receptorów m.in. na wiązanie z ligandami, sygnalizację, a także ich transport. Ważnym kierunkiem badań jest więc opracowanie narzędzi chemicznych do farmakologicznego charakteryzowania heterodimerów receptorów opioidowych a także poszukiwanie ich ligandów o potencjalnym zastosowaniu jako leki. Odpowiednio zaprojektowane biwalentne ligandy mogą potencjalnie służyć jako selektywne i skuteczne leki przeciwbólowe.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] X. Ruan, *Pain Phys.*, 2007, **10**, 357.
- [2] (a) T. Dzierżanowski, J. Jarosz, *Onkol. Prak. Klin.*, 2009, **5**, 47. (b) P. Holzer, *Eur. Rev. Med., Pharmacol. Sci.*, 2008, **12**, 119. (c) F. Porreca, M. Ossipov, *Pain Medicine*, 2009, **10**, 654.
- [3] C. Pasero, *J. Perianesth. Nurs.*, 2009, **24**, 186.
- [4] (a) S. Silverman, *Pain Physician*, 2009, **12**, 679. (b) L. Chu, D. Clark, M. Angs, *J. Pain*, 2006, **7**, 43.
- [5] R. Abs, J. Verhelst, J. Maeyaert, J. Buyten, F. Opsomer, H. Adriaensen, J. Verlooy, T. Havenbergh, M. Smet, K. Acker, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, **85**, 2215.
- [6] (a) S. Jan, *J. Manag. Care Pharm.*, 2010, **16**, 4. (b) H. Adriaensen, K. Vissers, H. Noorduyn, T. Meert, *Acta Anaesth. Belg.*, 2003, **54**, 37.
- [7] B. Cox, A. Borsodi, G. Caló, C. Chavkin, M. Christie, O. Civelli, L. Devi, C. Evans, G. Henderson, V. Höllt, B. Kieffer, I. Kitchen, M. Kreek, L. Liu-Chen, J. Meunier, P. Portoghese, T. Shippenberg, E. Simon, L. Toll, J. Traynor, H. Ueda, Y. Wong, *Opioid receptors*. [online], IUPHAR database (IUPHAR-DB), [dostęp: 2013-11-26]. Dostępny w Internecie: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=50>.
- [8] B. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghurib, T. Reisine, P. Bradley, P. Portoghese, M. Hamon, *Pharmacol. Rev.*, 1996, **48**, 567.
- [9] C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux, J. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart, J. Meunier, *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 33.
- [10] (a) L. Chiou, Y. Liao, P. Fan, P. Kuo, C. Wang, C. Riemer, E. Prinssen, *Curr. Drug Targets*, 2007, **8**, 117. (b) M. Connor, M. Christie, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1999, **26**, 493.
- [11] (a) B. Kieffer, K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, C. Hirth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 12048. (b) S. Li, J. Zhu, C. Chen, Y. Chen, J. Dieriel, B. Ashby, L. Liu-Chen, *Biochem. J.*, 1993, **295**, 629. (c) Y. Chen, A. Mestek, J. Liu, L. Yu, *Biochem. J.*, 1993, **295**, 625.
- [12] (a) C. Hiller, J. Kuhhorn, P. Gmeiner, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 6542. (b) B. Levac, B. O'Dowd, R. George, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2002, **2**, 76. (c) C. Hiller, J. Kuhhorn, P. Gmeiner, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 6542.
- [13] (a) S. Angers, A. Salahpour, M. Bouvier, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, **42**, 409. (b) C. Rios, B. Jordan, I. Gomes, L. Devi, *Pharmacol. Ther.*, 2001, **92**, 71. (c) I. Gomes, B. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy, L. Devi, *J. Neurosci.*, 2000, **20**, 1. (d) P. Portoghese, M. Lunzer, *Eur. J. Pharmacol.*, 2003, **467**, 233. (e) B. Jordan, L. Devi, *Nature*, 1999, **399**, 697. (f) D. Wang, X. Sun, L. Bohn, W. Sadee, *Mol. Pharmacol.*, 2005, **67**, 2173.
- [14] S. George, T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese, B. O'Dowd, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 26128.
- [15] S. Ballet, M. Pietsch, A. Abell, *Protein Peptide Lett.*, 2008, **15**, 668-682.
- [16] J. Shonberg, P. Scammells, B. Capuano, *Chem. Med. Chem.*, 2011, **6**, 963.

- [17] J. Soulier, O. Russo, M. Giner, L. Rivali, M. Berthouze, S. Ongeri, B. Maigret, R. Fischmeister, F. Lezoualch, S. Sicsic, I. Berque-Bestel, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 6220.
- [18] K. Jacobson, P. Galen, M. Williams, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 407.
- [19] P. Karellas, M. McNaughton, S. Bakern, P. Scammells, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6128.
- [20] Y. Zheng, E. Akgu, K. Harikumar, I. Hopson, M. Powers, M. Lunzer, L. Miller, P. Portoghese, *J. Med. Chem.* 2009, **52**, 247.
- [21] P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 2259.
- [22] (a) R. Bhushan, S. Sharma, Z. Xie, D. Daniels, P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2969. (b) S. Zhang, A. Yekkirala, Y. Tang, P. Portoghese, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 6978.
- [23] M. Weber, A. Bujotzek, R. Haag, *J. Chem. Phys.*, 2012, **137**, 1.
- [24] G. Vauquelin, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2013, **386**, 949.
- [25] M. Erez, A. Takemori, P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 1982, **25**, 841.
- [26] (a) P. Portoghese, G. Ronsisvalle, D. Lamon, A. Takemori, *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 1650. (b) P. Portoghese, D. Larson, C. Yim, L. Sayre, G. Ronsisvalle, A. Lipkowski, A. Takemori, K. Rice, S. Tam, *J. Med. Chem.*, 1985, **28**, 1140. (c) P. Portoghese, D. Larson, L. Sayre, C. Yim, G. Ronsisvalle, S. Tam, A. Takemori, *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 1855.
- [27] (a) P. Portoghese, H. Nagase, A. Lipkowski, D. Larson, A. Takemori, *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 836. (b) P. Portoghese, A. Garzon-Aburbbeh, H. Nagase, C. Lin, A. Takemori, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 1292. (c) P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 1927.
- [28] (a) S. Archer, A. Seyed-Mozaffari, Q. Jiang, J. Bidlack, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 1578. (b) S. Archer, S. Glick, I. Maisonneuve, J. Bidlack, J. Xu, M. Teitler, A. Sebastian, W. El-Hamouly, I. Hutchinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, **6**, 1139. (c) S. Archer, S. Glick, J. Bidlack, *Neurochem. Res.*, 1996, **21**, 1369.
- [29] (a) J. Neumeyer, A. Zhang, W. Xiong, X. Gu, J. Hilbert, B. Knapp, S. Negus, N. Mello, J. Bidlack, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 5162. (b) J. Mathews, X. Peng, W. Xiong, A. Zhang, S. Negus, J. Neumeyer, J. Bidlack, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **315**, 821. (c) X. Peng, B. Knapp, J. Bidlack, J. Neumeyer, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 256. (d) X. Peng, B. Knapp, J. Bidlack, J. Neumeyer, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 2254. (e) M. Decker, B. Fulton, B. Zhang, B. Knapp, J. Bidlack, J. Neumeyer, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 7389. (f) B. Fulton, B. Knapp, J. Bidlack, J. Neumeyer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 1507. (g) B. Zhang, T. Zhang, A. Sromek, T. Scrimale, J. Bidlack, J. Neumeyer, *Bioorg. Med. Chem.* 2011, **19**, 2808.
- [30] R. Jones, P. Portoghese, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, **396**, 49.
- [31] D. Daniels, A. Kulkarni, Z. Xie, R. Bhushan, P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1713.
- [32] (a) D. Daniels, N. Lenard, C. Etienne, P. Law, S. Roerig, P. Portoghese, *PNAS*, 2005, **102**, 19208. (b) N. Lenard, D. Daniels, P. Portoghese, S. Roerig, *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, **566**, 75. (c) M. Aceto, L. Harris, S. Negus, M. Banks, L. Hughes, E. Akgun, P. Portoghese, *Int. J. Med. Chem.*, 2012, ID 327257, 6 pages. (d) A. Yekkirala, A. Kalyuzhny, P. Portoghese, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 1412.
- [33] J. Harvey, D. Long, P. England, J. Whistler, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 640.
- [34] M. Giudice, A. Borioni, G. Bastanzio, M. Sbraccia, C. Mustazza, I. Sestili, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 1207.
- [35] A. Lipkowski, S. Tam, P. Portoghese, *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 1222.
- [36] P. Portoghese, D. Larson, G. Ronsisvalle, P. Schiller, T. Nguyen, C. Lemieux, A. Takemori, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 1991.
- [37] J. Neumeyer, X. Peng, B. Knapp, J. Bidlack, L. Lazarus, S. Salvadori, C. Trapella, G. Balboni, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5640.
- [38] Y. Lee, J. Nyberg, S. Moye, R. Agnes, P. Davis, S. Ma, J. Lai, F. Porreca, R. Vardanyan, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 2161.

- [39] (a) Lee Y., R. Petrov, C. Park, S. Ma, P. Davis, J. Lai, F. Porreca, R. Vardanyan, V. Hruby, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 5528. (b) Y. Lee, V. Kulkarani, S. Cowell, S. Ma, P. Davis, K. Hanlon, T. Vanderah, J. Lai, F. Porreca, R. Vardanyan, V. Hruby, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 382.
- [40] (a) R. Petrov, R. Vardanyan, Y. Lee, S. Ma, P. Davis, L. Begay, J. Lai, F. Porreca, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 4946. (b) R. Petrov, Y. Lee, R. Vardanyan, L. Liu, S. Ma, P. Davis, J. Lai, F. Porreca, T. Vanderah, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3434.
- [41] (a) A. Lipkowski, A. Konecka, I. Sroczyńska, *Peptides*, 1982, **3**, 697. (b) F. Feliciani, F. Pinnen, A. Stefanucci, R. Costante, I. Cacciatore, G. Lucente, A. Mollica, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2013, **13**, 11.
- [42] (a) B. Silbert, A. Lipkowski, M. Cepeda, S. Szyfelbein, P. Osgood, D. Carr, *Agents Actions*, 1991, **33**, 382. (b) P. Horan, A. Mattie, E. Bilsky, S. Weber, T. Davis, H. Yamamura, E. Malatynska, S. Appleyard, J. Slaninova, A. Misicka, A. Lipkowski, V. Hruby, F. Porreca, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, **265**, 1446.
- [43] M. Yamazaki, T. Suzuki, M. Narita, A. Lipkowski, *Life Sci.*, 2001, **69**, 1023.
- [44] (a) A. Lipkowski, A. Konecka, I. Sroczyńska, R. Przewłocki, L. Stala, S. Tam, *Life Sci.*, 1987, **40**, 2283. (b) A. Misicka, A. Lipkowski, R. Horvath, P. Davis, T. Kramer, H. Yamamura, V. Hruby, *Life Sci.*, 1992, **51**, 1025.
- [45] A. Misicka, A. Lipkowski, R. Horvath, P. Davis, F. Porreca, H. Yamamura, V. Hruby, *Life Sci.*, 1997, **60**, 1263.
- [46] G. Li, W. Haq, L. Xiang, B. Lou, R. Hughes, I. Leon, P. Davis, T. Gillespie, M. Romanowski, X. Zhu, A. Misicka, A. Lipkowski, F. Porreca, T. Davis, H. Yamamura, D. O'Brien, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, **8**, 555.
- [47] (a) A. Lipkowski, A. Misicka, P. Davis, D. Stropova, J. Janders, M. Lachwa, F. Porreca, H. Yamamura, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2763. (b) A. Lipkowski, A. Misicka, D. Kosson, P. Kosson, M. Lachwa-From, A. Brodzik-Bienkowska, V. Hruby, *Life Sci.*, 2002, **70**, 893.
- [48] A. Mollica, P. Davis, S. Ma, F. Porreca, J. Lai, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 367.
- [49] (a) A. Mollica, F. Pinnen, R. Costante, M. Locatelli, A. Stefanucci, S. Pieretti, P. Davis, J. Lai, D. Rankin, F. Porreca, V. Hruby, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 3419. (b) O. Frączak, A. Lasota, D. Podwysocka, A. Olma, A. Leśniak, A. Lipkowski. Dostępny w Internecie: http://21pps.umb.edu.pl/conference_book_suprasl_2011.pdf.
- [50] J. Stepinski, I. Zajaczkowski, D. Kazem-Bek, A. Temeriusz, A. Lipkowski, S. Tam, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, **38**, 588.
- [51] A. Mollica, P. Davis, S. Ma, J. Lai, F. Porreca, V. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 2471.
- [52] A. Mollica, F. Pinnen, F. Feliciani, F. Stefanucci, G. Lucente, P. Davis, F. Porreca, S. Ma, J. Lai, V. Hruby, *Amino Acids*, 2011, **40**, 1503.
- [53] (a) S. Leone, A. Chiavaroli, G. Orlando, A. Mollica, C. Nisio, L. Brunetti, M. Vacca, *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, **685**, 70. (b) A. Mollica, R. Costante, A. Stefanucci, F. Pinnen, G. Lucente, S. Fidanzad, S. Pieretti, *J. Pept. Sci.*, 2013, **19**, 233.
- [54] L. Lazarus, A. Guglietta, W. Wilson, B. Irons, R. Castiglione, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 354.
- [55] (a) Y. Jinsmaa, A. Miyazaki, Y. Fujita, T. Li, Y. Fujisawa, K. Shiotani, Y. Tsuda, T. Yokoi, A. Ambo, Y. Sasaki, S. Bryant, L. Lazarus, Y. Okada, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2599. (b) T. Li, Y. Fujita, K. Shiotani, A. Miyazaki, Y. Tsuda, A. Ambo, Y. Sasaki, Y. Jinsmaa, E. Marczak, S. Bryant, S. Salvadori, L. Lazarus, Y. Okada, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 8035.

**METODY OBLICZANIA NAPIĘCIA
MIĘDZYFAZOWEGO Z SYMULACJI
KOMPUTEROWYCH**

METHODS FOR CALCULATION INTERFACIAL
TENSION FROM COMPUTER SIMULATIONS

Jakub Chrzanowski, Stanisław Lamperski

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: qbachrzan@op.pl, slamper@amu.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Metody symulacyjne
2. Boks symulacyjny dla układów dwufazowych
3. Napięcie powierzchniowe i międzyfazowe
4. Metody obliczania napięcia międzyfazowego w symulacjach komputerowych
 - 4.1. Kikwood-Buff
 - 4.2. Bennett
 - 4.3. *Test-area*
 - 4.4. Układ rozszerzony
 - 4.5. Funkcja fali kapilarnej
 - 4.6. Metoda kwadratu gradientu
5. Ocena przedstawionych metod

Piśmiennictwo cytowane



Prof. UAM dr hab. Stanisław Lamperski jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopnie naukowe doktora nauk chemicznych i doktora habilitowanego nauk chemicznych w zakresie chemii – chemia fizyczna uzyskał na Wydziale Chemii tegoż Uniwersytetu. Prowadzi badania struktury i właściwości termodynamicznych obszarów międzyfazowych metodami symulacji molekularnych. Jest autorem oryginalnej metody obliczania indywidualnych i średnich współczynników aktywności elektrolitu. Od 2002 pełni funkcję Kierownika Zespołu

Dydaktycznego Chemii Fizycznej i Teoretycznej. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.



Mgr Jakub Chrzanowski jest absolwentem Chemii, specjalności Chemia z Zastosowaniem Informatyki na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Obecnie jest doktorantem w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Chemii UAM. Jego badania naukowe dotyczą właściwości termodynamicznych i strukturalnych obszaru międzyfazowego występującego między dwiema cieczami o ograniczonej rozpuszczalności metodą Monte Carlo. Poszukuje nowych metod obliczania wartości napięcia międzyfazowego z symulacji komputerowych.

ABSTRACT

Interfaces have been recently a subject of profound interest for physicists, chemists and biologists because of the processes taking place in the interfacial region like adsorption, *catalysis* of chemical reactions etc. Computer simulations treat an interface in a full atomic level and by that they are a valuable complementary technique for experiment and theory. In this paper, different methods for the calculation of an interfacial tension by computer simulations are described and compared. The most commonly used method for the interfacial tension calculation was developed by Kirkwood-Buff. It is based on the mechanical route definition. This approach uses normal and tangential pressure components of the pressure tensor. The interfacial tension can be also evaluated through its thermodynamic definition. The method of Bennett defines the interfacial tension as the free energy difference of two (or more) systems relative to the difference in interfacial areas. The “test-area” method is based upon the perturbation formalism. The test state is obtained from an infinitesimal change of the surface area of the reference system. The third method based on the thermodynamic route used to evaluate the interfacial tension is thought as an expanded ensemble simulation where two systems with different free energy and the interfacial area are connected by a discrete chain of intermediate subsystems. The next approach is based on the capillary wave theory formalism which provides a relationship between the surface tension and the wave width due the capillarity broadening. Interfacial tension may be also computed from the square gradient theory which is based on the expansion of the Hemholtz free energy in the Taylor series around the homogeneous state with the assumption that the molecular gradients in the interface are small compared to intermolecular distance. The theoretical basis, application and results of computer simulations of each method are presented. An accuracy of the methods in different simulation methodologies and systems is compared.

Keywords: interfacial tension, computer simulations, Kirkwood-Buff method, Bennetts method, test-area method, expanded ensemble simulation, capillary wave theory, square gradient theory

Słowa kluczowe: napięcie międzyfazowe, symulacje komputerowe, metoda Kirkwooda-Buffa, metoda Bennetta, metoda *test-area*, układ rozszerzony, funkcja fali kapilarnej, metoda kwadratu gradientu

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

a	– stała kapilarna
A	– pole powierzchni granicy faz
c_{ij}	– parametr wpływu w teorii kwadratu gradientu
F	– energia swobodna Hemholtza
\mathcal{F}	– siła
g	– stała grawitacji
G	– entalpia swobodna Gibbsa
H	– entalpia
H_0	– liczba konfiguracji o powierzchni A_0
H_M	– liczba konfiguracji o powierzchni A_M
k_B	– stała Boltzmanna
l	– długość, minimalna długość fali kapilarnej
L	– długość boku boku symulacyjnego, maksymalna długość fali kapilarnej
m	– masa
N	– liczba cząsteczek
p	– ciśnienie
p_n	– ciśnienie prostopadłe do płaszczyzny granicy faz
p_t	– ciśnienie równoległe do płaszczyzny granicy faz
q	– długość fali kapilarnej
\mathbf{r}	– wektor położenia cząsteczki
S	– entropia
t	– czas
T	– temperatura
U	– energia wewnętrzna
V	– objętość
w	– funkcja wirialna
w_{cw}	– kapilarna szerokość fali
w_i	– wewnętrzna szerokość granicy faz
w_t	– grubość granicy faz
W	– praca, szerokość boku symulacyjnego
α	– amplituda fali kapilarnej
γ	– napięcie międzyfazowe
ε	– głębokość studni potencjału Lennarda-Jonesa
ζ	– oscylacje fali kapilarnej
μ	– potencjał chemiczny
ρ	– gęstość liczbowa
Ω	– prawdopodobieństwo termodynamiczne

WPROWADZENIE

Granicą faz albo mówiąc bardziej precyzyjnie obszarem międzyfazowym nazywamy obszar leżący na styku przylegających do siebie faz. Charakteryzuje się on gradientem stężenia składników, a tym samym gradientem właściwości fizykochemicznych. Obszar ten ma wyjątkową strukturę oraz właściwości fizykochemiczne. Występują tam zjawiska takie jak adsorpcja, rozproszenie światła, efekt fotoelektryczny, kataliza heterogeniczna. W celu lepszego zrozumienia zjawisk występujących na granicy faz konieczne jest dokładne poznanie jej struktury na poziomie molekularnym. Szczególnie wymagająca z punktu widzenia badań jest granica faz ciecz/ciecz. Eksperymentalne techniki nie dają możliwości zbadania struktury i dynamiki tego obszaru ze względu na to, że jego grubość jest rzędu średnicy cząsteczki. Z tego powodu badania granicy faz ciecz/ciecz są atrakcyjne dla rozważań teoretycznych. Analityczny opis granicy faz wymaga zastosowania wielu uproszczeń. Natomiast molekularne symulacje komputerowe pozwalają badać granicę faz na poziomie cząsteczek i obliczać wielkości makroskopowe. Dlatego są one cennym uzupełnieniem technik eksperymentalnych oraz prac czysto teoretycznych. Podstawową wielkością opisującą granicę faz jest napięcie międzyfazowe. Istnieje szereg metod pozwalających obliczać wartość napięcia międzyfazowego z symulacji komputerowych. Metody oraz ich porównanie koncentrujące się na wadach i zaletach oraz na obszarze ich zastosowania przedstawione są w niniejszym artykule z naciskiem na obliczanie napięcia międzyfazowego na granicy faz pomiędzy dwoma cieczami.

1. METODY SYMULACYJNE

Molekularne symulacje komputerowe pozwalają badać właściwości oddziałujących ze sobą układów wielocząsteczkowych. Za pomocą symulacji można dokładnie określić położenia i prędkości wszystkich cząsteczek w układzie. Żaden eksperyment nie jest w stanie zaoferować tak szczegółowych informacji o układzie. Metody symulacyjne dzieli się na dwie grupy: deterministyczne i stochastyczne [1].

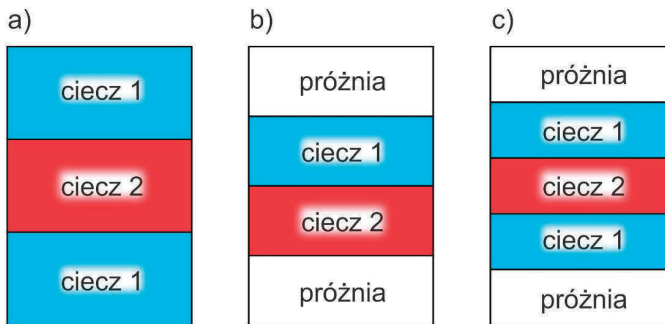
Dynamika molekularna zaliczana jest do pierwszej z nich. W metodach deterministycznych modeluje się ruch cząsteczek przeważnie opisywany równaniami Newtona, a zderzenia podlegają prawom mechaniki klasycznej. Technika ta służy do obliczania równowagowych i transportowych właściwości wielocząsteczkowych układów. Zaniedbywane są w jej przypadku efekty kwantowe. Wartość średnią badanej wielkości A otrzymuje się poprzez uśrednianie jej po czasie t

$$\bar{A} = \frac{1}{t - t_0} \int_{t_0}^t A(\tau) d\tau \quad (1)$$

Metody stochastyczne modelują jedynie konfiguracje układu. Cząsteczki nie poruszają się, a występuje tylko przeskok z jednej konfiguracji do następnej. Dzięki zastosowaniu algorytmu, który generuje konfiguracje zgodnie z prawdopodobieństwem ich wystąpienia, szukaną wartość oblicza się jako średnią arytmetyczną po wszystkich zaakceptowanych konfiguracjach. Do grupy metod stochastycznych zalicza się metodę Monte Carlo.

2. BOKS SYMULACYJNY DLA UKŁADÓW CIECZ–CIECZ

W badaniach symulacyjnych granicy faz ciecz–ciecz zwykle wykorzystywany jest boks symulacyjny o kształcie prostopadłościanu o długości L i szerokości W . W boksie symulacyjnym umieszczone są kolejno fazy prostopadle do jednego z kierunków, zwykle do kierunku z . Wykorzystywane są trzy sposoby wzajemnego ułożenia faz. W pierwszym przypadku w boksie symulacyjny występują 3 fazy w następującej kolejności: ciecz1 / ciecz2 / ciecz1 (Rys. 1a). Mamy tu tylko jeden typ granicy faz mianowicie ciecz1 / ciecz2. Dzięki tej geometrii symulowane są jednocześnie dwie granice faz ciecz1 / ciecz2, co poprawia statystykę wyników. Jest to najczęściej stosowane rozwiązanie [2–4]. Jego minusem jest to, że ciśnienie skierowane prostopadle do granicy faz p_n w stanie równowagi znacząco odbiega od ciśnienia założonego na początku symulacji. Jeśli nie jest znany profil granicy faz, to aby uzyskać założoną wartość ciśnienia p_n , należy manualnie dobierać rozmiar boksu podczas konfiguracji początkowych.



Rysunek 1. Geometrie symulacyjne dla granicy faz ciecz/ciecz: a) z jednym typem granicy faz, b) z dwoma różnymi granicami faz ciecz/próżnia, c) z jednym typem granicy ciecz/próżnia

Figure 1. Simulation geometries for liquid/liquid interface with: a) a single interface type; b) two types of liquid/vacuum interfaces; c) a single liquid/vacuum interface type

Jednym z rozwiązań niwelujących tę niedogodność jest wprowadzenie przy ścianach boksu dodatkowych faz będących próżnią. W ten sposób otrzymuje się drugi sposób wzajemnego ułożenia faz w boksie symulacyjnym, w którym występują odpowiednio 4 fazy ułożone w kolejności próżnia / ciecz1 / ciecz2 / próżnia (Rys 1b). Mamy też trzeci przypadek, w którym jest 5 faz w kolejności próżnia /

ciecz1 / ciecz2 / ciecz1 / próżnia (Rys 1c). Podejście drugie i trzecie umożliwia przeprowadzenie symulacji w układzie mikrokanonicznym przy jednoczesnej relaksacji gęstości. Do wad tego rozwiązania można zaliczyć skomplikowaną analizę wyników wynikającą z występowania kilku rodzajów obszarów międzyfazowych oraz to, że nie można przeprowadzać symulacji dla różnych wartości ciśnienia p_n , gdyż średnia wartość ciśnienia prostopadłego do granicy faz p_n musi być równa 0 atm. Alternatywnym podejściem jest zastosowanie geometrii z jednym rodzajem granicy faz (Rys. 1a) i boksem o zmiennej objętości. W tym przypadku wymagane jest jednak, aby znane były wartości ciśnienia p_n , powierzchni granicy fazy lub napięcia międzyfazowego. Van Buuren i współpracownicy [2], korzystając z tego ułożenia faz w boksie, przeprowadzili symulacje dynamiką molekularną granicy faz dla dwóch niemieszających się cieczy. Stosując symulacje przy stałym ciśnieniu uzyskali inny kształt profili gęstości granicy faz niż z symulacji w zespole mikrokanonicznym, a także niższe wartości napięcia międzyfazowego.

3. NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE I MIĘDZYFAZOWE

Między cząsteczkami każdej substancji działają siły van der Waalsa zwane również siłami kohezji (spójności) [5]. Są to siły bliskiego zasięgu. W głębi fazy objętościowej siły kohezji działające na cząsteczki równoważą się nawzajem, natomiast przy powierzchni granicy faz lub w jej pobliżu siły te są nieskompensowane. Siły kohezji działające w obszarze powierzchniowym cieczy powodują powstanie wypadkowej siły stycznej do powierzchni i przeciwdziałającej jej powiększaniu. Tym samym ciecze wykazują tendencję do przybierania kształtów, którym odpowiada najmniejsza powierzchnia. Wówczas najmniejsza liczba cząsteczek cieczy znajduje się na jej powierzchni, a największa jest w jej wnętrzu. Praca W potrzebna do zmiany pola powierzchni cieczy o infinitesimalną wartość jest proporcjonalna do zmiany jej powierzchni A

$$dW = \gamma dA, \quad (2)$$

gdzie γ jest napięciem powierzchniowym [5]. Wynika stąd, że miarą napięcia powierzchniowego jest praca, jaką trzeba wykonać, aby utworzyć jednostkową powierzchnię cieczy

$$\gamma = \left(\frac{\partial W}{\partial A} \right)_{p,T} \quad (3)$$

Napięcie powierzchniowe można też zdefiniować w oparciu o siłę \mathcal{F} styczną do powierzchni cieczy, działającą na jednostkę długości jej obrzeża l

$$\gamma = \frac{F}{l} \quad (4)$$

Siła ta dąży do zmniejszenia powierzchni cieczy. Napięcie powierzchniowe ma wymiar energia/powierzchnia lub siła/długość i wyraża się w układzie SI w jednostkach (J/m²) lub (N/m).

Zmiana entalpii swobodnej G (zwanej również energią Gibbsa) przy stałym ciśnieniu p i temperaturze T jest równa maksymalnej pracy nieobjętościowej

$$dG = dW_{\max} \quad p, T = \text{const.} \quad (5)$$

Mozna więc równanie (4) zapisać w postaci

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{p,T} \quad (6)$$

Entalpia swobodna zdefiniowana jest następująco:

$$G = H - TS, \quad (7)$$

gdzie H oznacza entalpię, a S entropię. Analogicznie przy stałej temperaturze T oraz objętości V napięcie powierzchniowe dane jest wzorem

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{V,T} \quad (8)$$

gdzie F jest to energia swobodna (Hemholtza), którą definiuje równanie

$$F = U - TS \quad (9)$$

natomiast U oznacza energię wewnętrzną.

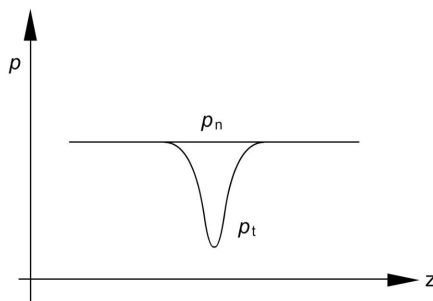
Pojęcie napięcia powierzchniowego dotyczy tylko granicy faz ciecz/gaz. Bardziej ogólnym pojęciem jest napięcie międzyfazowe. Ze zjawiskiem napięcia międzyfazowego mamy do czynienia wszędzie, gdzie istnieje powierzchnia graniczna niezależnie od tego, czy jest to granica faz ciało stałe / gaz, ciało stałe / ciecz, ciecz / gaz, czy też ciecz / ciecz. W przypadku granicy faz ciecz / ciecz oraz ciało stałe / ciecz występuje zjawisko adhezji. Adhezja jest to łączenie się ze sobą powierzchniowych warstw faz stałych, bądź ciekłych. Miarą adhezji jest praca przypadająca na jednostkę powierzchni, którą należy wykonać, aby rozłączyć stykające się powierzchnie. W przypadku granicy występującej między dwiema cieczami praca adhezji jest to praca potrzebna do rozdzielenia powierzchni granicy faz ciecz A / ciecz B na dwie powierzchnie ciecz A / gaz A oraz ciecz B / gaz B.

4. OBLICZANIE NAPIĘCIA MIĘDZYFAZOWEGO W SYMULACJACH KOMPUTEROWYCH

Istnieje szereg metod pozwalających obliczać wartość napięcia międzyfazowego za pomocą symulacji komputerowej. Metody można podzielić na klasy w oparciu o sposób definiowania napięcia międzyfazowego. Klasa pierwsza powstała w oparciu o termodynamikę statystyczną. Do klasy tej zalicza się metodę Kirkwooda-Buffa, która pozwala obliczać napięcie w oparciu o różnicę pomiędzy ciśnieniem prostopadłym a równoległym do granicy faz. Klasa druga, skupiająca w swoim obrębie najwięcej metod, bazuje na termodynamicznej definicji napięcia międzyfazowego danej wzorem (8). Zaliczamy do niej metodę Bennetta, *test-area* oraz metodę symulacji w układzie rozszerzonym. Kolejna klasa została opracowana w oparciu o formalizm funkcji fali kapilarnej. Ostatnie podejście do obliczania napięcia międzyfazowego opiera się na teorii gradientu.

4.1. KIRKWOOD-BUFF

Kirkwood razem z Buffem [6] opracowali równanie termodynamiki statystycznej na napięcie międzyfazowe obliczane z funkcji wiralnej. Jeśli przyjąć założenie, że kierunek z jest prostopadły do powierzchni płaskiej granicy faz, ciśnienie należy opisać wedle kierunków osi współrzędnych jako p_x , p_y oraz p_z . Wyróżniamy ciśnienie prostopadłe p_n i styczne p_t do granicy faz. Ciśnienie prostopadłe p_n jest równe z -owej wartości ciśnienia p_z , natomiast styczne p_t równa jest wyrażeniu $(p_x + p_y)/2$. Dla płaskiej granicy faz wartość ciśnienia p_n jest stała i niezależna od odległości od tej granicy, natomiast wartość ciśnienia p_t zmienia się w zależności od odległości od granicy faz. W znacznej odległości od granicy faz p_n jest równe p_c , natomiast w jej pobliżu p_n przyjmuje wartości niższe od p_c . Schematycznie pokazuje to Rysunek 2.



Rysunek 2. Ciśnienie styczne p_t i prostopadłe p_n do granicy faz
Figure 2. Tangential p_t and normal p_n pressure at the interface region

Wartość napięcia międzyfazowego jest obliczana z różnicy pomiędzy wartościami ciśnienia prostopadłego i stycznego do powierzchni granicy faz [7, 8].

$$\gamma = \int_{-\infty}^{\infty} dz [p_n - p_t(z)] \quad (10)$$

Z Rysunku 2 wynika, że nieznikający wkład do napięcia międzyfazowego pochodzi tylko z obszaru niejednorodności. Do obliczenia profili prostopadłego oraz równoległego do granicy faz ciśnienia niezbędna jest znajomość funkcji wirialnej w

$$w_i = \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{F}_i \quad (11)$$

gdzie \mathbf{r}_i jest wektorem położenia i -tej cząsteczki, a \mathbf{F}_i jest siłą wypadkową działającą na nią. Korzystając z funkcji wirialnej, przy założeniu, że granica faz jest prostopadła do kierunku z , napięcie międzyfazowe obliczamy ze wzoru

$$\gamma = \frac{1}{2A} \left\langle \sum_{i<j} \left(1 - \frac{3z_{ij}^2}{r_{ij}^2} \right) w_{ij} \right\rangle \quad (12)$$

gdzie $\langle \dots \rangle$ oznacza średnią po konfiguracjach, A jest powierzchnią granicy faz. Metodę Kirkwooda-Buffa można łatwo zastosować w symulacjach prowadzonych metodą dynamiki molekularnej, w których obliczana jest siła działająca na cząsteczki. W przypadku metody Monte Carlo niezbędne jest osobne obliczanie siły, co wpływa niekorzystnie na czas symulacji. Obliczanie napięcia międzyfazowego w oparciu o metodę Kirkwooda-Buffa jest szczególnie trudne dla układów, w których cząsteczki oddziałują poprzez nieciągły potencjał lub w przypadku oddziaływań niesferycznych.

Meyer i in. [4] wykorzystali teorię Kirkwooda-Buffa do opisu napięcia międzyfazowego zastosowaną w symulacjach dynamiki molekularnej. Badali symetryczny układ dwóch identycznych cieczy. Cząsteczki oddziaływały za pomocą potencjału Lennarda-Jonesa (przyjęto parametry dla argonu), a na wzajemną mieszalność cieczy wpływało przez zmianę wartości dodatkowych parametrów wprowadzonych do potencjału Lennarda-Jonesa. Mimo że badany układ był uproszczony i nierealistyczny, udało się uzyskać wartości napięcia międzyfazowego w granicy od 23,0 do 33,4 mN/m mieszczące się w zakresie wyników wyznaczonych eksperymentalnie dla realnych układów dwóch cieczy. Diaz-Herrera i in. [9] zastosowali metodę Kirkwooda-Buffa w symulacjach przeprowadzonych metodą dynamiki molekularnej dla dwóch niemieszających się cieczy. Badali zależność napięcia międzyfazowego od temperatury zredukowanej T^* ($T^* = Tk_B/\epsilon$, ϵ – parametr potencjału Lennarda-Jonesa) w zespole kanonicznym. Wykazali istnienie maksimum napięcia międzyfazowego w temperaturze wynoszącej w przybliżeniu $T^* \approx 1,1$. Pokazali, że rozmiar symulowanego układu ma wpływ na wartość napięcia międzyfazowego. Zaobserwowali również, że niewielkie oscylacje gęstości liczbowej fazy jednoskładnikowej prowadzą do znaczących oscylacji ciśnienia, szczególnie w obszarze niskich temperatur. Oscylacje te miały wpływ na wartości napięcia międzyfazowego. Buuren

i in. [2] wykorzystali metodę obliczania napięcia międzyfazowego występującego na granicy faz pomiędzy dekanem i wodą z funkcji wirialnej metodą dynamiki molekularnej w zespole kanonicznym. Przeprowadzili serie symulacji dla różnych modeli oddziaływań międzycząsteczkowych, które otrzymano odpowiednio dobiegając parametry potencjału Lennarda-Jonesa. Otrzymane tą drogą wartości napięcia międzyfazowego, mieszczące się w zakresie 42–83 mN/m, są znacząco wyższe od wartości eksperymentalnej wynoszącej $48,2 \pm 0,1$ mN/m dla temperatury 315 K. Zwrócili uwagę na kluczowy wpływ doboru parametrów oddziaływań międzycząsteczkowych na wartość napięcia międzyfazowego. Autorzy podkreślili, że obniżenie potencjału oddziaływania pomiędzy atomami tlenu i węgla powoduje wzrost napięcia międzyfazowego. Buuren i in. [2] zwrócili uwagę, że zawyżone wartości napięcia międzyfazowego mogą wynikać z podwyższonej wartości ciśnienia p_z , dlatego wprowadzili metodę skalowania p_z do wartości 1,0 atm, co wpłynęło na obniżenie wartości napięcia międzyfazowego dla różnych parametrów oddziaływań do zakresu 37–72 mN/m.

4.2. BENNETT

Inna metoda obliczania napięcia międzyfazowego zaproponowana została przez Bennetta [10]. Bazuje ona na zmianie energii swobodnej między dwoma lub więcej układami różniącymi się między sobą polem powierzchni obszaru międzyfazowego. Pozwala oszacować napięcie międzyfazowe z różnicy energii swobodnej pomiędzy układami rozdzielonymi granicą faz oraz układami, między którymi granica faz nie występuje. Różniczka energii swobodnej F dana jest wzorem

$$dF = -SdT - pdV + \sum_i \mu_i dN_i + \gamma dA \quad (13)$$

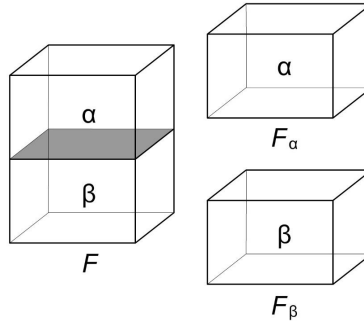
gdzie T jest to temperatura, V objętości, N_i liczba cząsteczek i -tego składnika, A powierzchnia obszaru międzyfazowego, oraz μ_i potencjał chemiczny i -tego składnika. Po scałkowaniu przy $T = \text{const}$. Otrzymujemy

$$F = -pV + \sum_i \mu_i N_i + \gamma A \quad (14)$$

Nadmiar energii swobodnej F^S spowodowany obecnością obszaru międzyfazowego definiuje się następująco:

$$F^S = F - F^\alpha - F^\beta \quad (15)$$

gdzie F to energia swobodna niejednorodnego układu, w którym występują dwie fazy jednorodne α i β oraz obszar międzyfazowy (Rys 3).



Rysunek 3. Układ boksów symulacyjnych pozwalających obliczyć nadmiar energii swobodnej F^s w metodzie Bennetta

Figure 3. Simulation systems used to calculate the free energy excess in the Bennett method

Energie swobodne faz jednorodnych zapisujemy

$$F^\alpha = -pV^\alpha + \sum_i \mu_i N_i^\alpha \quad (16)$$

$$F^\beta = -pV^\beta + \sum_i \mu_i N_i^\beta \quad (17)$$

natomiast energię swobodną obszaru międzyfazowego F^s definiuje się jako

$$F^s = \sum_i \mu_i N_i^s + \gamma A \quad (18)$$

gdzie $N_i^s = N_i - N_i^\alpha - N_i^\beta$ opisuje wkład każdego ze składników do obszaru międzyfazowego. Napięcie międzyfazowe można zapisać jako wartość energii swobodnej F^s przypadającej na powierzchnię obszaru międzyfazowego

$$\gamma = \frac{F^s}{A} \quad (19)$$

ale tylko wtedy, gdy wkład każdego ze składników do obszaru międzyfazowego zanika, $N_i^s = 0$. Wygodniejszy do opisu układów z granicą faz jest wielki potencjał termodynamiczny Ω , który zdefiniowany jest wzorem

$$\Omega = F - \sum_i \mu_i N_i \quad (20)$$

Możemy wówczas wielki potencjał międzyfazowy Ω^s zapisać jako

$$\Omega^s = \gamma A \quad (21)$$

Powyższe równania pozwalają oszacować wartość napięcia międzyfazowego jako różnicę energii swobodnej pomiędzy układami bez granicy faz a układem, w którym

występuje obszar międzyfazowy. Wadą tej metody jest to, iż wymaga ona wykonania dwóch lub więcej symulacji w celu uzyskania wartości napięcia międzyfazowego.

Metoda Bennetta została użyta przez Miyazakiego i in. [11]. Obliczyli oni napięcie powierzchniowe dla argonu ze zmiany energii swobodnej w podzielonym na kroki procesie formowania się granicy faz z bloku ciecchy w oparciu o symulacje Monte Carlo z wykorzystaniem potencjału Lennarda-Jonesa.

4.3. TEST-AREA

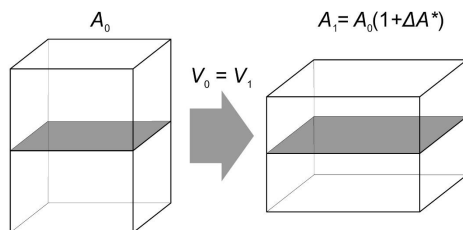
Gloor ze współpracownikami [12] zaproponowali metodę nazywaną *test-area* (TA), która podobnie jak metoda Bennetta oparta jest na termodynamicznej definicji napięcia międzyfazowego. W metodzie TA napięcie międzyfazowe obliczane jest w pojedynczej symulacji z różnicy energii swobodnej pomiędzy układem referencyjnym, a układem zaburzonym poprzez infinityzmalną zmianę powierzchni granicy faz

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{N,V,T} = \lim_{\Delta A \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta F}{\Delta A} \right)_{N,V,T} \quad (22)$$

Układ najpierw musi osiągnąć stan równowagi. Wtedy przyjmujemy jego stan jako referencyjny (układ 0). Zakłada się, że granica faz jest planarna i prostopadła do kierunku z oraz ma powierzchnię równą A_0 . Następnie tworzony jest układ zaburzony z nową powierzchnią A_1 granicy faz (układ 1) zgodnie ze wzorem

$$A_1 = A_0(1 + \Delta A^*), \quad (23)$$

gdzie ΔA^* jest bezwymiarowym parametrem ustalonym na początku symulacji. Powierzchnia granicy faz jest zwiększana lub zmniejszana poprzez zmianę długości boków boku L_x i L_y . Długość boku L_z jest dopasowywana w taki sposób, aby została zachowana stała objętość układu V .



Rysunek 4. Schemat zaburzenia poprzez zmianę powierzchni granicy faz w metodzie *test-area*
Figure 4. Scheme of perturbation of the interfacial area in *test-area* method

Różnicę energii swobodnej oraz powierzchni granicy faz pomiędzy stanem referencyjnym a zaburzonym wynoszą odpowiednio

$$\Delta F_{0 \rightarrow 1} = F_1 - F_0 \quad (24)$$

$$\Delta A_{0 \rightarrow 1} = A_1 - A_0 \quad (25)$$

Wzór na napięcie międzyfazowe (22) przyjmuje ostatecznie postać

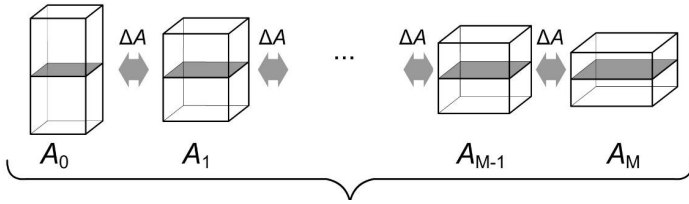
$$\gamma = \lim_{\Delta A \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta F_{0 \rightarrow 1}}{\Delta A_{0 \rightarrow 1}} \right)_{N, V, T} \quad (26)$$

Zaburzenie układu stosowane w metodzie TA nie wpływa na próbkowanie symulowanego układu, a symulacje mogą być przeprowadzane zarówno metodą Monte Carlo jak i dynamiki molekularnej. Gloor i współpracownicy [12] zaproponowali także ulepszoną odmianę metody TA, która tworzy jednocześnie dwa stany zaburzone z jednego stanu wyjściowego 0.

Zaletą metody TA w stosunku do metody Bennetta opartej na podobnych założeniach jest to, iż pozwala obliczyć wartość napięcia międzyfazowego z pojedynczej symulacji komputerowej. Metoda Bennetta jak i metoda TA mogą być z łatwością wykorzystywane w układach oddziałujących za pomocą nieciągłych potencjałów oraz w układach z oddziaływaniami niesferycznymi. Metoda TA zastosowana została przez Gloora i wsp. [12] do obliczenia napięcia międzyfazowego między cieczą i gazem, a wyniki odniesiono do metody Kirkwooda-Buffa. Biscay i in. [13] badali zależność napięcia międzyfazowego od ciśnienia dla granicy faz metan / woda. Symulacje przeprowadzono w układzie o stałej liczbie cząsteczek N , ciśnieniu prostym do płaszczyzny granicy faz p_n , powierzchni międzyfazowej A i temperaturze T . Autorzy stwierdzili, że jest to najlepszy układ termodynamiczny do badania zależności napięcia międzyfazowego od ciśnienia. (Uwzględnienie wpływu oddziaływań dalekiego zasięgu na wartość napięcia międzyfazowego było rzędu 2%.)

4.4. ZESPÓŁ ROZSZERZONY

Napięcie międzyfazowe można również obliczyć przeprowadzając symulację w zespole rozszerzonym (ang. *expanded ensemble*) [14]. Idea tej metody polega na połączeniu dwóch badanych układów poprzez serię podukładów, które stopniowo przekształcają jeden badany zespół w drugi i *vice versa*. Wcześniej symulacje w zespole rozszerzonym były stosowane do obliczania potencjału chemicznego [15, 16]. Natomiast Errington i Kofke [17] jako pierwsi zaproponowali zastosowanie tej metody do obliczenia napięcia międzyfazowego. W tym celu łączy się dwa układy o różnych powierzchniach granicy faz od minimalnej wartości A_0 do maksymalnej A_M , ale z identyczną liczbą cząsteczek, objętością oraz temperaturą poprzez serię podukładów, w których liniowo zwiększa się powierzchnię granicy faz od w serii M -kroków o wartości ΔA (Rys. 5).



Rysunek 5. Seria podukładów o identycznej objętości ale różnej powierzchni granicy faz, tworząca zespół rozszerzony

Figure 5. The expanded ensemble scheme: two systems with different interfacial area and the same volume connected through the series of subensembles

Symulacje przeprowadza się metodą Monte Carlo w zespole kanonicznym rozbudowanym o możliwość próbnego przejścia z jednego podukładu w drugi. Przejście pomiędzy podukładami, podobnie jak pomiędzy konfiguracjami, jest akceptowane zgodnie z warunkiem Metropolisia. Napięcie międzyfazowe obliczane jest z następującego wzoru opartego na termodynamicznej definicji napięcia międzyfazowego:

$$\gamma = \left(\frac{\Delta F}{\Delta A} \right)_{N,V,T} = \left(\frac{F_M - F_0}{A_M - A_0} \right)_{N,V,T}, \tag{27}$$

gdzie różnica powierzchni między badanymi układami $A_M - A_0$ wynosi $M\Delta A$, a różnicę energii swobodnej oblicza się z wzoru

$$F_M - F_0 = -kT \ln \left(\frac{H_M}{H_0} \right) \tag{28}$$

w którym H_M i H_0 są odpowiednio liczbami konfiguracji w podukładach o powierzchniach A_M i A_0 w szeregu wygenerowanych konfiguracji. Stosunek H_M/H_0 odpowiada stosunkowi prawdopodobieństwa wystąpienia podukładu M do podukładu 0 w symulacji w zespole rozszerzonym.

4.5. FUNKCJA FALI KAPILARNEJ

Lokalne fluktuacje gęstości występują w makroskopowo jednorodnych cieczach, ale ze względu na to, że są niewielkie, zaniebujemy je w opisie równowagowej termodynamiki statystycznej. Wyjątkiem są ciecze w pobliżu punktu krytycznego oraz granicy faz ciecz / gaz lub ciecz / ciecz. Fluktuacje gęstości zachodzące na powierzchni granicy faz mogą być opisane za pomocą teorii opartej na funkcji fali kapilarnej (ang. *Capillary Wave Theory*, CWT) [18–23]. Rozważany jest układ z kwadratową, planarną granicą faz o powierzchni $A = L^2$ równoległą do kierunków x i y . Powierzchnia $\zeta(x, y)$ oddzielająca fazy ma średnią wysokość $z = 0$. Zakłada się,

że opis fluktuacji gęstości uzyskuje się poprzez nałożenie rozkładu fal kapilarnych na profil gęstości

$$\begin{aligned}\rho_b(z) &= \rho^l & z < \langle \zeta \rangle = 0 \\ \rho_b(z) &= \rho^g & z > \langle \zeta \rangle = 0,\end{aligned}\quad (29)$$

gdzie ρ^l i ρ^g oznaczają odpowiednio gęstości liczbowe cieczy i gazu, a $\langle \zeta \rangle$ jest średnią wysokością płaszczyzny rozdzielającej fazy $\zeta(\mathbf{s})$, gdzie \mathbf{s} jest rzutem punktu \mathbf{r} w przestrzeni na płaszczyznę x, y . Fale kapilarne powodują oscylacje ζ , które można opisać następująco:

$$\zeta(\mathbf{s}) = \sum_q \alpha(q) e^{iq\mathbf{s}}, \quad \alpha(0) = 0 \quad (30)$$

gdzie α jest amplitudą fali kapilarnej, a q to jej liczba falowa. Prawdopodobieństwo wystąpienia określonej amplitudy $\alpha(q)$ spełnia rozkład Boltzmanna. Średnia kwadratowa amplituda jest określona przez wyrażenie $(2a^{-2} + q^2)^{-1}$, co prowadzi do wzoru na średnią kanoniczną kwadratu fluktuacji wartości ζ

$$\langle \zeta^2 \rangle = \frac{k_B T}{\gamma_{cw} A} \sum_{q>0} (2a^{-2} + q^2)^{-1} \quad (31)$$

W powyższym równaniu γ_{cw} oznacza napięcie międzyfazowe otrzymane metodą CWT. Najmniejsza długość fali kapilarnej wynosi l . Przyjmuje się, że jest ona rzędu średnicy cząsteczki. Natomiast L jest maksymalną długością fali kapilarnej. W symulacjach komputerowych przyjmuje się, że L jest równe długości boku boksu równoległego do płaszczyzny granicy faz. W ten sposób otrzymuje się wartości minimalnej i maksymalnej liczby falowej

$$q_{\min} = 2\pi/L \quad q_{\max} = 2\pi/l \quad (32)$$

Przeprowadzenie sumowania we wzorze (30) metodą całkowania prowadzi do równania, które opisuje zależność pomiędzy średnią kanoniczną kwadratu fluktuacji powierzchni granicy faz $\langle \zeta^2 \rangle$ i napięciem międzyfazowym γ_{cw}

$$\langle \zeta^2 \rangle = \frac{k_B T}{4\pi\gamma_{cw}} \ln \left(\frac{1 + 2(\pi a/l)^2}{1 + 2(\pi a/L)^2} \right) \quad (33)$$

Występująca w powyższym wzorze zmienna a

$$a^2 = 2\gamma_{cw} / mg(\rho^l - \rho^g) \quad (34)$$

zwana jest stałą kapilarną lub długością kapilarną cieczy, g oznacza stałą grawitacji. Jeśli zaniedbany zostanie efekt grawitacyjny, czyli gdy $g \rightarrow 0$, co jest dobrym przy-

bliznieniem w przypadku skali odległości występujących w symulacjach komputerowych, to otrzymuje się

$$\langle \zeta^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\pi\gamma_{cw}} \ln\left(\frac{L}{l}\right) \quad (35)$$

Teoria funkcji fali kapilarnej została wykorzystana do obliczania napięcia międzyfazowego przez wielu badawczy [24–30]. Używano różnych metod w celu oszacowania wartości średniej kanonicznej kwadratu fluktuacji powierzchni granicy faz $\langle \zeta^2 \rangle$. Zakładano różne wartości minimalnej długości fali wahające się w przedziale od 0,4 nm do 0,9 nm. Wyniki w niektórych przypadkach były bliskie wartościom eksperymentalnym, ale zwykle odbiegały od wyników obliczonych z teorii Kirkwooda-Buffa. Warto zauważyć, że choć funkcji fali kapilarnej a dobrze opisuje naturę obszaru międzyfazowego, to nie zawsze pozwala precyzyjnie obliczyć wartość napięcia międzyfazowego, a wyniki nie są zgodne z otrzymanymi metodą Kirkwooda-Buffa. Problem ten, jak wyjaśnili Jorge i Cordeiro [31], może wynikać z tego, że metoda pozwalająca oszacować wartość parametru $\langle \zeta^2 \rangle$ nie jest dobrze i jednoznacznie ustalona, podobnie jak i sposób obliczania minimalnej długości fali kapilarnej. Weeks [32] zaproponował hybrydową metodę polegającą na nałożeniu profilu gęstości międzyfazowej otrzymanej z kapilarnego rozszerzania na wewnętrzny profil gęstości. Całkowita grubość granicy faz wt może być określona jako pierwiastek z sumy kwadratów kapilarnej szerokości fali w_{cw} oraz wewnętrznej szerokości granicy faz w_i (ang. *intrinsic width*)

$$w_t = \sqrt{w_i^2 + w_{cw}^2} \quad (36)$$

Metoda ta została zastosowana do badania granicy faz ciecz / ciecz przez Senapataia i Berkowitza [33], którzy zaproponowali również sposób na obliczenie napięcia międzyfazowego bez konieczności oszacowania minimalnej długości fali kapilarnej l . Metoda ta wymaga wykonania co najmniej dwóch symulacji, w których różna jest powierzchnia obszaru międzyfazowego. Dla dwóch symulacji I i II wzór na napięcie międzyfazowe przyjmuje postać

$$\gamma_{cw} = \frac{k_B T}{2\pi(\langle \zeta_I^2 \rangle - \langle \zeta_{II}^2 \rangle)} \ln\left(\frac{L_I}{L_{II}}\right) \quad (37)$$

Dzięki tym poprawkom uzyskano zgodność wartości napięcia międzyfazowego otrzymanych z teorii CWT i metody Kirkwooda-Buffa.

4.6. METODA KWADRATU GRADIENTU

Napięcie międzyfazowe można obliczyć również z teorii kwadratu gradientu (ang. *Square Gradient Theory*, SGT) [34–36]. Teoria SGT została opracowana przez van der Waalsa [37]. Zgodnie z nią stężenia składników w obszarze międzyfazowym spełniają zasadę minimalnej energii swobodnej Hemholtza. Przyjmując założenie, że molekularny gradient jest niewielki w stosunku do odległości pomiędzy cząsteczkami, w teorii gradientu rozwija się energię swobodną w szereg Taylora względem stanu homogenicznego i obcina szereg na członie drugiego rzędu

$$F = \int_V \left[F_0(n) + \sum_i \sum_j \frac{1}{2} c_{ij} \nabla \rho_i \nabla \rho_j \right] dV \quad (38)$$

gdzie $\nabla \rho_i$ oznacza lokalny gradient gęstości liczbowej składnika i . Ze względu na brak potencjału zewnętrznego, energia swobodna układu heterogenicznego może zostać wyrażona jako suma dwóch składowych: energii swobodnej homogenicznej cieczy $F_0(\rho)$ o gęstości ρ oraz poprawki, którą jest funkcja lokalnych gradientów gęstości. Współczynnik c_{ij} opisuje tzw. parametr wpływu, którego fizyczna interpretacja związana jest z molekularną strukturą granicy faz. Ma on istotny wpływ na odpowiedź gradientu gęstości na lokalne odstępstwa potencjału chemicznego względem fazy objętościowej [38]. Zgodnie z zasadą minimalnej energii swobodnej przyjętą w równaniu (38) w przypadku płaskiej granicy faz oraz przy założeniu, że zależność parametru wpływu c_{ij} od gęstości można zaniedbać [39–41], gęstości równowagowe $\rho_i(z)$ muszą spełnić następujące równania Eulera-Lagrange:

$$\sum_j c_{ij} \frac{d^2 \rho_j}{dz^2} = \mu_i^0(\rho_1, \dots, \rho_N) - \mu_i \quad (39)$$

$$\equiv \mu_i(\rho_1, \dots, \rho_N) \quad \text{dla } i, j = 1 \dots N \quad (40)$$

gdzie $\mu_i^0 \equiv (\partial f_0 / \partial \rho_i)_{T, V, n_j}$, a μ_i oznacza potencjał chemiczny i -tego składnika w koegzystujących fazach objętościowych. Powyższy układ równań, który pozwala obliczyć profil gęstości każdego ze składników, można rozwiązać korzystając z metody Galerkin [36]. Kiedy znane są profile gęstości, napięcie międzyfazowe można obliczyć z poniższego równania

$$\gamma = \int_{-\infty}^{+\infty} \sum_i \sum_j c_{ij} \frac{d\rho_i}{dz^2} \frac{d\rho_j}{dz^2} dz \quad (41)$$

$$= \int_{-\infty}^{+\infty} 2 \left[f_0(n) - \sum_i \rho_i \mu_i + p \right] dz \quad (42)$$

Gdy równowaga fazowa zostanie osiągnięta, teoria gradientu wymaga jedynie podania gęstości energii swobodnej układu homogenicznego oraz parametrów wpływu dla niejednorodnej cieczy. Teoria gradientu pozwala przewidzieć właściwości fazy ciekłej jak również obszaru międzyfazowego.

Metoda kwadratu gradientu została wykorzystana przez Miqueu i in. [42] do badania właściwości granicy faz metan / woda zastosowana w symulacji Monte Carlo. Parametr wpływu c_{ij} obliczyli korzystając ze wzoru zaproponowanego przez Careya [43]

$$c_{ij} = \beta_{ij} \sqrt{c_i c_j} \quad (43)$$

gdzie β_{ij} jest regulowanym parametrem wzajemnego oddziaływania z zakresu 0–1, natomiast wartości samych parametrów wpływu c_i oraz c_j można otrzymać z teoretycznych wyrażeń [38, 44], które wymagają znajomości bezpośredniej funkcji korelacji cieczy jednorodnej. Zwykle jednak funkcje korelacji dla rzeczywistych układów nie są znane, dlatego parametry wpływu c_i i c_j szacuje się w oparciu o wartości eksperymentalne lub symulacyjne. Miqueu i in. [42] oszacowali parametry wpływu w oparciu o wartości eksperymentalne napięcia międzyfazowego przyjmując $\beta_{ij} = 0,75$. W ten sposób, za pomocą teorii gradientu i symulacji Monte Carlo, udało się odtworzyć wartości napięcia międzyfazowego zgodne z wartościami eksperymentalnymi dla szerokiego zakresu ciśnień. Müller i in. [45] również wykorzystali formalizm teorii kwadratu gradientu do obliczenia napięcia międzyfazowego dla trzech układów: heksan / dekan, ditlenek węgla / dekan oraz etan / eikozan. Parametr c_{ij} został wyznaczony zgodnie ze sposobem zaproponowanym przez Careya [43] z dopasowania do wartości eksperymentalnych napięcia międzyfazowego. Wykazano, że napięcie międzyfazowe maleje wraz ze wzrostem ułamka molowego składnika bardziej lotnego.

5. OCENA PRZEDSTAWIONYCH METOD

Najszerzej stosowana metoda Kirkwooda-Buffa opiera się na funkcji wiralnej, którą w przypadku symulacji stochastycznych (np. metoda Monte Carlo) należy dodatkowo obliczać, co znacząco wpływa na wydajność programu symulacyjnego. Metoda ta jest wrażliwa na niewielkie fluktuacje gęstości [9] i nie sprawdza się w przypadku symulacji w układzie kanonicznym [2]. Zastosowanie jej jest szczególnie trudne w przypadku układów, w których cząsteczki oddziałują poprzez nieciągły potencjał lub oddziaływania są niesferyczne [12].

Wartości napięcia międzyfazowego dla granicy faz ciecz / gaz otrzymane przez Gloora i in. [12] za pomocą metody TA były o około 12% wyższe od wartości obliczonych metodą Kirkwooda-Buffa. Biscay i in. [13] badali zależność napięcia międzyfazowego od ciśnienia. Uśrednione po ciśnieniu wartości napięcia międzyfazowego dla granicy faz metan / woda otrzymane metodą TA i Kirkwooda-Buffa różniły się

odpowiednio o 7% i 8% od wartości eksperymentalnych. Obydwie metody uzupełnione zostały o poprawki uwzględniające oddziaływania dalekiego zasięgu. Większe różnice zaobserwowano między krzywymi zależności napięcia międzyfazowego od ciśnienia dla poszczególnych metod, jak również pomiędzy wynikami symulacyjnymi a wartościami eksperymentalnymi. Errington i Kofke [17] porównali techniki obliczania napięcia międzyfazowego oparte o definicję termodynamiczną. Porównana została precyzja i wydajność metody Benneta, metody TA oraz zaproponowanej przez autorów metody wyznaczenia napięcia międzyfazowego z symulacji w zespole rozszerzonym. Zwrócili uwagę na to, iż metoda TA powinna być stosowana ze szczególną rozważą, ponieważ otrzymane wartości napięcia międzyfazowego dla kwadratowej studni potencjału okazują się niewłaściwe bez względu na wartość ΔA . Metoda TA z pojedynczymi perturbacjami zawodzi również w przypadku potencjału Lennarda-Jonesa, jeśli ΔA jest stosunkowo duże. Dla porównania, stosując metodę Benneta jak i symulacje w układzie rozszerzonym otrzymano zgodne i powtarzalne wyniki bez względu na wykorzystany model oddziaływań. Metoda Benneta wymaga jednak przeprowadzenia co najmniej dwóch symulacji w celu wyznaczenia wartości napięcia międzyfazowego.

Zwykle wartości napięcia międzyfazowego otrzymane z funkcji fali kapilarnej są znacząco niższe od obliczonych metodą Kirkwooda-Buffa [24, 25]. Zastosowanie hybrydowej teorii zaproponowanej przez Weeksa [32] oraz Senaptia i Berkowitza [33] poprawia zgodność wyników obliczonych metodami CWT i Kirkwooda-Buffa. Tak zmodyfikowaną metodę CWT wykorzystali Jorge i in. [31, 46] do badań granicy faz pomiędzy wodą i nitrobenzenem oraz pomiędzy wodą i kwasem organicznym. Otrzymali dobrą zgodność wartości napięcia międzyfazowego otrzymanego metodą CWT i Kirkwooda-Buffa, jednakże uzyskane wartości dla granicy woda / kwas organiczny były o 50% wyższe od wyznaczonych eksperymentalnie. Nicolas i de Souza [47] obliczyli napięcie międzyfazowe występujące pomiędzy *n*-heksanem i wodą korzystając z teorii Kirkwooda-Buffa. Uzyskali dobrą zgodność z wynikami eksperymentalnymi (różnica poniżej 10%). Wykazali niezgodność pomiędzy rzeczywistą grubością granicy faz, a otrzymaną z teorii CWT.

Müller i wsp. [45] porównali wyniki otrzymane metodą kwadratu gradientu z wartościami eksperymentalnymi jak i z uzyskanymi metodą TA. Otrzymano dobrą zgodność pomiędzy wynikami otrzymanymi metodą kwadratu gradientu i metodą TA. Średnia bezwzględna różnica pomiędzy wynikami nie przekroczyła 5,56%. Należy jednak zauważyć, że parametr wpływu w metodzie kwadratu gradientu wymaga oszacowania zgodnie z równaniem (43) zaproponowanym przez Careya [43] tak, aby móc dopasować obliczone wyniki napięcia międzyfazowego do danych eksperymentalnych.

Ghoufi i Malfreyt [3] oraz Biscay i in. [13] stwierdzili, że symulacje dwufazowych układów są trudne do realizacji i mogą być wrażliwe na szereg czynników takich, jak efekty związane z ograniczonymi rozmiarami boksu symulacyjnego [13, 17, 48, 49], zakresem oddziaływań [50–53], efektem obciążenia [50, 54–56],

a także wyborem metody symulacyjnej (Monte Carlo lub dynamika molekularna). Wszystkie te czynniki mają wpływ na wartość napięcia międzyfazowego. Dodatkowo wpływ ma wybór definicji napięcia międzyfazowego [12, 55, 57] oraz poprawki na oddziaływania dalekiego zasięgu [43, 52, 54–58].

Badania symulacyjne granicy faz pomiędzy cieczeniami dają wgląd w zjawiska powierzchniowe na poziomie molekularnym. Podstawową wielkością stosowaną w opisie granicy faz jest napięcie międzyfazowe. Przedstawiono szereg metod pozwalających obliczać wartość napięcia międzyfazowego, różniących się założeniami, efektywnością oraz zakresem zastosowania. Powyższy przegląd ukazuje złożoność zagadnienia, a także rolę jaką pełni właściwy dobór metody.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S. Lamperski, *Metody symulacyjne w chemii fizycznej*, Wydział Chemii UAM, 2005.
- [2] A.R. van Buuren, S.J. Marrink, H.J.C. Berendsen, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 9206.
- [3] A. Ghoufi, P. Malfreyt, *Phys. Rev. E*, 2010, **82**, 016706.
- [4] M. Meyer, M. Mareschal, M. Hayoun, *J. Chem. Phys.*, 1988, **89**, 1067.
- [5] J. Ościk, *Adsorpcja*, PWN, Warszawa, 1979.
- [6] J.G. Kirkwood, F.P. Buff, *J. Chem. Phys.*, 1949, **17**, 338.
- [7] J. Goodisman, *Electrochemistry: Theoretical Foundations*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [8] T.L. Hill, *Statistical Thermodynamics*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1962.
- [9] E. Diaz-Herrera, J. Alejandro, G. Ramirez-Santiago, F. Forstmann, *J. Chem. Phys.*, 1999, **110**, 8084.
- [10] C.H. Bennett, *J. Comput. Phys.*, 1976, **22**, 245.
- [11] J. Miyazaki, J.A. Barker, G.M. Pound, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 3364.
- [12] G.J. Gloor, G. Jackson, F.J. Blas, E. de Miguel, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 134703.
- [13] F. Biscay, A. Ghoufi, V. Lachet, P. Malfreyt, *J. Chem. Phys.*, 2009, **131**, 124707.
- [14] A.P. Lyubartsev, A.A. Martynovskii, S.V. Shevkunov, P.N. Vorontsov-Velyaminov, *J. Chem. Phys.*, 1992, **96**, 1776.
- [15] A.P. Lyubartsev, O.K. Forrissdahl, A. Laaksonen, *J. Chem. Phys.*, 1998, **108**, 227.
- [16] J.R. Errington, G.C. Boulougouris, I.G. Economou, A.Z. Panagiotopoulos, D.N. Theodorou, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 8865.
- [17] J.R. Errington, D.A. Kofke, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 174709.
- [18] J.D. van der Waals, *J. Stat. Phys.*, 1979, **20**, 197.
- [19] J.D. van der Waals, *Verhandel. Konink. Akad. Wet.*, Amsterdam (Sect. 1)1, No. 8, 56pp., 1893.
- [20] J.S. Rowlinson, B. Widom, *Molecular Theory of Capillarity*, Clarendon, Oxford, 1982.
- [21] F. Buff, R. Lovett, R. Stillinger, F. Stillinger, *Phys. Rev. Lett.*, 1965, **15**, 621.
- [22] M.S. Wertheim, *J. Chem. Phys.*, 1976, **65**, 2377.
- [23] J.D. Weeks, *J. Chem. Phys.*, 1977, **67**, 3106.
- [24] D. Michael, I.J. Benjamin, *Electroanal. Chem.*, 1998, **450**, 335.
- [25] I.J. Benjamin, *Chem. Phys.*, 1992, **97**, 1432.
- [26] D. Michael, J. Benjamin, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 1530.
- [27] K.J. Schweighofer, I. Benjamin, *J. Electroanal. Chem.*, 1995, **391**, 1.
- [28] P.A. Fernandes, M.N.D.S. Cordeiro, J.A.N.F. Gomes, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 6290.
- [29] S.R.P. da Rocha, K.P. Johnston, R.E. Westacott, J.P. Rossky, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 12092.
- [30] M.N.D.S. Cordeiro, *Mol. Simul.*, 2003, **29**, 817.
- [31] M. Jorge, M.N.D.S. Cordeiro, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 17612.

- [32] J.D. Weeks, *J. Chem. Phys.*, 1981, **52**, 7182.
- [33] S. Senapati, M.L. Berkowitz, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **87**, 176101.
- [34] B.S. Carey, *Ph.D. Thesis The gradient theory of fluid interfaces*, University of Minnesota: Minneapolis, MN, 1979.
- [35] H.T. Davis, L.E. Scriven, *Adv. Chem. Phys.*, 1982, **49**, 357.
- [36] H.T. Davis, *Statistical mechanics of phases, interfaces and thin films*, Wiley-VCH, New York, 1998.
- [37] J.D. van der Waals, *Zeit. Phys. Chem.*, 1893, **13**, 657.
- [38] V. Bongiorno, L.E. Scriven, H.T. Davis, *J. Colloid Interface Sci.*, 1976, **57**, 462.
- [39] B.F. McCoy, H.T. Davis, *Phys. Rev. A*, 1979, **20**, 1201.
- [40] B.S. Carey, L.E. Scriven, H.T. Davis, *AIChE J.*, 1980, **26**, 705.
- [41] C. Miqueu, B. Mendiboure, A. Garciaa, A. Lachaise, *J. Fluid Phase Equilib.*, 2003, **207**, 225.
- [42] C. Miqueu, J.M. Míguez, M. M. Piñeiro, Thomas Lafitte, Bruno Mendiboure, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115** (31), 9618.
- [43] M. Guo, B.C.Y. Lu, *J. Chem. Phys.*, 1997, **106**, 3688.
- [44] A.J.M. Yang, P.D.I. Fleming, J.H. Gibbs, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**(9), 3732.
- [45] E.A. Müller, A. Mejía, *Fluid Phase Equilibria*, 2009, **282**, 68.
- [46] M. Jorge, M.N.D.S. Cordeiro, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2415.
- [47] J.P. Nicolas, N.R. de Souza, *J. Chem. Phys.*, 2004, **120**, 2464.
- [48] P. Orea, J. Lopez-Lemus, J. Alejandre, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 114702.
- [49] M. Gonzales-Melchor, P. Orea, J. Lopez-Lemus, F. Bresme, J. Alejandre, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 094503.
- [50] A. Trokhymchuk, J. Alejandre, *J. Chem. Phys.*, 1999, **111**, 8510.
- [51] J. Lopez-Lemus, J. Alejandre, *Mol. Phys.*, 2002, **100**, 2983.
- [52] F. Goujon, P. Malfreyt, A. Boutin, A.H. Fuchs, *J. Chem. Phys.*, 2002, **116**, 8106.
- [53] P. Grosfils, J.F. Lutsko, *J. Chem. Phys.*, 2009, **130**, 054703.
- [54] F. Goujon, P. Malfreyt, J.M. Simon, A. Boutin, B. Rousseau, A.H. Fuchs, *J. Chem. Phys.*, 2004, **121**, 12559.
- [55] C. Ibergay, A. Ghoufi, F. Goujon, P. Ungerer, A. Boutin, B. Rousseau, P. Malfreyt, *Phys. Rev. E*, 2007, **75**, 051602.
- [56] F. Goujon, C. Bonal, P. Malfreyt, *Mol. Simul.*, 2009, **35**, 538.
- [57] A. Ghoufi, F. Goujon, V. Lachet, P. Malfreyt, *Phys. Rev. E*, 2008, **77**, 031601.
- [58] V.K. Shen, R.D. Mountain, J.R. Errington, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 6198.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 grudnia 2013

METODY WYKORZYSTYWANE DO WIZUALIZACJI ŚLADÓW LINII PAPILARNYCH

METHODS USED TO VIZUALIZE LATENT FINGERPRINTS

**Emilia Karolina Kołek-Kaczanowska, Joanna Kreczko,
Zbigniew Maćkiewicz**

*Wydział Chemii, Pracownia Chemii Polipeptydów, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Rodzaje śladów linii papilarnych
2. Skład substancji potowo-tłuszczowej
3. Metody chemiczne
4. Metody fizyczne
5. Metody fizykochemiczne

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Emilia Karolina Kołek-Kaczanowska – urodziła się w 1982 roku w Nowym Dworze Gdańskim. W latach 2001–2006 studiowała chemię na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2006 roku uzyskała tytuł magistra chemii i rozpoczęła służbę w Policji. W 2008 roku podjęła pracę w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Wojewódzkiej Policji w Gdańsku. Obecnie jest słuchaczką Studiów Doktoranckich chemii i biochemii przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Pracowni Chemii Polipeptydów, gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Maćkiewicza prowadzi badania nad zastosowaniem barwników fluorescencyjnych do kontrastowania śladów linii papilarnych ujawnionych metodą cyjanoakrylową.

Mgr Joanna Kreczko – urodzona w 1984 roku, absolwentka pięcioletnich studiów magisterskich na kierunku Ochrona Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dyplom magistra obroniła w 2008 roku. Ponadto ukończyła Międzywydziałowe Studia Podyplomowe – Współczesne metody analityki z elementami diagnostyki molekularnej (dyplom uzyskany w 2010 roku). Obecnie doktorantka na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz – urodził się w 1953 roku. W październiku 1973 roku rozpoczął studia na Wydziale Mat-Fiz-Chem na kierunku chemia. Od 1977 roku jest pracownikiem Katedry Chemii Organicznej. Obecnie jest kierownik Pracowni Chemii Polipeptydów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Prof. dr hab. Zbigniew Makiewicz jest autorem i współautorem około 100 publikacji oraz ponad 200 komunikatów, był opiekunem 10 prac doktorskich.

ABSTRACT

Dactyloscopy as one of the branches of forensic science deals with fingerprints identification of the individual human being. Fingerprints are in general invisible, therefore in order to set about the identification, we have to make them evident. To reveal hidden fingerprints, criminological technology uses physical methods, chemical reactions and even some biological processes. In this review, we present a set of methods that is being used in criminology to reveal fingerprints and other hidden traces.

In search for potential fingerprints, objects are exposed to natural and artificial light sources since visual methods are most commonly used by criminology technicians. Further methods for revealing fingerprints are selected on the basis of type of surface, the trace was left on, and the substance forming the fingerprint. In his article we present the set of methods, commonly used to reveal fingerprints, featuring physical, chemical and physicochemical approaches [6].

Chemical methods: DFO, 1,2-IND and Ninhydrin used for revealing fingerprints on absorptive surfaces, Amido Black, Hungarian Red, DAB and LCV used for detecting bloody fingerprints, DMAC used for revealing fingerprints on temperature-felt papers, RTX dioxide of ruthenium used to absorptive and nonabsorptive surfaces [9, 11, 14, 19, 22, 24, 26, 28, 30].

Next, we present physical methods among others optical methods which are helpful in revealing fingerprints for the naked eye and (if needed) enlarging optical devices. To achieve acceptable visibility, criminologists use various kinds of lamps and filters. Subsequently we present methods based on adhesion, that are based on adjoining the powder or suspension to sudoral-fatty substance. We present here methods based on the use of dactyloscopic powders, crystal violet which is appearing in the form of dark-green powder, SPR (Small Particle Reagent) – suspension of black MoS₂ powder, Sticky-side Powder which composition is accessing iron oxide and aluminum, Wet Powder Black, composed of iron oxide and Wet Powder White (titanium dioxide). Tape-Glo (ready-made red-orange solution), Sudan Black B (in the solid state it is a powder of the black colour), Liquid-drox (yellow solution), fluorescent dyes: Ardrex P133D, Safranin O, chelate of europium and Basic Yellow 40 [31, 34–38].

The other methods are physicochemical methods: cyanoacrylate, iodine, physical developer and multi metal deposition [42, 45, 46].

As a result of technological development newer methods of visualizing latent fingerprints appear, replacing those previously used. Improvement of the methods of revealing latent fingerprints leads to better readability and in effect, makes police work easier.

Keywords: fingerprints, dactyloscopy, revealing, visualization

Słowa kluczowe: ślady linii papilarnych, daktyloskopia, ujawnianie, wizualizacja

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DAB	- tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzydyny (ang. <i>3,3'-biphenyltetramine tetrahydrochloride</i>)
DFO	- 1,8-diazafluoren-9-on (ang. <i>1,8-diazafluoren-9-one</i>)
DMAC	- aldehyd 4-dimetyloaminocynamonowy (ang. <i>4-dimethylaminocinnamaldehyde</i>)
ECA	- 2-cyanoakrylan etylu (ang. <i>ethyl-2-cyanoacrylate</i>)
LCV	- fiolet leukokrystaliczny (ang. <i>leucocrystal violet</i>)
MCA	- 2-cyanoakrylan metylu (ang. <i>methyl-2-cyanoacrylate</i>)
MMD	- osadzanie wielometalowe (ang. <i>multi metal deposition</i>)
PD	- wywołувacz fizyczny (ang. <i>physical developer</i>)
RTX	- tetratlenek rutenu(VIII) (ang. <i>ruthenium tetroxide</i>)
SPC	- środek powierzchniowo czynny
SPR	- disiarczek molibdenu(IV) (ang. <i>small particle reagent</i>)
TEC	- chelat europu (ang. <i>thenoyl europium chelate</i>)
TTA	- 5-tienoilotrifluoroaceton (ang. <i>5-thenoyltrifluoroacetone</i>)
1,2-IND	- 1,2-indandion (ang. <i>1,2-indandione</i>)
5-MTN	- 5-metylotioninhydryna (ang. <i>5-methyltioninhydrin</i>)

WPROWADZENIE

Daktyloskopia jest jednym z działów kryminalistyki zajmującym się identyfikacją tożsamości człowieka na podstawie linii papilarnych występujących na wewnętrznych powierzchniach palców, dłoni oraz stóp. Linie papilarne to charakterystyczne układy (rysunki) listewek skórnych, rozdzielonych równoległe biegnącymi bruzdami. Różnią się między sobą długością, kierunkiem przebiegu, szerokością i kształtem.

W procesie identyfikacji przestępcy daktyloskopia wydaje się być niezastąpiona, a ślady linii papilarnych są niepodważalnym dowodem obecności sprawcy na miejscu przestępstwa. Daktyloskopia jest przy tym nauką, która wciąż się rozwija i dostarcza nowych informacji.

Aby można było przystąpić do identyfikacji daktyloskopijnej w pierwszej kolejności należy uwidocznić ślady linii papilarnych pozostawione przez przestępcę na miejscu zdarzenia. Na czytelność śladów linii papilarnych pozostawionych na miejscu przestępstwa ma wpływ rodzaj podłoża, ilość i jakość substancji potowo-tłuszczowej, sposób naniesienia śladu linii papilarnych na podłoże, warunki środowiskowe, jak również czas, jaki upłynął od powstania śladu do czasu jego ujawnienia i zabezpieczenia.

Większość śladów linii papilarnych naniesiona jest substancją potowo-tłuszczową, która wraz z biegiem czasu ulega wyschnięciu i traci właściwości adhezyjne. Na skutek tego, ślady tracą czytelność i pod wpływem czasu ulegają zanikaniu. W takich przypadkach konieczne jest uwidocznienie śladów linii papilarnych, do takiego stopnia, aby poprawić ich czytelność, która umożliwiłaby na swobodną analizę i ich badanie.

Do ujawniania śladów daktyloskopijnych stosowane są różnorodne metody, których działanie oparte jest na zjawiskach fizycznych, chemicznych i fizykochemicznych. Dobór odpowiedniej metody uzależniony jest, m.in. od rodzaju podłoża, na którym naniesione są ślady oraz rodzaju substancji tworzącej ślad.

Do metod ujawniania śladów linii papilarnych zalicza się metody chemiczne, fizyczne wśród, których wyodrębnia się zjawiska optyczne polegające na absorpcji, odbiciu światła, rozproszeniu światła i luminescencji jak i zjawisko oparte na adhezji oraz metody fizyko-chemiczne.

1. RODZAJE ŚLADÓW LINII PAPILARNYCH

Według Jana Sehna „*śladem kryminalistycznym nazywamy zmiany w obiektywnej rzeczywistości, które jako spostrzegalne znamiona po zdarzeniach będących przedmiotem postępowania mogą stanowić podstawę do odtworzenia i ustalenia przebiegu tych zdarzeń zgodnie z rzeczywistością*”, czyli śladem może być każda pozostałość po zdarzeniu, którą można spostrzec i wykorzystać do celów postępowania karnego.

Na podstawie podziału Jana Sehna ślady kryminalistyczne dzieli się na ślady materialne i ślady idealne czyli pamięciowe [1].

Standardowo wyodrębnia się następujące rodzaje śladów linii papilarnych:

- a) nawarstwione:
 - naniesione substancją potowo-tłuszczową;
 - naniesione innymi substancjami śladotwórczymi;
- b) odwarstwione;
- c) wgłębione.

Ślady nawarstwione naniesione substancją potowo-tłuszczową powstają na skutek odłączenia się od skóry i osadzenia się substancji potowo-tłuszczowej na dotykanej powierzchni przedmiotu.

Ślady nawarstwione naniesione innymi substancjami śladotwórczymi niż potowo-tłuszczowa powstają na skutek odłączenia się od skóry substancji śladotwórczej, np. krwi, smaru, kleju, sadzy i osadzenia się jej na dotykanej powierzchni przedmiotu.

Z kolei ślady odwarstwione powstają podczas dotykania powierzchni pokrytej kurzem, smarem, sadzą lub innymi substancjami. W takiej sytuacji linie papilarne zbierają substancję pokrywającą przedmiot w miejscu kontaktu z podłożem.

Tymczasem ślady wgłębione powstają podczas kontaktu palców, dłoni, stóp i innych części ciała z miękkimi podłożami, takimi jak wosk, kit, świeża farba.

2. SKŁAD SUBSTACJI POTOWO-TŁUSZCZOWEJ

Ilość i skład potu (prawidłowe wydzielanie potu nie powinno przekroczyć ok. 0,5 l dziennie) zależy od indywidualnych skłonności, stanu organizmu, wieku, diety – sposobu odżywiania, poziomu hormonów, schorzeń, chorób (przyjmowanie niektórych leków, menopauza, otyłość, zaburzenia endokrynologiczne, choroby układu nerwowego, w tym choroba Parkinsona, niektóre nowotwory i inne), płci, rasy, stresu, a także zatrucia środkami ochrony roślin, pory dnia – temperatury otoczenia, wysiłku fizycznego, liczby i rozmieszczenia kanalików potowych oraz stanu emocjonalnego [2]. Skład substancji potowo-tłuszczowej i zmiany jakie w nim zachodzą są niezwykle ważne do opracowywania coraz skuteczniejszych metod ujawniania śladów linii papilarnych.

W skład substancji potowo-tłuszczowej w największej mierze wchodzi woda około 98% a na pozostałe 2% szacuje się, aż 350 różnych związków [3].

Tabela 1. Zmodyfikowana tabela przedstawiająca organiczny skład potu ekrynowego wg Olsena [4]
 Table 1. Modified table showing organic composition of eccrine sweat according to Olsen [4]

Lp.	Nazwa związku	zawartość
1	Kwasy tłuszczowe	0,01–0,1 µg/l
2	Związki zawierające azot: A. Amoniak B. Mocznik C. Kwas moczowy D. Cholina E. Kreatyna F. Kreatynina G. Aminokwasy	0,5–8 mM 10–15 mM 0,3–2,59 mg/l
3	Lipidy: A. Proste a) Tłuszcze właściwe b) Woski B. Złożone a) Fosfolipidy b) Glikolipidy c) Inne lipidy złożone	0,01–0,1 µg/ml
4	Sterole, m.in. cholesterol, 7-dehydrocholesterol, estry cholesterolu	0,01–0,12 µg/ml
5	Witaminy rozpuszczalne w wodzie: C, B1, B2, B6, B11, B12, H1, PP	> 0,1 mg/100 ml

Ponadto w pocie występuje kwas pirogronowy, kwas mlekowy i glikogen, które pojawiają się w pierwszym etapie pocenia [5].

Stężenie mocznika, kwasu moczowego i aminokwasów w pocie zależy od ilości wydzielanego potu i maleje w czasie obfitego pocenia się. W skład potu wchodzi także związki nieorganiczne w postaci soli głównie chlorków sodu i potasu. Stężenie chlorku sodu to około 43–266 mg/l potu [6].

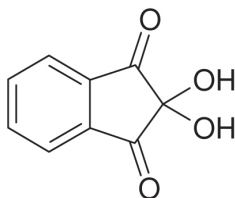
Drugim składnikiem substancji potowo-tłuszczowej jest wydzielina gruczołów łojowych, którą stanowią kwasy tłuszczowe, w tym oleinowy, stearynowy, palmitynowy oraz lipidy. Ilość lipidów na powierzchni skóry zależy od okolic ciała. Największa ich ilość występuje na twarzy i skórze głowy, natomiast na pozostałych częściach ciała więcej jest trójglicerydów i kwasów tłuszczowych pochodzących z gruczołów ekrynowych [6].

Bardzo duże znaczenie na ujawnienie śladów linii papilarnych naniesionych substancją potowo-tłuszczową ma czynnik czasu i warunki środowiskowe [7]. Jeżeli naniesiony ślad linii papilarnych na podłoże pozostaje nie ujawniony przez długi czas to środowisko powoduje odparowanie wody – głównego składnika potu i utlenianie się innych składników chemicznych. Na dodatek bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* oraz *Corynebacterium* powodują degradację składników biologicznych. Z tego powodu ujawnienie śladu linii papilarnych nadającego się do identyfikacji daktyloskopijnej jest niezmiernie trudne w miarę upływu czasu [8].

3. METODY CHEMICZNE

Metody chemiczne ujawniania śladów linii papilarnych polegają na wykorzystaniu reakcji chemicznych, które zachodzą pomiędzy odczynnikami, związkami chemicznymi a składnikami substancji potowo-tłuszczowej lub krwi. W wyniku zachodzących reakcji otrzymuje się efekty barwne w postaci śladów linii papilarnych widoczne w świetle naturalnym bądź przy użyciu odpowiednich filtrów krańcowych długofalowych.

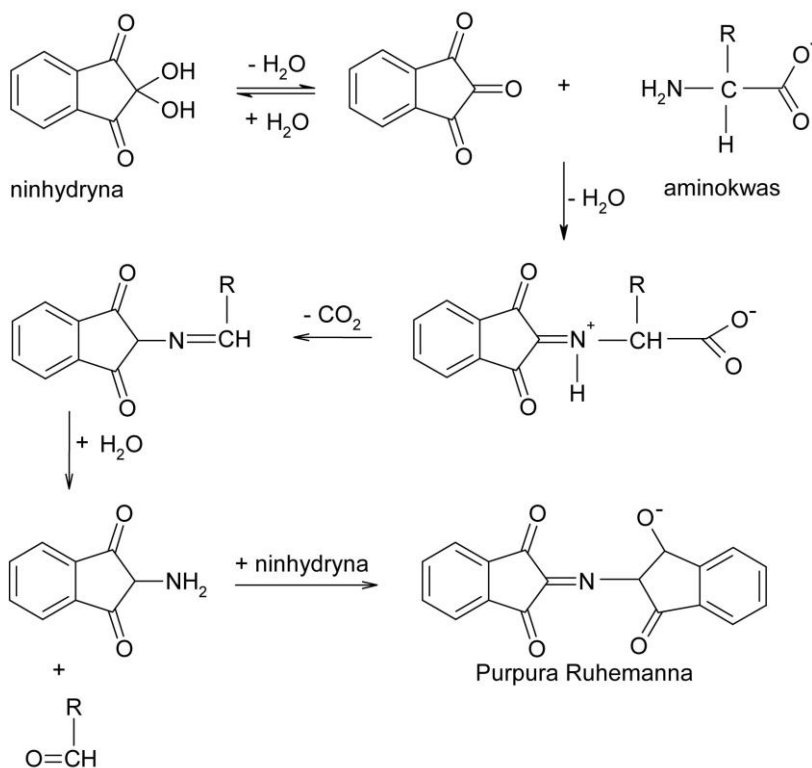
NINHYDRYNA (wodzian triketohydrindanu)



Rysunek 1. Wzór strukturalny ninhydriny
Figure 1. Chemical structure of Ninhydrin

Ninhydryna (Rys. 1) o wzorze sumarycznym $C_9H_6O_4$ została opisana pierwszy raz w 1910 roku przez Siegfrieda Ruhemanna, który zauważył, że ten nowy związek chemiczny reaguje z aminokwasami dając purpurowy, fioletowo-niebieski produkt [9]. Na podstawie tego odkrycia wydał szereg publikacji wyszczególniając poniższą reakcję (Rys. 2), której produkt znany jest dziś pod nazwą purpury Ruhemanna [140–142]. Mechanizm reakcji ninhydryny z aminokwasami opisał Friedmana i Williamsa, a jej reakcja pozwala jakościowo i ilościowo oznaczać aminokwasy [13].

Aminokwasy w reakcji ninhydryny ulegają utlenieniu, dekarboksylacji a później deaminacji. Przejściowo powstaje imina, zwana zasadą Schiffa i zredukowana ninhydryna. Następnie iminokwas w wieloetapowej reakcji przekształca się w aldehyd uboższy o jeden atom węgla w postaci 2-amino-3-hydrokso-1*H*-inden-1-onu, uwalnia się CO_2 oraz amoniak czyli aminokwasy w tym procesie tracą grupę aminową i ulegają dekarboksylacji do aldehydów krótszych o jeden atom węgla. Powstała pochodna aminoindenu reaguje z kolejną cząsteczką ninhydryny, tworząc kolejną zasadę Schiffa, tzw. purpurę Ruhemanna [14].



Rysunek 2. Schemat przebiegu reakcji ninhydryny z aminokwasami
 Figure 2. Scheme of the reaction ninhydrin with amino acid

Zależnie od rodzaju aminokwasu różna jest intensywność i odcień powstającego zabarwienia. Reakcja ninhydrynowa jest czuła i dokładna. Dodatni jej wynik dają wszystkie wolne aminokwasy w środowisku o pH > 4, dlatego reakcja ta jest powszechnie stosowana do wykazania rozdzielanych aminokwasów metodą chromatograficzną. Natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia aminokwasów, dlatego reakcja ninhydrynowa stanowi podstawę metody kolorymetrycznej, ilościowego oznaczania wolnych aminokwasów. Dodatni odczyn ninhydrynowy dają również inne związki, które zawierają grupę aminową, czyli sole amonowe, aminocukry, amoniak.

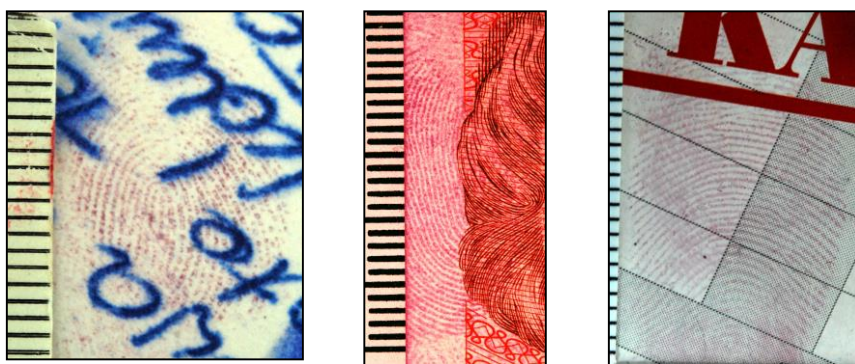
Reakcja jest charakterystyczna dla wszystkich aminokwasów oprócz:

- proliny – kolor żółty,
- hydroksyproliny – kolor różowy.

W 1954 roku dwóch szwedzkich naukowców Odén i von Hofsten wykorzystali ninhydrynę do ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach papierowych (chłonnych) [15]. W Polsce metodę tę zaczęto stosować od 1957 roku.

Ninhydryna jest organicznym, bezbarwnym, tworzącym kryształowy związek chemiczny, która w daktyloskopii wykorzystywana jest do ujawniania śladów linii

papilarnych pozostawionych na powierzchniach chłonnych, tj. papier, tektura tynk, surowe drewno. Ślady linii papilarnych ujawniają się w postaci fioletowo-niebieskich odwzorowań widocznych w świetle białym (Rys. 3–5). W pocie występuje wiele rodzajów aminokwasów i z każdym z nich reakcja ninhydrynowa ma różną czułość. W związku z tym powstałe zabarwienia posiadają różną intensywność koloru świadcząca o różnorodności i ilości aminokwasów znajdujących się w substancji potowo-tłuszczowej [16].



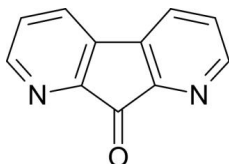
Rysunki 3–5. Odwzorowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem ninhydryny sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne

Figures 3–5. Fingerprints in repeated zoom visualized Ninhydrin, photographed in the white light. Reference – own study

Tworzenie barwnika zaczyna się w zależności od jakości śladu po około 0,5 h, biorąc pod uwagę temperaturę 20–30°C i wilgotność 50–75%. Czas ujawniania wynosi co najmniej 24 h i wydłuża się wraz z wiekiem śladów linii papilarnych. W niższych temperaturach i suchym powietrzu proces niekiedy wcale nie daje efektów barwnych. Z kolei w warunkach zbyt wilgotnych następuje rozmycie śladów w podłożu. Przyspieszenie reakcji przez podgrzewanie do 90°C lub naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym przyspiesza reakcję powodując szybkie ujawnienie śladów linii papilarnych. Następuje wtedy denaturacja białek prowadząca do zmian ich właściwości, w tym również reaktywności, na skutek rozpadu na krótsze łańcuchy, uwolnienia i uaktywnienia aminokwasów

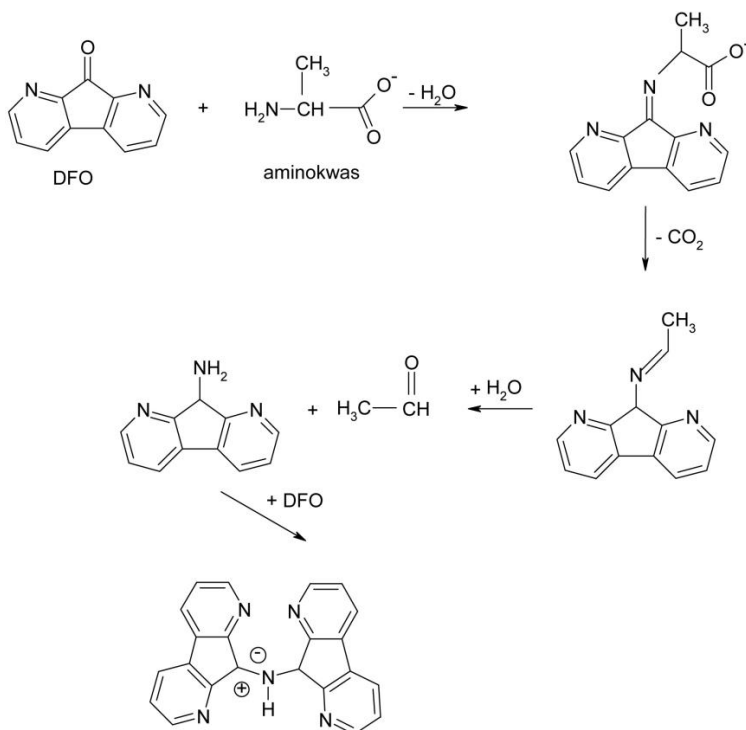
Według opublikowanych wyników badań metoda ninhydrynowa nie ma istotnego wpływu na skuteczność oznaczania DNA z próbek krwi, wobec tego nie powinna utrudnić przeprowadzenia badań biologicznych po wcześniej przeprowadzonych badaniach daktyloskopijnych [17].

DFO
(1,8-diazafluoren-9-on)



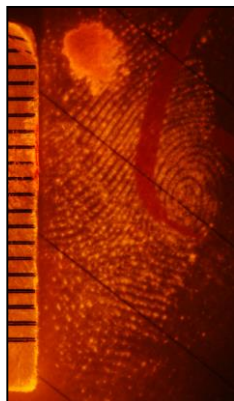
Rysunek 6. Wzór strukturalny 1,8 diazafluoren-9-on (DFO)
Figure 6. Chemical structure of DFO

Związek chemiczny 1,8-diazafluoren-9-on (Rys. 6) o wzorze sumarycznym $C_{11}H_6N_2O$ nazywany w skrócie DFO został po raz pierwszy zsyntetyzowany w 1950 roku, ale jego reaktywność z aminokwasami została odkryta dopiero w latach 90. ubiegłego stulecia [18]. DFO w stanie stałym ma postać krystaliczną, żółtą barwę i jest produktem przejściowym powstającym przy syntezie pochodnej ninhydryny. Związek ten reaguje z aminokwasami zawartymi w substancji potowo-tłuszczowej (Rys. 7), tworząc podobny do purpury Ruhemanna czerwony produkt reakcji. Czasem ślady są widoczne w świetle białym w postaci bładoróżowych odwzorowań.



Rysunek 7. Schemat przebiegu reakcji DFO z aminokwasami [19]
Figure 7. Scheme of the reaction DFO with amino acid [19].

Prawidłowe wykonanie procesu wymaga podwyższonej temperatury (90–100°C) oraz niskiej wilgotności. Reakcja zachodzi również w temperaturze pokojowej, lecz w zdecydowanie dłuższym czasie. Związek ten wykazuje fluorescencję przy wzbudzeniu promieniowaniem niebiesko-zielonym o długości fali 470–560 nm i obserwuje się przez filtr krawędziowy długofalowy jako żółto-pomarańczowy obraz śladu (Rys. 8) [19, 20].

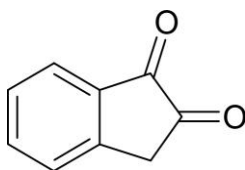


Rysunek 8. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem DFO sfotografowane w świetle niebiesko-zielonym przy wykorzystaniu filtra krawędziowego długofalowego.
Źródło – opracowanie własne

Figure 8. Fingerprint in repeated zoom visualized DFO, photographed in the blue-green light using goggle.
Reference – own study

Badania nad DFO udowodniły, że jest związkiem o wiele bardziej skutecznym przy ujawnianiu śladów linii papilarnych niż ninhydryna, dlatego zaleca się stosowanie DFO w sekwencji metod przed ninhydryną.

1,2-IND
(1,2-indandion)

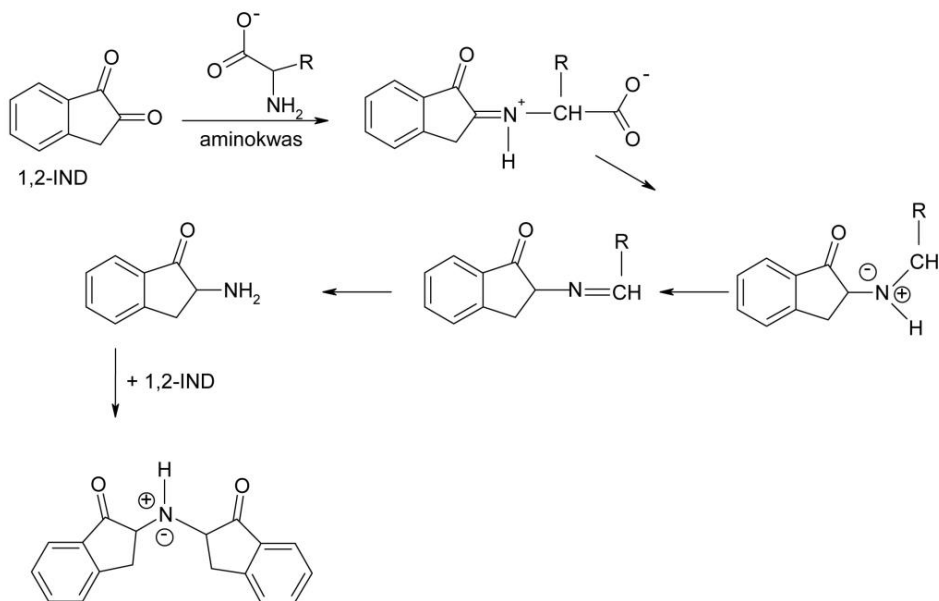


Rysunek 9. Wzór strukturalny 1,2-indandionu (1,2-IND)

Figure 9. Chemical structure of 1,2-IND

1,2-IND (Rys. 9) o wzorze sumarycznym $C_9H_6O_2$ został zsyntetyzowany w 1997 roku jako produkt przejściowy w reakcji otrzymywania pochodnej ninhydryny,

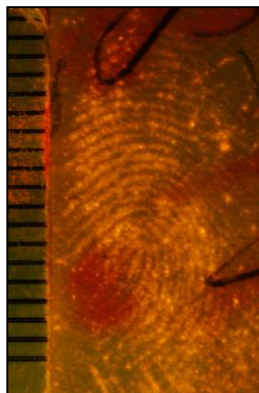
5-metylotioninhydryny (5-MTN) i wykorzystany do ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach chłonnych. 1,2-IND podobnie jak DFO i ninhydryna reaguje z aminokwasami będącymi składnikami substancji potowo-tłuszczowej (Rys. 10) [21].



Rysunek 10. Schemat przebiegu reakcji 1,2-IND-u z aminokwasami [19]

Figure 10. Scheme of the reaction 1,2-IND with amino acid [19]

W rezultacie zachodzi reakcja w wyniku, której powstaje produkt wykazujący fluorescencję przy wzbudzeniu promieniowaniem niebiesko-zielonym o długości fali 505–530 nm, który można obserwować przy zastosowaniu filtra krawędziowego długofalowego (570–590 nm) jako żółto-pomarańczowy obraz śladu linii papilarnych (Rys. 11).



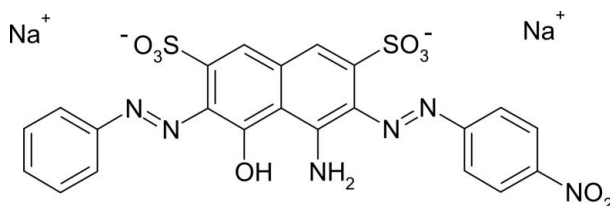
Rysunek 11. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem 1,2-IND sfotografowane w świetle niebiesko-zielonym przy wykorzystaniu filtra krawędziowego długofalowego. Źródło – opracowanie własne

Figure 11. Fingerprint in repeated zoom visualized 1,2-IND, photographed in the blue-green light using goggles. Reference – own study

Podobnie jak w DFO, może pojawić się różowe zabarwienie śladów widzialne w świetle białym, lecz znacznie słabe [22].

Niewielka różnica w działaniu DFO i 1,2-IND powoduje, że nie ma przeszkód na traktowanie 1,2-IND jako zamiennika DFO.

AMIDO BLACK

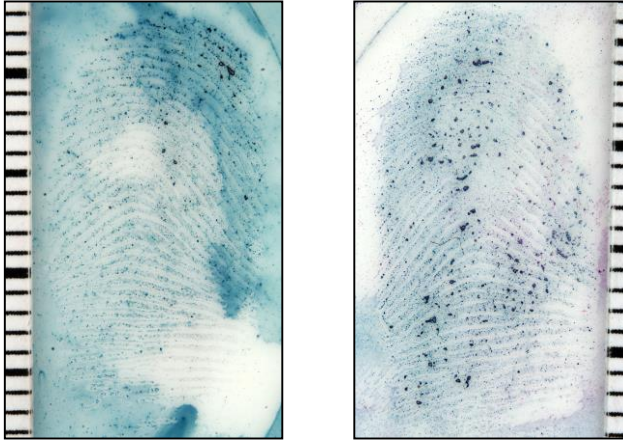


Rysunek 12. Wzór strukturalny czerni amidowej

Figure 12. Chemical structure of Amido Black

Amido Black (Rys. 12) czyli czerni amidowa o wzorze sumarycznym $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ to sól disodowa kwasu disulfonowego 4-amino-5-hydroksy-3-[(4-nitrofenyl)azo]-6-(fenylazo)-2,7-naftalenu. Związek ten stosowany jest do ujawniania lub wzmacniania śladów linii papilarnych pozostawionych krwią lub innym płynem ustrojowym. Czerni amidowa reaguje z cząsteczkami białek będącymi składnikami osocza krwi oraz innych płynów ustrojowych. Ślady linii papilarnych ujawniają się w postaci ciemnoniebieskich odwzorowań (Rys. 13–14). Metoda ta umoż-

liwia ujawnianie śladów linii papilarnych na dowolnych powierzchniach chłonnych i niechłonnych [23].



Rysunek 13–14. Odzworowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem Amido Black sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne
 Figures 13–14. Fingerprints in repeated zoom visualized Amido Black, photographed in the white light. Reference – own study

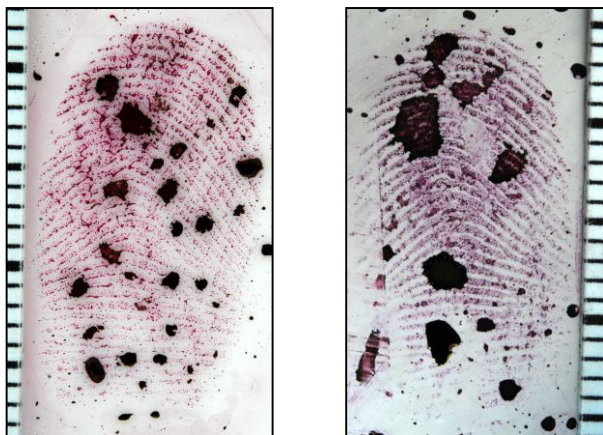
Zastosowanie czerni amidowej do kontrastowania krwawych śladów linii papilarnych datuje się na koniec lat 80. XX wieku, kiedy to Hussain oraz Pounds wykorzystali ją po raz pierwszy [24]. Czernią amidową nie wchodzi w reakcje z substancją potowo-tłuszczową znajdującą się na listewkach skórnych, dlatego też metoda ta powinna być stosowana po ujawnieniu ewentualnych śladów potowo-tłuszczowych innymi metodami [25].

HUNGARIAN RED

Czerwień węgierska to nazwa handlowa roztworu barwy purpurowej produkowanego przez firmę Bvda Internatiomal b.v. z Holandii, który pojawił się na rynku w połowie lat 90. XX wieku. Związek ten zawiera barwnik rozpuszczony w mieszaninie wody i kwasu octowego reagujący z białkami znajdującymi się w osoczu krwi. W wyniku reakcji powstaje związek kompleksowy, który ujawnia krwawe ślady linii papilarnych barwy purpurowej. Roztwór ten stosowany jest do ujawniania śladów linii papilarnych na powierzchniach chłonnych i niechłonnych.

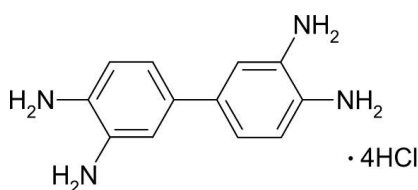
Czerwień węgierska wykazuje fluorescencję w zakresie 515–560 nm, a ślady obserwuje się przy zastosowaniu filtra krawędziowego długofalowego 600 nm. Po zastosowaniu czerwieni węgierskiej ślady również są widoczne w świetle białym (Rys. 15–16). Związek ten tak samo jak czernią amidową nie wchodzi w reakcję z substancją potowo-tłuszczową, dlatego też zaleca się przed zastosowaniem tej metody ujawnić ewentu-

alne ślady potowo-tłuszczowe. Reakcja ta przebiega w dwóch etapach w zależności od podłoża. W podłożu chłonnym ślady krwawe są utrwalane roztworem kwasu 5-sulfosalicylowego, a następnie kontrastowane roztworem czerwieni węgierskiej. Odnośnie podłoży niechłonnych czynność ta jest odwrotna [6].



Rysunek 15–16. Odzworowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem Hungarian Red sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne
 Figure 15–16. Fingerprints in repeated zoom visualized Hungarian Red, photographed in the white light. Reference – own study

DAB
(tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny)

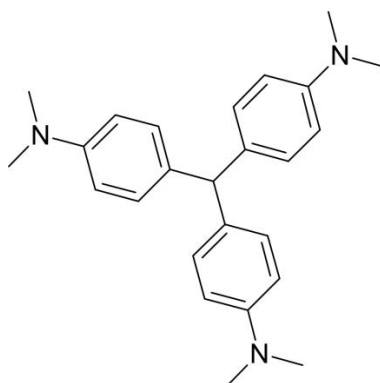


Rysunek 17. Wzór strukturalny DAB
 Figure 17. Chemical structure of DAB

DAB (Rys. 17) o wzorze sumarycznym $C_{14}H_{10}C_{14}$ w reakcji katalizowanej hemoglobina w obecności nadtlenu wodoru ulega utlenianiu co prowadzi do powstania ciemnobrązowej barwy produktu. Metoda ta służy do ujawniania lub wzmacniania krwawych śladów linii papilarnych na podłożach chłonnych i niechłonnych. Pierwsze informacje o tej metodzie pojawiły się na początku lat 90. XX wieku, kiedy to Sahs opublikował raport pt. „An Advancement in Blood Print Detection” w *Journal of Forensic Identification*. Artykuł dotyczył metodologii i wyników używania

3,3'-diaminobenzzydiny służącej do uwydatnienia krwawych śladów linii papilarnych. Związek ten tak samo jak czerń amidowa i czerwień węgierska nie reaguje ze składnikami substancji potowo-tłuszczowej [6].

LCV
(fiolet leukokrystaliczny)

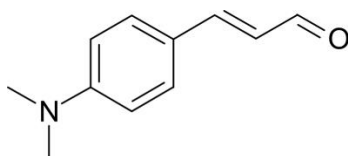


Rysunek 18. Wzór strukturalny fioletu leukokrystalicznego

Figure 18. Chemical structure of LCV

Fiolet leukokrystaliczny (Rys. 18) ulega reakcji utleniania przez nadtlenek wodoru. LCV w obecności hemoglobiny prowadzi do powstania barwnego produktu barwy jasnoniebieskiej. Związek ten wykorzystuje się zarówno do ujawniania jak i kontrastowania krwawych śladów linii papilarnych. Metodę tę po raz pierwszy wykorzystano w połowie lat 90. XX wieku [26]. LCV nie reaguje ze składnikami substancji potowo-tłuszczowej, w związku z tym należy zastosować inne metody do ujawniania ewentualnych śladów potowo-tłuszczowych. Metoda ta skuteczna jest zarówno na podłożach chłonnych jak i niechłonnych.

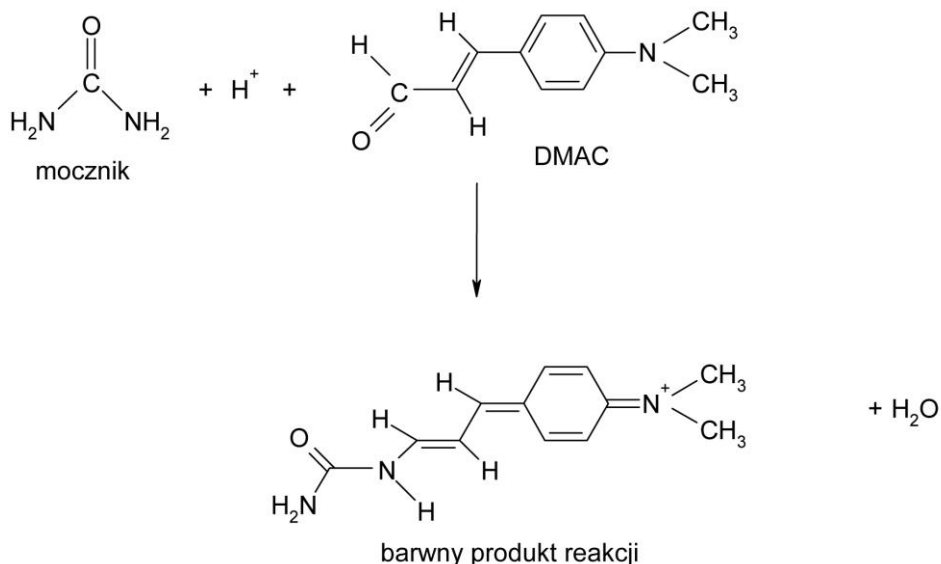
DMAC
(aldehyd 4-dimetyloaminocynamonowy)



Rysunek 19. Wzór sumaryczny DMAC

Figure 19. Chemical structure of DMAC

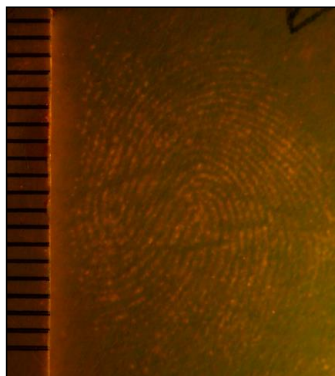
DMAC (Rys. 19) o wzorze sumarycznym $C_{11}H_{13}NO$ reagujący z mocznikiem i aminami wchodzącymi w skład substancji potowo-tłuszczowej (Rys. 20), który został opisany po raz pierwszy 1973 roku przez Morrisa [27].



Rysunek 20. Schemat przebiegu reakcji DMAC z mocznikiem

Figure 20. Scheme of the reaction DMAC with Urea

DMAC daje produkt reakcji wykazujący fluorescencję przy wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 450–505 nm, który obserwuje się i rejestruje przy zastosowaniu filtru krawędziowego długofalowego 590 nm. Ślady linii papilarnych są widoczne w postaci żółtego (pomarańczowego) koloru (Rys. 21). Związek ten jest stosowany do ujawniania śladów linii papilarnych naniesionych substancją potowo-tłuszczową na podłożach papierowych (chłonnych) pokrytych emulsją termoczułą, np. wydruki z bankomatu, paragony z kasy fiskalnej.



Rysunek 21. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione roztworem DMAC sfotografowane w świetle niebiesko-zielonym przy wykorzystaniu filtra krawędziowego długofalowego. Źródło – opracowanie własne

Figure 21. Fingerprint in repeated zoom visualized DMAC, photographed in the blue-green light using goggles. Reference – own study

Przed zastosowaniem DMAC należy zwrócić uwagę czy badane podłoże było narażone na działanie niekorzystnych czynników atmosferycznych w postaci podwyższonej temperatury oraz wysokiej wilgotności. Warunki środowiskowe mogą obniżyć skuteczność metody na skutek rozpuszczenia związków reagujących z DMAC [28].

RTX (tetra tlenek rutenu VIII)

Mechanizm działania RTX polega na redukcji RuO_4 w kontakcie z substancją potowo-tłuszczową zawierającą, m.in. nienasycone kwasy tłuszczowe (Rys. 22). Ujawnione ślady dają obraz czarny, ciemnoszary lub ciemnobrązowy widoczny w świetle białym.

Metoda ta po raz pierwszy została opisana przez Roberta Olsena w 1978 roku i polegała na ogrzaniu stałego RuO_4 na łaźni wodnej w celu uzyskania par, które osadzały się na substancji potowo-tłuszczowej uwidaczniając w ten sposób ślady linii papilarnych [29]. Mając na uwadze wydłużony czas oczekiwania na osadzenie się tlenku rutenu(VIII) na śladach linii papilarnych oraz niebezpieczeństwo wybuchu wynikające z ogrzewania RuO_4 do temperatury powyżej 50°C nie zaczęto jej stosować w praktyce. W latach 90. XX wieku Kenzo Mashiko, japoński naukowiec opisał nowy sposób otrzymania gazowego tetratlenku rutenu poprzez zmieszanie wodnego RuO_4 z wodnym roztworem azotanu amonu ceru $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$. W wyniku tej reakcji powstają pary RuO_4 , które unoszą się nad roztworem, a następnie osadzają się na śladach. RTX można stosować na papierach zwykłych i termoczułych, two-

nia śladów linii papilarnych i przyczynia się do poprawy kontrastu i czytelności ujawnionych śladów.

PROSZKI DAKTYLOSKOPIJNE

W praktyce daktyloskopijnej do ujawniania śladów linii papilarnych stosuje się różnego rodzaju adhezyjne proszki daktyloskopijne. Dobór uwarunkowany jest od kontrastu powstałego między śladem a podłożem. W niektórych wypadkach kontrast uzyskuje się dopiero po przeniesieniu śladu na folię daktyloskopijną, z którą kontrastuje stosowany proszek przylegający do ujawnionego śladu.

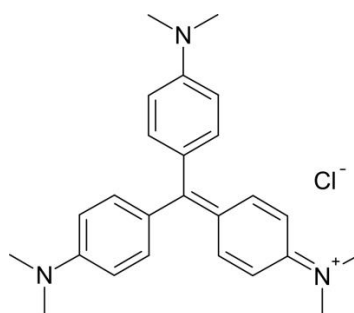
Proszki daktyloskopijne nanoszone są za pomocą pędzla z włosia naturalnego (np. wiewiórki, bobra), włókna szklanego lub puchu marabuta oraz pędzla magnetycznego. Kiedy pojawi się zarys śladu wykonuje się rejestrację fotograficzną przy wykorzystaniu skalówki i przenosi się ślad na folię daktyloskopijną, którą dobiera się w oparciu o zasadę kontrastowości.

Proszki daktyloskopijne można podzielić na:

- zwykłe: argentorat (stop aluminium), sadza angielska (tlenek żelaza, tlenek manganu, kalafonia), grafit;
- ferromagnetyczne (tlenek żelaza, sproszkowane żelazo);
- fluorescencyjne (powstają na bazie proszków zwykłych lub ferromagnetycznych poprzez dodanie barwnika fluorescencyjnego).

FIOLET KRystaliczny

(chlorek tris (4-(dimetyloamino)fenylo)metylu)

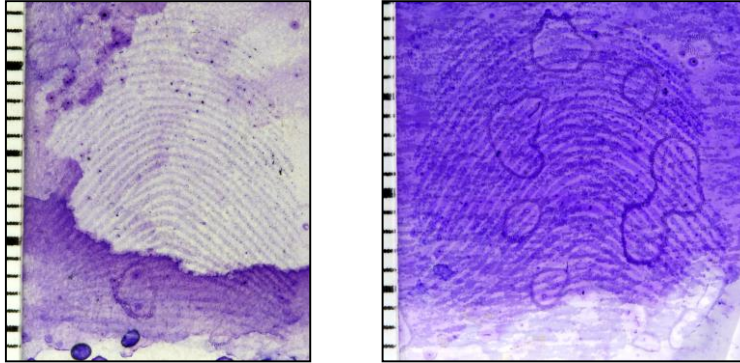


Rysunek 23. Wzór strukturalny fioletu krystalicznego

Figure 23. Chemical structure of Crystal Violet

Fiolet krystaliczny (Ryc. 23) o wzorze sumarycznym $C_{25}H_{30}N_3Cl$, który występuje w postaci ciemnozielonego proszku lub kryształów. Związek ten stosowany jest do kontrastowania śladów linii papilarnych ujawnionych metodą cyjanoakry-

lową, śladów krwawych, na klejącej stronie taśm samoprzylepnych, powierzchniach zabrudzonych klejami i smarami. Barwi podłoże (w przypadku tłustego podłoża można zaobserwować, że to właśnie podłoże zostanie zabarwione na fioletowo a substancja śladotwórcza pozostanie bez zmian) lub substancję śladotwórczą na kolor fioletowy (Rys. 24–25), nadając im kontrast, który umożliwia rejestrację fotograficzną w świetle białym.



Rysunek 24–25. Odzworowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu, ujawnione fioletem krystalicznym, sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne
 Figure 24–25. Fingerprints in repeated zoom visualized Crystal Violet, photographed in the white light. Reference – own study

Metoda ta jest zalecana w przypadku jasnych podłoży, ponieważ w przypadku podłoży ciemnych nie daje właściwych wyników ze względu na brak kontrastu substancji śladotwórczej z podłożem. Ujawnianie polega na zanurzeniu badanego przedmiotu w roztworze fioletu krystalicznego do momentu uzyskania kontrastu śladu z podłożem [31].

SPR (Small Particle Reagent)

SPR jest wodną zawiesiną drobnocząsteczkowego czarnego proszku disiarczku molibdenu(IV) o wzorze sumarycznym MoS_2 z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego (SPC). Preparat ten charakteryzuje się występowaniem części hydrofilowej i hydrofobowej umożliwiającą zmieszanie dwóch niemieszających się ze sobą cieczy, np. wody i oleju [32]. Do wizualizacji śladów linii papilarnych stosuje się środki powierzchniowo czynne o nazwach handlowych Tergitol typ NP-7 oraz Photo-Flo 200. SPR stosowany jest do ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach niechłonnych, m.in. metale, szkło, tworzywa sztuczne. Daje dobre wyniki szczególnie na podłożach mokrych i natłuszczonych. Cząsteczki disiarczku molibdenu(IV) przylegają do substancji śladotwórczej pozostawiając szary nalot (Rys. 26–27) [33].



Rysunek 26–27. Odzworowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione SPR, sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne

Figure 26–27. Fingerprints in repeated zoom visualized SPR, photographed in the white light. Reference – own study

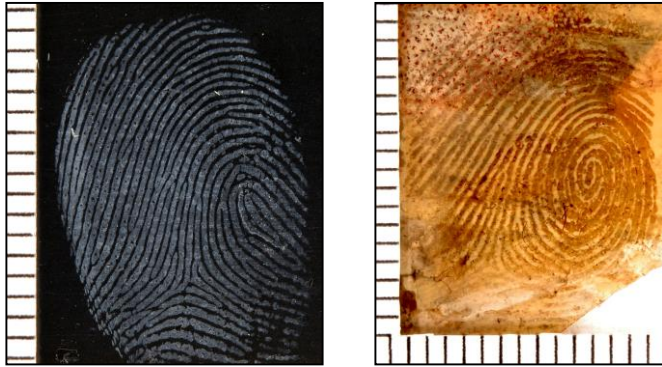
Small Particie Reagent jako metodę do wizualizacji śladów linii papilarnych opisano po raz pierwszy w 1979 roku przez Morrisona i Wellsa, którzy pracowali w Atomic Weapons Research Establishment w Aldermaston w Wielkiej Brytanii. SPR jest proszkiem daktyloskopijnym występującym w postaci ciekłej tworzący zawiesinę i na ogół dużo bardziej skutecznym od proszków daktyloskopijnych.

STICKY-SIDE

Sticky-side to proszek barwy grafitowej z metalicznym połyskiem, którego pierwsze wzmianki o zastosowaniu datuje się na lata 90. XX wieku w Japonii [34]. Produkt ten stosowany jest do ujawniania śladów linii papilarnych na klejących stronach taśm samoprzylepnych naniesionych substancją potowo-tłuszczową oferowany przez firmę Bvda, w którego skład wchodzi tlenek żelaza i płatki aluminium. Zasada działania polega na adsorpcji cząstek proszku na substancji potowo-tłuszczowej śladu linii papilarnych, który nanosi się pędzlem na stronę klejącą taśmy i delikatnie zmywa jego nadmiar pod bieżącą wodą. Po ujawnieniu śladów linii papilarnych oględziny oraz rejestrację fotograficzną przeprowadza się w świetle białym.

WET POWDER (White & Black)

Wet Powder to nazwa handlowa środka służącego do ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach niechłonnych pokrytych klejem (taśmy samoprzylepne) [35]. Wet Powder jest zawiesiną proszku barwy białej (Rys. 28) bądź czarnej, której zastosowanie zależy od barwy podłoża (Rys. 29).



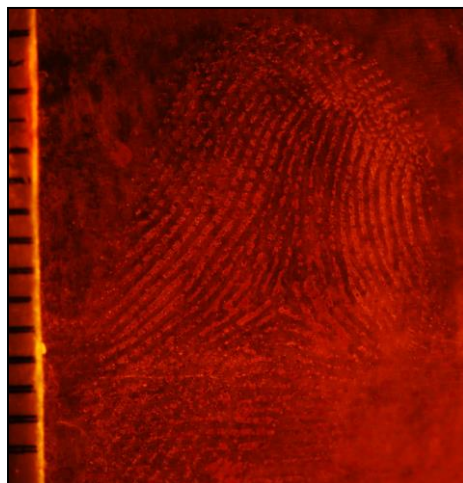
Rysunek 28–29. Odzworowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione zawiesiną Wet Powder White (po lewej stronie) i Wet Powder Black (po prawej stronie), sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne

Figure 28–29. Fingerprints in repeated zoom visualized Wet Powder White and Wet Powder Black, photographed in the white light. Reference – own study

Skład Wet Powder Black opiera się na tlenku żelaza, a Wet Powder White na dwutlenku tytan.

TAPE-GLO

Tape-Glo to roztwór barwy czerwono-pomarańczowej, który zawiera w swoim składzie barwnik fluorescencyjny osadzający się na miejscu występowania substancji potowo-tłuszczowej (jego skład jest objęty tajemnicą handlową i jest dostępny jako gotowy produkt oferowany przez firmę Lightning Powder Company Inc. z USA) na powierzchniach klejących, m.in. na taśmach samoprzylepnych. Ujawnianie śladów linii papilarnych przy zastosowaniu Tape-Glo polega na naniesieniu środka przy użyciu pędzla na badane podłoże i zmyciu wodą jego nadmiar. Ujawnione ślady linii papilarnych fluoryzują przy wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 505–530 nm, a ich obserwacji i rejestracji fotograficznej dokonuje się przy użyciu filtrów krawędziowych długofalowych 590 nm (Rys. 30).

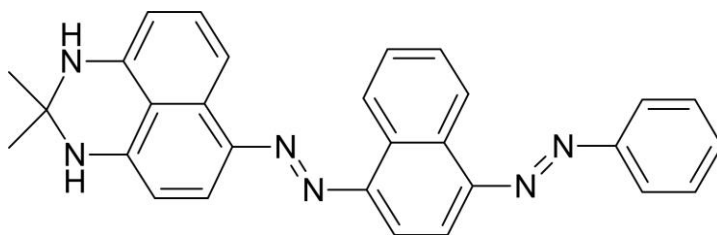


Rysunek 30. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Tape-Glo, sfotografowane w świetle niebiesko-zielonym przy użyciu filtra krawędziowego długofalowego. Źródło – opracowanie własne

Figure 30. Fingerprint in repeated zoom visualized Tape-Glo, photographed in the blue-green light using goggle. Reference – own study

SUDAN BLACK B

(2,2-dimethyl-1,3-dihydroperimidin-6-yl)-(4-phenylazo-1-naphthyl)diazene



Rysunek 31. Wzór strukturalny Sudan Black B

Figure 31. Chemical structure of Sudan Black B

Sudan Black B (Rys. 31) czyli czerń sudanowa o wzorze sumarycznym $C_{29}H_{24}N_6$. Stosowana jest głównie do kontrastowania śladów na powierzchniach zabrudzonych smarami, artykułami spożywczymi i śladów potowo-tłuszczowych ujawnionych metodą cyjanoakrylową. W stanie stałym jest czarnym, drobnym proszkiem, natomiast w stanie rozpuszczonym posiada barwę ciemnogrnatową i takie też zabarwienie uzyskują ujawnione nim ślady linii papilarnych (Rys. 32). Zasada działania polega na naniesieniu spryskiwaczem lub zanurzeniu w roztworze badanego

przedmiotu, a następnie spłukanie wodą nadmiaru barwnika, który osadza się na śladzie. Oględziny i rejestrację fotograficzną dokonuje się w świetle białym [36].

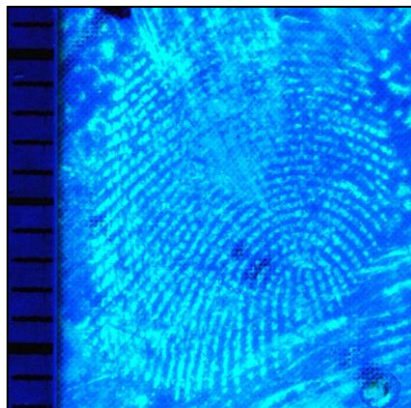


Rysunek 32. Odzworowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Sudan Black B, sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne

Figure 32. Fingerprint in repeated zoom visualized Sudan Black B, photographed in the white light. Reference – own study

LIQUI-DROX

W skład roztworu Liqui-drox wchodzi mieszanina bezfosforanowego detergentu o nazwie handlowej Liqui-nox firmy Alconox Inc z USA, Ardroux P133D (barwnik fluorescencyjny) i wody destylowanej. Mieszanina ta jest roztworem o żółtym zabarwieniu. Roztwór ten stosowany jest do kontrastowania śladów linii papilarnych ujawnionych metodą cyjanoakrylową zarówno na stronie klejącej jak i nieklejącej taśm samoprzylepnych koloru ciemnego. Obecność detergentu Liqui-nox w roztworze Liqui-drox ułatwia proces osadzania barwnika. Nadmiar roztworu łatwo wmywany jest wodą. Ujawnione ślady linii papilarnych fluoryzują przy wzbudzeniu promieniowaniem ultrafioletowym (Rys. 33) [37].



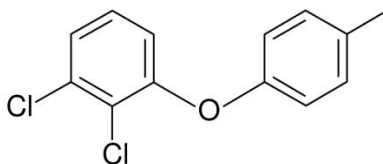
Rysunek 33. Odzworowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Liqui-drox, sfotografowane w świetle ultrafioletowym. Źródło – opracowanie własne

Figure 33. Fingerprint in repeated zoom visualized cyanoacrylate contrasted by Liqui-drox, photographed in the ultraviolet light. Reference – own study

BARWIENIE CYJANOARYLANÓW

Barwienie cyjanoakrylanów to metoda polegająca na powinowactwie fizycznym substancji tworzącej ślad z odczynnikiem ujawniającym, polegająca na przyleganiu barwnika do substancji śladotwórczej lub podłoża.

ARDROX P133D (1,2-dichloro-3-(2-metylofenoksy)benzenu)



Rysunek 34. Wzór strukturalny Ardrexu P133D

Figure 34. Chemical structure of Ardrex P133D

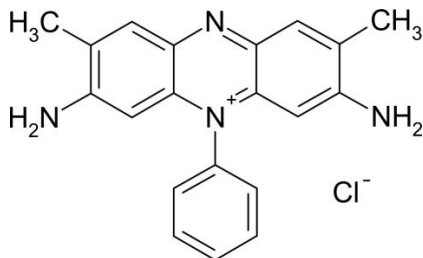
Ardrex P133D (Rys. 34) to barwnik fluorescencyjny o wzorze sumarycznym $C_{13}H_{10}Cl_2O$ stosowany do kontrastowania śladów linii papilarnych ujawnionych na podłożach niechłonnych metodą cyjanoakrylową, który jest silnie adsorbowany przez polimer cyjanoakrylowy. Barwnik ten wykazuje fluorescencję przy wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 350 nm (Rys. 35). Roztwór ten występuje w postaci żółtej cieczy, która łatwo wymywana jest wodą [38].



Rysunek 35. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Ardroxem P133D sfotografowane w świetle ultrafioletowym. Źródło – opracowanie własne

Figure 35. Fingerprint in repeated zoom visualized cyanoacrylate contrasted by Ardrox P133D, photographed in the ultraviolet light. Reference – own study

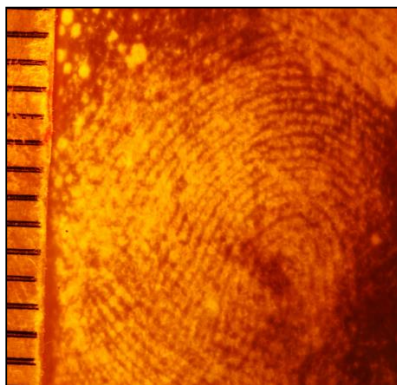
SAFRANINA O
(chlorek 3,7-dimetylo-10-fenylofenazyn-10-ilo-2,8-diaminy)



Rysunek 36. Wzór strukturalny Safraniny O

Figure 36. Chemical structure of Safranin O

Safranina O (Rys. 36) o wzorze sumarycznym $C_{20}H_{19}ClN_4$ jest organicznym barwnikiem fluorescencyjnym występującym w postaci proszku barwy bordowej. Jego zastosowaniem jest kontrastowanie śladów linii papilarnych ujawnionych na powierzchniach niechłonnych metodą cyjanoakrylową.

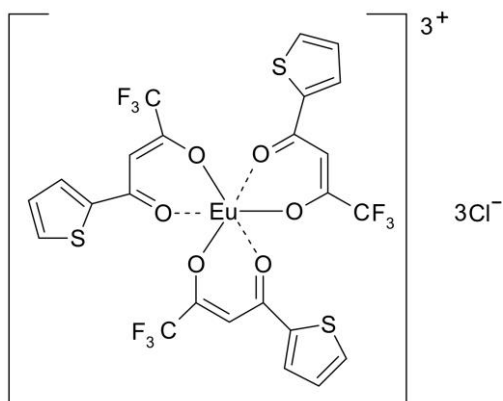


Rysunek 37. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Safraniną O sfotografowane w świetle niebiesko-zielonym przy wykorzystaniu filtra krawędziowego długofalowego. Źródło – opracowanie własne

Figure 37. Fingerprint in repeated zoom visualized Safranin O photographed in the blue-green light using goggle. Reference – own study

Nadmiar barwnika wypłukiwany jest wodą. Wykazuje fluorescencje przy wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 505 nm, a obserwację i rejestrację śladów linii papilarnych dokonuje się przy użyciu filtrów krawędziowych długofalowych 590 nm (Rys. 37) [39].

TEC
(chylat europu z tienoilotrifluoroacetnem)

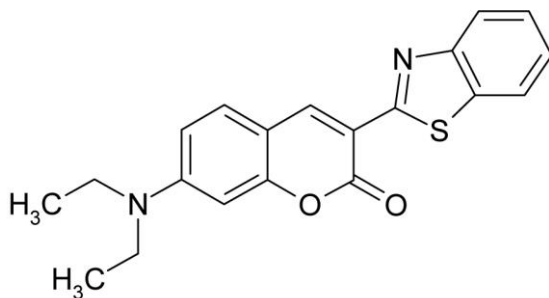


Rysunek 38. Wzór strukturalny chylatu europu z tienoilotrifluoroacetnem

Figure 38. Chemical structure of Thenoyl Europium Chelate

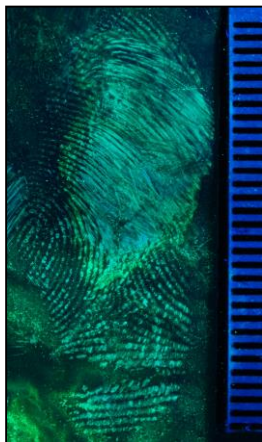
Trzy cząsteczki 5-tienoilotrifluoroacetonu (TTA) wiążą w roztworze jeden atom europu tworząc chelat europu (TEC) (Rys. 38). TEC jest barwnikiem posiadającym właściwości fluorescencyjne, stosowanym do kontrastowania śladów linii papilarnych ujawnionych na podłożach niechłonnych metodą cyjanoakrylową. Roztwór chylatu europu jest bezbarwny i mocno absorbuje promieniowanie w zakresie ultrafioletowy. Z kolei wąskie pasmo emisji występuje przy około 614 nm. Chylat europu jest przykładem metody charakteryzującej się emisją fluorescencji o dużym przesunięciu Stokesa w stosunku do promieniowania wzbudzającego. Początki wykorzystania TEC to lata 90. XX wieku, kiedy Misner, Wilkinson i Watkin opublikowali możliwość zastosowania TEC jako barwnika fluorescencyjnego do kontrastowania śladów linii papilarnych [40].

BASIC YELLOW 40
(3-(2-benzotiazol)-7-dietyloamino kumaryny)



Rysunek 39. Wzór strukturalny Basic Yellow 40
Figure 39. Chemical structure of Basic Yellow 40

Basic Yellow 40 (Rys. 39) to barwnik fluorescencyjny o wzorze sumarycznym $C_{20}H_{18}N_2O_2S$, który jest intensywnie adsorbowany przez polimer cyjanoakrylowy [41]. Wykazuje fluorescencję przy wzbudzeniu promieniowaniem w zakresie 350-505 nm, zatem ślady linii papilarnych można obserwować w świetle ultrafioletowym oraz pomarańczowym (Rys. 40). Należy pamiętać, że przy wzbudzeniu w zakresie ~505 nm obserwacji i rejestracji dokonuje się przy użyciu filtrów krawędziowych długofalowych 590 nm [6].



Rysunek 40. Odwzorowanie linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione Basic Yellow 40 sfotografowane w świetle ultrafioletowym. Źródło – opracowanie własne

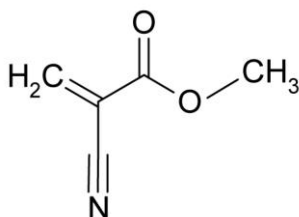
Figure 40. Fingerprint in repeated zoom visualized cyanoacrylate contrasted by Basic Yellow 40 photographed in the ultraviolet light. Reference – own study

5. METODY FIZYKOCHEMICZNE

Do wizualizacji śladów linii papilarnych wykorzystuje się również metody fizykochemiczne, w których występują zarówno zjawiska fizyczne, jak i reakcje chemiczne. W takim przypadku proces ten przebiega etapowo.

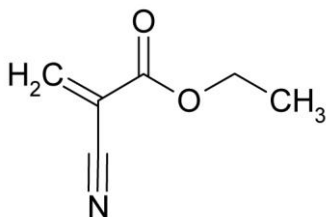
CYJANOAKRYLAN

Cyanoakrylan to klej cyanoakrylowy powszechnie stosowany jako szybko schnący, występujący w handlu pod nazwą Super Glue, Cyjanopan czy Kropelka. W jego skład wchodzi 2-cyanoakrylan metylu (MCA) $C_5H_5NO_2$ (Rys. 41) bądź 2-cyanoakrylan etylu (ECA) $C_6H_7NO_2$ (Rys. 42) [199, 200].



Rysunek 41. Wzór strukturalny 2-cyanoakrylanu metylu (MCA)

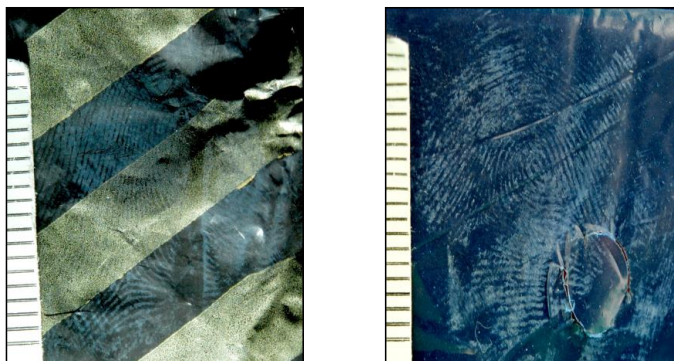
Figure 41. Chemical structure of methyl-2-cyanoacrylate



Rysunek 42. Wzór strukturalny 2-cyanoakrylanu etylu (ECA)

Figure 42. Chemical structure of ethyl-2-cyanoacrylate

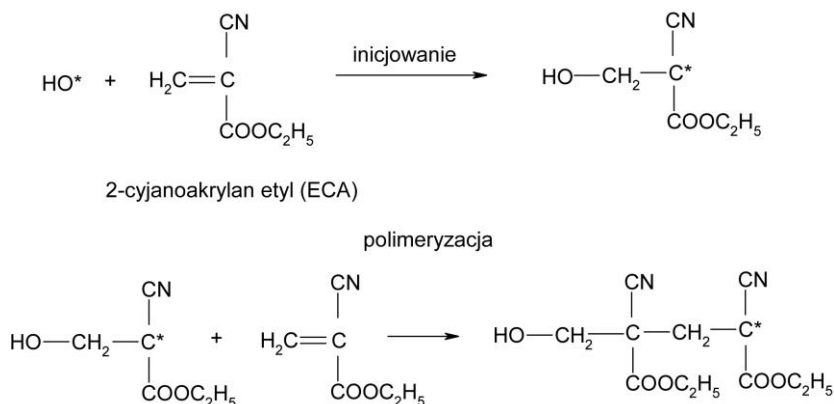
Metoda cyjanoakrylowa została opracowana w 1978 r. w Oddziale Identyfikacji Kryminalnej Japońskiej Policji Narodowej. Polega ona na polimeryzacji estrów kwasu 2-cyanoakrylowego katalizowanego składnikami wydzieliny potowo-tłuszczowej tworzącej ślady daktyloskopijne. W procesie ujawniania śladów linii papilarnych wykorzystuje się działanie par estrów kwasu 2-cyanoakrylowego, które osiadając się na grzbietach listewek skórnych ulegają polimeryzacji tworząc białoszary nalot (Rys. 43–44) [42, 43].



Rysunek 43–44. Odwzorowania linii papilarnych w kilkakrotnym powiększeniu ujawnione cyjanoakrylanem sfotografowane w świetle białym. Źródło – opracowanie własne

Figure 43–44. Fingerprints in repeated zoom visualized cyanoacrylate, photographed in the white light. Reference – own study

Wydłużenie łańcuch polimeru katalizowane jest przez jony hydroksylowe (Rys. 45). Metoda cyjanoakrylowa w procesie ujawniania śladów linii papilarnych wykorzystuje zdolność par estrów do polimeryzacji anionowej, kationowej lub rodnikowej. Powstały polimer przylega do powierzchni polarnych [44].



Rysunek 45. Schemat przebiegu reakcji polimeryzacji 2-cyjanoakrylanu etylu
 Figure 45. Scheme of the reaction of the polymerization cyanoacrylate

Polimer cyjanoakrylowy można skonstruować barwnikami fluorescencyjnymi (Ardrox P133D, Safranina O, Basic Yellow 40) lub innymi związkami chemicznymi przeznaczonymi do wzmocnienia widoczności śladów linii papilarnych ujawnionych cyjanoakrylanem, np. fiolet krystaliczny.

Proces polimeryzacji musi być przez cały czas obserwowany przez eksperta kryminalistyki, gdyż zbyt duże osadzenie się opar kleju na śladach linii papilarnych może spowodować nieodwracalne zatarcie śladu.

Do ujawniania metodą cyjanoakrylową wykorzystuje się powszechnie dostępne na rynku kleje, takie jak: *Cyjanopan*, *Super Glue* lub specjalnie produkowane do celów kryminalistycznych preparaty o większej lotności niż kleje, m.in. tzw. folie cyjanoakrylowe.

Metoda cyjanoakrylowa jest skuteczna na powierzchniach niechłonnych: metale, szkło, tworzywa sztuczne, drewno lakierowane, a także na powierzchniach chłonnych o gładkiej i błyszczącej powierzchni. Najnowsze badania donoszą, że ujawnianie śladów linii papilarnych parami estru cyjanoakrylowego stosuje się do śladów pozostawionych na powierzchniach klejących, takich jak taśmy samoprzylepne [45]. Jest ona znacznie skuteczniejsza od proszków daktyloskopijnych i daje wiele możliwości późniejszego kontrastowania.

Zaletą metody cyjanoakrylowej jest fakt, iż nie wpływa negatywnie na przeprowadzenie późniejszych badań biologicznych, a nawet ułatwia wykonanie tego rodzaju badań. Poprzez osadzenie par estru cyjanoakrylowego na substancji potowo-tłuszczowej w postaci biało-szarego nalotu, który widać bez konieczności wykorzystania powiększających przyrządów optycznych. Zawęża to obszar działania sprawcy zdarzenia, z którego należałoby pobrać wymazy do badań biologicznych.

Laboratoria Kryminalistyczne Policji posiadają specjalistyczne komory cyjanoakrylowe przystosowane do ujawniania śladów linii papilarnych metodą cyjanoakrylową, które wyposażone w klimatyzację, termostat oraz nawilżacz powietrza

z regulowaną wilgotnością (optymalna 80%) i temperaturą podgrzewacza (140°C) oraz wentylatorem zapewniającym równą cyrkulację par w całej komorze (Rys. 46).



Rysunek 46. Komora cyanoakrylowa Model Safefume CATRI firmy Air Science z USA. Zbudowana z trzech oddzielnych komór z niezależnym systemem sterowania oraz bezkanałowym systemem filtrów węglowych

Figure 46. Cyanoacrylate chamber Model Safefume CATRI of the Air Science company from the USA

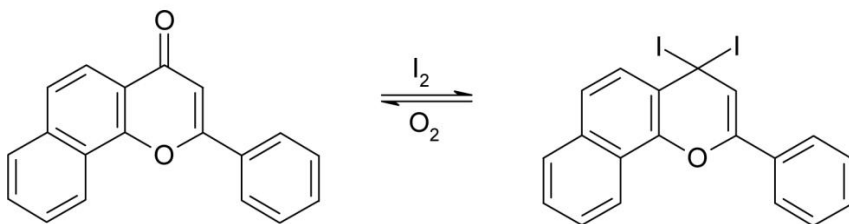
Ze względu na fakt, że komory cyanoakrylowe dysponują ograniczoną pojemnością, problemem jest ujawnianie śladów daktyloskopijnych tą metodą na przedmiotach wielkogabarytowych. Utrudnienie to zostało zażegnane za pośrednictwem Instytutu Technologii Bezpieczeństwa „MORATEX”, Centralnego Laboratorium Kryminalistyczne Policji, przedsiębiorstwa sprzętu ochronnego Maskpol S.A. oraz firmy STANIMEX S.J., którzy zrealizowali projekt na opracowanie technologii namiotu do ujawniania śladów parami estru kwasu cyanoakrylowego (NUS). Następnym projektem jest nowoczesny namiot pneumatyczny o lekkiej i stabilnej konstrukcji z możliwością łączenia segmentowego wraz z osprzętem, który może być wykorzystany w różnych warunkach środowiskowych na miejscu zdarzenia. Perspektywa ujawniania śladów linii papilarnych na przedmiotach wielkogabarytowych z możliwości bezpośredniego wykorzystania na miejscu zdarzenia przyczyni się do skrócenia czasu prowadzonych czynności procesowych.

JOD (I₂)

Opary jodu stosowane są do ujawniania śladów linii papilarnych naniesionych substancją potowo-tłuszczową na podłożach chłonnych i niechłonnych.

Metoda ujawniania polega absorbowaniu par sublimującego jodu głównie przez substancje tłuszczowe występujące w pocie. W rezultacie tego powstaje ciemnobrązowy obraz śladu. Ujawnione ślady szybko zanikają w skutek dalszej sublimacji jodu. Metoda ta jest jedną z najstarszych metod ujawniania niewidocznych odcisków, której początki datuje się na lata 30. XX wieku [46].

Opary jodu można stosować jedynie do śladów świeżych, które nie utraciły jeszcze lepkości na skutek przemiany substancji potowo-tłuszczowej. Ponadto metod ta wymaga szybkiej rejestracji fotograficznej ujawnionego śladu, ponieważ ze względu na właściwości jodu następuje szybki jego zanik. Ujawnione ślady można poddać utrwaleniu. Jako utrwalacz wykorzystuje się, m.in. skrobię w postaci sypkiej, zawiesiny w wodzie oraz pasty, poza tym roztwór 7,8-benzoflavonu oraz α -naftoflavonu (Rys. 47) [47].



Rysunek 47. Schemat przebiegu reakcji jodu z α -naftoflavonem

Figure 47. Scheme of the reaction of iodine with α -naphthoflavone

Pary jodu są sprawdzoną metodą pozyskiwania śladów linii papilarnych pozostawionych na ludzkiej skórze [48].

UWAGI KOŃCOWE

W następstwie rozwoju technicznego oraz kolejnymi badaniami ukazują się coraz to nowsze metody wizualizacji śladów linii papilarnych, które zastępują dotychczas stosowane. Doskonalenie metod ujawniania śladów linii papilarnych prowadzące do poprawy czytelności, umożliwią przeprowadzenie badań identyfikacyjnych służących do wykrycia sprawcy przestępstwa. Należy pamiętać, że daktyloskopia wciąż się rozwija a jej możliwości wykorzystania są niezwykle różnorodne.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] J. Sehn, *Ślady kryminalistyczne. Z zagadnień kryminalistyki*, 1960, t. 1.
- [2] T. Janus, K. Borowiak, B. Potocka-Banaś, *Ann. Acad. Med. Stein.*, 2007, **53** (2), 175.
- [3] U. Bernier, D. Barnard, C. Schesck, R. Yost, *Anal. Chem.*, 2000, **72**(4), 747.
- [4] R. Olsena, *Fingerprint and Ident. Mag.*, 1972, **10**, 3.
- [5] M. Miklaszewska, *Pol. Med. J.*, 1968, **7**, 617.
- [6] M. Rybczyńska-Królik, M. Pękała, *Przewodnik po metodach wizualizacji śladów daktyloskopijnych*, Wyd. CLK KGP Warszawa 2006.
- [7] M. Kulicki, V. Kwiatkowska-Darul, L. Stęпка, *Kryminalistyka Wybrane zagadnienia teorii i praktyki śledczo-sądowej*, Wyd. UMK Toruń 2005.
- [8] A.V. Alekseyenko, G.I. Perez-Perez, A. De Souza, B. Strober, Z. Gao, M. Bihan, K. Li, B.A. Methé, M.J. Blaser, *Microbiome*, 2013, **1**(1), 31.
- [9] S. Ruhemann, *J. Chem. Soc. Trans.*, 1911, **97**, 2025.
- [10] R. Grigg, J.F. Malone, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1986, **5**, 421.
- [11] C.J. Lennard, P.A. Margot, M. Stoilovic, R.N. Warrenner, *Forensic Sci. Soc.*, 1986, **26**(5), 323.
- [12] C. Dent, *Biochem. J.*, 1948, **43**, 169.
- [13] M. Friedman, L.D. Williams, *Bioorg. Chem.*, 1974, **3**, 267.
- [14] N.D. Petraco, G. Proni, J.J. Jackiw, A.M. Sapse, *J. Forensic Sci.*, 2006, **51**(6), 1267.
- [15] S. Oden, B. von Hosten, *Nature*, 1954, **173**, 449.
- [16] A.V. Petruncio, *J. Forens. Ident.*, 2000, **50**(5), 462.
- [17] C.J. Fregeau, O. Germain, R.M. Fourney, *J. Forens. Sci.*, 2000, **45**(2), 354.
- [18] J. Druey, P. Schmidt, *Helv. Chim. Acta*, 1950, **33**(4), 1080.
- [19] D. Wilkinson, *Forensic Sci. Int.*, 2000, **109**(2), 87.
- [20] R. Grigg, T. Mongkolaussavaratana, C.A. Pounds, *J. Forensic Sci.*, 1990, **35**(1), 169.
- [21] D.B. Hauze, O. Petrovskaia, B. Taylor, M.M. Joullie, R. Ramotowski, A.A. Cantu, *J. Forensic Sci.*, 1998, **43**(4), 744.
- [22] R. Ramotowski, A.A. Cantu, M.M. Joullie, O. Petrovskaia, *Fingerprint Whorld*, 1997, **23**(90), 131.
- [23] V.G. Sears, T.M. Prizeman, *J. Forensic Ident.*, 2000, **50**(5), 470.
- [24] J.I. Hussain, C.A. Pounds, *Forensic Sci Service UK, Report 649*, London 1989: Home Office.
- [25] P. Warric, *J. Forensic Ident.*, 2000, **50**, 20.
- [26] W.J. Bodziak, *Forensic Sci. Int.*, 1996, **82**(1), 45.
- [27] J.R. Morris, G.C. Goode, J.W. Godsell, *Police Research Bull.*, 1973, **21**, 31.
- [28] J. Brennan, S. Bramble, S. Crabtree, G. Wright, *J. Forens. Ident.*, 1995, **45**, 373.
- [29] R.D. Olsen, *Fingerprint Ident.*, 1975, **56**(7), 3.
- [30] K. Mashiko, T. Miyamoto, *J. Forensic Ident.*, 1998, **48**(3), 279.
- [31] M.L. Gray, *J. Forensic Ident.*, 1996, **46**(3), 268.
- [32] P. Cuce, G. Polimeni, A.P. Lazzaro, G. De Fulvio, *Forensic Sci. Int.*, 2004, **146**, 7.
- [33] A. Frank, J. Almog, *J. Forensic Ident.*, 1993, **43**(3), 240.
- [34] D.S. Burns, *J. Forensic Ident.*, 1994, **44**(2), 133.
- [35] T. Kulczyk, T. Szczepanski, *Problem Krym.*, 2007, **258**, 63.
- [36] M. Rybczyńska-Królik, J. Moszczyński, *Problem Krym.*, 1997, **217**, 217.
- [37] M. Hollars, T. Trozzi, B. Barron, *J. Forensic Ident.*, 2000, **50**(4), 357.
- [38] D.A. Wilkinson, A. Misner, *J. Forensic Ident.*, 1994, **44**(4), 387.
- [39] S.K. Ghosh, S.C. Bhattacharya, *Chem. Phys. Lipids*, 2004, **131**(2), 151.
- [40] E.R. Lock, W.D. Mazzella, P. Margot, *J. Forensic Sci.*, 1995, **40**(4), 654.
- [41] J.I. Thorton, *J. Forensic Sci.*, 1979, **23**(3), 536.
- [42] L. Lewis, *J. Forensic Sci.*, 2001, **46**, 241.

- [43] S.P. Wargacki, J. Forensic Sci., 2008, **53**, 1138.
- [44] H. Cummins, T. Rroozzi, *J. Forensic Ident.*, 1993, **43(3)**, 221.
- [45] E. Kołek-Kaczanowska, E. Rogoża, Drzewiecka K.: *Problem Krym* 2013, **281(3)**, 47.
- [46] A.R. Borne, *Sci. Am.* 1936., **155**, 274.
- [47] D.A. Wilkinson, J.E. Watkin, A.H. Misner, *J. Forens. Ident.*, 1996, **46(4)**, 432.
- [48] J.M. Adcock, *J. Forens. Sci.*, 1977, **22(3)**, 599.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 lutego 2014

**CHARAKTERYSTYKA ENDOGENNYCH
INHIBITORÓW ENZYMÓW ROZKŁADAJĄCYCH
ENKEFALINY**

**CHARACTERISTIC OF THE ENDOGENOUS
ENKEPHALIN DEGRADING ENZYMES INHIBITORS**

Małgorzata Sobocińska*, Zbigniew Maćkiewicz

*Pracownia Chemii Polipeptydów
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63 80-308 Gdańsk
e-mail: mk.sobocinska@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Inhibitory enzymów rozkładających enkefaliny

2. Siarolfina

3. Opiorfina

4. Spinorfina

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Małgorzata Sobocińska – w latach 2007–2012 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – uzyskując w 2012 roku tytuł magistra. Prace magisterską pod tytułem „Chemiczna synteza pochodnych aminokwasowych zawierających w łańcuchu bocznym donor fluorescencji” pisała pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Lesnera w Katedrze Chemii Bioorganicznej. Obecnie słuchaczka Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Chemii i Biochemii na Wydziale Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie wykonuje prace doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Maćkiewicza.

prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz – profesor Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, kierownik Pracowni Chemii Polipeptydów w Katedrze Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego specjalizujący się w syntezie w roztworze i na nośniku stałym polipeptydów mających zastosowanie w badaniach immunologicznych. Głównym kierunkiem pracy prof. Maćkiewicza jest synteza i badania immunogenności fragmentów antygenów wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV) oraz opracowywanie testów diagnostycznych do wykrywania WZW typu B i C. W ostatnich latach prof. Maćkiewicza zajmował się otrzymywaniem peptydów biologicznie czynnych i ich oddziaływaniem z kationami metali ciężkich (Cu, Zn) oraz syntezą fragmentów parahormonu (PTH) i wybranych fragmentów ludzkich białek szoku termicznego (Hsp). Od niedawna zespół prof. Maćkiewicza prowadzi badania nad inhibitorami enzymów rozkładających enkefalinę poszukując dogodnego analogu, który wykazywałby maksymalną aktywność biologiczną w danych warunkach środowiskowych.

ABSTRACT

Management of acute and chronic pain has always been a key area of clinical research. Pain and stress stimulation may cause an increase in the level of endogenous opioids in the body. Endogenous enkephalins activate opioid receptors in the brain, leading to the analgesic effect. Enkephalinases inactivate endogenous opioids, abolishing their activity. Enkephalin degrading enzyme inhibitors (EIs) in turn inhibit these enzymes, preventing them from degrading endogenous enkephalins what leads to analgesia. The enkephalin degrading enzyme inhibitors seem to be promising analgesic agents [2]. Analgesic effect of EIs has been discovered recently and their therapeutic potential has not been effectively investigated yet. The main advantage of enkephalinase inhibitors is that they do not show adverse effects characteristic for opioids. EIs play an important role in modulating nociception, so they are potential agents for the treatment of acute and chronic pain. They often possess also additional antidiarrheal, antidepressant and anticancer properties [3]. The potential EIs targets appear to be aminopeptidase N (APN), dipeptidyl peptidase III (DPP III), angiotensin-converting enzyme (ACE) and neutral endopeptidase (NEP) [4].

EIs may be broadly classified as endogenous and those that are obtained synthetically [4]. The purpose of this work is to present a review of endogenous enkephalinase inhibitors: sialorphan, opiorphin, and spinorphan.

Sialorphan (Gln-His-Asn-Pro-Arg) is synthesized predominantly in the submandibular gland and prostate of adult rats in response to androgen steroids and is released locally and systemically in response to stress. Sialorphan protects endogenous enkephalins released after nociceptive stimuli by inhibiting NEP *in vivo*. Sialorphan prevents spinal and renal NEP from breaking down substance P and Met-enkephalin *in vitro*. Sialorphan suppressed pain sensation for both chemical-induced inflammation and acute physical pain [8, 9, 12].

Opiorphan (Gln-Arg-Phe-Ser-Arg) is an endogenous chemical compound first isolated from human saliva. Opiorphan is a natural analgesic. Opiorphan protects enkephalins from degradation by human neutral endopeptidase and aminopeptidase N. Opiorphan is closely related to the rat sialorphan peptide [12, 13, 19].

Spinorphan (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) has been isolated from the bovine spinal cord as an endogenous inhibitor of enkephalin - degrading enzymes. Spinorphan is an antagonist of the P2X3 receptor and a weak partial agonist/antagonist of the FP1 receptor [24, 25, 26].

Keywords: endogenous enkephalin degrading enzymes inhibitors, opioid, peptides, pain, analgesic agents

Słowa kluczowe: endogenne inhibitory enzymów rozkładających enkefaliny, opioidy, peptydy, ból, środki przeciwbólowe

WPROWADZENIE

Ból (łac. *dolor*) jest pojęciem subiektywnym, nieprzyjemnym doznaniem zmysłowym i emocjonalnym powstającym pod wpływem bodźców rzeczywistych lub potencjalnie zagrażających uszkodzeniem ciała. Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu definiuje ból jako „Nieprzyjemne doświadczenie zmysłowe i emocjonalne związane z rzeczywistym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek lub opisywane w kategoriach takiego uszkodzenia” [1].

Opioidy to grupa substancji działających na receptory opioidowe obecne w ludzkim organizmie. Opioidy można podzielić na: opioidy endogenne, opiaty oraz syntetyczne odpowiedniki opiatów (leworfanol, fentanyl, metadon, petydyna). Opioidy endogenne to peptydy produkowane przez mózg lub przysadkę (endorfiny, dynorfiny, enkefalin). Głównym zastosowaniem opioidów jest walka z silnym bólem [2]. Działanie opioidów objawia się zahamowaniem czucia bólu na poziomie rdzenia kręgowego, tłumieniem rozprzestrzeniania się impulsów, a także hamowaniem percepcji bólu w mózgowiu [3]. Opioidowe leki przeciwbólowe są stosowane w uśmierzaniu bardzo silnego bólu pooperacyjnego, łagodzeniu objawów choroby nowotworowej, a także w przypadku silnych bólów na zalecenie lekarza prowadzącego. Stanowią ostateczną alternatywę dla dostępnych bez recepty niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

Artykuł ten dokonuje przeglądu literaturowego endogennych inhibitorów enzymów rozkładających enkefalinę, które mogłyby stanowić nową generację leków będących alternatywą dla obecnie dostępnych medykamentów.

1. INHIBITORY ENZYMÓW ROZKŁADAJĄCYCH ENKEFALINĘ

Ból i bodźce stresowe mogą powodować wzrost poziomu endogennych opioidów w organizmie. Endogenne enkefalinę aktywują receptory opioidowe w mózgu, co prowadzi do działania przeciwbólowego. Enkefalinazy, inaktywują endogenne opioidy powodując zahamowanie ich działania. Inhibitory enzymów rozkładających enkefalinę (EIs) blokują enkefalinazy, uniemożliwiając tym samym rozkład endogennych enkefalin.

Działanie inhibitorów enzymów rozkładających enkefalinę (EIs) polega na hamowaniu rozkładu naturalnych opioidów. Enkefalinę charakteryzują się brakiem działań niepożądanych charakterystycznych dla opioidów. Nie powodują uzależnienia, jednocześnie większość z nich posiada często dodatkowo właściwości przeciwbiegunkowe, przeciwdepresyjne i przeciwnowotworowe [4–6]. EIs wydają się być obiecującymi środkami leczniczymi o działaniu przeciwbólowym. Przeciwbólowe działanie EIs odnotowano już ponad dziesięć lat temu, jednak ich potencjał terapeutyczny nie został jeszcze skutecznie zbadany. EIs można podzielić na: peptydy endogenne (opiorfina, spinorfina, sialorfina) i syntetyczne (RB 101, RB 120) [4].

Potencjalne cele EIs to enzymy takie jak aminopeptydaza N (APN), neutralna endopeptydaza (NEP), peptydaza dipeptydylowa III (DPP III), inhibitory konwektazy angiotensyny (ACE) [4]. Charakterystykę aminopeptydazy N, neutralnej endopeptydazy, peptydazy dipeptydowej III, inhibitorów konwektazy angiotensyny przedstawia Tabela 1.

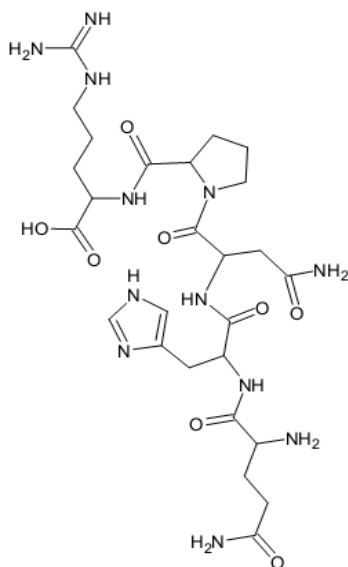
Tabela 1. Charakterystyka aminopeptydazy N, neutralnej endopeptydazy, peptydazy dipeptydowej III, inhibitorów konwektazy angiotensyny

Table 1. Characteristic of the aminopeptidase N, neutral endopeptidase, dipeptidyl peptidase III, angiotensin-converting enzyme

NAZWA	SKRÓT	FUNKCJE
Aminopeptydaza N	APN/CD13	Hydrolija m.in. małych mediatorów peptydowych. Modulacja ruchliwości komórek [7].
Neutralna endopeptydaza (neprylizyna)	NEP/CD10	Inaktywacja hormonów peptydowych (m.in. endogenne enkefaliny, bradykininę, substancje P). Zaangażowany w liczne procesy fizjologiczne i patologiczne zachodzące w organizmie [8].
Peptydaza dipeptydowa III	DPP III	Obrona przed stresem oksydacyjnym. Modulacja percepcji bólu. Rozkład enkefalin [9].
Inhibitory konwektazy agiotensyny	ACE	Hamowanie powstawanie angiotensyny II, enzymu konwertującego angiotensynę. Działanie hipotensyjne, antyproliferacyjne, nefroprotektoryjne, przeciwzakrzepowe [10].

2. SIALORFINA

Zastosowanie różnych modeli farmakologii molekularnej oraz modeli behawioralnych przez francuskich naukowców z Instytutu Pasteur we Francji przyczyniło się do zidentyfikowania inhibitora metalo-ektopeptydaz [5]. Inhibitor ten jest fizjologicznym czynnikiem regulującym aktywność związaną z błoną enkefalinazy u ssaków. Francuscy naukowcy dostarczyli molekularnych i funkcjonalnych dowodów na istnienie u szczurów hormonalnego łącznika komunikacji międzykomórkowej tzn. ostatecznego dojrzałego peptydu wygenerowanego z pre-prohormonu SMR1- SMR1-Pentapeptydu, obecnie określanego jako sialorfina o sekwencji Gln-His-Asn-Pro-Arg [5]. Wzór strukturalny sialorfiny prezentuje Rysunek 1.



Rysunek 1.
Figure 1.

Wzór strukturalny sialorfiny (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
Structural formula sialorphin (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

Szereg przeprowadzonych badań i testów dowiodło wszechstronnego działania/zastosowania sialorfiny. Pierwsze eksperymenty opisują sialorfinę jako mediatora, mającego zastosowanie w leczeniu zaburzeń interpersonalnych, behawioralnych, w tym zaburzeń seksualnych. Dopiero kolejne lata badań pozwoliły na stwierdzenie, że sialorfina jest fizjologicznym modulatorem percepcji bólu, który nie powoduje uzależnień, jednocześnie posiada właściwości przeciwdepresyjne, przeciwnowotworowe [5, 11, 12].

Sialorfina wydzielana jest przez śliniankę podżuchwową szczura, prostatę u dorosłych szczurów oraz w odpowiedzi na stres środowiskowy u samca szczura. Pobudza zachowania seksualne samców szczurów, a także nasila erekcję u starzejących się szczurów [5, 11, 12].

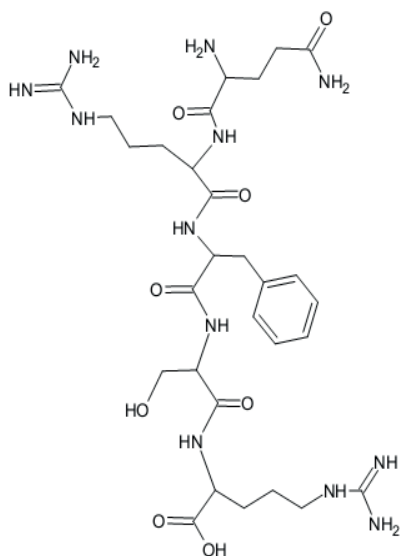
W testach na dwóch behawioralnych modelach szczura, dożylnie wprowadzanie sialorfiny wywołało silną odpowiedź antynocyceptywną. Szczury były poddane mechanicznej oraz chemicznej nadwrażliwości na ból. Sialorfina hamowała odczuwanie bólu wywołanego bodźcami mechanicznymi podczas testu ukucia szpilką, jak i bólu towarzyszącego stanowi zapalnemu wywołanego przez czynniki chemiczne w teście formalinowym. W testach sialorfina wykazywała najlepsze efekty przeciwbólowe w dawkach 100–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [13]. W czasie przeprowadzonych testów analgezja czyli zniesienie bólu powstałego w skutek czynników fizycznych i chemicznych spowodowana przez sialorfinę wymagała aktywacji receptorów opioidowych. Sialorfina działała poprzez aktywację endogennej opioidozależnej ścieżki przekazywania sygnału bólu. Tak więc sialorfina jest podwójnym fizjologicznym antagonistą aktywności metalo-ektopeptydaz NEP i ANP, oraz zapobiega

degradacji substancji P Met-Enkefaliny *in vitro* przez rdzeniowy i nerkowy NEP [5, 12, 13]. Co więcej jest silnym inhibitorem percepcji bólu. Badania prowadzone na szczurach wykazały, że sialorfina chroni endogenne enkefaliny uwalniane w odpowiedzi na bodźce bólowe przez hamowanie ekto-enkefalinaz.

Efekt przeciwbólowy uzyskiwany przy podaniu sialorfiny jest silniejszy niż w przypadku syntetycznych podwójnych inhibitorów NEP/ANP takich jak kelatorfan [5].

3. OPIORFINA

Sialorfina była jednym z pierwszych zidentyfikowanych inhibitorów enzymów rozkładających enkefaliny u ssaków [5]. Odkrycie sialorfiny pociągnęło za sobą lawinę poszukiwań endogennych inhibitorów rozkładających enkefaliny w ludzkim organizmie. Francuscy naukowcy z instytutu Pasteura w Paryżu zainspirowani sialorfiną poszukiwali ludzkiego odpowiednika tej substancji przeciwbólowej w ludzkiej ślinie. W ślinie człowieka wykazano obecność szeregu różnych związków [14], które poddano dokładnej analizie metodami chromatograficznymi (HPLC), identyfikując tym sposobem działający analogicznie do sialorfiny pentapeptyd opiorfinę o sekwencji Gln-Arg-Phe-Ser-Arg. Wzór strukturalny opiorfiny prezentuje Rysunek 2.



Rysunek 2.
Figure 2.

Wzór strukturalny opiorfiny (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
Structural formula opiorphin (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

Pierwsze badania nowo odkrytej substancji przeprowadzono na gryzoniach. Przeprowadzone testy dały bardzo pozytywne rezultaty. W badaniach podawana

dożylnie opiorfina wywoływała silne odpowiedzi antynocyceptywne w dawce 0,3 mg/kg w dwu behawioralnych modelach u szczura [6]. W teście wymuszonego pływania zaobserwowano, że opiorfina wykazuje działanie przeciwdepresyjne w dawce 3 mg/kg [6]. Po dożylnym podaniu opiorfiny nie zaobserwowano szeregu niekorzystnych reakcji fizjologicznych charakterystycznych dla opioidów takich jak rozwój tolerancji i uzależnienie [15]. Opiorfina podobnie jak sialorfina hamowała odczuwanie bólu, indukowanego przez urazy bólu ostrego, tonicznego, testu ukucia szpilką jak i bólu towarzyszącego stanowi zapalnemu wywołanego przez czynniki chemiczne w teście formalinowym. Opiorfina podawana dożylnie dała identyczne rezultaty jak morfina [15–17].

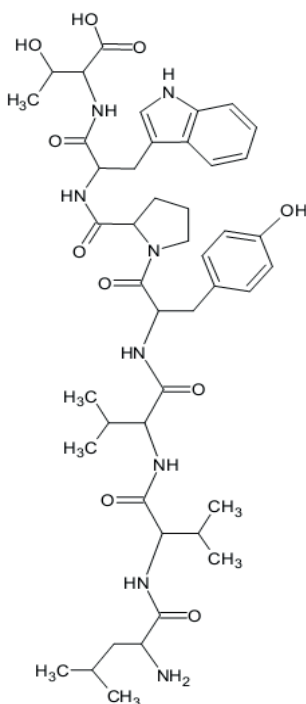
Opiorfina została uznana za funkcjonalny ludzki homolog pentapeptydu SMR1 sialorfiny. Okazało się, że prekursor PROL1, z którego wytwarzana jest opiorfina, kodowany jest przez tę samą rodzinę genów (Gen VCSA1) co prekursor sialorfiny [5, 6, 18, 19]. Opiorfina otrzymywana jest w wyniku cięcia enzymatycznego z *N*-końcowego regionu białka prekursorowego PROL1, kodowanego przez gen VCSB. PROL1 zasadowe białko łoż bogate w prolinę, zwane jest również jako PrL lub BPL, powstaje w gruczołach ślinowych człowieka [18, 19].

Testy potwierdziły mechanizm działania opiorfiny jako inhibitora hydrolaz. Jej działanie polega na hamowaniu hydrolizy enzymatycznej enkefalin [20]. Opiorfina działając na pewną grupę enzymów hamuje rozkład enkefalin – naturalnych opioidów wydzielanych w mózgu, odpowiedzialnych za łagodzenie doznań bólowych. Opiorfina stymuluje wydzielanie enkefalin w ośrodkowym układzie nerwowym [16, 17]. Jest inhibitorem ludzkiej neutralnej endopeptydazy (NEP) i aminopeptydazy N (ANP), może powodować skurcze okrężnicy, a także wpływać na erekcje u szczurów [6, 11, 21].

Średnia zawartość opiorfiny w ślinie oznacza się za pomocą testu ELISA i techniki LC-MS/MS. Zawartość opiorfiny w ślinie oznaczona testem ELISA wynosi 61 ± 23 ng/ml dla kobiet i 59 ± 17 ng/ml dla mężczyzn. Możliwe jest też oznaczenie tego peptydu techniką LC-MS jednak czułość tej metody jest sześciokrotnie niższa niż testu ELISA [22, 23]. Terapeutyczne zastosowanie opiorfiny u człowieka wymaga modyfikacji cząsteczki w celu obniżenia szybkości degradacji w jelicie oraz polepszenia penetracji przez barierę krew–mózg [6, 24]. Dotychczasowe badania potwierdziły, że opiorfina nie powoduje typowych dla opioidów efektów ubocznych może więc być obiecującą substancją wiodącą w leczeniu depresji u pacjentów, którzy nie mogą stosować obecnie dostępnych środków przeciwdepresyjnych. Zastosowanie opiorfiny w leczeniu może przynieść większe korzyści w porównaniu do obecnie stosowanych opioidowych silnych leków przeciwbólowych.

4. SPINORFINA

W ostatnich latach w bydłym rdzeniu kręgowym japońscy naukowcy Nishimura i Hazato z Instytutu Medycznego w Tokyo identyfikowali inhibitor enzymów rozkładających enkefalinę - spinorfinę [25]. Mechanizm działania tego inhibitora jak na razie nie został w pełni poznany. Japończycy dokonali szczegółowej analizy spinorfiny. Spinorfina została wyizolowana i oczyszczona metodami chromatograficznymi (HPLC), a analiza strukturalna wykazała, że jest to heptapeptyd o sekwencji leucyna-walina-walina-tyrozyna-prolina-tryptofan-treonina, należący do rodziny hemorfin, który odpowiada pozycji 32-38 ludzkiej hemoglobiny. β -Spinorfina została wykryta w ludzkim płynie mózgowo-rdzeniowym [25, 26]. Wzór strukturalny spinorfiny prezentuje Rysunek 3.



Rysunek 3.
Figure 3.

Wzór strukturalny spinorfiny (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
Structural formula spinorphin (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

Mimo, że mechanizm działania spinorfiny nie został w pełni poznany podobnie jak inne hemorfiny spinorfina jest antagonistą receptora angiotensyny AT4 w mózgu, jak i antagonistą inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę enzymu przekształcającego angiotensynę. Jest również antagonistą receptora P2X3 oraz częściowym agonistą/antagonistą receptora FP1 [25–27]. Hamuje enzymy degradujące enkefalinę, działa jako regulator enkefalin poprzez hamowanie trzech

enzymów: aminopeptydazy N (APN), dipeptylopeptydaza III (DPP III), obojętnej endopeptydazy (NEP) [9, 25–28]. Jest fizjologicznym modulatorem bólu, ciśnienia krwi, hamuje skurcze mięśni gładkich, a także działa przeciwwzpalnie [29].

PODSUMOWANIE

Leczenie bólu ostrego i przewlekłego jest kluczowym tematem badań klinicznych. Za standard w leczeniu bólu pooperacyjnego, a także w chorobach nowotworowych przyjęło się uważać podawanie morfiny. Jednak przy dłuższym jej stosowaniu wyzwała się tolerancja i konieczność zwiększenia dawek dla osiągnięcia pożądanego efektu, co w konsekwencji prowadzi do uzależnienia, działania euforycznego, depresji oddechowej. Dlatego tak bardzo ważnym celem badań naukowców na całym świecie stało się poszukiwanie nieuzależniających substancji pomocniczych w łagodzeniu bólu. Nowych leków i metod terapeutycznych leczenia bólu, a także substancji, które mogłyby stanowić nową generację leków alternatywnych dla obecnie stosowanych, silnie uzależniających leków opioidowych.

Powyższa praca przeglądowa ukazuje, że inhibitory enzymów rozkładających enkefalinę wydają się być obiecującymi środkami leczniczymi o działaniu przeciwbólowym. Stanowią alternatywę dla obecnie dostępnych środków przeciwbólowych. Ich szczegółowa analiza wykazała, że nie powodują efektów ubocznych charakterystycznych dla opioidów. Posiadają one często dodatkowo właściwości przeciwbiegunkowe, przeciwdepresyjne, przeciwwzpalne i przeciwnowotworowe. Mogą stać się obiecującym kandydatem do leczenia bólu u pacjentów, którzy nie mogą stosować obecnie dostępnych środków znieczulających.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Dobrogowski, J. Wordliczek, *Leczenie bólu*, PZWL, Warszawa 2007.
- [2] Światowa Organizacja Zdrowia, Instytut Psychiatrii Neurologii, Warszawa, 1997.
- [3] H. Lüllmann, K. Mohr, L. Heun, D. Bieger, *Color atlas of pharmacology*, Thieme, 2005, s. 208.
- [4] V. Thanawala, J.V. Kadam, R. Ghosh, *Curr. Drug Targets*, 2008, **9**, 887.
- [5] C. Rougeot, J.F. Hualme, M.N. Ungeheuer, A. Wisner, E. Dufour, Patent, FP 1577320 T3.
- [6] P. Popik, E. Kamysz, J. Kreczko, M. Wróbel, *Behav. Brain Res.*, 2010, **213**, 88.
- [7] J. Wulfaenger, S. Niedling, D. Riemann, B. Seliger, *Mol. Membr. Biol.*, 2008, **25** 72.
- [8] A. Kubiak-Wlekły, Z.I. Niemir, *Pol. Merk. Lek.*, 2009, **157**, 51.
- [9] K. Nishimura, T. Hazato, *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 1993, **194**, 713.
- [10] G. Konieczny, A. Posadzy-Mańczyńska, A. Tykarski, *Via Medica*, 2006, **3**, 140.
- [11] M. Messaoudi, D. Desor, A. Nejdj, C. Rougeot, *Horm. Behav.*, 2004, **46**, 684.
- [12] K.P. Davies, M. Tar, C. Rougeot, A. Melman, *BJU Int*, 2007, **99**, 431.
- [13] C. Rougeot, M. Messaoudi, V Hermitte, A.G. Rigault, T. Blisnick, C. Dugave, D. Desor, F. Rougeon, *PNAS* 2003, **100**, 8549.
- [14] M. Marini, L.G. Roda, *Arch Oral Biol.*, 2000, **45**, 775.
- [15] C. Rougeot, F. Robert, L. Menz, J.F. Bisson, M. Messaoudi, *J Physiol. Pharmacol.*, 2010, **61**, 483.

- [16] A. Wisner, E. Dufour, M. Messaoudi, A. Nejdj, A. Marcel, M.N. Ungeheuer, C. Rougeot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 17979.
- [17] V. Thanawala, V.J. Kadam, R. Ghosh, *Curr. Drug Targets*, 2008, **9**, 887.
- [18] C. Rougeot, I. Rosinski-Chupin, F. Rougeon, *Biomed. Rev.*, 1998, **9**, 17.
- [19] D.P. Dickinson, M. Thiesse, *Curr. Eye Res.*, 1996, **15**, 377.
- [20] C. Rougeot, M. Messaoudi, V. Hermitte, A.G. Rigault, T. Blisnick, C. Dugave, D. Desor, F. Rougeon, *PNAS* 2003, **100**, 8549.
- [21] H. Javelot, M. Messaoudi, S. Garnier, C. Rougeot, *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, **61**, 355.
- [22] C. Rougeot, E. Dufour, S. Villard-Saussine, M.N. Ungeheuer, P. Jouannet, Patent, WO 2010/060995 A1.
- [23] L. Brkljačić, M. Sabalić, I. Salarić, I. Jerić, I. Alajbeg, I. Nemet, J. Chromatogr. B, *Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, **879**, 3920.
- [24] C. Rougeot, F. Robert, L. Menz, J.F. Bisson, M. Messaoudi, *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, **61**, 483.
- [25] K. Nishimura, T. Hazato, Musai, 1993, **42**, 1497.
- [26] T.S. Liang, J.L. Gao, O. Fatemi, M. Lavigne, T.L. Leto, P.M. Murphy, *J. Immunol.*, 2001, **167**, 6609.
- [27] K. Jung, H. Moon, G. Lee, H. Lim, C. Park, Y. Kim, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 4543.
- [28] G.A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 6525.
- [29] M. Honda, H. Okutsu, T. Matsuura, *Jpn. J. Pharmacol.*, 2001, **87**, 261.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 lutego 2014

FELIETON NAUKOWY



OKRUCHY XXXI.
ANTONI GRABOWSKI – CHEMIK-ESPERANTYSTA

Ignacy Z. Siemion, Kazimiera Lukjan

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie, 50.383 Wrocław*



prof. dr hab. Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których pięcioro się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 140 artyku-

łów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

mgr Kazimiera Lukjan ukończyła studia w 1979 roku na Wydziale Filologicznym Uniwersytetu Wrocławskiego. W tym też roku podjęła pracę w Bibliotece Wydziału Chemii UW, gdzie pracuje do chwili obecnej. Od 2004 roku pracuje na stanowisku kustosa dyplomowanego. Od 1980 roku na stałe współpracuje z czasopismem „Wiadomości Chemiczne”, a od roku 2006 z Gabinetem Historii Chemii.



źródło: <http://www.wikipedia.pl>

Nasze zainteresowanie postacią Antoniego Grabowskiego zaczęło się od wizyty u nas działacza wrocławskich esperantystów, pana Władysława Salika. Namawiał on nas, byśmy się czynnie zajęli tym byłym wrocławskim studentem chemii, który później miał się stać wybitnym propagatorem esperanta, sztucznego języka, wymyślonego przez Ludwika Zamenhofa. Bo właśnie wtedy miało nastąpić stulecie wystawienia we Lwowie „Halki” Moniuszki w języku esperanto – arii której słowa na ten język przełożył Grabowski. Dlatego rok 2012 został przez wrocławskich esperantystów ogłoszony rokiem Antoniego Grabowskiego na Dolnym Śląsku. Namawiał nas pan Salik do zorganizowania rocznicowych obchodów tego wydarzenia i przekonywał, że przecież chodzi,

bądź co bądź, o chemika, który u nas, choć za niemieckich jeszcze czasów, ukończył studia. Trzeba powiedzieć, że sprawa ta nie znalazła na naszym Wydziale specjalnego poparcia. W natłoku codziennych zajęć nie dało się o tym pomyśleć. Odnotowujemy więc te wydarzenia przynajmniej w tym tekście.

Sporo danych o życiu Antoniego Grabowskiego znaleźć można w Internecie. Stamtąd je więc w dużej mierze czerpiemy. Antoni Grabowski (1857–1921) urodził się we wsi Nowe Dobra, niedaleko Chełmna. W swoich tekstach, pisanych w języku niemieckim podpisywał się jako „von Grabowski”, co oznaczało szlacheckie pochodzenie. Można więc przypuszczać, że wywodził się z tamtejszego ziemiaństwa. Krótco po jego urodzeniu rodzina przeniosła się do Torunia, gdzie Antoni ukończył szkołę początkową i w roku 1879 Gimnazjum im. Mikołaja Kopernika. W tym samym roku znalazł się na studiach we Wrocławiu. Ukończył je w roku 1882, ze stopniem zawodowym inżyniera chemii. Podczas swoich studiów był członkiem działającego w środowisku studentów- Polaków Towarzystwa Literacko-Słowiańskiego.

Używany przez Grabowskiego tytuł zawodowy świadczy, że specjalizował się w chemicznej technologii. Chemią uniwersytecką we Wrocławiu zawiadywał podówczas przybyły z Zurychu Carl Jacob Löwig (1803–1890). Był to wprawdzie chemik średniej miary, ale odznaczał się przyjaznym ludziom charakterem. To było zapewne powodem, dla którego habilitował się u niego cały szereg wybitnych potem chemików. W roku 1856 habilitował się więc tu Hans Landolt, w lutym 1859 – Lothar Meyer, w 1866 Paul Friedländer, a w 1875 Wiktor Richter. [1] Richter po swojej habilitacji pozostał we Wrocławiu i pracował tu aż do swojej śmierci. O tej bardzo interesującej i mającej pewne związki z naszym krajem postaci nie tak dawno pisał jeden z nas w Wiadomościach Chemicznych [2]. Richter (1841–1891) urodził się w Kurlandii, a kształcił się w Dorpacie i Petersburgu, gdzie w 1871 roku uzyskał tytuł doktora. Rok później mianowano go profesorem chemii w Instytucie Technologiczno-Agronomicznym w Puławach, które car Mikołaj I przemianował na Nową Aleksandrię.

W czasie, gdy przebywał w Petersburgu, Mendelejew pracował nad sformułowaniem układu okresowego, a wyniki swoich dociekań referował na posiedzeniach Rosyjskiego Towarzystwa Chemicznego. Dokładne wiadomości o kolejnych posiedzeniach zamieszczał Richter w swoich korespondencjach, które drukowano w latach 1869–1870 na łamach niemieckich „Berichte”.

Tak więc, za pośrednictwem właśnie Richtera świat zachodni poznawał idee rosyjskiego chemika. W Puławach napisał Richter podręcznik chemii nieorganicznej, oparty na układzie okresowym. Ukazał się on w roku 1874. O niezwykłym powodzeniu tego podręcznika świadczy fakt, że do roku 1913 wyszło 12 kolejnych jego wydań w języku rosyjskim. Ukazało się też sześć wydań niemieckich, trzy amerykańskie, dwie edycje włoskie, a nawet jedno wydanie holenderskie. Taka znakomita książka powstała więc w Puławach, a jak można sądzić, richterowski wykład chemii dla studentów też musiał być pierwszym w Polsce wykładem teorii Mendelejewa. Dodajmy tutaj, że habilitacja Richtera we Wrocławiu też była oparta na niemieckim wydaniu tego podręcznika.

Richter porzucił Puławy szukając korzystniejszego dla swoich płucnych dolegliwości klimatu. Po dłuższej podróży po ciepłych, jak mówiono, krajach osiadł, jak już mówiliśmy we Wrocławiu. Löwig powierzył mu wykłady z chemii technicznej i nadzór nad praktyczną chemią organiczną dla studentów. Przyszły inżynier chemii Grabowski, musiał więc trafić pod opiekę Richtera. O przebiegu jego studiów nie zachowały się w archiwum uniwersytetu żadne wiadomości. Pewne o nich pojęcie może jednak dać przewodnik doktorski innego chemika z ziem polskich, Izidora Lewkowicza z Ostrowa, w latach późniejszych uznanego znawcy chemii tłuszczów. Materiały tego przewodu zachowały się w archiwum, wraz z jego odznaczoną najwyższym wyróżnieniem rozprawą. [3]

Lewkowicz wstąpił na uniwersytet w roku 1875, a więc w roku habilitacji Richtera, a ukończył studia, ze stopniem doktora, w roku 1879. Przez sześć semestrów odbywał zajęcia w kierowanym przez Löwiga laboratorium uniwersyteckim, a następnie, przez cztery semestry, w laboratorium Richtera. Musiały to być najważniejsze w kształceniu Lewkowicza lata, bo podkreślając rolę Richtera, swoją rozprawę doktorską poświęcił „Swemu wielce szanownemu nauczycielowi, panu prof. dr von Richterowi, z głębokim szacunkiem i wdzięcznością.” Dla naszych wywodów ważny jest tu wniosek, że, po pierwsze, w tym czasie istniała samodzielna pracownia, pozostająca pod opieką Richtera, a po drugie, że zajęcia w jej ramach trwały przez cztery semestry. W tym właśnie laboratorium musiał, jak sądzimy, pracować i Grabowski.

Po ukończeniu studiów pracował Grabowski w Zawierciu i kilku miejscowościach w Czechach i na Morawach, specjalizując się w farbiarstwie, czyli był, jak wtedy mówiono, kolorystą. W 1887 roku uzyskał ważną posadę w zakładach tekstylnych Paluszyna i Dierbienjewa w Iwanowo-Wozniesieńsku, ważnym ośrodku przemysłu tekstylnego Rosji. Pracował tam dziesięć lat, a w roku 1898 powrócił na stałe do kraju. I od roku 1904 zamieszkał w Warszawie.

O jego zawodowej aktywności dobrze świadczą dwa patenty niemieckie, które omówiono krótko w „Jahres-bericht über die Leistungen der chemischen Techno-

logie für das Jahr 1903” [4, 5]. Dotyczyły one przeciwdziałaniu wyblakaniu tkanin, przez impregnowanie ich specjalną, wynalezioną przez Grabowskiego zaprawą, w skład której wchodziła glukoza (lub syrop skrobiowy) chlorek cynku i wodorotlenek sodu, dodawany do reakcji słabo alkalicznej. Rozcieńczonym roztworem zaprawy traktował on zabarwione tkaniny, albo też dodawał ją do zaprawy barwiącej tkaniny. Pozytywne wyniki stosowania swojej metody potwierdził doświadczalnie, naświetlając potraktowane w ten sposób tkaniny. Swoim badaniom poddał dość dużą grupę barwników trójfenylometanowych (jak zieleń brylantowa, fuksyna, fioleto metylowy i inne) oraz ftaleinowych, jak np. rodamina.

Powrót Grabowskiego do kraju przypadł na szczytowy okres dyskusji toczony między warszawskimi i krakowskimi chemikami na temat polskiej nomenklatury chemicznej. Na rok 1900 przewidywano zorganizowanie w Krakowie kolejnego, IX Zjazdu lekarzy i przyrodników polskich. Chemicy warszawscy, skupieni w kole chemicznym Towarzystwa Popierania Przemysłu i Handlu, chcieli doprowadzić na tym zjeździe do ostatecznego uzgodnienia nazewnictwa. W XIX wieku ukształtowały się, niezależnie od siebie, dwie polskie chemiczne nomenklatury, krakowska i warszawska. Warszawska nawiązywała do propozycji prezentowanych przez wileńskich jeszcze chemików, Jędrzeja Śniadedckiego i Ignacego Fonberga. Bardzo ważny udział miał w Warszawie, w tworzeniu podstaw chemicznej nomenklatury, Seweryn Zdzitowiecki. On to głównie doprowadził do wydania, w 1853 roku, w Warszawie, „Projekt do słownictwa chemicznego”. Bardzo ważnym pomysłem warszawskim było między innymi zaproponowane terminu „tlen” dla dawniejszego „kwasorodu”

Krakowską nomenklaturę tworzył pracujący we Francji Filip Walter, a rozwił ją, zachowując jego propozycje, Emil Czyrniański. Jedną z rozbieżności, pomiędzy obydwojema nazewnictwami było stosowanie w Krakowie końcówek „awy” i „owy” w nazwach kwasów, zasad i soli, czemu się sprzeciwiali chemicy warszawscy. Wszczęto więc szeroką dyskusję nad tą propozycją. Grabowski, który cieszył się autorytetem wybitnego lingwisty (znał biegle 9 języków, a rozumiał 15), stał się jednym z głównych jej uczestników. Jego artykuł pt. „O terminologii naszej chemicznej”, ogłoszony w warszawskim „Wszzechświecie”, stał się podstawą prowadzonej dyskusji. [6] Dyskusję, toczoną na posiedzeniach Sekcji Chemicznej, zainspirował przewodniczący sekcji, Bronisław Znatowicz. Propozycje Grabowskiego przedyskutowano na kolejnych posiedzeniach sekcji, w dniach 7 i 28 kwietnia, oraz 12 i 26 maja 1900 roku. W dyskusjach uczestniczyło 60 członków sekcji, a wśród nich tacy prominentni warszawscy chemicy jak J. Boguski, K. Jabłczyński, W. Leppert, N. Milicer, K. Łagodziński, K. Sławiński, B. Znatowicz. Dyskutanci poparli całość propozycji, jakie wnosił Grabowski, a zwłaszcza tę, by zamiast bardzo złej końcówki „awy” używać zgodnej z duchem języka końcówki „isty”. A więc nie miało już być kwasu siarkawego, ale „kwas siarczysty”. Materiały dyskusji zostały troskliwie zebrane w specjalnej broszurze, sygnowanej przez Grabowskiego [7]. Zabrano też tam korespondencyjnie zgłoszone uwagi, przedstawione tak przez ludzi z Kongresówki, jak i Galicji. Do broszury dołączono ułożony przez Grabowskiego słownik

chemiczny, niemiecko-polski, oparty na przedstawionych przez niego propozycjach nomenklaturowych.

Stanowisko chemików galicyjskich przedstawił w obszernym piśmie T. Estreicher, a podpisali ten rodzaj odezwy czołowi chemicy Krakowa i Lwowa: S. Tołłoczko, L. Bruner, K. Olszewski, E. Bandrowski, J. Schramm. Bronili oni zawzięcie przyjętych w Galicji reguł nazewniczych, mimo, że niektórzy z nich nie tak dawno „naturyzowali się” w Galicji. Najsilniejszy sprzeciw przeciwko końcówce „awy” wyraził A. Kryński. „Przy czytaniu dzieła E. Bandrowskiego – pisał – „Wykład chemii ogólnej” (Kraków 1895, wyd. 2-e) niepodobna opędzić się przykreemu uczuciu, jakiego się doznaje spotykając co krok takie terminy jak: sole miedziawe i miedziowe, żelazawe i żelazowe, chromawe i chromowe, tlenki ołowiane i ołowiowe, itp. Tylko silne stępienie, lub zanik poczucia estetycznej strony języka mógł być źródłem natchnienia, które wytworzyło tak niefortunną, szpecącą język terminologią” [8].

Opozycja Galicji była też silna. F. Krček ze Lwowa tak więc wyrokował: „Bez obawy „nielogiczności” można pozostać przy zwyczaju krakowskim. Za nim przemawia tradycja, przeciw niemu nie przemawiają bynajmniej względy rozumowe. W każdym zaś razie – isty nie przewyższa dobrocią swego spółzawodnika, jak to wynika z tego, co powiedziałem wyżej o znaczeniu przymiotników o tym zakończeniu.” [9] W „orędziu” zaś T. Estreichera czytamy: „Mam nadzieję, że propozycja p. Grabowskiego co do zastąpienia końcówki „awy” przez „isty”, zostanie *a limie* usunięta spod rozbioru wszystkich, kogo ta sprawa obchodzi, tem bardziej, że wnosi niepotrzebnie zaczyn niezgody w kwestję zupełnie załatwioną i nie potrzebującą reformy” [10].

Na zjazd krakowski obie strony przyjechały więc z odmiennymi stanowiskami. Nie wiemy, czy ta kwestia była na zjeździe dyskutowana. Faktem jest, że historycznie zwyciężyła końcówka „awy” i w ogóle przestała ona razić ucho chemika. Ale nie było to zwycięstwo absolutne. Bo współczesne ustalenia kompletne zaniechały końcówki „awy” na rzecz nazw wskazujących wprost wartościowość pierwiastków. A więc zostały się kwasy: „siarkowy (VI)” i „siarkowy (IV)”. Cała ta historia wyraźnie nas uczy, że raczej nie warto toczyć bojów nazewniczych.

Z tego co powiedzieliśmy wynika, że Grabowski cieszył się w gronie chemików warszawskich nie lada autorytetem, jako znawca języków. Jak już powiedzieliśmy, znał on biegle 9 języków, a rozumiał 15. Jeszcze na studiach zainteresował się sztucznym językiem, utworzonym przez księdza Johanna Martina Schleyera, o nazwie volapük. Ale zraził się do niego, kiedy podczas spotkania z twórcą języka stwierdził, że sam twórca nie umie nim mówić biegle. Poznanie, w latach 80. XIX wieku, Ludwika Zamenhofs uczyniło zaś z Grabowskiego prawdziwego entuzjastę języka esperanto. W roku 1904 założył on Warszawski Związek Esperantystów i został jego przewodniczącym. W roku 1908 związek przemianowano na Polski Związek Esperantystów, gdzie Grabowski nadal działał. Był sekretarzem I Kongresu Esperantystów w Bolonii. Walnie przyczynił się do powołania *Akademio del Esperanto* i wiele lat, kierował, jako jej dyrektor, sekcją gramatyki tej akademii. W 1910

roku opracował i wydał Słownik Języka Esperanto, który miał w latach 1910–1990 pięć wydań [11].

Ambitny plan Grabowskiego zakładał wzbogacenie języka esperanto w tłumaczenia wybitnych dzieł literatury światowej i polskiej. Pierwszym jego tego rodzaju dokonaniem było wydane, w roku 1888, tłumaczenia opowiadania Puszkina pt. „Zamiec”. Wiosną natomiast 1913 roku wydał książkę pt. *El parnaso del popoloj* (Z parnasu narodów), zawierająca tłumaczenia na język esperanto 110 utworów poetyckich 30 narodów, obok 6 oryginalnych wierszy w języku esperanto, autorstwa Grabowskiego. Książka ta miała w latach 1913–1983 siedem wydań w trzech językach.

Najwybitniejszym jednak dziełem Grabowskiego było przetłumaczenie na język esperanto „Pana Tadeusza” Adama Mickiewicza. [12] Język esperanto, jak żaden inny, okazał się znakomity do oddania osobliwości poezji Mickiewicza.

Aby umożliwić Czytelnikom posmakowanie poezji naszego wieszczka w języku esperanto, przytaczamy tutaj trzy pierwsze strofy jego bardzo znanego utworu. Jest to wszystkim znana „Pani Twardowska”, w tłumaczeniu Grabowskiego. Niewątpliwie ten teks dźwięczy bardzo podobnie do polskiego oryginału. W ten sposób nasz szkic o chemiku-lingwiście doprowadził nas do szesnastowiecznej postaci legendarnego czarnoksiężnika i zapewne alchemika, Twardowskiego. Zatarłe koleje życia czarnoksiężnika starał się odcyfrować Roman Bugaj [13]. Według Bugaja był to niemiecki znawca nauk tajemnych, Laurentius Dhur. Dhur, w łacińskiej wersji językowej to Duranovius, i już jesteśmy blisko Twardowskiego, bo „durus” to po łacinie „twardy”. Studiował on medycynę w Wittenberdze, która była wówczas słynna z uprawiania nauk tajemnych. Tutaj, w latach dwudziestych XVI wieku studiował Faust. W Wittenberdze miał Dhura poznać przebywający tutaj dla studiów nad alchemią i astrologią Franciszek Krasieński, który później protegował go na dworze królewskim. Istotnie, nazwisko Dhur, albo Dor, figuruje kilkakrotnie w latach 1549–1571 w rachunkach dworu królewskiego, gdzie Krasieński, zanim został biskupem krakowskim, pełnił funkcję podskarbiego królewskiego. Na dworze królewskim patronowała też Dhurowi stojąca blisko króla, Zygmunta Augusta, rodzina Mniszków. Wspomnijmy, że Jerzy Mniszek, miłośnik alchemii, finansował badania alchemika wszech czasów, Michała Sędziwoja. Tłumacz poematu Mickiewicza chcąc nie chcąc połączył swoją pracą stare i nowe czasy nauk chemicznych.



źródło: <http://www.wikipedia.pl> [14]

Pamięć o Grabowskim, naszym dawnym studentcie, chemiku-esperantysty, bardzo troskliwie przechowują entuzjaści esperanta. Na ścianie domu w Warszawie, przy ulicy Hożej 42, gdzie on mieszkał, umieszczono pamiątkową tablicę. Inna tablica została umieszczona we Wrocławiu, na „domu dwóch Polaków” (są to figurki dwóch postaci ludzkich, widniejące na ścianie domu przy ulicy Kuźnicznej 43) – tam Grabowski mieszkał w czasie studiów. Zamieszczamy tutaj fotografie obydwu tablic.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Patrz: *Festschrift zur Feier des hunderjārigen Bestehens der Universitāt Breslau*, wyd. G. Kaufmann, Zw. Th., Breslau 1911, s. 451.
- [2] I.Z. Siemion, *Wiktor von Richter – pierwszy na ziemiach polskich rzecznik idei Mendelejewa*, *Wiad. Chem.*, 2001, 55, 773.
- [3] I. Lewkowitsch, *Die Synthese der Nitrofettsäuren und eine neue Darstellungsmethode der Alanine (Gekrönte Freisschrift)*, Breslau 1879.
- [4] A.v. Grabowski, *Verfahre zur Darstellung einer zur Verstärkung der Lichtechtheit von Färbungen dienenden Lösung von Zinkpolyglycosat*, D.R.P. Nr 139 954, Jahres-bericht über die Leistungen der chemischen Tchnologie für das jahr 1903, Th. 2, Leipzig 1904, s. 481.
- [5] A. v. Grabowski, *Verfahren, auf Textil- und sonstigen Waaren erzeugte Färbungen und Drucke lichtecht zu nachen*, D.R.P. Nr. 141 508, jw., s. 481.
- [6] A. Grabowski, *O terminologii naszej chemicznej: Wszechświat*, 1900, Nr 13, s. 202.
- [7] A. Grabowski, *Polskie słownictwo chemiczne. Rzecz przedstawiona przez chemików warszawskich pod obrady IX Zjazdu lekarzy i przyrodników polskich w Krakowie przez Bronisława Znatowicza, przewodniczącego Sekcji Chemicznej*. Dodatek bezpłatny do Tygodnika Wszechświat. Waersaawa 1900.
- [8] Jw, s. 35.
- [9] Jw., s. 40.
- [10] Jw., s. 64.

- [11] A. Grabowski, *Słownik Języka Esperanto = Grando vortaro pola-esperanta*. Pięć wydań w latach 1910–1990.
- [12] *Sinjoro Tadek; au Lasta armita posedopreno en Litvo*; trzy wydania w 1918 roku i pięć dalszych w latach 1955–1986.
- [13] R. Bugaj, *Nauki tajemne w Polsce w dobie Odrodzenia*, Wrocław 1976.
- [14] Antoni Grabowski (chemik) [online]. Wikipedia: wolna encyklopedia, 2014-03-31 20:15Z [dostęp: 2014-04-16 16:14Z]. Dostępny w Internecie: [//pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Antoni_Grabowski_\(chemik\)&oldid=39164414](http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Antoni_Grabowski_(chemik)&oldid=39164414)

Adam Mickiewicz
„Sinjorino Twardowska”

Oni manĝas, trinkas, bruas,
Fumo, danc, „diboĉ” petola
Tutan la drinkejon skuas;
Ha, ha, hi, hi hejse, hola!

Twardowski, ĉe l’fino tabla
Kiel baŝa sin apogas,
Krias: He diboĉ diabla!
Ridigas, timigas, logas.

Jen soldat“, kun brava vido,
Ĉiujn insultas kaj puŝas;
Sonis glav”, orelon tuŝas,
El soldat” – jam leporido.

Tł. Antoni Grabowski

NOWE WYDAWNICTWA



Ćwiczenia rachunkowe z chemii analitycznej, Redakcja naukowa: Zbigniew Galus, Wydanie: dziesiąte, zmienione, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013, Oprawa miękka, s. 364

Wydany właśnie został, po raz dziesiąty, niezmiernie popularny podręcznik, z którym zetknął się chyba każdy, kto studiował albo studiuje chemię, zaś niżej podpisany korzystał z tej książki prowadząc w zamierzczłych czasach pierwsze w swoim życiu zajęcia ze studentami.

To oczywiście, że od czasu pierwszego wydania poczyniono wiele zmian. Z ostatnich poprawek należy zauważyć usunięcie programików w języku Basic z rozdziału poświęconego statystycznej analizie wyników – to dość oczywista korekta, skoro Basic praktycznie przestał być stosowany a obliczenia statystyczne można z łatwością wykonać za pomocą arkuszy kalkulacyjnych, takich jak np. Excel.

W tym miejscu uwaga: na stronie 15 pojawia się nowy rozdział „Zagadnienia chemiczna z równaniami trzeciego stopnia”. Sposób rozwiązywania takich równań jest krok po kroku opisany właśnie z zastosowaniem Excela. Proponuję „pójść za ciosem” i w innych miejscach także pokazać czytelnikowi, w jaki sposób można wykorzystać to narzędzie. Szczególnie nadaje się do tego rozdział poświęcony obliczaniu krzywych miareczkowania alkacymetrycznego, gdzie zupełnie pominięto krzywe dla kwasów wieloprotonowych (lub zasad wielowodorotlenowych). Obliczenie takich krzywych za pomocą papieru i ołówka, a nawet kalkulatora proste nie jest, natomiast można podać (skądinąd znany) wzór pozwalający wyliczyć i następnie wykreślić taką krzywą nawet np. dla kwasów trój- i więcej protonowych. Jest to niezmiernie pouczające, bo dopiero znajomość krzywej pozwala na dobranie wskaźnika, ponadto taką teoretyczną zależność można porównać ze zmierzoną (miareczkowanie pehametryczne) i wykazać korelację między teorią i doświadczeniem, co ma szczególnie walor dydaktyczny.

Zastosowanie Excela lub jego darmowych zastępników ma szczególnie sens w obliczeniach statystycznych, bo podstawowe parametry i testy są weń wbudowane. Dlatego warto o tym wspomnieć we właściwym miejscu i w ten sposób nauczyć studentów pełniejszego i racjonalnego korzystania z komputerów oraz popularnego oprogramowania.

Możliwych zmian i poprawek jest więcej. W dziale poświęconym obliczaniu potencjałów redox, przy wyprowadzaniu wzoru na potencjał w PR miareczkowania redoksometrycznego zakłada się $[H^+] = 1$, co oczywiście upraszcza formułę, ale jest uproszczeniem nieco nadmiernym. Dociekliwy student będzie miał wprawdzie możliwość samodzielnego wyprowadzenia odpowiedniego wyrażenia dla dowolnego pH i zapewne powinien sobie z nim poradzic, lecz skoro w książce starannie wyprowadza się znacznie prostsze zależności, dla tych trudniejszych przydałby się przynajmniej wzór końcowy. Nie wspominam nawet o bardziej skomplikowanych przypadkach, jak choćby taki sam wzór dla miareczkowania chromiano-

metrycznego – tu prócz wpływu pH dodatkowym problemem jest powstawanie dwóch moli jonów Cr^{3+} z jednego mola dwuchromianu i wynikająca z tego postać potencjału Nernsta.

Tradycyjnie, na końcu książki znalazły się tabele z danymi liczbowymi (gęstości roztworów kwasów, zasad i soli, stałe równowag itp.). Sądzę, że przynajmniej niektóre z tych tabel można by wzbogacić o dodatkowe, jak choćby o stałe kwasowe dla kwasu askorbinowego czy acetylosalicylowego. Oba te kwasy są dostępne w popularnych lekach i paralekach i łatwo dają się oznaczać metodami objętościowymi, co się często robi w studenckich laboratoriach. Pouczające mogą być także np. stałe trwałości kompleksów metali z aminokwasami i innymi związkami ważnymi biologicznie.

Wszystkie powyższe uwagi mają jednak w istocie charakter kosmetyczny, bowiem omawiany podręcznik jest już tak dogłębnie sprawdzoną pomocą dydaktyczną, że właściwie to nie wyobrażam sobie codziennej pracy ze studentami bez niego. Dlatego będę go nadal polecał i stosował, bo – prawdę mówiąc – dotychczas lepszego u nas nie wydano.

Prof. dr hab. Jacek Gliński
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2014

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2014 r. będzie wynosiła **200 zł + 5% VAT** 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 2014 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
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

PODZIĘKOWANIA

Komitet Redakcyjny „Wiadomości Chemicznych” pragnie złożyć słowa podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie finansowe w roku 2013:

- Panu prof. dr hab. Henrykowi Koroniakowi, Dziekanowi Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu,
- Panu prof. dr hab. Andrzejowi Trochimczukowi, Dziekanowi Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,
- Panu prof. dr hab. Andrzejowi Jeżowskiemu, Dyrektorowi Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN we Wrocławiu,
- Pani prof. dr hab. Annie M. Trzeciak, Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
- Firmie Farmaceutycznej Merck Sp. z o.o.

Kierujemy również bardzo serdeczne słowa podziękowania dla wszystkich Recenzentów i Autorów, którzy współpracowali z nami w roku 2013. To właśnie dzięki ich pracy możliwe było utrzymanie wysokiego poziomu naukowego czasopisma.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.



II Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej Horyzonty Chemii

Wrocław, 7–10 września 2014

W dniach od 7 do 10 września 2014 roku, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego odbędzie się:

II Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej.

Głównym tematem Forum jest określenie wiodących i perspektywicznych obszarów szeroko pojętej chemii nieorganicznej. Podczas konferencji zostaną zaprezentowane najważniejsze osiągnięcia i aktualne wyniki badań naukowych, będzie także okazja do dyskusji i wymiany doświadczeń.

Oczekujemy, że spotkanie uczonych o znakomitym dorobku naukowym z doktorantami i młodymi pracownikami nauki przyczyni się do określenia wizji i perspektyw rozwoju chemii, a także pozwoli nawiązać ciekawą współpracę.

W trakcie Forum przedstawimy 60-letni dorobek chemii na Uniwersytecie Wrocławskim, restytuowanej w 1954 roku po wojennej przerwie.

Zapraszamy do udziału w Forum wszystkich zainteresowanych badaniami w zakresie współczesnej chemii nieorganicznej, a przede wszystkim młodych adeptów nauki, doktorantów i studentów oraz nauczycieli chemii wraz z uczniami.

Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie: <http://fchn.chem.uni.wroc.pl>

*prof. Anna Trzeciak
przewodnicząca Komitetu Naukowego*

I EDYCJA OGÓLNOPOLSKIEJ OLIMPIADY KRYSZTALOGRAFICZNEJ



Szanowni Państwo,

w dniu 7 lipca 2012 roku, na posiedzeniu plenarnym Komitetu Krystalografii PAN została podjęta decyzja dotycząca zorganizowania cyklicznej imprezy, konkursu dla studentów i uczniów szkół ponadgimnazjalnych – **Ogólnopolskiej Olimpiady Krystalograficznej**. Komitet postanowił w ten sposób upamiętnić kilka ważnych dla krystalografii rocznic: pierwszego eksperymentu z dyfrakcją promieni rentgenowskich na kryształach (rok 1912), wykorzystania promieni rentgenowskich do określenia struktury kryształu przez W.H. i W.L. Braggów (rok 1913), Nagrody Nobla z fizyki dla Maxa von Lauego (rok 1914). Olimpiada stanowić miała także mocny akcent w polskich obchodach ustanowionego przez ONZ Międzynarodowego Roku Krystalografii – 2014.

Organizację Olimpiady Komitet Krystalografii PAN powierzył Komisji ds. Ogólnopolskiej Olimpiady Krystalograficznej, w następującym składzie: prof. dr hab. Mariusz Jaskólski, *Wydział Chemii UAM* oraz *Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu*, prof. dr hab. Anna Kozioł, *Zakład Krystalografii UMCS w Lublinie*, dr hab. Edward Michalski (przewodniczący), *Instytut Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie*, prof. dr hab. Radosław Przeniosło, *Instytut Fizyki Doświadczalnej, Uniwersytet Warszawski*, dr hab. Danuta Stróż, *Instytut Nauki o Materiałach, Uniwersytet Śląski, Katowice*.

W Olimpiadzie mogą brać udział entuzjaści krystalografii – studenci studiów I i II stopnia oraz uczniowie szkół ponadgimnazjalnych wszystkich placówek znajdujących się na terenie Polski. Olimpiada składa się z dwóch etapów: uczelnianego oraz finałowego ogólnopolskiego. Procedura wyłaniania reprezentacji na etapie uczelnianym jest sprawą wewnętrzną odpowiednich jednostek i może odbywać się w sposób ustalony np. drogą eliminacji czy też rankingu ocen uzyskanych z przedmiotów zawierających treści krystalograficzne. Oficjalnym językiem finału pierwszej edycji Olimpiady będzie język polski. Zgłoszenia uczestników do etapu finałowego należy przysyłać na adres Komisji do **15 maja 2014 roku**. Krajowy finał I edycji Ogólnopolskiej Olimpiady Krystalograficznej odbędzie się 25 czerwca 2014 r. we Wrocławiu, zaś uroczyste wręczenie nagród, podczas inauguracji 56. Konwersatorium Krystalograficznego.

Dla laureatów, oprócz prestiżowych dyplomów, przewidziane są cenne nagrody ufundowane przez sponsorujące Olimpiadę firmy: głównego sponsora Testchem/Rigaku oraz współsponsorów – PANalytical, Bruker i Agilent Technologies. Wśród nagród przewidziane są m.in. siedmiodniowa wycieczka do Japonii połączona ze zwiedzaniem zakładów Rigaku oraz komputer MacBook.

Więcej informacji można znaleźć na stronie internetowej Ogólnopolskiej Olimpiady Krystalograficznej: www.komkryst.pan.pl, gdzie zamieszczono m.in. regulamin Olimpiady, informacje dotyczące zakresu materiału objętego konkursem, wykaz zalecanych podręczników oraz inne materiały np. listę przykładowych pytań z podziałem tematycznym.

Zaproszenia do wzięcia udziału w I Ogólnopolskiej Olimpiadzie Krystalograficznej wraz z plakatami zostały rozesłane w listopadzie 2013 roku, do około stu pięćdziesięciu zakładów/wydziałów/uczelni i innych instytucji oraz indywidualnych osób zaangażowanych w dydaktykę krystalografii.

*Edward Michalski,
Wojskowa Akademia Techniczna w Warszawie*



Politechnika Wrocławska

Studia Doktoranckie na Wydziale Chemicznym

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej ogłasza nabór na czteroletnie stacjonarne **STUDIA DOKTORANCKIE** w roku akademickim 2014/2015, w następujących dyscyplinach:

- **BIOTECHNOLOGIA**
- **CHEMIA**
- **INŻYNIERIA CHEMICZNA**
- **TECHNOLOGIA CHEMICZNA**

Warunkami przyjęcia na studia są ukończone studia wyższe II stopnia i pozytywny wynik postępowania kwalifikacyjnego.

Zgłoszenia wraz z wymaganymi dokumentami należy składać w Dziale Nauczania Politechniki Wrocławskiej (Wybrzeże Wyspiańskiego 27, budynek A-1, pokój 153) w dniach od 5 do 28 maja bieżącego roku.

Przewidywany termin rozmów kwalifikacyjnych: 23–25 czerwca 2014.

Kandydaci zakwalifikowani na studia, którzy uzyskają wysoką lokatę w postępowaniu rekrutacyjnym, mogą otrzymać stypendium doktoranckie. Ponadto, zgodnie z Regulaminem Studiów Doktoranckich, doktoranci mogą ubiegać się o stypendia socjalne i naukowe.

Dodatkowe informacje, w tym o potencjalnych promotorach, można uzyskać na stronach internetowych Studium Doktoranckiego Politechniki Wrocławskiej (<http://www.doktoranci.pwr.wroc.pl>) i Wydziału Chemicznego (<http://www.ch.pwr.wroc.pl>).

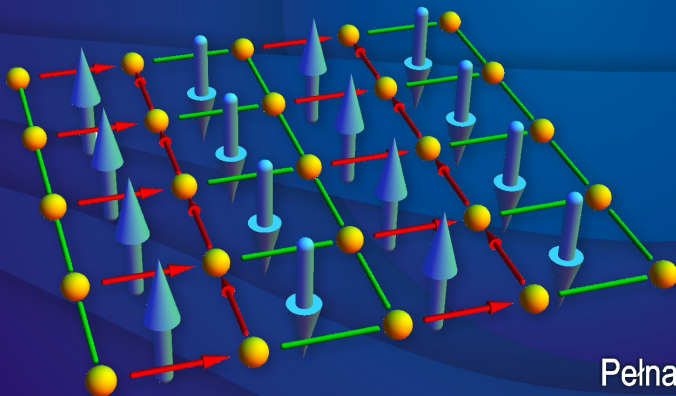


Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych
im. Włodzimierza Trzebiatowskiego
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

zaprasza na

STUDIA DOKTORANCKIE

FIZYKA I CHEMIA CIAŁA STAŁEGO



Stypendium im. W. Trzebiatowskiego
dla najlepszych doktorantów

Program praktyk i staży dla
studentów wszystkich lat studiów

Termin składania podań: **23 czerwca 2014 r.**

Pełna informacja: www.intibs.pl





VIII Kopernikańskie

Seminarium

Doktoranckie

25 – 27 czerwca 2014

"Gród Piasta"

Chomiąża Szlachecka k. Żnina

Wydział Chemii UMK

Serdecznie zapraszamy
wszystkich Doktorantów Nauk Ścisłych
i Przyrodniczych

<http://www.ksd.chem.umk.pl>

ksd@chem.umk.pl

by Marta Cwiklińska

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 indywidualności 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. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, 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 substacji 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 I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomościach Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za **kolorowe rysunki i wykresy** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie:

<http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

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

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl lub wchem@chem.uni.wroc.pl, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Anna NOWICKA, Hanna LISZKIEWICZ, Wanda Paulina NAWROCKA: Syntezy wybranych zasad Manni- cha o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej <i>in vitro</i>	161
Anna NOWICKA, Hanna LISZKIEWICZ, Wanda Paulina NAWROCKA: Zasady Schiffa – wybrane syntezy, reakcje i aktywność biologiczna	187
Paulina FURMANIAK, Monika WYSZCZELSKA-ROKIEL, Paweł KUBALCZYK, Rafał GŁOWACKI: Zastoso- wanie soli chinolinowych i pirydynowych do oznaczania wybranych związków siarki w próbkach biologicznych	211
Oliwia FRĄCZAK, Aleksandra OLMA: Biwalentne ligandy receptorów opioidowych	233
Jakub CHRZANOWSKI, Stanisław LAMPERSKI: Metody obliczania napięcia międzyfazowego z symulacji komputerowych	257
Emilia Karolina KOŁEK-KACZANOWSKA, Joanna KRECZKO, Zbigniew MAĆKIEWICZ: Metody wykorzy- stywane do wizualizacji śladów linii papilarnych	279
Małgorzata SOBOCIŃSKA, Zbigniew MAĆKIEWICZ: Charakterystyka endogennych inhibitorów enzymów rozkładających enkefalinę	317
Felieton naukowy	
Ignacy Z. Siemion, Kazimiera Lukjan: Okruchy XXXI. Antoni Grabowski – chemik-esperantysta ...	329
Nowe wydawnictwa	339
Informacje	341

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Zofia KOSTURKIEWICZ: Krystalografia w Polsce
Ilona TUROWSKA-TYRK, Julia BĄKOWICZ: Transformacje strukturalne w kryształach wywołane reakcjami foto- chemicznymi
Maciej KUBICKI: Badania rozkładu gęstości elektronowej w kryształach, czyli jak zobaczyć szczegóły struktury elektronowej cząsteczek
Paulina Maria DOMINIAK: Znaczenie i przykłady zastosowania banków asferycznych pseudoatomów w krysta- lografii białek i małych cząsteczek
Barbara BANKIEWICZ, Agnieszka RYBARCZYK-PIREK, Magdalena MAŁECKA, Małgorzata DOMAGAŁA, Marcin PALUSIAK: Zastosowanie topologicznej analizy gęstości elektronowej do opisu oddziaływań niekowalen- cyjnych.
Anna OLEJNICZAK, Kamil DZIUBEK, Damian PALIWODA, Witold ZIELIŃSKI, Marcin PODSIADŁO, Andrzej KA- TRUSIAK: Krystalografia wysokich ciśnień, czyli jak zobaczyć strukturę materii głębiej
Wiesław ŁASOCHA, Katarzyna LUBERDA-DURNAŚ: Nowe metody w badaniach struktur polikryształów
Agata BIAŁOŃSKA: Od rozpoznania molekularnego do rozdziału racemicznego metodą frakcyjnej krystalizacji soli diastereomerycznych
Agnieszka KILISZEK, Wojciech RYPNIEWSKI: Struktura a patogenezą powtórzeń CNG
Mirosław GILSKI: Wysokorozdzielcza krystalografia makromolekuł