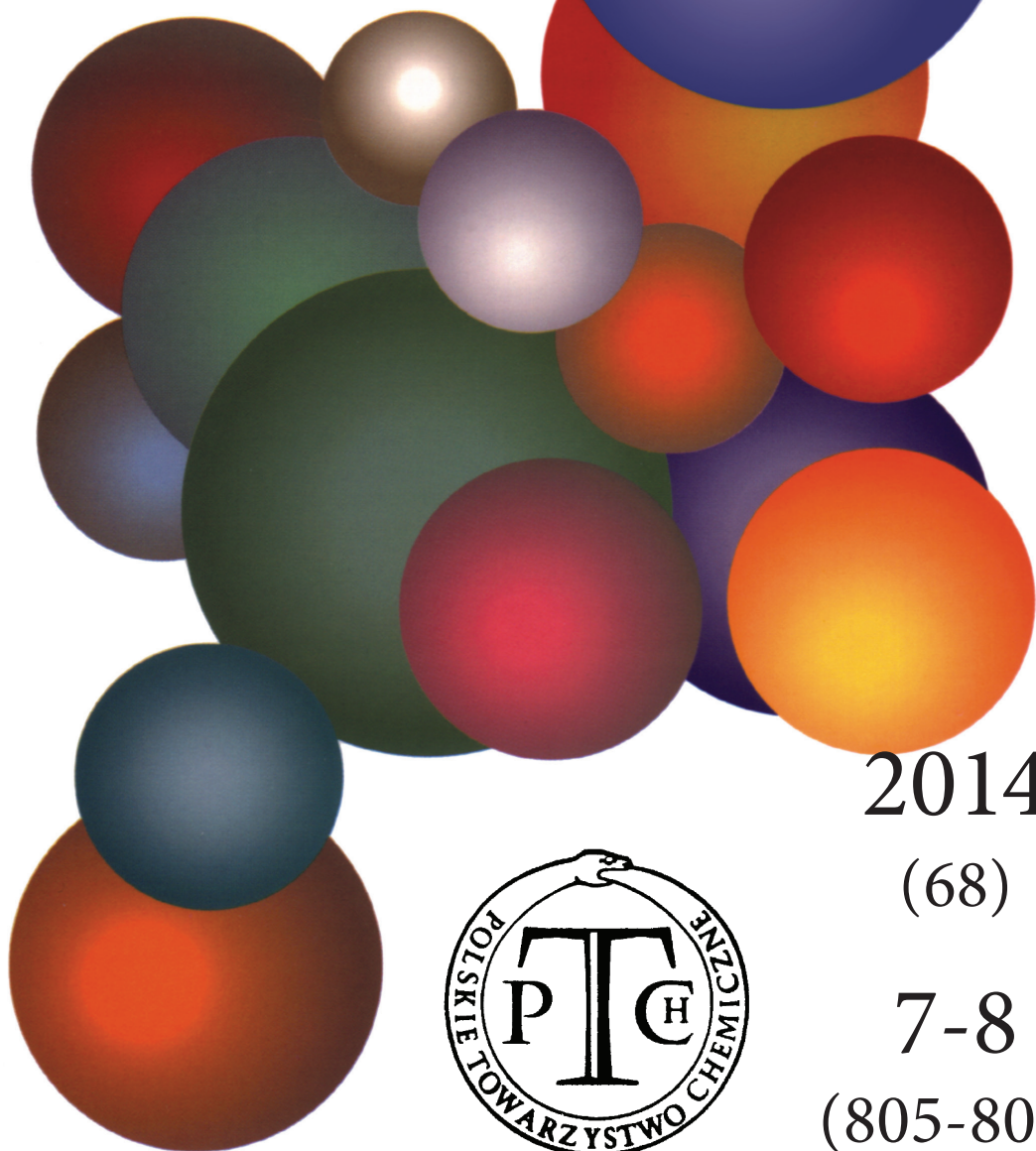


WIADOMOŚCI *chemiczne*

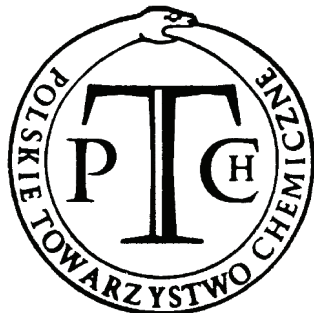


2014

(68)

7-8

(805-806)



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 JEZIERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSLAW 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: lipiec 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

ZASTOSOWANIA „CLICK CHEMISTRY” W MODYFIKACJACH NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW

APPLICATIONS OF CLICK CHEMISTRY IN MODIFICATION OF NUCLEOSIDES AND OLIGONUCLEOTIDES

Michał Gładysz*, Jan Milecki

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
Pracownia Spektrochemii Organicznej
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: migladysz@amu.edu.pl

Abstract

Wprowadzenie

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

1. Zastosowanie „Click Chemistry” w modyfikowaniu kwasów nukleinowych
2. Modyfikacje części zasady azotowej kwasu nukleinowego
 - 2.1. Antysensowne oligonukleotydy (ASO) i siRNA
 - 2.2. Nanomateriały oparte na oligonukleotydach
 - 2.3. Określanie struktury
 - 2.4. Znakowanie fluorescencyjne
 - 2.5. Poszukiwanie substancji przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych
3. Modyfikacje części cukrowej kwasu nukleinowego
 - 3.1. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C3'
 - 3.2. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C5'
 - 3.3. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C2'
4. Modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego
 - 4.1. Modyfikacje szkieletu DNA
 - 4.2. Modyfikacje szkieletu RNA
 - 4.3. Pozostałe modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego
5. Biosprzężenia

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

mgr Michał Gładysz ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w roku 2009. W tym samym roku został przyjęty na studium doktoranckie na tym samym wydziale, gdzie pod kierunkiem prof. Jana Mileckiego realizuje swoją pracę doktorską. Mgr Gładysz prowadzi badania nad syntezą acyklicznych pochodnych nukleozydów i oligonukleotydów z zastosowaniem „Click Chemistry”. Przedmiotem jego zainteresowań badawczych jest chemia nukleozydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody „Click Chemistry”.

dr hab. Jan Milecki studiował chemię na UAM i na tej samej uczelni obronił doktorat oraz się habilitował. Dwukrotnie był stypendystą NIH, odbywał staże badawcze w Freie Universitaet Berlin i Biomedical Center University of Uppsala. Jego zainteresowania badawcze to synteza modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów stosowanych w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Zajmuje się też chemią medyczną, stosowaniem trwałych izotopów do selektywnego znakowania związków organicznych, badaniami fluorescencji, spektroskopią NMR. Jest profesorem UAM.

ABSTRACT

Since the year 2001 new ideology of clean and simple synthesis in organic chemistry has been established. The outstanding scientists Meldal and Sharpless presented their concepts of Click Chemistry. Among the reactions chosen for this concept the reaction of Copper(I) Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) became the most popular one. It is the basis of syntheses employed for building blocks synthesis in medicinal chemistry and material science. Libraries of potentially pharmacologically active anticancer and antivirus compounds possessing neutral triazol linkage could be easily obtained.

Remarkable efficiency of CuAAC reaction influenced on DNA- and RNA-based synthesis of novel oligonucleotides derivatives. Many of nucleic acid molecular modifications found applications in enzymatic transformation, nucleic acid hybridization, molecular tagging and gene silencing. The CuAAC reaction allows for introducing modifications into practically every region of nucleoside/nucleotide/oligonucleotide. This includes versatile modifications of the base moiety both aiming at the base pairing ability or specific labeling of the nucleoside unit. Different conjugates (bio-, fluorescent-, affinity- or spin labels) are being attached to the base part of the nucleic acid taking advantage of the presence of azide or alkyne substituents, which can be installed without great difficulty.

Labeling at the sugar part of the nucleoside can be realized at the position 2', 3' or 5', the latter two giving rise to the end-labeled oligonucleotides and the 2' position serving as the attachment point for labeling inside the oligonucleotide chain. These kind of nucleic acid modifications are very promising. Versatility of CuAAC reactions is demonstrated by numerous examples of introducing modifications into practically every reactive site of the nucleotide/oligonucleotide molecule. The review systematically presents application of the “click” technique for modification of nitrogenous base, sugar or pseudosugar moiety or phosphorus center. Possibility of creating new kind of chain linkage, devoid of negative charge and nuclease resistant is also shown. This allows to design a new class of nucleic acid analogues, similar in its DNA-mimicking properties to PNA's.

Keywords: Click Chemistry, CuAAC, nucleosides modifications, oligonucleotides, DNA, RNA

Słowa kluczowe: „Click Chemistry”, CuAAC, modyfikacje nukleozydów, oligonukleotydy, DNA, RNA

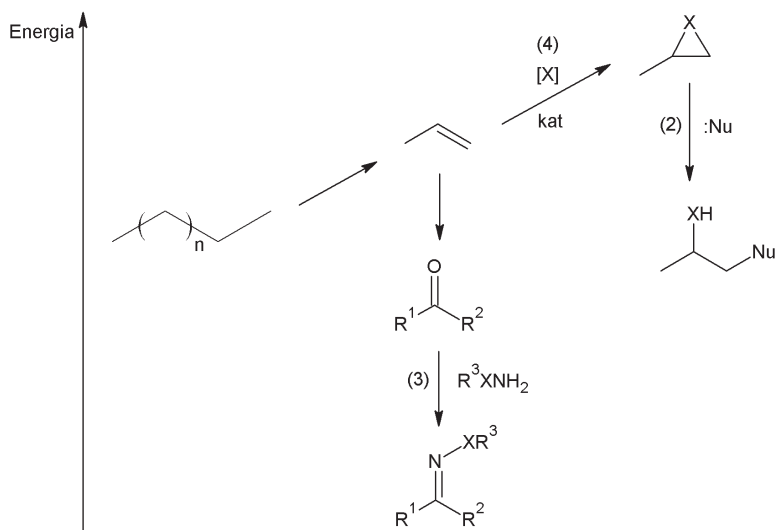
WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

CuAAC	– katalizowana miedzią(I) cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>copper(I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
RNA	– kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
5-FU	– fluorouracyl
PNA	– kwas peptydonukleinowy (ang. <i>peptide nucleic acid</i>)
RuAAC	– katalizowana rutenem(II) cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>ruthenium(II) catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
ASO	– antysensowny oligonukleotyd (ang. <i>antisense oligonucleotide</i>)
siRNA	– małe interferujące RNA (ang. <i>short-interfering RNA</i>)
ANA	– analog nukleozydu o aktywności przeciwwirusowej (ang. <i>antiviral nucleoside analogue</i>)
TFO	– oligonukleotydy tworzące potrójną helisę (ang. <i>triplex forming oligonucleotides</i>)
RSV	– wirus syncytium nabłonka oddechowego (ang. <i>respiratory syncytial virus</i>)
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>hepatitis C virus</i>)
ssDNA	– jednoniciowe DNA (ang. <i>single stranded DNA</i>)
mRNA	– matrycowe RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
TMS	– grupa trimetylosililowa (ang. <i>trimethylsilyl</i>)
Ph	– grupa fenyłowa (ang. <i>phenyl</i>)
Ac	– grupa acetylowa (ang. <i>acetyl</i>)
RNAi	– interferencja RNA (ang. <i>RNA interference</i>)
ADAR	– deaminaza adenozyiny dwuniciowego RNA
AZT	– 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i>)
N3BC	– 7-azydo-4-(bromometylo)-2H-chromen-2-on
EPR	– spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. <i>electron paramagnetic resonance</i>)
SDLS	– ukierunkowane znakowanie spinowe (ang. <i>site-directed spin labeling</i>)
TBTA	– tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metylo]amina
DIPEA	– <i>N,N</i> -diizopropylometyloamina
THF	– tetrahydrofuran
TEMPO	– wolny rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksylowy
SNP	– polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)

ANP	– acykliczne fosfoniany nukleozydów (ang. <i>acyclic nucleoside phosphonate</i>)
CML	– przewlekła białaczka szpikowa (ang. <i>chronic myelogenous leukemia</i>)
AICAR	– 5-amino-4-karboksyamido-imidazoilo1- β -D-rybofuranozyd (Acadesine)
TK	– kinaza tymidynowa
dNK	– kinaza deoksyrybonukleinowa
MSNT	– 1-(mezytyleno-2-sulfoniano)-3-nitro-1,2,4-triazol
DMT	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa
^{TL} DNA	– DNA połączone układem triazolowym (ang. <i>triazole-linked DNA</i>)
Fmoc	– grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
ODN	– oligodeoksynukleotyd (ang. <i>oligodeoxynucleotide</i>)
SPAAC	– katalizowana naprężeniem pierścienia cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>)

WPROWADZENIE

Prawie 15 lat temu, w 2001 roku, Meldal i Sharpless odkryli katalityczny wpływ jonów miedzi(I) na reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Reakcja CuAAC stała się klasycznym przykładem reakcji typu „Click Chemistry” [1]. Do tej rodziny reakcji zaliczamy również inne procesy, których wspólnym mianownikiem jest spełnianie kilku warunków - charakteryzują się wysoką wydajnością, prostotą prowadzenia, odpornością na tlen i wodę, łatwością oczyszczenia produktów i ich stabilnością w warunkach fizjologicznych. Istnieją cztery podstawowe typy reakcji spełniających te warunki: (1) cykloaddycja hetero-Dielsa-Aldera i 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena [2], (2) substytucja nukleofilowa w naprężonych elektrofilowych układach heterocyklicznych [3, 4], (3) reakcje grupy karbonylowej typu niealdolowego, (4) reakcje z udziałem wiązań wielokrotnych węgiel-węgiel (Rys.1) [1].



Rysunek 1. Różne typy reakcji „Click Chemistry” – (2) nukleofilowe otwarcie naprężonego pierścienia, (3) reakcje typu niealdolowego z karbonylem, (4) reakcje addycji do wiązania podwójnego [1]

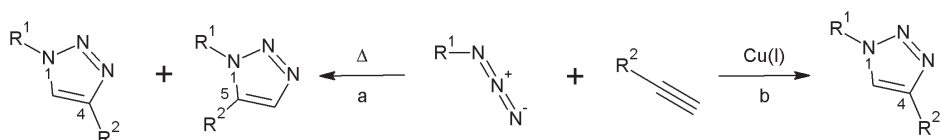
Figure 1. Different types of Click Chemistry – (2) nucleophilic ring opening, (3) non-aldol carbonyl chemistry, (4) addition to double bond [1]

Spośród tych różnych typów reakcji „Click Chemistry”, to właśnie reakcja pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem zyskała największą popularność. Dzięki dużej różnorodności, dużej szybkości reakcji, prostocie jej prowadzenia i szerokiemu wachlarzowi zastosowań [5–8], stała się kluczem do produkcji nowych materiałów [9, 10] oraz bibliotek związków o potencjalnej aktywności biologicznej [6]. Reakcja CuAAC może być stosowana w procesie biotransformacji żywych komórek ze względu na różnorodność warunków prowadzenia reakcji, wysoką wydajność zachodzącego sprzęgania azydku z alkinem oraz fizjologiczną bierność substratów reakcji [11]. Ważna jest również kontrola regio- jak i stereospecyficzności triazo-

lowego produktu [1]. Ponadto na korzyść stosowania metody CuAAC wpływają następujące cechy:

- Grupy alkinowe i azydkowe mogą zostać przyłączone do biocząsteczek bez istotnego zaburzenia ich biofizycznych właściwości;
- Azydki i nieaktywne alkinu są praktycznie obojętne względem grup funkcyjnych naturalnie występujących w kwasach nukleinowych czy białkach, reagują tylko ze sobą;
- Układ jednostki triazolowej jest bardzo stabilny i nie wykazuje toksyczności.

W przypadku reakcji pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem inicjowanej termicznie, czas reakcji jest długi i otrzymuje się mieszaninę regioizomerów 1,4- i 1,5-dipodstawionych 1,2,3-triazoli. Kataliza jonami miedzi(I) powoduje zwiększenie szybkości reakcji 10^6 razy oraz regioselektywny jej przebieg do produktu 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu (Schemat 1) [8].



Schemat 1. Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena inicjowana termicznie (a) oraz katalizowana jonami miedzi(I) (b) [12]

Scheme 1. Huisgen reaction of 1,3-dipolar cycloaddition initiated thermally (a) and catalyzed by copper(I) ions (b) [12]

Reakcja katalizowana związkami kompleksowymi rutenu(II) jest też regioselektywna, szybka i wydajna. Produktem reakcji RuAAC jest 1,5-dipodstawiony 1,2,3-triazol. Możliwa jest również reakcja cykloaddycji między azydkiem i alkinem wewnętrznym, która prowadzi do 1,4,5-tripodstawionych 1,2,3-triazoli (Schemat 2) [13–15].



Schemat 2. Otrzymywanie 1,4,5-tripodstawionych 1,2,3-triazoli w obecności kompleksów rutenu(II)

Scheme 2. Synthesis of 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazoles in the presence of ruthenium(II) complexes

1. ZASTOSOWANIE „CLICK CHEMISTRY” W MODYFIKOWANIU KWASÓW NUKLEINOWYCH

W procesie poszukiwań nowych farmaceutyków i narzędzi biotechnologicznych, przeprowadza się liczne i wielokierunkowe modyfikacje kwasów nukleinowych. W przypadku oligonukleotydów modyfikacje mogą służyć osłabieniu niektórych kłopotliwych cech wynikających z ich budowy – na przykład polianionowej struktury szkieletu oraz ich podatności do rozszczepiania przez nukleazy [16]. Wprowadzenie modyfikacji powoduje, że związki tej klasy znajdują zastosowania w diagnostyce molekularnej, między innymi do syntezy mikromacierzy DNA [17–19], sond molekularnych [20, 21], pełnią rolę antysensownych oligonukleotydów (ASO) [22, 23] i krótkich fragmentów dwuniciowego RNA służących wyciszeniu ekspresji genów (siRNA) [24–26]. Analogi fragmentów kwasów nukleinowych są badane jako substancje aktywne w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, jak i substancje regulujące ekspresję genów. Przeciwwirusowe analogi nukleozydów (ANA) i antysensowne oligonukleotydy są handlowo dostępne i stosowane do zwalczania chorób wirusowych oraz ekspresji wadliwych genów w chorych komórkach [27, 28]. Nadal trwają badania nad efektywnością i możliwością zastosowania siRNA w terapii farmakologicznej [29–32]. Innymi przykładami zastosowania biologicznie aktywnych pochodnych kwasów nukleinowych jest otrzymywanie syntetycznych rybozymów [33], unikalnych aptamerów [34] i oligonukleotydów formujących potrójną nić (TFO) [35].

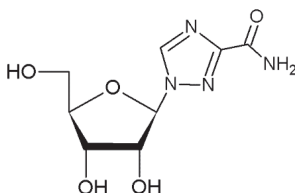
Kwasy nukleinowe mogą być modyfikowane na trzy główne sposoby: (1) modyfikacje części cukrowej nukleotydu, (2) modyfikacje nukleotydowej zasady azotowej oraz (3) modyfikacje fragmentu fosfodiesterowego będącego międzynukleotydowym łącznikiem. Do wprowadzania modyfikacji w każdej z części nukleotydu, coraz szerzej stosowana jest metoda „Click Chemistry”.

Najczęściej modyfikacje z użyciem „Click Chemistry” wprowadzane są we fragmencie zasady azotowej nukleozydu [36]. Tak przeprowadza się znakowanie fluoroforowe lub izotopowe dla obrazowania molekularnego [37–40], formuje połączenia między nićmi oligonukleotydów [41–43], wytwarza bio-połączenia z cząsteczkami transportującymi w terapiach z użyciem kwasów nukleinowych [44], a nawet syntetyzuje się nowe analogi całej części zasady azotowej nukleotydu [45–48]. Natomiast mniejsza jest liczba prac dotyczących zmian naturalnej struktury szkieletu oligonukleotydowego [49]. Głównym problemem w zastosowaniu analogów oligonukleotydów jako substancji terapeutycznych, jest ich polianionowa struktura wynikająca z obecności fosfodiesterowego łącznika [24, 26, 32]. „Click Chemistry” może zaproponować substytut dla układu fosfodiesterowego, podstawiając w jego miejsce elektrycznie obojętny i stabilny w warunkach fizjologicznych układ triazolowy.

2. MODYFIKACJE CZĘŚCI ZASADY AZOTOWEJ KWASU NUKLEINOWEGO

Zasady azotowe są najczęściej modyfikowanymi fragmentami kwasów nukleinowych, co wynika z obecności centrów aktywnych chemicznie, krótszych dróg wprowadzania modyfikacji oraz różnorodności w funkcjonalności otrzymywanych pochodnych [39, 50]. Analogi zawierające zmodyfikowaną część zasadową mogą zostać włączone w łańcuch oligonukleotydu w postaci amidofosforynowego bloku budulcowego [51]. W ten sam sposób można wprowadzić do oligonukleotydu analogi zawierające modyfikacje części cukrowej lub szkieletu. Przewagą w przypadku modyfikacji części zasady azotowej, jest możliwość włączenia analogu w środku łańcucha oligonukleotydowego, a nie tylko na jego końcach [52]. Modyfikowane zasady azotowe mogą zostać sterycznie wpasowane w dużą i małą bruzdę w dupleksach DNA i RNA, bez zakłócania bezpośrednich oddziaływań Watsona-Cricka [50, 53]. W niektórych przypadkach modyfikacja tego typu zwiększa dokładność hybrydyzacji krótkich modyfikowanych fragmentów DNA i RNA, zapobiegając niewłaściwemu sparowaniu [38, 47]. Zmienia to aktywność tak modyfikowanych analogów oligonukleotydów w procesie wyciszania wadliwych genów, poprzez zmianę termodynamiki parowania ich zasad [54].

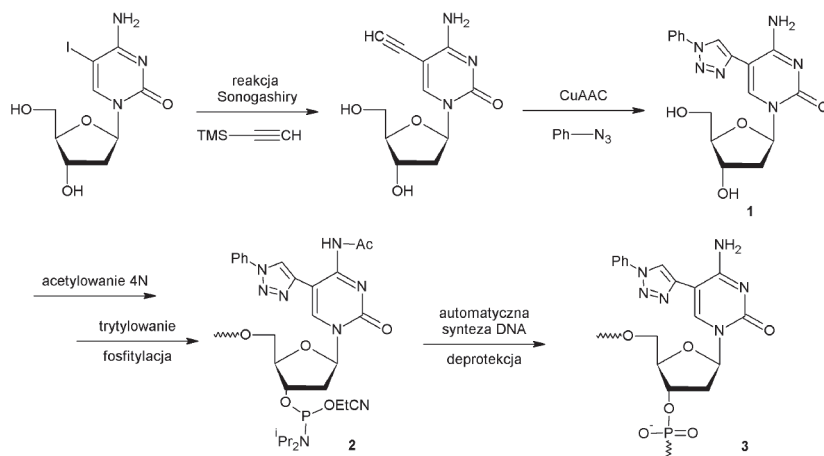
Z wykorzystaniem „Click Chemistry” najczęściej modyfikuje się pozycje 7-aza lub deaza i N⁹ adeniny lub guaniny, oraz grupy aminowe 2-N guaniny i 6-N adeniny. W przypadku zasad pirymidynowych, najczęściej modyfikowane są pozycje C5, grupa aminowa 4-N cytozyny i pozycja N¹. Modyfikacja pozycji C5 w pirymidynie i pozycji 7-deaza w purynach wykorzystuje przestrzeń dużej bruzdy dupleksów RNA i DNA oraz nie wpływa niekorzystnie na naturalne parowanie się zasad. Ta strategia pozwala na przyłączanie dużych cząsteczek w celu badań strukturalnych, fluorescencyjnej wizualizacji bądź ułatwienia transportu [40, 55, 56]. Poza modyfikacją naturalnie występujących zasad azotowych, triazole wykorzystano jako substytut tej części nukleotydu (Rys. 2) [57]. Wśród analogów nukleozydów tej grupy, można wskazać wykazujące działanie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe [58–60].



Rysunek 2. Rybawiryna – lek przeciwwirusowy stosowany w zakażeniach wirusami RSV i HCV
 Figure 2. Ribavirine – antiviral agent active against RSV and HCV viruses

2.1. ANTYSSENSOWNE OLIGONUKLEOTYDY (ASO) I siRNA

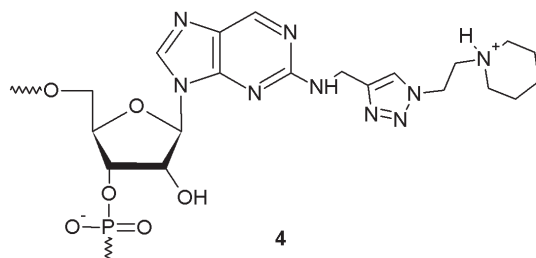
Antysensowne oligonukleotydy to jednoniciowe fragmenty DNA (ssDNA), które odnajdują i hybrydują komplementarnie ze specyficznymi transkryptami mRNA w komórkach. Ograniczają w ten sposób ekspresję niepożądanych struktur białkowych [61–63]. Ponadto dupleks ASO:RNA może aktywować enzym Rybonukleazę H (RNase H), która rozkłada transkrypt RNA lub fizycznie inhibuje jego właściwą translację. Modyfikacja zwiększa odporność ASO na degradację enzymatyczną z jednoczesnym zwiększeniem stabilności interakcji DNA:RNA [64]. W badaniach Nielsena przyłączano ugrupowanie hydrofobowe i aromatyczne w pozycji C5 zasad pirymidynowych, wykorzystując układ triazolowy [65]. Wykazano, że wpasowanie grup hydrofobowych w przestrzeń dużej bruzdy DNA może zwiększyć stabilność dupleksów, poprzez oddziaływania steryczne [66, 67]. Z powodów sterycznych jak i z uwagi na możliwość tworzenia wiązania wodorowego z protonem przy atomie węgla C5 ugrupowanie triazolowe podnosi stabilność dupleksów [65, 68, 69]. W badaniach potwierdzających te właściwości otrzymano, wychodząc z C5-jodo-cytydyny, analog cytydyny **1**, który po przekształceniu do bloku budulcowego **2** wprowadzono do sekwencji DNA otrzymując nić zawierającą analog cytydyny **3**. Podobny analog otrzymano także dla 5-(fenylotriazolo)urydyny (Schemat 3) [68]. Stwierdzono że pochodna urydyny lepiej oddziaływała z RNA lub dupleksem DNA, jako oligonukleotyd tworzący trójniciowe DNA (TFO).



Schemat 3. Synteza układu z modyfikacją w pozycji C5 cytydyny, zwiększającą stabilność dupleksu DNA
 Scheme 3. Synthesis of C5 modified cytosine structures, for increased DNA duplex stability

siRNA to dwuniciowe RNA zwykle o długości 21 par zasad, w którym jedna nić jest aktywna (przewodnia) i odpowiada za selektywne rozszczepianie transkryptów mRNA [25]. Struktury siRNA są modyfikowane w celu zredukowania ich skłonności do wiązania białek nie uczestniczących w interferencji RNA (RNAi) [70, 36]. Białka wiążące się z tym dwuniciowym RNA oddziałują głównie poprzez małą bruzdę

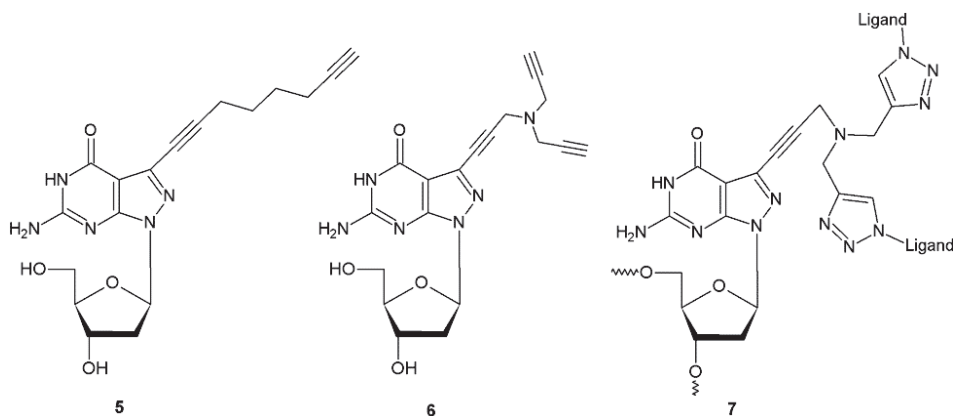
struktury dwuniciowej [71, 72]. Beal wraz z zespołem zaproponował modyfikacje rejonu małej brzozy dupletu RNA za pomocą analogu nukleotydu purynowego **4**, który włączono zarówno do nici przewodniej jak i nici nieaktywnej (Rys. 3). Okazało się, że aktywność wyciszania niechcianych genów nie została zmniejszona, ale również przy modyfikacji nici nieaktywnej zredukowano wiązanie siRNA z deaminazą adenozykową (ADAR1) uczestniczącą w metabolizmie puryn [73].



Rysunek 3. Struktura związku **4** wykorzystywanego w badaniach siRNA
Figure 3. Compound **4** used for siRNA-based applications

2.2. NANOMATERIAŁY OPARTE NA OLIGONUKLEOTYDACH

Seela i jego grupa badawcza otrzymali i przebadali nanomateriały oparte na DNA zawierającym ugrupowanie triazolowe. Możliwe jest ich zastosowanie jako substancji przenoszących leki [44] i do nanoznakowania powierzchni stałych. Zespół Seeli przeprowadził reakcje funkcjonalizowania 7-deaza-2'-deoksyguanozyny alkilowymi łącznikami o różnej długości zawierającymi terminalne mono- lub diacetylenki, otrzymując odpowiednio pochodne **5** i **6** (Rys. 4).

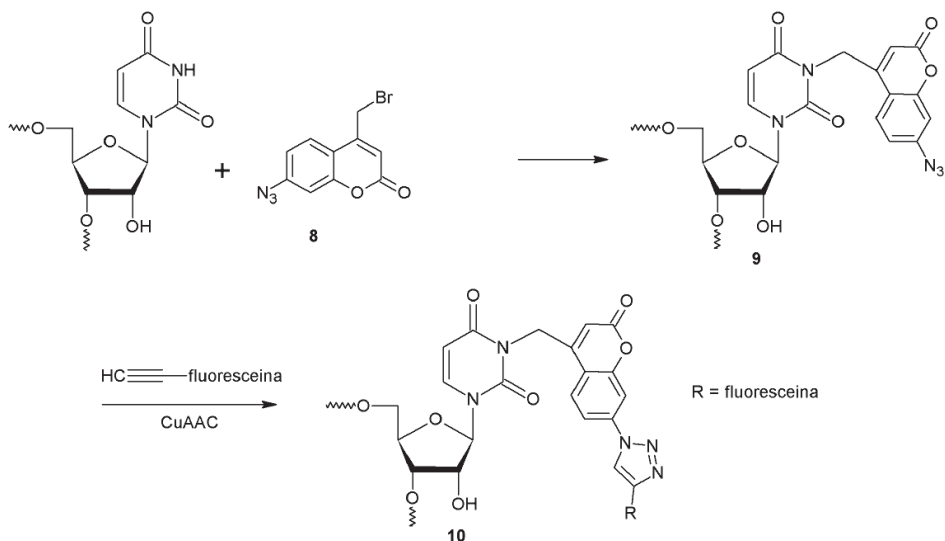


Rysunek 4. Struktury analogów 8-aza-7-deazaguanozyny z podstawnikiem alkinowym
Figure 4. Structures of 8-aza-7-deazaguanosine analogues with alkyne substituent

Po przyłączeniu związku **5** w postaci amidofosforynu do końca 5' lub w centralnym regionie syntetyzowanego oligonukleotydu, doszło do połączenia przez układ triazolowy z podłożem krzemowym sfunkcjonalizowanym azydkiem [74]. Imobilizowane oligonukleotydy formowały samoistnie wzory w zależności od położenia analogów deoksyguanozyny [68, 75]. Seela i in. kontynuowali funkcjonalizowanie związku **6** przez reakcje podwójnej cykloaddycji, wykorzystując w tym celu różne pochodne zawierające grupę azydkową (AZT, PEG-N₃, azydek benzylu) – co miało wpływ na zdolność transportu leków przez zmodyfikowany produkt **7**.

2.3. OKREŚLANIE STRUKTURY

Wiele różnych grup funkcyjnych znajduje zastosowanie w określaniu struktury i funkcji związków opartych na DNA lub RNA. Helm ze swoją grupą badawczą przeprowadził post-syntetyczne znakowanie łańcucha oligonukleotydu chromoforem (N3BC, **8**) opartym na strukturze kumaryny (Schemat 4) [79].

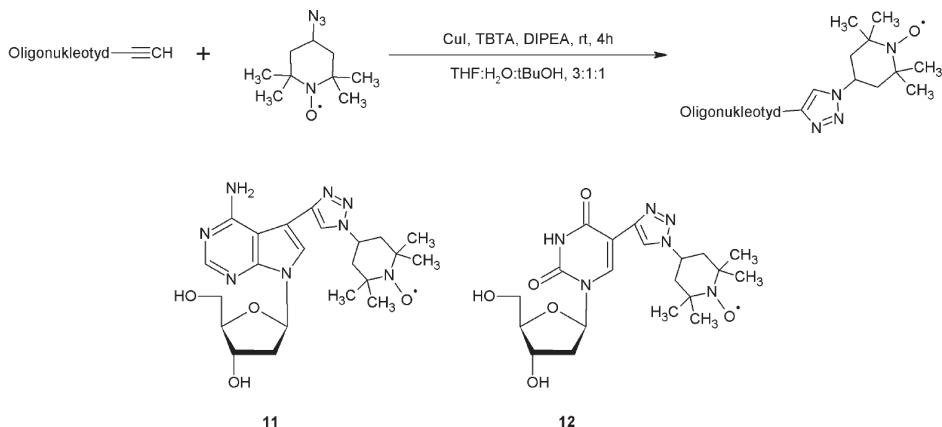


Schemat 4. Alkilowanie urydyny specyficznie w pozycji N³ za pomocą N3BC
Scheme 4. Site-specific N³-alkylation of uridine with N3BC

Chromofor N3BC reagował specyficznie z pochodną urydyny (**9**) zawartą w badanej sekwencji RNA. Wykazywał też, analogicznie do kumaryny, maksimum długości fali wzbudzenia przy 320 nm. Następnie tak zmodyfikowane RNA poddano reakcji CuAAC z fluoroforem sfunkcjonalizowanym grupą alkinową, dzięki wolnej grupie azydkowej w cząsteczce N3BC (**10**) [36].

W celu wykorzystania EPR połączonego z SDLS [76], grupa badawcza Seeli zastosowała metodę „Click Chemistry” do modyfikacji cząsteczek DNA i RNA

zawierających sfunkcjonalizowane alkinem analogi purynowe **11** i pirymidynowe **12**. Modyfikacja polegała na sprzęganiu z rodnikiem nitroksylowym 4-azydo-TEMPO będącym znacznikiem spinu (Schemat 5) [55, 77]. Był to pierwszy przykład tego typu modyfikacji służącej analizie struktury za pomocą EPR.



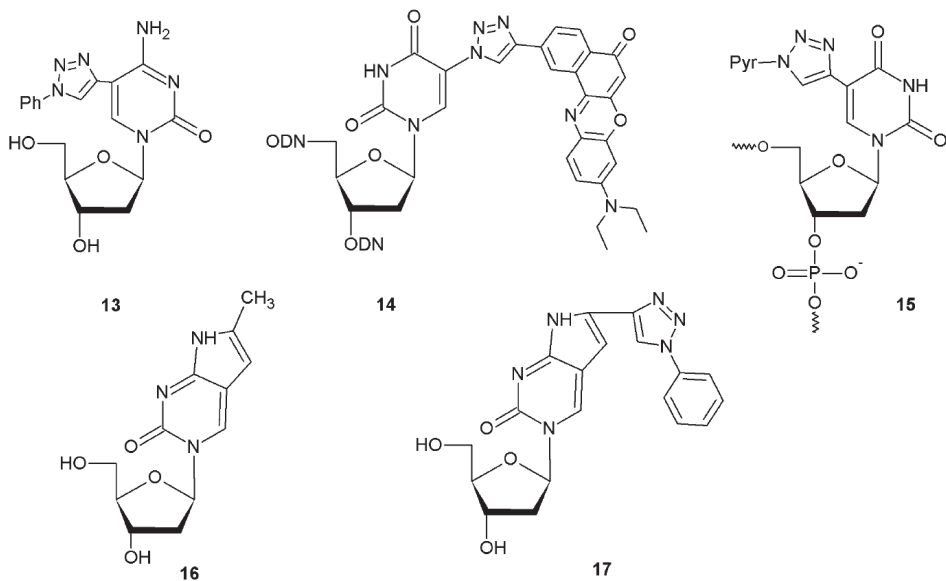
Schemat 5. Postsyntetyczne znakowanie oligonukleotydu za pomocą 4-azydo-TEMPO oraz przykładowe struktury purynowego i pirymidynowego mimika

Scheme 5. The post-synthetic click-ligation of the 4-azido-TEMPO spin label and examples of purine and pyrimidine mimics

2.4. ZNAKOWANIE FLUORESCENCYJNE

Przyłączanie sond fluorescencyjnych do zasad azotowych [38, 40, 56] lub włączanie zasady nukleinowej w strukturę fluorofora jako jego integralnej części [39, 52, 78] jest powszechną techniką znakowania oligonukleotydów. Pozwala to zbierać dane wizualizujące proces hybrydacji, w zależności od struktury badanego związku [38,79]. Zastosowanie reakcji CuAAC znacznie upraszcza proces przyłączania fragmentu fluorescencyjnego do badanych związków.

Ciekawym przykładem fluorofora jest analog cytydyny **13** (Rys. 5), który powstał w wyniku reakcji CuAAC bloku budulcowego C5-etynylocytydyny z azydem, przy czym żaden z reagentów nie jest faktycznym fluoroforem [39]. Innym przykładem jest przyłączenie fluorofora – Czerwieni Nilu, za pomocą układu triazolowego, w pozycji C5-urydyny (**14**) [56]. Żeby wykryć obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) za pomocą fluorescencji, Hrdlicka wraz z zespołem wykorzystali reakcje CuAAC i przyłączyli piren poprzez układ triazolowy w pozycji C5 urydyny. Tak otrzymany związek **15** wskazywał na obecność polimorfizmu przez obniżenie wydajności kwantowej fluorescencji w obecności zmienionej sekwencji [38].



Rysunek 5. Struktury analogów nukleozydów zawierających układ triazolowy, o właściwościach fluorescencyjnych
 Figure 5. Structures of nucleosides analogues with fluorescent properties

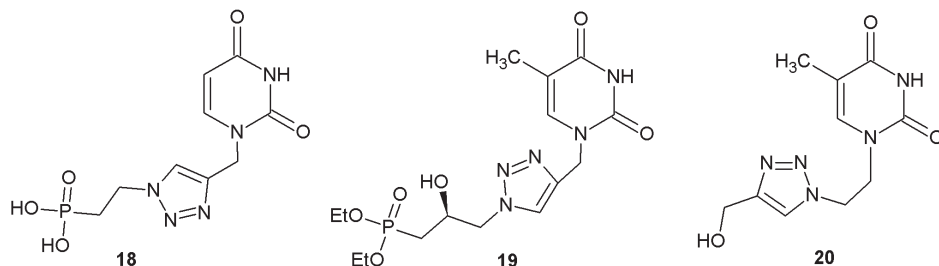
Seela i jego grupa otrzymali alternatywną pochodną pirolo-deoksycytydyny **16**, którą zmodyfikowano przez układ triazolowy otrzymując związek **17**, o dziesięciokrotnie większej wydajności kwantowej fluorescencji [47]. Stwierdzono, że fluorescencja związku **17** ulega silnemu wygaszeniu przy hybrydyzacji z komplementarną sekwencją. Wygaszenie fluorescencji jest największe przy parowaniu z deoksygwanozyną.

2.5. POSZUKIWANIE SUBSTANCJI PRZECIWWIRUSOWYCH I PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Modyfikowane nukleozydy znane są ze swoich właściwości przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Związki takie jak AZT, 5-fluorouracyl czy Ribawiryna są powszechnie stosowanymi komercyjnymi lekami. Zastosowanie reakcji CuAAC umożliwia tworzenie bibliotek nowych modyfikacji o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym [80]. O możliwości tworzenia wielu pochodnych nukleozydów wykazujących aktywność leczniczą, decydują wspomniane na wstępie bardzo korzystne właściwości łącznika triazolowego i „Click Chemistry” [1, 6, 7, 11].

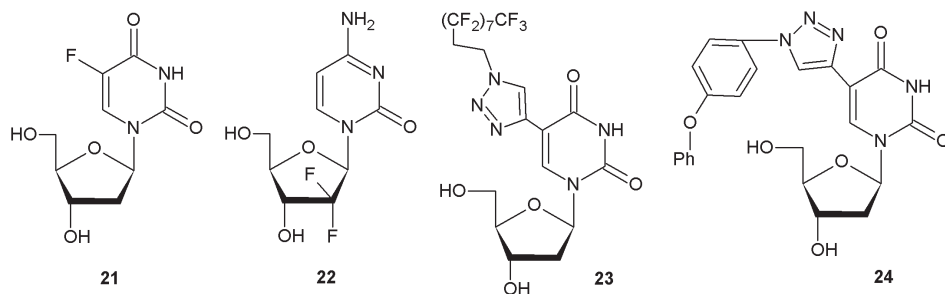
Substancje będące aktywnymi antypatogenami należą do grupy acyklicznych fosfonianów nukleozydów (ANP). Występujący naturalnie cukrowy pierścień furanozy jest w nich zastąpiony przez łańcuch alkilowy, łączący fosfonian poprzez triazol z pozycją N¹ zasady pirymidynowej lub pozycją N⁹ zasady purynowej. Przed-

stawicielami tej klasy są związki: **18**, wykazujący aktywność przeciwko wirusowi HCV [31] oraz **19**, o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym [81]. Przykładem aktywnego przeciwwirusowo acyklicznego analogu N¹-pirymidyny pozbawionego reszty fosfonianowej jest związek **20** (Rys. 6).



Rysunek 6. Struktury związków o właściwościach przeciwwirusowych
Figure 6. Compounds displaying antiviral properties

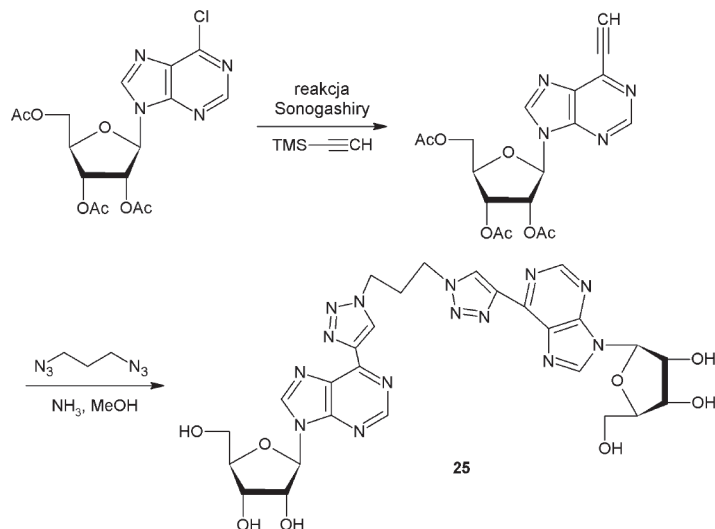
Inną grupą modyfikowanych nukleozydów o aktywności przeciwnowotworowej są fluorowane analogi, takie jak skuteczne leki 5-fluorouracyl, 5-fluorodeoksyurydyna (**21**) czy Gemcytabina (**22**). Tworzone są biblioteki związków fluorowanych zawierających układ triazolowy i testowana jest ich aktywność przeciwwirusowa [82, 58]. Modyfikując pozycję C5 układów 2'-deoksyprymidynowych [39, 65] uzyskano pochodne takie jak związek **23**. Wykazują one właściwość inhibicji wzrostu komórek rakowych [58]. Agrofoglio wraz z zespołem również opracowali bibliotekę pochodnych modyfikowanych w pozycji C5. Jeden z uzyskanych związków (**24**) wykazuje aktywność przeciw wirusom DNA, ale również jest aktywny przeciwnowotworowo w stopniu porównywalnym z 5-fluorouracylem (Rys. 7) [59].



Rysunek 7. Struktury leków przeciwnowotworowych – 5-fluorodeoksyurydyny (**21**) i Gemcytabiny (**22**) oraz związków **23** i **24**, również aktywnych przeciwnowotworowo
Figure 7. Anticancer active compounds – Floxuridine (**21**), Gemcitabine (**22**) and compounds **23** and **24**

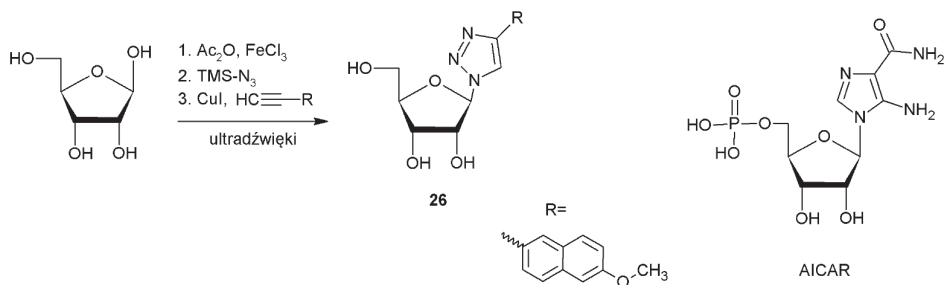
Mathew wspólnie z innymi autorami opracował syntezę analogów nukleozydów wykorzystując podstawnik alkinowy w pozycji C6 puryny. Dzięki sprzężeniu z zydkiem w reakcji typu CuAAC otrzymano kilka pochodnych takich jak dimer

homopurynowy **25** (Schemat 6). Związki tego typu są agonistami lub antagonistami receptorów adenyzynowych [83].



Schemat 6. Synteza dinukleozydu z łącznikiem triazolowym w części zasadowej
Scheme 6. Synthesis of triazole-linked dinucleosides

Kolejnym rodzajem modyfikacji jest substytucja części zasadowej nukleozydu, czyli wprowadzenie triazolu w pozycji 1'-furanozy. Istnieje kilka przykładów aktywnych biologicznie cząsteczek imitujących naturalne nukleozydy, z pierścieniem triazolowym w pozycji 1'-furanozy [84]. Praktyczną metodą wprowadzania układu triazolowego okazała się synteza z wykorzystaniem ultradźwięków. Reakcję typu „one-pot” prowadzi się w obecności jonów żelaza(III), użycie ultradźwięków skraca czas reakcji do minut, jednocześnie zwiększa się wydajność procesu (Schemat 7). Wykazano, że produkt reakcji (**26**) skraca czas życia komórek K562 przewlekłej białaczki szpikowej (CML) o 93% w porównaniu ze znanym inhibitorem AICAR skracającym ten czas o 35%.



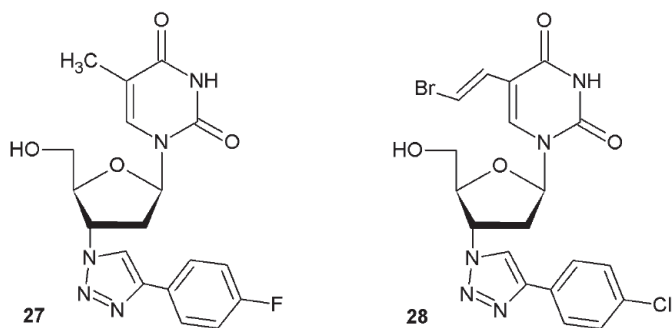
Schemat 7. Synteza mimików nukleozydów wspomagana ultradźwiękami oraz struktura AICAR
Scheme 7. Ultrasonic irradiation assisted one-pot synthesis of nucleosides mimics and AICAR structure

3. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ KWASU NUKLEINOWEGO

Modyfikacje części cukrowej nukleozydów służą przede wszystkim poszukiwaniom nowych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Wykorzystanie reakcji CuAAC umożliwia tworzenie bibliotek związków z różnorodnymi modyfikacjami, zawierających łącznik triazolowy. Ograniczeniem w przypadku tego typu zmian struktury jest niewielka ilość miejsc aktywnych w części cukrowej mogących ulec modyfikacji [85, 86]. Modyfikacje wprowadzane w pozycjach C3' i C5' są stosowane w przypadku cząsteczek monomerów lub dimerów, ewentualnie w przypadku terminalnego nukleotydu łańcucha DNA lub RNA [87–92]. Modyfikacja w pozycji C2' umożliwia wprowadzenie analogu nukleotydu w środek syntetyzowanego łańcucha oligonukleotydu [93–95].

3.1. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C3'

Bardzo popularną strategią przy wprowadzaniu modyfikacji w pozycji C3' furanozy jest wykorzystywanie komercyjnie dostępnej cząsteczki AZT jako substratu reakcji CuAAC [87]. Errikson wraz z zespołem otrzymał w ten sposób między innymi związek **27** (Rys. 8), będący inhibitorem kinazy tymidynowej 1 (TK1). Enzym ten odpowiedzialny jest za etap inicjujący replikację DNA, ograniczający szybkość całego procesu, w przypadku linii komórek rakowych ulega on nadmiernej ekspresji [96, 97].

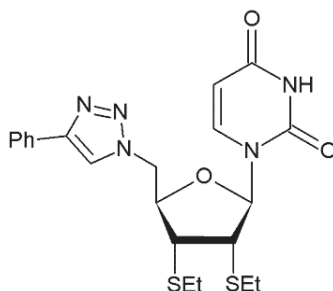


Rysunek 8. Struktury związków **27** i **28**
Figure 8. Structures of compounds **27** and **28**

Van Celenbergh wraz z zespołem w podobny sposób otrzymał analogi nukleozydów z dodatkowym podstawnikiem 2-bromowinylovym w pozycji C5 zasady azotowej [88]. Przykładem jest związek **28** (Rys. 8), będący selektywnym inhibitorem kinazy tymidynowej 2 (TK2), należącej do grupy enzymów - kinaz deoksyrybonukleinowych (dNK) [98].

3.2. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C5'

Analogi nukleozydów modyfikowane azydkiem lub alkinem w pozycji C5' rybozy mogą zostać przyłączone na końcu 5' syntetycznego oligonukleotydu. Daje to możliwość dalszej modyfikacji z użyciem reakcji CuAAC w celu polepszenia zdolności komplementarnej hybrydyzacji łańcucha, możliwości jego transportu czy potencjału cytotoksycznego [91]. Wu wraz z zespołem przebadali serię urydyn, tymidyn i cytydyn modyfikowanych triazolem w pozycji C5', pod kątem właściwości przeciwnowotworowych [89]. Związek **29** wykazał znaczną aktywność cytotoksyczną przeciwko trzem z czterech przebadanych linii komórek rakowych, przewyższając sześciokrotnie aktywność 5-fluorouracylu, będącego substancją porównawczą w badaniu (Rys. 9).

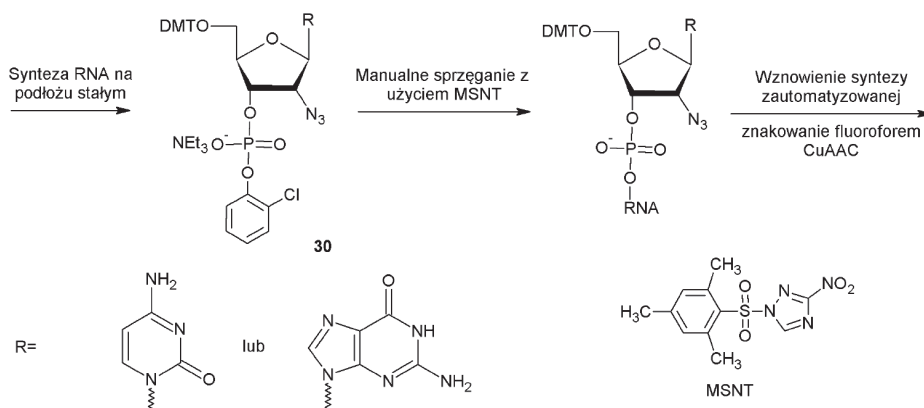


Rysunek 9. Analog urydyny **29**, modyfikowany w pozycji C5'

Figure 9. Uridine analogue **29**, modified at C5' position

3.3. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C2'

W przeciwieństwie do analogów nukleozydów modyfikowanych w pozycjach C3' i C5', związki modyfikowane w pozycji C2' mogą być włączone w dowolnej pozycji syntetycznego oligonukleotydu. Fauster wspólnie z innymi autorami opracowała analogi cytydyny i guanozyny modyfikowane w pozycji C2' grupą azydkową [93]. Problemem utrudniającym ich zastosowanie jest niekompatybilność azydków w technice amidofosforynowej syntezy oligonukleotydów (redukcja Staudingera) [99]. Dlatego w większości przypadków modyfikacji oligonukleotydu za pomocą reakcji CuAAC, wprowadza się do łańcucha nukleotydy zawierające podstawnik alkinowy. Można jednak włączyć diester **30** w określonej pozycji tworzonej nici oligonukleotydu techniką triestrową P(V), przy pomocy aktywatora MSNT (Schemat 8) [93, 100]. Kontynuowanie zautomatyzowanej syntezy z użyciem amidofosforynów nie wpłynęło negatywnie na wolną grupę azydkową w zmodyfikowanym nukleotydzie. Otrzymany w zautomatyzowanym procesie azydowany siRNA może zostać oznaczony fluoroforem. Taka strategia syntezy umożliwia uniwersalne znakowanie struktury DNA i RNA.



Schemat 8. Synteza RNA metodą amidofosforynową w obecności wolnej grupy azydkowej w pozycji C2' oraz struktura MSNT

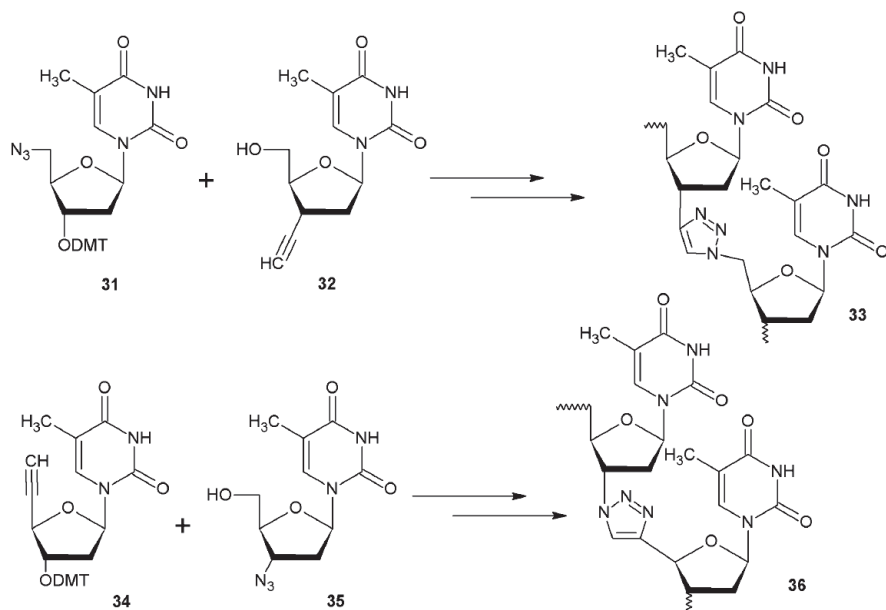
Scheme 8. RNA synthesis using phosphoramidite chemistry in the presence of free azide moiety at C2' position and structure of MSNT

4. MODYFIKACJE SZKIELETU KWASU NUKLEINOWEGO

Wprowadzanie modyfikacji w szkielecie kwasu nukleinowego jest bardzo korzystne z punktu widzenia zachowania lub zwiększenia aktywności siRNA lub ASO. Limitem długości dla syntetycznego oligonukleotydu jest w przybliżeniu sto zasad, przy wykorzystaniu tradycyjnych technik syntezy DNA i RNA, takich jak synteza amidofosforynowa na podłożu stałym [101]. W celu pominięcia limitu długości łańcucha udało się utworzyć nową klasę oligonukleotydów z modyfikowanym szkieletem, w których 1,4-dipostawiony-1,2,3-triazol stanowi internukleotydowe połączenie [33, 102]. Korzyścią płynącą z wykorzystania oligonukleotydów połączonych układem triazolowym, jest ich odporność na rozszczepienie przez endo- i egzozukleazy, co zwiększa możliwości zastosowania tych związków w środowisku fizjologicznym [5, 11, 26].

4.1. MODYFIKACJE SZKIELETU DNA

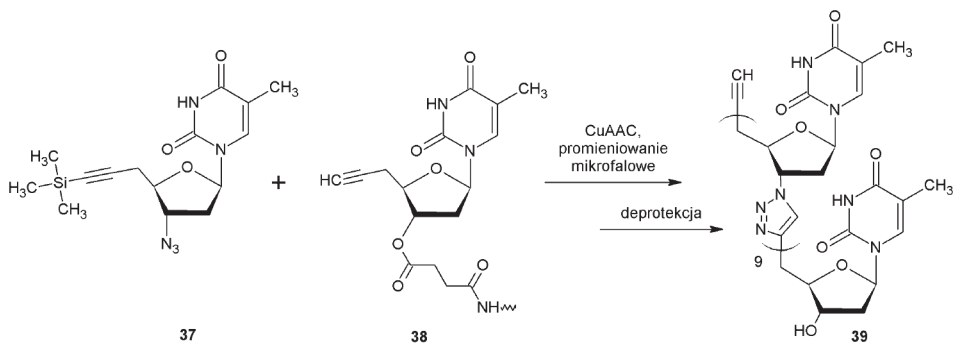
W ramach modyfikacji szkieletu DNA zamieniono naturalnie występujące połączenie fosfodiestrowe na układ triazolowy. Dondoni wspólnie z innymi autorami użył analogów nukleozydów **32** i **34** posiadających podstawnik alkinowy oraz analogów nukleozydów **31** i **35** z ugrupowaniem azydkowym; otrzymano dwa typy struktur DNA **33** i **36** o triazolowym szkielecie (Schemat 9). Otrzymane produkty różnią się liczbą atomów w zmodyfikowanym szkielecie. Otrzymano również modelową cząsteczkę trimeru składającego się z trzech nukleozydów tymidynowych połączonych ugrupowaniem triazolowym [103].



Schemat 9. Synteza analogu DNA z nienaturalnym triazolowym szkieletem

Scheme 9. Synthesis of DNA analogue with unnatural triazole backbone linkage

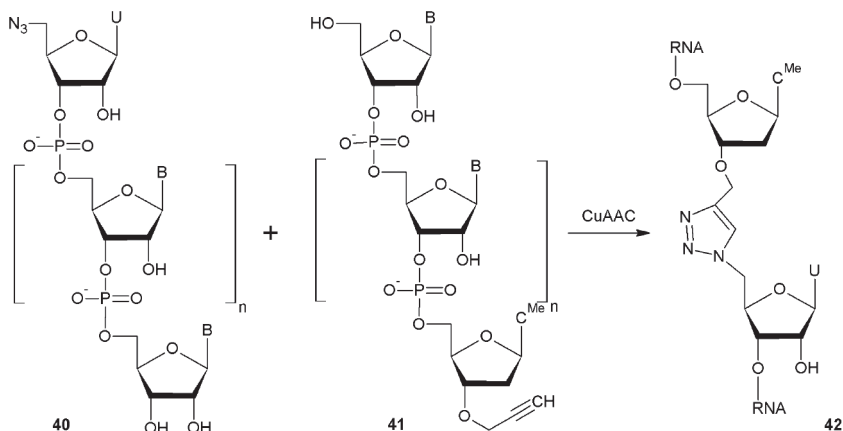
Koncepcja takiej modyfikacji szkieletu DNA została rozwinięta przez Isobe i jego zespół. Zaprojektowano i zsyntezowano nowy analog DNA połączonego układem triazolowym (^{TL}DNA) wykorzystując reakcję CuAAC. Ten analog oligonukleotydu otrzymano selektywnie i z wysoką wydajnością, co powinno umożliwić przeprowadzenie reakcji w większej skali. Pochodna azydkowa **37** i alkinowa **38** przereagowały dając chronione oligomery, które w wyniku deprotekcji dały produkt **39** (Schemat 10). Otrzymany produkt może okazać się przydatny, z perspektywy badania struktury i aktywności biologicznej oligonukleotydów, z powodu sztywnego szkieletu bogatego w elektrony π co daje możliwość koordynacji metalu [104].

Schemat 10. Katalizowana promieniowaniem mikrofalowym synteza 10-meru analogu ^{TL}DNAScheme 10. Microwave assisted synthesis of 10-mer ^{TL}DNA analogue

Otrzymany w ten sposób analog oligonukleotydu jest rozpuszczalny w wodzie do stężenia 7 μmoli na litr, przy czym rozpuszczalność zwiększa się w obecności acetonitrylu. Temperatura topnienia dupleksu utworzonego przez produkt z nicią naturalnego komplementarnego DNA wynosi 61°C. Jest to wartość znacznie wyższa od temperatury topnienia (20°C) dupleksu utworzonego przez dwie naturalne nici DNA (dA_{10}, dT_{10}). Autorzy sugerują, że korzystny wpływ na trwałość otrzymanego dupleksu ma występująca w szkielecie analogu i powtarzająca się odległość sześciu wiązań pomiędzy łącznikami triazolowymi. Większa długość triazolowego fragmentu szkieletu, zdaje się destabilizować dwuniciową strukturę. Udało się również przeprowadzić zbieżną syntezę analogu oligonukleotydu o siedmiu i ośmiu jednostkach [105]. Odblokowanie pochodnej alkinowej chronionej układem silylowym i sprzęganie typu CuAAC dwóch oligomerów przeprowadzono w systemie „one pot”. Analogi nukleotydów tego typu będą mogły konkurować z kwasem peptydono-nukleinowym (PNA) jeśli zostanie opracowana metoda syntezy T^1 DNA o mieszanej sekwencji, to znaczy oligomery będą zawierać wszystkie cztery zasady nukleinowe Watsona i Cricka w zadanej sekwencji.

4.2. MODYFIKACJE SZKIELETU RNA

Podobnie jak w przypadku modyfikacji szkieletu DNA, badania nad RNA skupiają się na zamianie naturalnie występującego łącznika fosfodiesterowego na układ triazolowy. El-Sagheer i Brown przeprowadzili łączenie metodą „Click Chemistry” mniejszych polimerów rybo- i deoksyrybonukleotydowych sfunkcjonalizowanych podstawnikami alkinowymi lub azydkowymi. Tym samym, za pomocą reakcji CuAAC uzyskano analogiczny efekt jaki otrzymano by w reakcji z udziałem ligazy przy łączeniu DNA. W tych eksperymentach udało się otrzymać serie katalitycznie aktywnych RNA lub DNA:RNA złożonych struktur rybozymów typu Hairpin i Hammerhead o długości około 100 nukleotydów [33]. Hybryda **42** została utworzona w wyniku reakcji CuAAC pomiędzy terminalnymi alkinem i azydkiem, umieszczonymi na końcach 3' lub 5' wolnych nici DNA lub RNA (Schemat 11). W wyniku reakcji substratu **40** – 5'-azydourydyny z substratem **41** – 3'-propargilo-2'-deoksycytydyny, otrzymano modyfikowane rybozymy typu Hairpin i Hammerhead wykazujące aktywność względem cząsteczek docelowych. Właściwości te świadczą o potencjalnej kompatybilności oligonukleotydów o zmodyfikowanym przez triazol szkielecie z naturalnymi kwasami nukleinowymi i związkami o aktywności biologicznej.

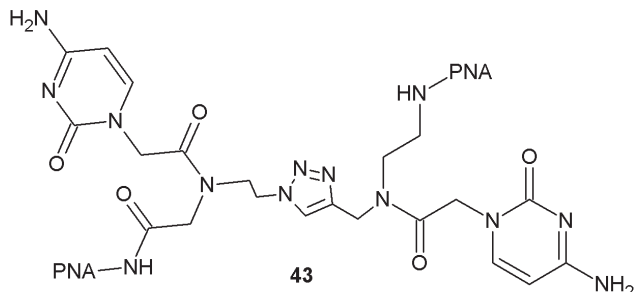


Schemat 11. Otrzymywanie hybryd DNA-RNA przy pomocy reakcji CuAAC

Scheme 11. DNA-RNA hybrids obtained with CuAAC reaction

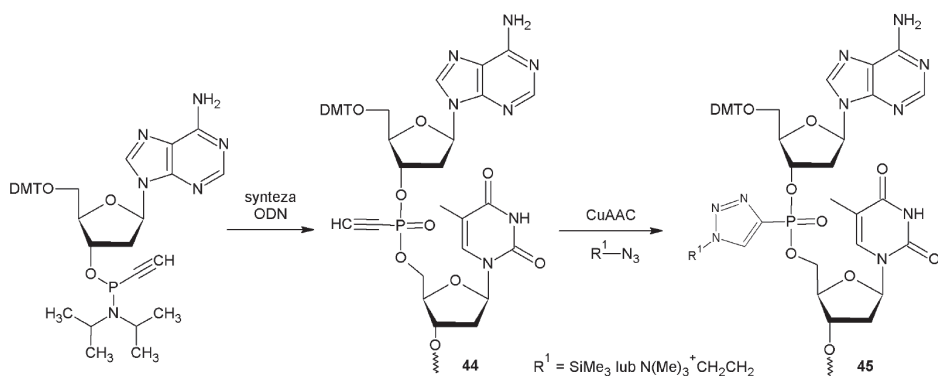
4.3. POZOSTAŁE MODYFIKACJE SZKIELETU KWASU NUKLEINOWEGO

Grupa badawcza Winssingera dokonała substytucji łącznika amidowego w kwasie peptydonukleinowym (PNA), przez łącznik triazolowy [106]. Oligomery PNA posiadające terminalną grupę azydkową zostały otrzymane w standardowej procedurze Fmoc [107], następnie przeprowadzono ich sprzężanie w reakcji CuAAC z różnymi monomerami alkinowymi. W głównym produkcie, dimerze **43**, modyfikacja w postaci łącznika triazolowego miała niewielki wpływ na zdolność hybrydyzacji modyfikowanej nici PNA i dokładność sekwencji syntetyzowanej nici (Rys. 10). Te wyniki wskazują, że grupa triazolowa jest odpowiednim zamiennikiem łącznika amidowego w PNA, co można wykorzystać do sprzężania struktur PNA w reakcji CuAAC.

Rysunek 10. Struktura PNA łączonego układem triazolowym **43**Figure 10. Structure of PNA linked with triazole moiety **43**

Krishna i Caruthers opracowali połączenie internukleotydu 1,2,3-triazolo-fosfonianowego (TP), w którym ugrupowanie 1,2,3-triazolowe związane jest przez

heterocykliczny atom węgla C4 z układem fosfonianowym [49]. Otrzymane połączenia 1,2,3-triazolofosfoniano-internukleotydy **45** są tworzone w procesie dwuetapowym. W pierwszym kroku wprowadzono połączenie internukleotydy zawierające ugrupowanie alkinowe **44**, wykorzystując klasyczną metodę amidofosforynową. W drugim etapie wykorzystano reakcję CuAAC z wybranymi azydami tworząc układ triazolowy, jeszcze przed odłączeniem syntetyzowanego oligonukleotydu od podłoża stałego (Schemat 12). W ten właśnie sposób udało się otrzymać chimery oligonukleotydydowe zbudowane z 16-23 merów, zawierające do sześciu modyfikacji 1,2,3-triazolofosfonianowych jak i innych modyfikacji [108]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że tak modyfikowane układy są wysoce odporne na działanie egzonukleaz, a stabilność dupleksów z RNA nie zmienia się znacznie. Fluorescencyjnie znakowany oligonukleotyd zbudowany z 16 zasad i dwóch połączeń typu 1,2,3-triazolofosfonianowego, został z sukcesem wychwycony przez komórki ssaka podczas transfekcji.



Schemat 12. Synteza łącznika internukleotydydowego 1,2,3-triazolofosfonianowego

Scheme 12. Synthesis of 1,2,3-triazolylphosphonate internucleotide linkage

5. BIOSPRZEŻENIA

Modyfikacje typu biosprzeżeń polegają na generowaniu połączeń pomiędzy cząsteczką oligonukleotydu i wybranymi strukturami biologicznymi. Takie połączenia zmieniają właściwości wyjściowego oligonukleotydu, przykładowo możliwe jest zwiększenie zdolności transportu syntetycznych oligonukleotydydów do określonych komórek czy tkanek, poprzez przyłączenie do nich cząsteczek białek, lipidów czy cukrów. Z kolei fluorescencyjne znakowanie syntetycznych oligonukleotydydów umożliwia nam śledzenie jaką funkcję sprawują i jak się zachowują w układach biologicznych [109, 110].

Dużym utrudnieniem jest niemożliwość stosowania katalizy jonami miedzi(I) w organizmach żywych z powodu ich toksyczności. Jony miedzi mogą powodować uszkodzenia DNA i RNA co ostatecznie prowadzi do przerwania ich nici [111].

Z tego powodu prowadzone są badania nad niekatalizowaną wersją reakcji. Dotychczasowe poszukiwania skupiają się wokół zastosowania nietoksycznych pochodnych cyklooktynu, które mogą ulegać reakcji SPAAC - katalityczny wpływ ma naprężenie struktury cyklooktynu i niepotrzebna jest obecność jonów miedzi(I) [112,113].

UWAGI KOŃCOWE

Procesy funkcjonalizacji kwasów nukleinowych w celu poszukiwania nowych właściwości biologicznych jak i rozwój nowych nanomateriałów dobrze rokują na przyszłość. Reakcja typu katalizowanej jonami miedzi(I) cykloaddycji Huisgena [3+2] okazała się bardzo wydajnym narzędziem, w porównaniu do klasycznych metod modyfikacji kwasów nukleinowych. Selektywne sprzęganie azydków z alkinami z utworzeniem 1,4-regioizomeru w szerokim spektrum warunków daje bardzo wiele możliwości prowadzenia modyfikacji nukleozydów. Jeśli dodamy do tego ilość modyfikowalnych pozycji w strukturze kwasów nukleinowych, otrzymujemy praktycznie nieskończone możliwości kreacji nowych biopolimerów, leków przeciwwirusowych i struktur wyciszających wadliwe geny.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2004.
- [2] A. Padwa, W.H. Pearson, *Synthetic Applications Of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles And Natural Products*, Wiley, New York 2002.
- [3] F.S. Liang, A. Brik, Y.C. Lin, J.H. Elder, C.H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1058.
- [4] I.M. Pastor, M. Yus, *Curr. Org. Chem.*, 2005, **9**, 1.
- [5] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4207.
- [6] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 1128.
- [7] M. Meldal, C.W. Tornoe, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2952.
- [8] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, **41**, 2596.
- [9] G. de Miguel, M. Wielopolski, D.I. Schuster, M.A. Fazio, O.P. Lee, C.K. Haley, A.L. Ortiz, L. Echegoyen, T. Clark, D.M. Guldi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 13036.
- [10] M. van Dijk, M.L. Nollet, P. Weijers, A.C. Dechesne, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2834.
- [11] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1388.
- [12] M. Dobkowski, M. Pieszko, M. Alenowicz, M. Wojciechowska, J. Ruczyński, P. Rekowski, P. Mucha, *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, 2012, **XXIX**, 21.
- [13] M.V. Gil, M.J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis*, 2007, **11**, 1589.
- [14] L. Zhang, X. Chen, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15998.
- [15] B.C. Boren, S. Narayan, L. Rasmussen, G. Jia, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8923.
- [16] I.S. Cho, J. Kim, D.H. Lim, H.C. Ahn, H. Kim, K.B. Lee, Y.S. Lee, *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30**, 1901.
- [17] M.B. Miller, Y.W. Tang, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, **22**, 611.
- [18] T.S. Seo, X.P. Bai, H. Ruparel, Z.M. Li, N.J. Turro, J.Y. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 5488.

- [19] Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 2398.
- [20] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. Tan, *Anal. Biochem.*, 2000, **283**, 56.
- [21] K. Seio, Y. Takaku, K. Miyazaki, S. Kurohagi, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2440.
- [22] J.G. Izant, H. Weintraub, *Cell*, 1984, **36**, 1007.
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, 1990, **90**, 543.
- [24] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, D.W.Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 711.
- [25] A. Fire, S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, *Nature*, 1998, **391**, 806.
- [26] J.K. Watts, G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 842.
- [27] R.S. Geary, S.P. Henry, L.R. Grillone, *Clin. Pharmacokinet.*, 2002, **41**, 255.
- [28] J.H. Huffman, R.W. Sidwell, G.P. Khare, J.T. Witkowski, L.B. Allen, R.K. Robins, *Antimicrob. Agents Ch.*, 1973, **3**, 235.
- [29] S.I. Kim, D. Shin, H. Lee, B.Y. Ahn, Y. Yoon, M. Kim, *J. Hepatol.*, 2009, **50**, 479.
- [30] S. Khaliq, S.A. Khaliq, M. Zahur, B. Ijaz, S. Jahan, M. Ansar, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 27.
- [31] H. Elayadi, M. Smietana, C. Pannecouque, P. Leyssen, J. Neyts, J.-J. Vasseur, H.B. Lazrek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 7365.
- [32] D.R. Corey, *J. Clin. Invest.*, 2007, **117**, 3615.
- [33] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 15329.
- [34] M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2012, **51**, 1316.
- [35] K. Kaihatsu, B.A. Janowski, D.R. Corey, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 749.
- [36] T. Efthymiou, W. Gong, J.-P. Desaulniers, *Molecules*, 2012, **17**, 12665.
- [37] P.M.E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 3442.
- [38] M.E. Ostergaard, D.C. Guenther, P. Kumar, B. Baral, L. Deobald, A.J. Paszczynski, P.K. Sharma, P.J. Hrdlicka, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 4929.
- [39] D.W. Dodd, K.N. Swanick, J.T. Price, A.L. Brazeau, M.J. Ferguson, N.D. Jones, R.H.E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 663.
- [40] F. Seela, S.A. Ingale, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 284.
- [41] H. Xiong, F. Seela, *Bioconjug. Chem.*, 2012, **23**, 1230.
- [42] A.H. El-Sagheer, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2009, **28**, 315.
- [43] M.F. Jacobsen, J.B. Ravnsbaek, K.V. Gothelf, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 50.
- [44] F. Seela, H. Xiong, S. Budow, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 3930.
- [45] Y. Saito, V. Escuret, D. Durantel, F. Zoulim, R.F. Schinazi, L.A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 3633.
- [46] K. El Akri, K. Bougrin, J. Balzarini, A. Faraj, R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 6656.
- [47] X. Ming, F. Seela, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 9590.
- [48] Z. Xiong, X.-L. Qiu, Y. Huang, F.-L. Qing, *J. Fluorine Chem.*, 2011, **132**, 166.
- [49] H. Krishna, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 11618.
- [50] H. Peacock, O. Maydanovych, P.A. Beal, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 1044.
- [51] E. Ohtsuka, M. Ikehara, D. Soll, *Nucleic Acids Res.*, 1982, **10**, 6553.
- [52] J.N. Wilson, E.T. Kool, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 4265.
- [53] A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photoch. Photobio. C*, 2005, **6**, 108.
- [54] H. Addepalli, Meena; C.G. Peng, G. Wang, Y. Fan, K. Charisse, K.N. Jayaprakash, K.G. Rajeev, R.K. Pandey, G. Lavine, L. Zhang, K. Jahn-Hofmann, P. Hadwiger, M. Manoharan, M.A. Maier, *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, 7320.
- [55] P. Ding, D. Wunnicke, H.-J. Steinhoff, F. Seela, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 14385.
- [56] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2230.
- [57] P. Chittepudi, V.R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 8427.

- [58] S.M. Park, H. Yang, S.-K. Park, H.M. Kim, B.H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 5831.
- [59] A. Montagu, V. Roy, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei, L.A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 778.
- [60] D.G. Streeter, J.T. Witkowski, G.P. Khare, R.W. Sidwell, R.J. Bauer, R.K. Robins, L.N. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 1174.
- [61] B.Yu, X. Zhao, L.J. Lee, R.J. Lee, *AAPS J.*, 2009, **11**, 195.
- [62] S.T. Crooke, *Basic Principles of Antisense Therapeutics*, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1998.
- [63] M.L. Stephenson, P.C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 285.
- [64] G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 937.
- [65] N.K. Andersen, H. Dossing, F. Jensen, B. Vester, P. Nielsen, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 6177.
- [66] A.J. Gutierrez, M.D. Matteucci, D. Grant, S. Matsumura, R.W. Wagner, B.C. Froehler, *Biochemistry*, 1997, **36**, 743.
- [67] P. Kumar, N. Chandak, P. Nielsen, P.K. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 3843.
- [68] P. Kocalka, N.K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 2106.
- [69] M. Whiting, J. Muldoon, Y.C. Lin, S.M. Silverman, W. Lindstrom, A.J. Olson, H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, J.H. Elder, V.V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 1435.
- [70] M. Robbins, A. Judge, I. MacLachlan, *Oligonucleotides*, 2009, **19**, 89.
- [71] K.Y. Chang, A. Ramos, *FEBS J.*, 2005, **272**, 2109.
- [72] B. Tian, P.C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, M.B. Mathews, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, **5**, 1013.
- [73] H. Peacock, E. Fostvedt, P.A. Beal, *ACS Chem. Biol.*, 2010, **5**, 1115.
- [74] G. Qing, H. Xiong, F. Seela, T. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15228.
- [75] M.N. Manalo, L.M. Perez, A. LiWang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 11298.
- [76] O. Schiemann, T.F. Prisner, *Q Rev. Biophys.*, 2007, **40**, 1.
- [77] N.G. Bushmakina, A.Y. Misharin, *Synthesis-Stuttgart*, 1986, **11**, 966.
- [78] H. Inoue, A. Imura, E. Ohtsuka, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1987, 1214.
- [79] S. Kellner, S. Seidu-Larry, J. Burhenne, Y. Motorin, M. Helm, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 7348.
- [80] M. Koszytkowska-Stawinska, E. Mironiuk-Puchalska, T. Rowicki, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 214.
- [81] M. Ganesan, K.M. Muraleedharan, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2010, **29**, 91.
- [82] R. Duschinsky, E. Plevin, C. Heidelberger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4559.
- [83] S.C. Mathew, Y. By, A. Berthault, M.-A. Virolleaud, L. Carrega, G. Chouraque, L. Commeiras, J. Condo, M. Attolini, A. Gaudel-Siri, J. Ruf, J. Rodriguez, J.-L. Parrain, R. Guieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3874.
- [84] M. Driowya, A. Puissant, G. Robert, P. Auberger, R. Benhida, K. Bougrin, *Ultrason. Sonochem.*, 2012, **19**, 1132.
- [85] A.S. Jorgensen, K.I. Shaikh, G. Enderlin, E. Ivarsen, S. Kumar, P. Nielsen, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 1381.
- [86] S.K. Singh, P. Nielsen, A.A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.*, 1998, 455.
- [87] J. Lin, V. Roy, L. Wang, L. You, L.A. Agrofoglio, D. Deville-Bonne, T.R. McBrayer, S.J. Coats, R.F. Schinazi, S. Eriksson, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 3261.
- [88] S. Van Poecke, A. Negri, F. Gago, I. Van Daele, N. Solaroli, A. Karlsson, J. Balzarini, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 2902.
- [89] J.-L. Yu, Q.-P. Wu, Q.-S. Zhang, X.-D. Xi, N.-N. Liu, Y.-Z. Li, Y.-H. Liu, H.-Q. Yin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3219.
- [90] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 723.
- [91] T. Yamada, C.G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K.N. Jayaprakash, M.R. Alam, K. Mills, M.A. Maier, K. Charisse, M. Sekine, M. Manoharan, K.G. Rajeev, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 1198.

- [92] V. Roy, A. Obikhod, H.-W. Zhang, S.J. Coats, B.D. Herman, N. Sluis-Cremer, L.A. Agrofoglio, R.F. Schinazi, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2011, **30**, 264.
- [93] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**, 581.
- [94] O. Kaczmarek, H.A. Scheidt, A. Bunge, D. Foese, S. Karsten, A. Arbusova, D. Huster, J. Liebscher, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 1579.
- [95] S.P. Sau, P.J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 5.
- [96] K. Johansson, S. Ramaswamy, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson, H. Eklund, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, **8**, 616.
- [97] M. Hallek, L. Wanders, S. Strohmeyer, B. Emmerich, *Ann. Hematol.*, 1992, **65**, 1.
- [98] S. Eriksson, B. Munch-Petersen, K. Johansson, H. Eklund, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1327.
- [99] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 1919, **2**, 635.
- [100] R. Micura, *Chem. Eur. J.* 1999, **5**, 2077.
- [101] M.H. Caruthers, *Accounts Chem. Res.* 1991, **24**, 278.
- [102] E. Paredes, S.R. Das, *ChemBioChem* 2011, **12**, 125.
- [103] A. Nuzzi, A. Massi, A. Dondoni, *QSAR Comb. Sci.* 2007, **26**, 1191.
- [104] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3729.
- [105] T. Fujino, N. Yamazaki, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.* 2009, **50**, 4101.
- [106] D. Chouikhi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 5476.
- [107] S.A. Thomson, J.A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C.F. Hassman, M.J. Luzzio, A.J. Pipe, K.L. Reed, D.J. Ricca, R.W. Wiethe, S.A. Noble, *Tetrahedron* 1995, **51**, 6179.
- [108] F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, **88**, 4292.
- [109] M. Sameiro, T. Goncalves, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 190.
- [110] M.D. Best, *Biochemistry* 2009, **48**, 6571.
- [111] J.C. Jewett, C.R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* 2010, **39**, 1272.
- [112] P. van Delft, N.J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H.S. Overkleef, G.A. van der Marel, D.V. Filippov, *Org. Lett.* 2010, **12**, 5486.
- [113] K.N. Jayaprakash, C.G. Peng, D. Butler, J.P. Varghese, M.A. Maier, K.G. Rajeev, M. Manoharan, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 5410.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 czerwca 2014

MALDI – METODA DO ZASTOSOWAŃ W ANALIZIE STRUKTURALNEJ POLIMERÓW

MALDI – METHOD FOR USE IN STRUCTURAL ANALYSIS OF POLYMERS

Beata Swinarew^{1*}, Andrzej Szymon Swinarew²

*1Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników,
Oddział Farb i Tworzyw, 44-100 Gliwice*

**e-mail: b.swinarew@impib.pl*

2Instytut Nauki o Materiałach, Uniwersytet Śląski, 40-007 Katowice

Abstract

Wprowadzenie

1. Preparatyka

2. Sprzężanie MALDI z SEC

3. Sprzężanie MALDI z urządzeniami, które oddzielają makrocząsteczki według grup funkcyjnych lub składu

4. Określanie struktury

5. Identyfikacja grup końcowych

6. Tandemowa spektrometria mas (MS/MS)

7. Charakterystyka kopolimerów

8. Przykłady zastosowania analizy MALDI w polimerach

Piśmiennictwo cytowane

dr Beata Swinarew urodziła się w Rudzie Śląskiej w 1981 roku. Dyplom magistra (2005) i stopień naukowy doktora nauk technicznych (2012) uzyskała w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Od roku 2010 pracuje w Instytucie Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu w Oddziale Farb i Tworzyw w Gliwicach na stanowisku asystenta. Od roku 2012 objęła stanowiska adiunkta. Zawodowo interesuje się modyfikowanymi poliuretanami do specjalnych zastosowań oraz technikami badań materiałów polimerowych.

dr Andrzej Swinarew urodził się w Świętochłowicach w 1980 roku. Dyplom magistra (2005) i stopień naukowy doktora nauk technicznych (2010) uzyskał w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Od roku 2009 zatrudniony jest w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach, najpierw na stanowisku asystenta, a od roku 2011 na stanowisku adiunkta w Zakładzie Polimerów i Technologii Materiałów mieszczącym się w Śląskim Międzyuczelnianym Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie. Zawodowo zajmuje się polimerowymi i niskocząsteczkowymi materiałami optycznie aktywnymi oraz modyfikowanymi poliuretanami do specjalnych zastosowań konstrukcyjnych i górniczych.

ABSTRACT

Polymers as one of the fastest growing groups of widespread use of synthetic materials are characterized by a great diversity of structures. Structural characterization of polymers generally includes: an assessment of the average molecular weight (M_n) and the molar mass distribution (PD) to determine the structure of repeating units (mers) sequence analysis of the copolymer, identification of the end groups, the detection and identification of contaminants and substances present in the composition of the polymer as a dopant. Modern mass spectrometry (MS) offers the opportunity to study the smallest structural details of macromolecular materials [1–10].

Because of the variety of potential structures of polymer analysis process is to answer a few questions by a certain pattern. The first step is to determine the chemical structure of the polymer backbone. The second step is to identify whether the chains have branching points and define the degree of branching. The third important step is to correct end groups identification, also for the detection of cyclic oligomers that can be present.

The structural studies can be made by mass spectrometer using reflectron mode. In the essence, the method involves three steps. The first analysis is performed with standard mass spectrum of the sample. Then the precursor ion (parent ion) is selected, which is subjected to further analysis by MS changed voltages and reflectron mode.

This paper aims to present the issues related to the detailed analysis and characterization of polymeric materials produced on a large scale. Before, for materials such as poly(propylene), poly(ethylene), poly(styrene), polycarbonate, etc., increasing demands on the mechanical and technological parameters were placed. Maintaining a high level of products is associated with a very rigorous process control of the manufacturing, processing and transportation at every stage. The optimal tool for the structural characteristics of these polymeric materials is the defense technique MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer) due to its versatility, speed and extremely high precision. Below, we present some aspects of MALDI MS analysis of polymeric materials and composites.

Note, that the following literature review focuses on the recent developments in the field of preparation of the samples, to achieve high mass resolution, the identification of polymers and copolymers, the accuracy of the molar mass determination and the identification of functional end groups, sequence analysis of the copolymer.

Keywords: polymers, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, copolymers, polymer degradation

Słowa kluczowe: polimery, spektrometria mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą, kopolimery, degradacja polimeru

WPROWADZENIE

Polimery jako jedna z najszybciej rozwijających się grup materiałów syntetycznych szerokiego zastosowania charakteryzują się ogromną różnorodnością struktur. Najogólniej można dokonać podziału na polimery zawierające w swojej budowie łańcuchy: liniowe, cykliczne, rozgałęzione, kopolimery o różnych architekturach, dendrymery i polimery gwiazdziste z różną liczbą ramion. Charakterystyka strukturalna polimerów zwykle obejmuje: ocenę średniej masy cząsteczkowej (M_n) oraz molowy rozkład masy (PD); określenie powtarzalnej jednostki struktury (meru); analizę sekwencji kopolimeru; identyfikację grup końcowych; wykrywanie i identyfikację zanieczyszczeń i substancji występujących w składzie polimeru jako domieszki. Nowoczesna spektrometria mas (MS) oferuje możliwość badania najdrobniejszych szczegółów strukturalnych materiałów wielkocząsteczkowych [1–10].

Najwszechstronniejszą techniką umożliwiającą badanie tej grupy polimerów jest MALDI-TOF (Spektrometria mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą z detektorem czasu przelotu), której zakres działania umożliwia rejestrowanie widm masowych do 36–500 000 Da, w niektórych przypadkach możliwa jest nawet analiza cząstek o masach przekraczających 1 MDa nawet w złożonych mieszaninach. Zarejestrowane na widmach sygnały pochodzą od nienaruszonych łańcuchów polimerowych, w związku z tym możliwe jest określenie strukturalne oligomerów. W ciągu ostatnich kilku lat byliśmy świadkami wybitnego postępu w dziedzinie zastosowania spektrometrii MALDI, co doprowadziło do powstania nowych problemów dotyczących charakterystyki polimerów. Dlatego oprócz zapewnienia jednoznacznej informacji o strukturze chemicznej polimeru, MALDI umożliwia identyfikację łańcuchów, grup końcowych i funkcyjnych, w tym fragmentów obecnych w mniejszych ilościach. Identyfikacja grup końcowych posiada kluczowe znaczenie w strukturalnej analizie masowej materiałów wielkocząsteczkowych i obecnie jest jedną z najbardziej popularnych aplikacji MALDI stosowaną do polimerów. Ustalenie struktury końcowego nienaruszonego łańcucha polimeru często pozwala poznać interesujące efekty, jak określenie procedur badawczych i przemysłowych stosowanych w syntezie polimerów, oraz pozwala na przechwytywanie informacji na temat stosowanych dodatków.

Uwaga poniższego przeglądu literaturowego skupia się na najnowszych osiągnięciach w dziedzinie: preparowania próbek, osiągnięcia wysokiej rozdzielczości masowej, identyfikacji polimerów i kopolimerów, dokładności molowego wyznaczenia masy, identyfikacji funkcyjnych i końcowych grup, analizie sekwencji kopolimeru, monitorowania reakcji polimeryzacji oraz połączenia MALDI z chromatografią cieczą.

1. PREPARATYKA

Przygotowanie próbek do pomiarów stanowi pierwszy i zarazem kluczowy element analizy i decyduje w dużym stopniu o sukcesie. W większości przypadków stosowana jest tak zwana „metoda wysuszonych kropelek” (ang. *dried droplet*) [1–4]. Matrycę, analit i sól (czynnik jonizujący) miesza się i następnie nanosi na płytkę analityczną. Metody *dried droplet* nie można używać do analizy próbek polimerów nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczających się w rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego znaczną część wysiłków poświęcono rozwojowi nowych metod preparacji próbek.

Metoda bezrozpuszczalnikowa *solvent-free* polega na zanurzeniu próbki polimeru w ciekłym azocie, po czym dodaje się sproszkowaną matrycę i mieszaninę dokładnie rozdrabnia się w obrotowym młynie kulowym. Metoda *solvent-free* znalazła zastosowanie do takich polimerów jak: polieteroimidy [11–13], poliamidy aromatyczne [14], wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) [15] itp. [16].

Ostatnio uzyskano widma całkowicie aromatycznych, słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych poliamidów (oligomery Nomex i Kevlar), stosując mokre metody mielenia [14], gdzie mieszanina matryca/próbka jest początkowo przetwarzana w znany sposób (np. przy użyciu obrotowo-kulowych młynów planetarnych), a następnie rozdrobnioną mieszaninę zawiesza się w rozpuszczalniku. Pojawiły się także doniesienia [17] o nowej metodzie przygotowania próbek, która może być uważana za wariant powyższej, ponieważ składa się z dwóch etapów. Pierwszym krokiem jest rozpylenie mieszaniny analit/matryca na podłożu i liofilizacja, a drugim krokiem jest rozmieszczenie otrzymanego proszku na drugim podłożu (płytkę analityczną).

Czasami jakość widma MALDI jest tak zła, że polimeru nie można poprawnie zanalizować. W tych przypadkach można zmodyfikować chemicznie polimer i zarejestrować jego widmo. Jednakże znalezienie skutecznej chemicznej modyfikacji może być bardzo czasochłonne.

Na przykład w przypadku nasyconych poliolefin, takich jak polietylen (PE) czy polipropylen (PP), poddaje się je przed analizą MALDI reakcji bromowania [18]. Tak modyfikowany polietylen pozwala na uzyskanie widma. Pamiętać jednak należy, że w tym przypadku średnie masy cząsteczkowe są znacząco niższe niż szacowane przy użyciu konwencjonalnych metod osmometrycznych. W innym badaniu olefiny (próbki poliizobutylenowe) zostały sulfonowane przed analizą MALDI i w tym przypadku zmierzone masy cząsteczkowe pokryły się z wartościami uzyskanymi metodą rozpraszania światła i osmometrii prężności pary, z wyjątkiem prób charakteryzujących się wysoką masą cząsteczkową i dużą dyspersyjnością, co od zawsze stanowiło bolączkę metod bazujących na czasach przelotu TOF [19].

Dla związków o niskich masach cząsteczkowych zwykle nie stosuje się powyższej preparatyki. Nawet jeśli analit pozwala na uzyskanie widma, to matryca rozpada się, tworząc różne związane jony, zatem widmo jest zaburzone związkami jonowymi

matrycy. Trudno jest zatem analizować związki o niskiej masie cząsteczkowej ($m/z < 500$ Da) za pomocą MALDI ze względu na nakładanie się pików analitu i matrycy. Aby przezwyciężyć ten problem, opracowano kilka sposobów alternatywnych.

Jednym z rozwiązań jest nałożenie polimeru bezpośrednio na płytkę analityczną bez dodawania matrycy. To działa np. dla alaniny i niektórych peptydów, ale często konieczne jest w trakcie takiej analizy podniesienie mocy lasera. W celu przezwyciężenia tej przeszkody proponuje się modyfikację. Metoda zwana DIOS (desorpcja/jonizacja na krzemie) polega na nanoszeniu analitu na porowaty krzem, który działa jak matryca (w tym sensie, że nie adsorbuje promieniowania UV i jest w stanie promować jonizację analitu), poprawiając stosunek intensywności sygnałów analitu do sygnałów szumu [20, 21].

Dostępny na rynku, absorbujący światło i elektrycznie przewodzący polimer poli(3-*N*-2-octylthiophene-5-diyl), zastosowany został jako matryca [22] do analizy niektórych cząsteczek aromatycznych i alifatycznych posiadających grupę kwasu karboksylowego. W innych badaniach [23] surfaktant pod postacią bromku cetylotrimetyloamoni dodano do matrycy CHCA (kwas α -cyjno-4-hydroksycynamonowy) i uzyskano widma różnych cząsteczek o niskiej masie. Małocząsteczkowe składniki poliestrów, jak poli(neopentylglikol adypinowy), oznaczano natomiast przy użyciu jako matrycy (10,15,20-tetrakis(pentafluorofenyl)) nazwanej F20TPP, która nie daje sygnałów poniżej $m/z = 822$ [24].

Spektrometria mas może być stosowana do określenia masy cząsteczkowej polimerów o różnych rodzajach łańcucha i rozkładu masy cząsteczkowej polimeru. Spektrometry są najczęściej wyposażone w czujnik, który daje odpowiedź zarówno od jonów masie 1 kDa, jak i 100 Da (właściwie o każdej masie), który w niego uderzy. Proces jonizacji musi być tzw. jonizacją miękką. Jeśli nastąpi jonizacja „twarda”, następuje fragmentacja łańcucha, co wpływa na pomiar i zwiększa błąd systematyczny, powodując zaniżenie M_n i M_w . Zaobserwowano również, że stopień fragmentacji cząsteczki zmniejsza się, gdy zmniejsza się moc lasera oraz gdy w trakcie preparatyki próby zastosuje się duży nadmiar matrycy. Według Montaudo niewiele polimerów ulega fragmentacji podczas jonizacji laserem; przytłaczająca większość pozostaje nienaruszona podczas desorpcji, z fragmentacją równą prawie zero. Niewielką ilość polimerów podlegających fragmentacji obejmuje polietylen [18], oraz niektóre hiperrozgałęzione polimery [25, 26]. Stosując opisaną powyżej metodę, wielu autorów porównywało wyniki analizy liczbowo średniej i wagowo średniej masy cząsteczkowej otrzymanych przy wykorzystaniu metody MALDI-TOF w stosunku do mas cząsteczkowych otrzymanych tradycyjnymi metodami (SEC, wiskozymetria, rozpraszanie światła itp.). Wykonane porównania wskazują na bardzo wysoką zgodność w przypadku polimerów o niskiej polidispersyjności syntezowanchna drodze polimeryzacji anionowej lub kationowej [3, 4, 27–30].

Warto wspomnieć o próbie, jaką przeprowadzili naukowcy z NIST (dawniej National Bureau of Standards), którzy zauważyli, że autorzy znali z wyprzedzeniem średnie masy cząsteczkowe próbek, a zatem wyniki mogą być wypaczone. Z tej przyczyny wykonano międzylaboratoryjne porównanie wyników otrzymana-

nych w 23 laboratoriach, porównanie zostało przeprowadzone na podstawie próbki polistyrenu, której średniej masy cząsteczkowej nie znali uczestnicy eksperymentu. Po otrzymaniu wyników analizy MALDI naukowcy NIST upublicznili, że próbkę o niskiej polidispersyjności otrzymano przez anionową polimeryzację i masa cząsteczkowa skupiała się na 7 kDa. Wyniki były zadowalające i faktycznie uzyskano widma, w których najsilniejsze sygnały skupiały się w okolicy 7 kDa.

Ostatnio pojawiły się doniesienia o nowej metodzie przygotowania próbek [17] polegającej na wymrażaniu mieszaniny analitu z matrycą. Sposób ten z powodzeniem zastosowano do uzyskania niskiej polidispersyjności poliwinylolipirolidonu (PVP), politlenku etylenu (PEO), dekstranu, lichenanu i nigeranu.

2. SPRZĘGANIE MALDI Z SEC

Chromatografia żelowa (SEC) jest bardzo popularną metodą separacji oraz charakteryzowania materiałów wielkocząsteczkowych i polimerów, jednak należy pamiętać, że kalibracja SEC jest podatna na błędy. Jedną z metod pomiaru stałej kalibracji polega na przygotowaniu mieszaniny pięciu lub więcej próbek polimerowych, każda z nich powinna charakteryzować się bardzo wąskim rozrzutem mas cząsteczkowych. Pomiar objętości elucji i wykreślenie ich w zależności od logarytmu masy daje parametr kalibracji niezbędny do wyznaczania mas bezwzględnych. Niezawodność techniki SEC silnie zależy od dostępności zestawu standardów o znanej masie i dyspersyjności możliwie zbliżonej do 1 oraz o takiej samej strukturze i objętości hydrodynamicznej, jak badany polimer. Często do sporządzania krzywej kalibracyjnej wykorzystuje się mieszaniny polistyrenu i zakłada, że nadają się do oznaczania mas cząsteczkowych każdego typu polimeru. Jednak jest to dużym przybliżeniem obarczonym nawet kilkudziesięcioprocentowym błędem przy oznaczaniu masy bezwzględnej.

Może zaistnieć sytuacja, że parametry, które pojawiają się w SEC w równaniu krzywej kalibracji, są niezależne od struktury polimeru. Niestety sytuacja taka nie występuje zbyt często. Przykładowo, gdy używa się tetrahydrofuranu (THF) jako rozpuszczalnika, podczas analizy SEC poliwęglanu uzyskuje się w wyniku tylko połowę masy ze względu na ogromną różnicę pomiędzy objętością hydrodynamiczną PC i PS w tym rozpuszczalniku [31]. Aby pokonać tę trudność, zaczęto stosować połączenie SEC-MALDI. Rozdzielanie składników polimerów odbywa się z zastosowaniem chromatografii żelowej SEC. Następnie wybrane frakcje analizowane są metodą MALDI. Stałe kalibracji w metodzie SEC są otrzymywane poprzez korelację danych masowych z techniki MALDI z objętościami elucji konkretnych frakcji z metody SEC. Głównym celem połączenia SEC-MALDI [3, 4] jest uzyskanie dokładnych wartości M_n i M_w , gdy próbka posiada szeroki rozrzut mas lub gdy jest to kopolimer. Pojawiły się liczne doniesienia opisujące ten sposób analizy [32–36]. Metodę tą można także zautomatyzować [33, 37–39].

Jeżeli próbka rozdzielana z zastosowaniem chromatografii żelowej SEC jest mieszaniną makrocząsteczek liniowych i cyklicznych z takim samym łańcuchem głównym, należy pamiętać, że liniowe łańcuchy i cykle mają znacząco różną objętość hydrodynamiczną. Liniowe łańcuchy zajmują większe objętości niż odpowiednie łańcuchy cykliczne, a tym samym są wymywane przy różnych czasach retencji [40–43]. Podaje się, że istnieje korelacja pomiędzy masami i opisuje się ją jako stosunek mas $DCL = M_{cyc} / M_{lin}$ w danej objętości elucji, gdzie M_{cyc} jest masą cykli i M_{lin} masą liniowych łańcuchów. Teoria ta [40] przewiduje, że DCL jest równa 1,25 dla mas do 100 kDa, a następnie zaczyna wzrastać w kierunku wyższych wartości (1,30, a nawet wyższych).

3. SPRZĘGANIE MALDI Z URZĄDZENIAMI, KTÓRE ODDZIELAJĄ MAKROZĄSTECZKI WEDŁUG GRUP FUNKCYJNYCH LUB SKŁADU

Wykazano, że niektóre cieczowe urządzenia chromatograficzne mogą rozdzielić makrocząsteczki ze względu na grupy funkcyjne. W szczególności makrocząsteczki zawierające taki sam łańcuch główny, ale różne grupy końcowe ifunkcyjne, mogą być wymywane z kolumny w innym czasie.

W odpowiednich warunkach HPLC oddziela makrocząsteczki o różnych grupach końcowych. Na początku badań Pascha i Rode [44] wykazali możliwość zbierania frakcji HPLC poli(dekametylenu adypinianu) oraz określenia występujących frakcji w oligomerach przez rejestrowanie ich widm metodą MALDI. HPLC/MALDI jest czasochłonne i dlatego jego zastosowanie jest ograniczone głównie do przypadków, gdy widmo MALDI niefrakcjonowanej próbki jest zbyt skomplikowane, aby dać pełny właściwy obraz próbek i uniemożliwia właściwą interpretację. Peetz [45] otrzymał poli(2,5-diheptyloxy-1,4-diwinilo-benzen) poprzez metatezę acyklicznego dienu. W celu wyizolowania oligomerów o różnych rozmiarach (trimer, tetramer i pentamer) przepuścił próbkę przez kolumnę chromatograficzną, a zebrane frakcje następnie wykorzystane były do analizy metodą MALDI. Każda frakcja dawała pojedyncze sygnały. Zaobserwowano także dobre dopasowanie pomiędzy wyliczonymi danymi a intensywnością sygnału.

Chromatografia cieczowa w stanie krytycznym jest prowadzona w warunkach przejścia elucja-adsorbpcja. Może być stosowana do różnego rodzaju separacji, m.in. do oddzielania makrocząsteczek o różnych grupach funkcyjnych (głównie zakończenia łańcuchów) i kopolimerów blokowych [46–48].

W chromatografii cienkowarstwowej (TLC) łańcuchy polimeru zakończone na różne sposoby dają również różnie położone plamki względem czoła rozpuszczalnika. Poprawnie analizując techniką MALDI substancje rozdzielone na płytkach TLC, można określić grupy terminalne polimeru [49].

4. OKREŚLANIE STRUKTURY

Z powodu różnorodnych potencjalnych struktur proces analizy polimeru ma odpowiedzieć na kilka pytań według pewnego schematu. Pierwszy krok polega na określeniu struktury chemicznej łańcucha głównego polimeru. Drugi etap – na ustaleniu, czy łańcuchy posiadają punkty rozgałęzień i określenie stopnia rozgałęzienia. Trzeci etap polega na ustaleniu grup końcowych, a zatem także na wykrywaniu cyklicznych oligomerów, które mogą występować. Pierwszy krok jest dość prosty. Widma masowe dwóch polimerów posiadających różne powtarzające się jednostki dadzą szerokie spektra, gdzie różnić się będą odstęp między pikami: np. w poli(glikolu etylenowym) jest odstęp 44,05 g/mol, w poli(kwasie mlekowym) 72,1 g/mol, w poli(dimetylosiloksanie) 74,1 g/mol, w poli(tereftalanie butylenu) 220,2 g/mol. Funkcja ta zapewnia identyfikację polimeru.

W przypadku oligomerów interesująca jest liczba i pozycja rozgałęzień. Korzystając z MS, ich identyfikacja jest czasami niemożliwa, bo rozgałęzione i liniowe makrocząsteczki często mają taką samą masę (poliolefiny są typowym przypadkiem takiego utrudnienia). Jednakże gdy mają grupy końcowe różne od atomów wodoru, a rozdzielność widma masowego jest wysoka, to masa polimerów rozgałęzionych i odpowiedników liniowych jest inna. Trój- lub więcej funkcyjne jednostki mogą mieć inne masy niż odpowiadający im polimer liniowy (taki przypadek często występuje w szczepionych kopolimerach). Czasami dotyczy to także mieszaniny złożonej z makrocząsteczek, gdzie powtarza się taka sama jednostka, ale o różnej architekturze. Dla przykładu podczas syntezy polimerów gwiazdzistych z czterema ramionami może zdarzyć się, że gwiazdy z trzema lub dwoma ramionami również powstaną.

Często także zdarza się, że makrocząsteczki należące do złożonej mieszaniny mają różne masy, w tych przypadkach MALDI rozróżni je i pojawią się sygnały odpowiadające poszczególnym makrocząsteczkom.

5. IDENTYFIKACJA GRUP KOŃCOWYCH

Ogólna struktura jonów wykrywany przez MALDI jest typu



gdzie G1 i G2 oznaczają grupy końcowe, C⁺ oznacza proton lub kation, A oznacza jednostkę powtarzalną (mer).

Określenie grupy końcowej przez MS jest wykonywane w następujący sposób: przeprowadza się kalkulacje masowe dla jednego z pików i odejmuje masę C, a następnie kilkakrotnie odejmuje się masę powtarzającej się jednostki, aż uzyska się sumę masy G1+G2.

6. TANDEMOWA SPEKTROMETRIA MAS (MS/MS)

Do badań strukturalnych można wykorzystać także spektrometr masowy z wykorzystaniem analizatora czasu przelotu (TOF) wyposażonego w zwierciadło jonów, czyli reflektrom. W skrócie metoda polega na trzech etapach. Przy pierwszej analizie wykonywane jest standardowo widmo masowe analizowanej próbki. Następnie wybierany jest jon-prekursor (nadrzędny jon), który poddawany jest kolejnej analizie MS przy zmienionych napięciach i trybie pomiaru reflektrom. W takiej sytuacji do analizy przez bramki przepuszczany jest tylko ten konkretny dominujący jon i otrzymujemy widmo masowe. Analiza wykonywana jest przy użyciu kolizyjnej celi wysokoenergetycznej (CID) i odpowiednich napięć zmieniających tor lotu cząstek. Efektem zderzenia w komorze jest zwiększenie liczby jonów, które oddzielają się od siebie. W ten sposób uzyskuje się widmo zwane MALDI-CID [50]. W ostatnich latach pojawił się tandem time-of-flight (TOF/TOF) – narzędzia, które są szczególnie ważne w przypadku analizy wysokiej masy pojedynczego jonu [50–52].

7. CHARAKTERYSTYKA KOPOLIMERÓW

Widma masowe kopolimerów są znacznie bardziej złożone od prostych homopolimerów, a tym samym proces analizy jest bardziej wymagający. Jednak procedura jest taka sama: najpierw stawiana jest hipoteza odnośnie struktur chemicznych, które mogą być obecne w próbce, następnie obliczana jest masa wszystkich możliwych łańcuchów i następuje sprawdzanie, czy oczekiwane sygnały są faktycznie obecne na widmie. Na przykład z widma MALDI styren-metakrylan metylu pojawia się wiele pików i różnice w masie między pikami wynoszą 108 i 100, co odpowiada dokładnie masom monomerów. Intensywności pików MS mogą być wykorzystane do określenia kompozycji kopolimeru [3, 9, 53], pod warunkiem że metoda używana do jonizacji desorpcji i jonizacji oligomerów nie wywołuje znacznego podziału jonów.

8. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA ANALIZY MALDI W POLIMERACH

Polistyren o wąskim i szerokim rozrzucie mas, syntetyzowany różnymi metodami z różnymi grupami końcowymi był często badany techniką MALDI-TOF [47, 54]. Bartsch i inni [55] stwierdzili, że PS może być analizowany przy wykorzystaniu łagodnych warunków protonowania (jonizowania) z użyciem matrycy DHB. Zelt [56] razem ze współpracownikami otrzymał polistyren (PS) znakowany rodaminą-b (PS-RhB) poprzez reakcje ze znacznym nadmiarem kwaśnego chlorku rodamin-y z polistyrenem posiadającym końcowe grupy hydroksylowe (PS-OH). Widmo MALDI PS-RhB pokazuje piki w przedziale 9000–13 000 Da, co daje dobry

wynik, a dodanie soli srebra jako środka kationowego do PS-RhB nie dało pików od kationu srebra.

Cauvin i współpracownicy [57] badali kationową polimeryzację *p*-metoksystyrenu w miniemulsji. Otrzymali widma MALDI dwóch próbek polimeru MP2 i MP5, odpowiednio po 2 dniach i po upływie 5 dni. Próbka PM2 była prawie w 100% wagowych przereagowana i na widmie widać było sygnały od łańcuchów mających jedną grupę metylową i jedną grupę hydroksylową. Nie zauważono występowania reakcji ubocznej. Próbka PM5 zanalizowana 3 dni po zakończeniu reakcji była częściowo zdegradowana. Na widmie MALDI pojawiła się seria nowych sygnałów. Na podstawie pozycji i intensywności nowych sygnałów autor był w stanie określić, że łańcuchy uległy dehydratacji.

W literaturze można znaleźć wiele artykułów opisujących analizę poli(metakrylanu metylu) (PMMA) i polimerów akrylowych [58, 59]. Norman [60] zsyntezował PMMA, gdzie łańcuchy były zakończone głównie nienasyconymi grupami końcowymi. Widmo MALDI pokazało tylko dwie grupy jonów, serie sygnałów T1 i T2. T1 należą do nienasyconych grup końcowych, natomiast T2 do grup końcowych zawierających pięć cykli. Sygnały T1 są trzy razy liczniejsze od sygnałów T2, co zgadza się z pomiarami z TGA i NMR. Favier [61] analizował syntezę pochodnej acylamidu. Teoria przewiduje, że średnia molowa masa zwiększa się liniowo z konwersją, a stała proporcjonalności jest związana w prosty sposób ze stosunkiem monomer/inicjator ($[m]/[i]$). Aby porównać teoretyczne przewidywania z eksperymentem, autorzy wykreślali masę molową w miarę konwersji. Zgodność wyników oszacowania i MALDI była wysoka. Najbardziej intensywne sygnały MALDI należą do łańcuchów zakończonych grupą tiobenzoesową. Autorzy wykazali, że w przypadku odpowiednio prowadzonej reakcji, mogą również odpowiednio reagować, tworząc tym samym np. dłuższe łańcuchy.

Nonaka [62] zademonstrował, że podczas użycia jako matrycy ditranolu i AgTFA jako czynnika kationizującego w trakcie wzrostu mocy lasera, podczas analizy MALDI-TOF następuje w PMMA częściowe odfluorowanie.

Analiza SEC/MALDI materiału polimerowego uzyskanego w polimeryzacji akrylanu butylu w obecności tiobenzoesanu kumylu stanowi pierwszy przykład syntezy gwiazdy czteroramiennej poprzez pośredni proces polimeryzacji rodnikowej [63], wykazując tworzenie trzy- i czteroramienistych gwiazd.

Analiza widm MALDI dla poli(octanu winylu) [64], poli(etylenu) [18, 65], poli(butadienu) [66, 67] i poliizoprenu [68] zostały szeroko opisane przez wielu autorów [18, 19, 49, 64–68]. Z reguły analiza MALDI dla polietylenu wymaga bardziej starannego przygotowania próbki, jednakże autorzy [18, 69, 70] dowiedli, że wyjątkiem są widma dla próbek o niskich masach cząsteczkowych. Świtek [71] otrzymał poliizopren przy użyciu butylolitu 1-*tert*-butyldimetylsiloksypropylolitu jako inicjatora. Widmo MALDI w tym przypadku posiadało trzy serie mas. Pierwsza seria pojawia się tylko w wysokich masach i sygnały przyporządkowano jako trójramienny gwiazdzisty polimer.

Druga i trzecia z serii są obecne odpowiednio jedynie w środkowym zakresie mas i w niskiej masie cząsteczkowej. Sygnały te odpowiadają strukturze dwułańcuchowego ketonu i łańcuchom poli(izoprenu) zakończonych protonem. Wszystkie sygnały na widmie MALDI potwierdzają proponowany mechanizm reakcji.

Gobom i współautorzy [72] wykazali, że możliwe jest, aby skalibrować widma MALDI-TOF z dokładnością do 10 ppm. Aby osiągnąć swój cel, musieli przedstawić alternatywną funkcję czasu do masowej konwersji i wybrać analit, który produkuje wiele intensywnych równomiernie rozmieszczonych sygnałów w zakresie masowym 1000–7000 Da. Ich wybór padł na PPG lub precyzyjniej – na mieszanek czterech PPG, każdy o wąskiej dystrybucji obejmując cały zakres.

W pracach z 2004 roku [73, 74] metodą MALDI-TOF scharakteryzowano różne grupy końcowe w oligo(izobutylo winylo eterze). Widma MALDI-TOF MS poli(tlenku propylenu) otrzymanego w polimeryzacji anionowej w obecności inicjatorów metalicznych dodatkowo, poza oczekiwanymi intensywnymi sygnałami oligomerów zakończonych alkoholowymi grupami inicjatora i grupami OH, posiadały słabe sygnały oligomerów zawierających nienasycone grupy allilowe i zakończone grupami OH, które nie były zarejestrowane na widmie $^1\text{H NMR}$.

MALDI-TOF MS stosowane jest również do charakteryzowania kopolimerów tlenku etylenu (EO) i tlenku propylenu (PO) [75, 76]. Przy zastosowaniu własnego oprogramowania do analizy widm Terrier [75] określił skład trójblokowego kopolimeru. Zauważył on, że widmo MALDI kopolimerów trójblokowych zależy od parametrów eksperymentalnych, takich jak liczba uderzeń lasera do stosunku polimer/sól, i od rodzaju matrycy. Podczas analizy MALDI wykryto produkty reakcji ubocznej z nienasyconymi grupami końcowymi, analizując kopolimer zarówno przed rozfrakcjonowaniem metodą SEC, jak i po nim. Wyniki te zostały potwierdzone przez widma $^1\text{H NMR}$ [75].

Metodą MALDI-TOF MS przeprowadzono także wiele analiz poliestrów [24, 26, 44, 77], gdzie np. widma cyklicznych łańcuchów hiperrozgałęzionych posiadały poza oczekiwanymi sygnałami także sygnały o niskiej intensywności pochodzące od formacji pojedynczych cyklicznych łańcuchów powstających w wyniku wewnątrzcząsteczkowej ubocznej reakcji eteryfikacji oraz utraty wody. Reakcja eteryfikacji potwierdzona została metodą NMR.

Do analizy poliwęglanów najczęściej łączy się MALDI-TOF z metodami chromatograficznymi [31, 78, 79], znaleźć można jednak także kilka opisów klasycznej analizy MALDI-TOF MS [80–82].

Gibson [83] rejestrował widma MALDI dla tworzyw aramidowych syntezowanych przy użyciu eterów koronowych i 4,4-oksydianiliną (ODA). Mieszanka matrycy i analitu była наносzona na sól srebra i oczekiwano w wyniku jonów srebra, jednak uzyskano kationy sodu i potasu. Bardzo dokładnie opisał zarejestrowane do $m/z = 9100$ Da sygnały z przerwami równymi 700,27 Da, co odpowiada masie cząsteczkowej jednostki powtarzającej się. Zaobserwował również sygnały od liniowych aminokwasów $m/z = 700n + 18$, dikwasów $m/z = 700n + 536$ oraz

diamin $m/z = 700n + 200$. Słaby klaster przy $m/z = 2858$ Da odpowiada adduktowi potasowemu tetrametrycznego aminokwasu $m/z = 700n + 18 + 39$. Klaster przy $m/z = 2866$ natomiast odpowiada adduktowi srebra makrocyklicznego tetramery, który utracił cząsteczkę CO_2 $m/z = 700n - 44 + 106,95$.

Często badane są również polimery zawierające w łańcuchu głównym fenyl i inne pierścienie z uwagi na ich właściwości przewodzące i świecące [12, 15, 16, 84].

Willemse i współpracownicy [85] monitorowali syntezę kopolimeru blokowego styrenu (ST) i izoprenu (IPR) z pomocą MALDI. Syntetyczna procedura polegała na dodawaniu kolejno inicjatora, monomeru ST i wówczas monomeru IPR. Widma MALDI zostały wykorzystane do obliczenia stosunku molowego ST / IPR (tj. średni skład kopolimeru), który zgadza się z $^1\text{H NMR}$.

Opisywane są także w literaturze analizy metodą MALDI-MS struktury kopolimerów uzyskanych na drodze reaktywnego mieszania w stanie stopionym ich odpowiednich homopolimerów [86–89]. Eksperymenty skierowane są głównie w trzech kierunkach: (1) struktura grup końcowych reagujących polimerów, (2) stopień kopolimeryzacji w funkcji czasu mieszania, (3) kompozycja i sekwencja składu utworzonego kopolimeru. Przegląd literatury [90–93] wskazuje także na bardzo dużą przydatność analizy MALDI w badaniach nad chemiczną modyfikacją, włączając w to także degradację polimerów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann., *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 2866.
- [2] D.C. Schriemer, L. Li, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2721.
- [3] G. Montaudo, M.S. Montaudo, F. Samperi, [w:] *Mass spectrometry of polymers*, G. Montaudo, R.P. Lattimer (Red.), Boca Raton, CRC Press, 2002.
- [4] H. Pasch, W. Schrepp, *MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers*, Springer, Berlin, 2003. str. 298.
- [5] C.N. McEwen, [w:] *Advances in mass spectrometry*, A.E Ashroft, G. Brenton, J.J. Monaghan (Red.), London, vol. 16, 2004.
- [6] P.M. Peacock, C.N. McEwen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 3417.
- [7] R.J. Cotter, B.D. Gardner, S. Litchenko, R.D. English, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1976.
- [8] M.W.F. Nielen, *Mass. Spectrom. Rev.*, 1999, **18**, 309.
- [9] M.S. Montaudo, *Mass. Spectrom. Rev.*, 2002, **21**, 108.
- [10] S.D. Hanton, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 527.
- [11] A.P. Gies, W.K. Nonidez, M. Anthamatten, R.C. Cook, J.W. Mays, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2002, **16**, 1903.
- [12] G.C. Eastmond, J. Paprotny, *Polymer*, 2004, **45**, 1073.
- [13] K. Yoshimura, L. Przybilla, S. Ito, J. D. Brand, M. Wehmeir, H. J. Räder, K. Müllen, *Macromol. Chem. Phys.*, 2001, **202**, 215.
- [14] A.P. Gies, W.K. Nonidez, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1991.
- [15] L. Przybilla, J.-D. Brand, K. Yoshimura, J. Räder, K. Müllen, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 4591.
- [16] A.R. Dolan, T.D. Wood, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2004, **15**, 893.
- [17] P. Malvagna, G. Impallomeni, R. Cozzolino, E. Spina, D. Garozzo, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2002, **16**, 1599.

- [18] S. Lin-Gibson, L. Brunner, D.L. Vanderhart, B.J. Bauer, B.M. Fanconi, C.M. Guttman, W.E. Wallace, *Macromolecules*, 2002, **35**, 7149.
- [19] M. Nagy, L. Orosz, S. Keki, G. Deak, P. Herczegh, M. Zsuga, *Macromol. Rapid. Comm.*, 2004, **25**, 1073.
- [20] W.G. Lewis, Z.X. Shen, M.G. Finn, G. Siuzdak, *Int. J. Mass. Spectrom.*, 2003, **226**, 107.
- [21] Z.X. Shen, J.J. Thomas, C. Averbuj, K.M. Broo, M. Engelhard, J.E. Crowell, M.G. Finn, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* 2001, **73**, 612.
- [22] R.M. Whittal, L. Li, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1950.
- [23] P. Juhasz, M.T. Roskey, I.P. Smirnov, L.A. Haff, M.L. Vestal, S.A. Martin, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 941.
- [24] R. Arakawa, Y. Shimomae, H. Morikawa, K. Ohara, S. Okuno, *J. Mass. Spectrom.*, 2004, **39**, 961.
- [25] H.R. Kricheldorf, L. Vakhtangishvili, G. Schwarz, R.P. Kruger, *Macromolecules*, 2003, **36**, 5551.
- [26] L. Chikh, X. Arnaud, C. Guillermain, M. Tessier, A. Fradet., *Macromol. Symp.*, 2003, **199**, 209.
- [27] R.M. Whittal, L. Li, S. Lee, M.A. Winnik, *Macromol. Rapid. Comm.*, 1996, **17**, 59.
- [28] S. Lee, M.A. Winnik, R.M. Whittal, L. Li, *Macromolecules*, 1996, **29**, 3060.
- [29] A.T. Jackson, H.T. Yates, C.I. Lindsay, Y. Didier, J.A. Segal, J.H. Scrivens, G. Critchley, J. Brown, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 1997, **11**, 520.
- [30] A.T. Jackson, H.T. Yates, W.A. MacDonald, J.H. Scrivens, G. Critchley, J. Brown, M.J. Deery, K.R. Jennings, C. Brookes, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 1997, **8**, 132.
- [31] C. Puglisi, F. Samperi, S. Carroccio, G. Montaudo., *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 1999, **13**, 2260.
- [32] R. Erra-Balsells, H. Nonami, *Arkivoc*, 2003, **x**, 517.
- [33] J. Zhang, R. Zenobi, *J. Mass. Spectrom.*, 2004, **39**, 808.
- [34] B.J. Bauer, C.M. Guttman, D.W. Liu, W.R. Blair, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2002, **16**, 1192.
- [35] L.J. Soltzberg, P. Patel, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2004, **18**, 1455.
- [36] Z. Guo, Q. Zhang, H. Zou, J. Ni, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1637.
- [37] E.P. Maziarz, X.M. Liu., *Eur. J. Mass. Spectrom.*, 2002, **8**, 397.
- [38] E.P. Maziarz, X.M. Liu, G.A. Baker, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2003, **17**, 2450.
- [39] X.M. Liu, E.P. Maziarz, D.J. Heiler, G.L. Grobe, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2003, **14**, 195.
- [40] M.S. deVries, H.E. Hunziker, *Appl. Surf. Sci.*, 1996, **106**, 466.
- [41] D. Vitalini, P. Mineo, E. Scamporrino, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 1999, **13**, 2511.
- [42] R.S. Brown, D.A. Weil, C.L. Wilkins, *Macromolecules.*, 1986, **19**, 1255.
- [43] G. Montaudo, C. Puglisi, F. Samperi, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 1995, **9**, 453.
- [44] H. Pasch, K. Rode, *J. Chromatogr. A*, 1995, **699**, 21.
- [45] R. Peetz, A. Strachota, E. Thorn-Csányi, *Macromol. Chem. Phys.*, 2003, **204**, 1439.
- [46] C. Keil, E. Esser, H. Pasch, *Macromol. Mater. Eng.*, 2001, **286**, 161.
- [47] S. Park, D. Cho, J. Ryu, K. Kwon, W. Lee, T. Chang, *Macromolecules*, 2002, **35**, 5974.
- [48] H. Lee, T. Chang, D. Lee, M.S. Shim, H. Ji, W.K. Nonidez, J.W. Mays, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 126.
- [49] H. Ji, N. Sato, Y. Nakamura, Y. Wan, A. Howell, Q.A. Thomas, R.F. Storey, W.K. Nonidez, J.W. Mays, *Macromolecules*, 2002, **35**, 1196.
- [50] A.V. Loboda, A.N. Krutchinsky, M. Bromirski, W. Ens, K.G. Standing, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2000, **14**, 1047.
- [51] J.R. Chapman, *Practical organic mass spectrometry, a guide for chemical and biochemical analysis*, 2nd edn, NY, Wiley, 1993.
- [52] L. Sleno, D.A. Volmer, *J. Mass. Spectrom.*, 2004, **39**, 1091.
- [53] G. Montaudo, M.S. Montaudob, C. Puglisi, F. Samperi, *Macromolecules*, 1998, **31**, 8666.
- [54] R.P. Quirk, R.T. Mathers, C. Wesdemiotis, M.A. Arnould, *Macromolecules*, 2002, **35**, 2912.

- [55] A. Bartsch, W. Dempwolf, M. Bothe, S. Flakus, G. Schmidt- Naake, *Macromol. Rapid. Commun.* 2003, **24**, 614.
- [56] H. Zettl, W. Hafner, A. Boker, H. Schmalz, M. Lanzendorfer, A.H.E. Muller, G. Krausch, *Macromolecules*, 2004, **37**, 1917.
- [57] S. Cauvin, A. Sadoun, R. Dos Santos, J. Belleney, F. Ganachaud, P. Hemery, *Macromolecules*, 2002, **35**, 7919.
- [58] A. Hirao, A. Matsuo, *Macromolecules*, 2003, **36**, 9742.
- [59] R.X.E. Willemse, B.B.P. Staal, A.M. van Herk, S.C.J. Pierik, B. Klumperman, *Macromolecules*, 2003, **36**, 9797.
- [60] J. Norman, S.C. Moratti, A.T. Slark, D.J. Irvine, A.T. Jackson, *Macromolecules*, 2002, **35**, 8954.
- [61] A. Favier, C. Ladavière, T. Charreyre, C. Pichot, *Macromolecules*, 2004, **37**, 20264.
- [62] H. Nonaka, M. Ouchi, M. Kamigaito, M. Sawamoto, *Macromolecules*, 2001, **34**, 2083.
- [63] R. Venkatesh, B.B.P. Staal, B. Klumperman, M.J. Monteiro, *Macromolecules*, 2004, **37**, 7906.
- [64] M. Wakioka K.-Y. Baek, T. Ando, M. Kamigaito, M. Sawamoto, *Macromolecules*, 2002, **35**, 330.
- [65] T. Yalcin, W.E. Wallace, C.M. Guttman, L. Li, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 4750.
- [66] R.P. Quirk, Y. Guo, C. Wesdemiotis, M.A. Arnould, *Polymer*, 2004, **45**, 3423.
- [67] Z. Li, M.A. Hillmyer, T.P. Lodge, *Macromolecules*, 2004, **37**, 8933.
- [68] C. Janiak, K.C.H. Lange, P. Marquardt, R.-P. Kruger, R. Hanselmann, *Macromol. Chem. Phys.*, 2002, **203**, 129.
- [69] R.G. Lopez, C. Boisson, F. D'agosto, R. Spitz, F. Boisson, D. Bertin, P. Tordo, *Macromolecules*, 2004, **37**, 3540.
- [70] B.J. Bauer, W.E. Wallace, B.M. Fanconi, C.M. Guttman, *Polymer*, 2001, **42**, 9949.
- [71] K.A. Switek, F.S. Bates, M.A. Hillmyer, *Macromolecules*, 2004, **37**, 6355.
- [72] J. Gobom, M. Mueller, V. Egelhofer, D. Theiss, H. Lehrach, E. Nordhoff, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3915.
- [73] W. Lang, P.K. Sarker, S. Rimmer, *Macromol. Chem. Phys.*, 2004, **205**, 1001.
- [74] Y. Suzuki, S. Hiraoka, A. Yokoyama, T. Yokozawa, *J. Polym. Sci. Part. A, Polym. Chem.*, 2004, **42**, 1198.
- [75] P. Terrier, W. Buchmann, G. Cheguillaume, B. Desmazières, J. Tortajada, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 3292.
- [76] R. Chen, A.M. Tseng, M. Uhing, L. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, **12**, 55.
- [77] D.H. Zhang, M.A. Hillmyer, W. Tolman, *Macromolecules*, 2004, **37**, 8198.
- [78] C. Puglisi, F. Samperi, S. Carroccio, G. Montaudo, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 1999, **13**, 2268.
- [79] L. Coulier, E.R. Kaal, Th. Hankmeier, *J. Chromatogr A*, 2005, **1070**, 79
- [80] M.H. Chisholm, D. Navarro-Llobet, Z.P. Zhou, *Macromolecules*, 2002, **35**, 6494.
- [81] H.R. Kricheldorf, S. Böhme, G. Schwarz, C.L. Schultz, *Macromol. Rapid. Commun.*, 2002, **23**, 803.
- [82] H.R. Kricheldorf, S. Böhme, G. Schwarz, C.L. Schultz, *Macromolecules*, 2004, **37**, 1742.
- [83] H.W. Gibson, D.S. Nagvekar, N. Yamaguchi, S. Bhattacharjee, H. Wang, M.J. Vergne, D.M. Hercules, *Macromolecules*, 2004, **37**, 7514.
- [85] R.X.E. Willemse, B.B.P. Staal, E.H.D. Donkers, A.M. van Herk, *Macromolecules*, 2004, **37**, 5717.
- [86] F. Samperi, M.S. Montaudo, C. Puglisi, S. Di Giorgi, G. Montaudo, *Macromolecules*, 2004, **37**, 6449.
- [87] C. Puglisi, F. Samperi, S. Di Giorgi, G. Montaudo, *Macromolecules*, 2003, **36**, 1098.
- [88] F. Samperi, C. Puglisi, R. Alicata, G. Montaudo, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 2003, **41**, 2778.
- [89] F. Samperi, M.S. Montaudo, C. Puglisi, R. Alicata, G. Montaudo, *Macromolecules*, 2003, **36**, 7143.
- [90] C. Puglisi, F. Samperi, S. Di Giorgi, G. Montaudo, *Polym. Degrad. Stab.*, 2002, **78**, 369.
- [91] F. Samperi, C. Puglisi, R. Alicata, G. Montaudo, *Polym. Degrad. Stab.*, 2004, **83**, 3.

- [92] F. Audouin, R. Nuffer, C. Mathis, *J. Polym. Sci. Part. A, Polym. Chem.*, 2004, **42**, 4820.
[93] S. Carroccio, C. Puglisi, G. Montaudo, *Macromolecules*, 2005, **38**, 6863.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 listopada 2013

**IZOFLAWONY – STRUKTURA, AKTYWNOŚĆ
BIOLOGICZNA ORAZ METODY OZNACZANIA
PRZY UŻYCIU WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**ISOFLAVONES – STRUCTURE, BIOLOGICAL ACTIVITY
AND DETERMINATION BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ilona Bachanek, Marian Czauderna

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
Polska Akademia Nauk
ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna
e-mail: i.bachanek@ifzz.pan.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Struktura

2. Aktywność biologiczna izoflawonów

3. Metody oznaczania izoflawonów

3.1. Przygotowanie próbki do oznaczania izoflawonów

3.1.1. Ekstrakcja

3.1.2. Sonifikacja

3.1.3. Refluxing – mrożenie

3.2. Użycie standardu wewnętrznego

3.3. Chromatograficzne techniki oznaczania izoflawonów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Iłona Bachanek – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej oraz Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Obecnie doktorantka w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN. Zajmuje się metodami analizy chromatografii cieczowej związków biologicznie aktywnych w paszy oraz treści układu pokarmowego, krwi i moczu u zwierząt gospodarskich.

prof. dr hab. Marian Czauderna – studiował chemię (w latach 1971–1976) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (UW), doktoryzował się (1980 r.) na Wydziale Chemii UW natomiast habilitował się (2000 r.) na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt, Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. Od roku 1995 jest pracownikiem Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN. Tytuł naukowy profesora uzyskał w 2008 r. Jego zainteresowania naukowe dotyczą, m.in. badania wpływu dodatków związków seleniu, izomerów CLA i olejów roślinnych do dawki pokarmowej na zawartość aminokwasów (szczególnie egzogennych), tokoferoli, kwasów tłuszczowych, wskaźników rozmiaru syntezy białka bakteryjnego oraz wybranych pierwiastków w tkankach i narządach wewnętrznych zwierząt gospodarskich.

ABSTRACT

Isoflavones are a subclass of flavonoids and are also described as phytoestrogen compounds, since they exhibit estrogenic activity (similar effects to estradiol hormones). The basic characteristics of isoflavone structure is a flavone nucleus, composed of two benzene rings (A and B) linked to a heterocyclic ring C (Fig. 1). The benzene ring B position is the basis for the categorization of a flavanoid class (position 2) and a isoflavonoid class (position 3) [8]. Isoflavones are classified according to substitutions. The glucoside forms can be esterified at the 6''-O-position of the glucose ring with malonyl or acetyl groups forming another compounds.

In food and plants, flavonoids exist primarily as 3-O-glycosides and polymers [14]. Isoflavonoids are a group of chemical compounds which is widely distributed in the vegetable world. Their biological activity has found remarkable pharmaceutical, therapeutic, dietary and nutritional applications. The structure of phytoestrogens enables them to bind to the estrogen receptors (ERs), they are similar to 17 β -estradiol, contain an aromatic ring with hydroxyl group and have the binding affinity to both estrogen. In addition, isoflavones interact with the metabolism of steroid hormones. Recently, they have come into focus of interest due to several reports about their positive effect on human health, in particular prevention of hormone-dependent cancers, cardiovascular diseases, osteoporosis, adverse menopausal manifestations and age-related cognitive decline.

To identify the potential health benefits associated with the consumption of isoflavones, it is of critical importance to have high-quality and comprehensive data. To this end, adequate analytical methodologies are essential for a reliable and exact identification as well as for quantification. Moreover, methodologies and techniques used need to keep up with technology to improve the performance in terms of resolution, efficiency, precision, reproducibility and speed, allowing a proportionate increase in the amount and quality of information gathered [7].

Common methods for the extraction of isoflavones from soybeans and soy products include organic solvent extraction with aqueous methanol, ethanol or acetonitrile, using simple mixing, ultra-sonification or refluxing techniques [24].

The application of micro-scale and nano-scale extraction and separation techniques is the most likely future development, resulting in quick, sensitive analytical methods for sample preparation and analysis of flavonoids and their metabolites. Miniaturization, high-throughput systems utilizing new sorbents and automation of chromatographic systems are of great interest in clinical, pharmaceutical, environmental and food fields. The most used analysis technique for the quantification of isoflavones in solid samples is, with no doubt, reversed-phase HPLC using C18 based columns with water and methanol or acetonitrile containing small amounts of acid as a mobile phase [7].

Keywords: isoflavone, sample preparation, determination, high performance liquid chromatography (HPLC)

Słowa kluczowe: izoflawony, przygotowanie próbek, oznaczanie, wysokosprawna chromatografia cieczowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ERs	- receptor estrogenowy
ER α	- receptor estrogenowy α
ER β	- receptor estrogenowy β
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
GC-MS	- chromaogrfa gazowa ze spektrometrem mass
UHPLC	- ultrasprawnna/ultraciśnienowa chromatografia cieczowa
UV/VIS	- spektrofotometria z zakresu promieniowanie ultrafioletowego i widzialnego
DAD	- detektor z matrycą fotodiodową
MS	- spektrometria mas
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
DMBA	- 7,12-dimetylobenzo[α]antracen
IGF -1	- insulinopodobnego czynnika wzrostu 1
IR	- spektroskopia w podczerwieni
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
LLE	- ekstrakcja ciecz-ciecz
SPE	- ekstrakcja do fazy stałej
IS	- standard wewnętrzny
CE	- elektorforeza kapilarna
RP-LC	- chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
ED	- detektor elektrochemiczny
FL	- detektor fluorescencyjny
DMSO	- dimetylosulfotlenek
PVDF	- polifluorek winylidenu

WPROWADZENIE

Izoflawony z chemicznego punktu widzenia są aromatycznymi polifenolami o budowie zbliżonej do budowy hormonów steroidowych, jednak nie są pochodnymi cholesterolu. Dlatego też nazywane są hormonami niesteroidowymi, które to w organizmie zwierząt i ludzi mogą wykazywać działanie hormonalne.

Naturalnie izoflawony występują w ponad 300 rodzajach roślin, najczęściej w ich korzeniach i nasionach [1]. W znacznych ilościach można je znaleźć w soi, koniczynie czerwonej, nasionach roślin bobowatych, soczewicy oraz szpinaku. Mogą być produkowane przez niektóre rodzaje bakterii i grzyby. Zawartość izoflawonów w poszczególnych roślinach zależy od gatunku, warunków klimatycznych oraz jakości uprawy i waha się pomiędzy 560 a 3810 mg/kg [2]. Spożycie tych związków w krajach europejskich i azjatyckich jest diametralnie różne. Mieszkańcy Holandii, Włoch i Wielkiej Brytanii dziennie przyjmują od 3 do 11 mg izoflawonów, natomiast Japończycy i Koreańczycy od 23 do 200 mg/dzień [3,4].

W roślinach izoflawony występują głównie w wakuolach komórkowych w postaci wolnej lub w formie glukokoniugatów takich jak: daidzina, genistina, glicytina, onionin i sissotrin, które są biologicznie nieaktywne. Obok tych związków, występują pośrednie produkty metabolizmu glukozydów jakimi są formy malonylo i acetylo glukozowe. W organizmie zwierząt i ludzi wszystkie formy są hydrolizowane przez enzymy układu pokarmowego oraz jego mikroflorę do form aktywnych jakimi są – aglikony, kolejno: daidzeina, genisteina, glicyteina, formononetyna oraz biochanina A [5]. Analiza stężenia poszczególnych cząsteczek jest istotna dla oszacowanie form aktywnych oraz form glukozowych, co ma znaczenie w badaniach nad wpływem tych związków na procesy fizjologiczne.

Od wielu lat wzrasta liczba doniesień naukowych opisujących wpływ izoflawonów na aktywność biologiczną i farmakologiczną w organizmie zwierząt i ludzi. Ich struktura chemiczna jest podobna do 17- β -estradiolu, dzięki czemu zdolne są do wiązania receptorów estrogenowych, przy czym wyższe powinowactwo mają w stosunku do ER- β niż ER- α . Co więcej, mogą wpływać na aktywację zarówno genomowego jak i niegenomowego szlaku sygnalizacji estrogenów. Ponadto związki te wpływają na metabolizm hormonów steroidowych. Dzięki tym właściwościom możliwe jest działanie na mechanizm regulujący procesy fizjologiczne (np. wpływ na rozwój nowotworów hormonozależnych, metabolizm lipidów oraz witamin z grupy D) [6].

Istnieje wiele technik analitycznych pozwalających na oznaczanie związków izoflawonowych. Najlepiej poznanymi i wykazującymi największą czułość są chromatografia gazowa (GC-MS) lub chromatografia cieczowa (HPLC lub UHPLC) z detekcją UV/VIS lub spektrometrią mas. Przedmiotem tego artykułu jest przegląd publikacji dotyczących analiz związków izoflawonowych metodą HPLC w materiale pochodzenia sojowego. Głównym zagadnieniem na które należy zwrócić uwagę przy oznaczaniu tych związków jest odpowiednio dobrana procedura ekstrakcji badanego materiału oraz optymalizowanie rozdzielania chromatograficznego koniuga-

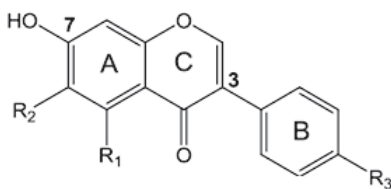
tów (malonylo, acetylo i form glukozowych), które niejednokrotnie ulegają elucji bez zadowalającego rozdzielania analizowanych związków [7].

1. STRUKTURA

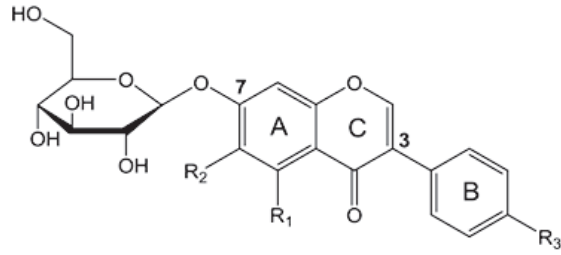
Flawonoidy do których zaliczamy: izoflawony, katechiny, antocyjanidyny, flawonole, flawony, flawanony i flawanonole stanowią jedną z ważniejszych grup polifenoli. Są naturalnymi pochodnymi 2-fenylochromen-4-onu (2-fenilo-1,4-benzopiron) tzw. flawonu [8]. Ich struktura opiera się na 15 węglowym szkielecie C6-C3-C6 w niektórych publikacjach oznaczana jako pierścieniowa forma A+C+B. Poniżej (Rys. 1) przedstawiony jest podstawowy model budowy związków flawonowych. Pierścień C6-C3 (A+C), zwany chromonem powstaje na drodze redukcji kwasu cynamonowego do kwasu kumarowego, natomiast pierścień C6-C1 (B) w wyniku kondensacji trzymolowych fragmentów malonylo-koenzymu A i połączony jest z pierścieniem C3 (C) poprzez węgiel C-2 lub C-3 [9].

W ogólnym wzorze izoflawonowym obecny jest tlen w pozycji 4 oraz grupa OH przy węglu C-7. Związki te przejawiają silną tendencję do wiązania grup glikozydowych przy tlenie z grupy wodorotlenowej obecnej w pozycji C-7. Takie związki nazywa glikozydami. Ponadto do form glikozydowych należy zaliczyć związki posiadające grupę malonylową oraz acetylową, które znajdują się przy ugrupowaniu glukozowym. W wyniku hydrolizy zasadowej oraz kwasowej dochodzi do rozerwania wiązań pomiędzy grupami – kolejno malonylową i acetylową a cukrem przyłączony do pierścienia A. Dzięki temu m.in. w układzie pokarmowym powstają związki pozbawione grupy glikozydowej czyli aglikony. Struktura chemiczna aglikonów izoflawonów jest podobna do 17- β -estradiolu, dzięki czemu zdolne są do wiązania ERs [10].

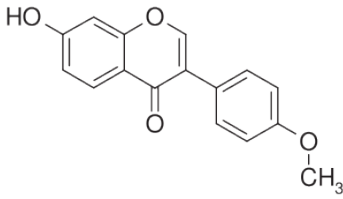
Przedstawicielami izoflawonów są takie związki jak: biochanina A, formonetina, genisteina, sissotrin, glyciteina, daidzeina, ononin, genistina, glycitina lub daidzina. Struktury chemiczne tych związków widnieją poniżej (Rys. 3); po lewej stronie umieszczone są aglikony a po prawej ich prekursorzy.



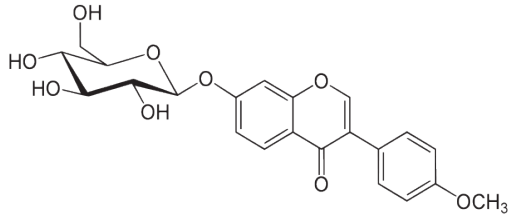
Rysunek 1. Struktura chemiczna aglikonu izoflawonów
Figure 1. The chemical structure of aglicone isoflavone



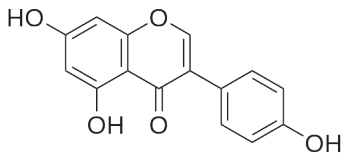
Rysunek 2. Struktura chemiczna glikozydu izoflawonów
Figure 2. The chemical structure of glycoside



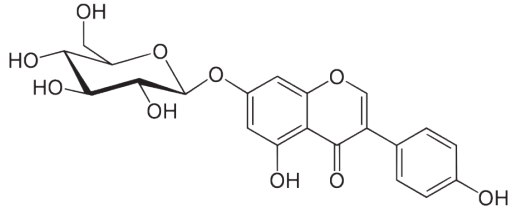
Formononetyna
(7-hydroksy-4'-metoksyizoflawon)



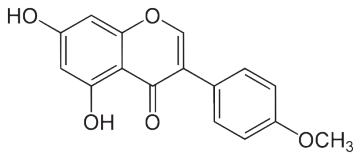
Onionina
(-hydroksy-4'-metoksyizoflawon 7-glukozyd)



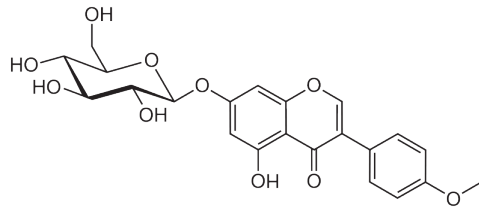
Genisteina
(4',5,7-trzyhydroksyizoflawon)



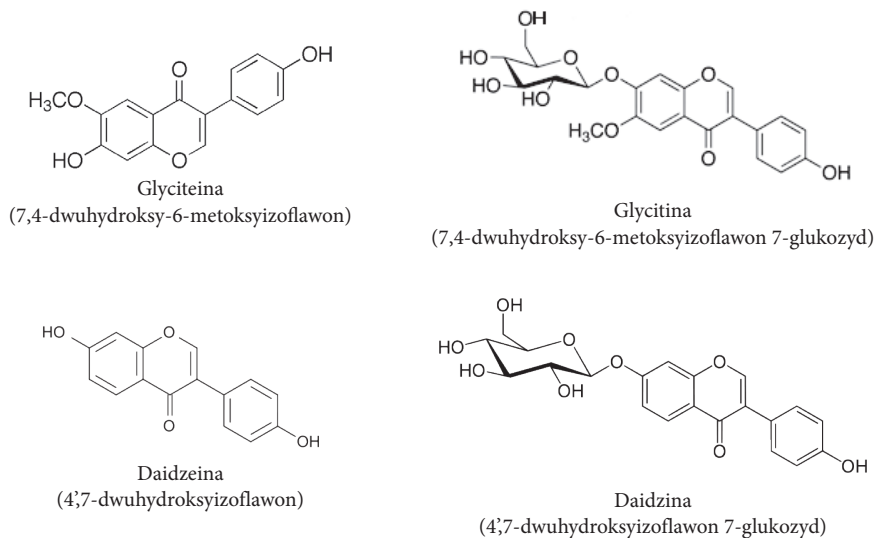
Genisteina
(4',5,7-trzyhydroksyizoflawon 7-glukozyd)



Biochanina A
(5,7-dwuhydroksy-4'-metoksyizoflawone)



Sissotrin
(5,7-dwuhydroksy-4'-metoksyizoflawone 7-glukozyd)



Rysunek 3. Wzory strukturalne izoflawonów
Figure 3. The chemical structures of all isoflavons

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA IZOFLAWONÓW

Na rynku dostępnych jest wiele suplementów diety produkowanych na bazie ziół oraz roślin z rodziny bobowatych zawierających opisane fitoestrogeny. Głównym celem zażywania tych preparatów jest łagodzenie negatywnych skutków menopauzy, bez konieczności stosowania terapii hormonalnej. Jednak związki te charakteryzują się szerszym zakresem aktywności biologicznej i farmakologicznej o dużej skuteczności działania leczniczego, kosmetycznego oraz profilaktycznego. Do najbardziej aktywnych biologicznie izoflawonów zaliczamy genisteinę, daidzeinę, biochaninę A oraz formononetynę.

Aktywacja błonowych receptorów estrogenowych przez te związki powoduje kaskadę wewnątrzkomórkowych mechanizmów prowadzących do zmiany aktywności białek G, fosfolipazy, kinazy białkowej oraz adenocyklazy. Zdolność łączenia się z receptorami estrogenowymi w jądrze komórkowym prowadzi do ekspresji wielu genów, mających istotny wpływ na procesy fizjologiczno-metaboliczne organizmu ludzkiego lub zwierzęcego. Inne mechanizmy związane z aktywacją receptorów estrogenowych mogą prowadzić do hamowania lub aktywowania licznych enzymów estrogenozależnych, ponadto wykazują konkurencję z estradiolem o miejsce wiązania w receptorze [11,12]. Kolejną drogą działania izoflawonów na poziomie komórki jest inhibicja aktywności topoizomerazy I i II DNA oraz helikazy rozplatającej podwójną nić DNA, w celu udostępnienia miejsc dla enzymów replikacyjnych i transkrypcyjnych [13].

Aktywność antyoksydacyjna tych związków wynika z łatwości oddawania atomów wodoru z grup hydroksylowych, dzięki czemu neutralizują wolne rodniki nadtlenkowe i wodorotlenkowe. Procesy wolnorodnikowe modyfikują w komórkach struktury białkowe, materiał DNA; modyfikacje te mogą powodować mutagenezę, karcinogenezę lub cytotoksyczność. Izoflawony działają również stymulująco na aktywność różnych enzymów antyoksydacyjnych (np.: katalazy, peroksydazy glutationowej, dysmutazy nadtlenkowej czy reduktazy glutationowej). Struktura chemiczna izoflawonów sprzyja wydajnemu kompleksowaniu kationów metali, w szczególności dwuwartościowych, które katalizują reakcję utleniania [14].

Xiaoping Liu i in. [15] dowiedli, iż stosowanie doustnie dzaidzeiny lub jej metabolitu ekwolu hamuje wzrost DMBA oraz wzrost linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF-7. Genisteina działa hamująco na aktywność kinaz tyrozynowych zlokalizowanych w błonie komórkowej, które to uczestniczą w wytwarzaniu, modulacji i przekazywaniu sygnałów chemicznych do jądra komórkowego wywołujących ekspresję genów odpowiedzialnych również za nowotwory. Badania epidemiologiczne potwierdzają przeciwnowotworowe działania izoflawonów. Wynika z nich, iż u kobiet azjatyckich spożywających je w znacznie większych ilościach, obserwuje się czterokrotnie rzadsze występowanie raka piersi niż u kobiet z krajów zachodnich. Izoflawony zmniejszają ryzyko chorób układu krwionośnego, zwłaszcza choroby wieńcowej serca i miażdżycy naczyń krwionośnych. Pod wpływem fitoestrogenów następuje obniżenie we krwi poziomu całkowitego cholesterolu, lipoprotein o niskiej gęstości i triglicerydów, a także zmniejszenie ilości endogenego cholesterolu. Daidzeina i pueraria, poprzez zmniejszenie lepkości krwi, poprawiają mikrokrążenie obwodowe oraz zmniejszają ryzyko agregacji erytrocytów i płytek krwi w naczyniach krwionośnych. Dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym, hamują one mikrosomalne utlenianie lipidów, zwłaszcza tych z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi których oksydacja powoduje utratę przepuszczalności błon komórkowych co sprzyja powstawaniu miażdżycy. Izoflawony, podobnie jak cholesterol i witamina E łatwo wiążą się z rdzeniem lipidowym błony komórkowej co wzmacnia jej stabilność oraz zmniejsza płynność i mozaikowatość [16, 17].

Biochanina A i genisteina hamują tworzenie się osteoklastów (komórek kościogubnych), natomiast stymulują aktywność osteoblastów (komórek kościotwórczych). Ponadto mogą stymulować sekrecję IGF-I, który pobudza biosyntezę kolagenu *in vitro* przez osteoblasty. Proces ten stymuluje działanie parathormonu regulującego gospodarkę wapniowo-fosforanową organizmu powodując wzrost poziomu wapnia we krwi i kościach. Izoflawony wykazują również wpływ na metabolizm witaminy D₃ (cholekalcyferol). Stymulują aktywność enzymu CYP27B1 katalizującego syntezę 1,25-dihydroksycholekalcyferolu o funkcji hormonalnej, mającego wpływ na wzrost, różnicowanie i metabolizm komórek tkanki kostnej, ich mineralizację i regenerację [18,19].

3. METODY OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

Dzięki obecności pierścieni fenolowych, izoflawony w analizowanych próbkach można bez upochodnienia identyfikować wykorzystując porównanie widm UV, IR lub PMR z widmami standardów. Jednakże metody te wymagają często starannego usuwania z analizowanych próbek endogennych składników utrudniających jakościowe i ilościowe oznaczanie izoflawonów; dlatego też metody te mogą być kosztowne oraz pracochłonne. Najczęściej stosowaną techniką do analizy ilościowej i jakościowej jest chromatografia cieczowa. Przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub Ultra HPLC (UPLC) w połączeniu z różnymi technikami detekcji istnieje możliwość dokładnego i precyzyjnego rozdzielania oraz wykrycia poszczególnych izoflawonów.

3.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

Niezmiernie istotnym jest odpowiednie przygotowanie analizowanej próbki; jej stan skupienia oraz stężenie i struktura chemiczna oznaczanego izoflawonu w analizowanym materiale biologicznym rzutuje na metodę przygotowania badanej próbki. Jeżeli analizujemy materiał biologiczny w którym znajdują się niskie stężenia izoflawonów możemy zastosować ekstrakcję; pozwoli to na zwiększenie stężenia analitu oraz może zmniejszyć efekty związane z obecnością matrycy [20]. W materiale roślinnym oraz próbkach żywności występują przede wszystkim glikozydy, natomiast w materiale pochodzącym z organizmu zwierzęcego lub ludzkiego występują w wyższych stężeniach pochodzące od nich aglikony, a w moczu i krwi dodatkowo obecne są koniugaty glukuronowe i siarczanowe. Biologiczna próbka, w zależności od jej stanu skupienia najpierw powinna być zhomogenizowana, zliofilizowana lub zamrożona w ciekłym azocie. Kolejno przeprowadzana jest ekstrakcja w układzie LLE przy zastosowaniu eteru dietylowego, octanu, etylu lub chlorku metylenu z małą ilością kwasu octowego lub mrówkowego. Często też stosuje się wstępne usunięcie endogennych składników analizowanej próbki wykorzystując ekstrakcję SPE. Podstawą tej techniki analitycznej są kolumny pakowane żelom krzemionkowym, modyfikowanym oktadecylem (C18), natomiast fazę ciekłą stanowi metanol, etanol lub acetonitryl [1]; następnie oznaczane anality w uzyskanym eluacie są finalnie analizowane przy użyciu RP-HPLC. W przypadku badania próbek ciekłych wystarczy zazwyczaj zastosować tylko filtrację lub wirowanie [21].

W niektórych próbkach biologicznych, na przykład w soi oraz produktach sojowych, pojawiają się duże ilości polarnych izoflawonów (m.in. glikozydy izoflawonów) [22]. Dlatego też tę grupę polarnych izoflawonów zaleca się analizować przy użyciu kolumn chromatograficznych zawierających wypełnienie z ugrupowaniem polarnym, które wbudowane jest w hydrofilowy łańcuch, takich jak faza acyloamidowa, cholesterolowa lub fosfolipidowa.

3.1.1. EKSTRAKCJA

Proces ekstrakcji związków izoflawonowych jest trudnym wyzwaniem, zależnym od ilości związków jakie chcemy wyizolować, form malonylo- i acetyloglukozowych oraz dostępności rynkowej standardów. Inne metody ekstrakcji oraz rodzaj rozpuszczalnika będziemy stosowali w celu oznaczenia glikozydów a inne aglikonów. Największą gamę związków można znaleźć w materiale biologicznym pochodzącym z kundzu, bo aż 31 oraz z koniczyny łąkowej i lucerny [23]; niestety wiąże się to z bardziej skomplikowanym procesem ekstrakcji. W produktach sojowych spodziewać się można pochodnych daidziny, genistyny oraz glicytyny. Najprostszym sposobem jest ekstrakcja na gorąco metanolem i wodą w różnych proporcjach objętościowych. Co umożliwi izolację glikozydów i aglikonów w przybliżonej zawartości. Jednak aby całkowicie przekształcić formy malonylo- i acetyloglukozowe w glikozydy i aglikony należy zastosować odpowiednio hydrolizę zasadową oraz kwasową. Dzięki tym procesom wszystkie izoflawony mogą być łatwo oznaczone w badanych materiałach biologicznych [7, 24].

Zadaniem ekstrakcji zasadowej jest usunięcie wiązań estrowych, w rezultacie czego z form 6''-O-malonylo-glikozydowych i 6''-O-acetylo-glikozydowych otrzymujemy odpowiednie β -glikozydy. Dla produktów sojowych często stosowana jest hydroliza zasadowa zgodnie z metodą AOAC 2001.10 [25] lub jej modyfikacje (Tab. 1).

Hydroliza katalizowana kwasami stymuluje pękanie wiązań glikozydowych między aglikonami a grupą glukozową dając aglikony z wyjątkiem pueraryny. Stosuje się ją do analizy złożonych próbek i identyfikacji cukrowych izoflawonów poprzez porównanie z wynikami hydrolizy zasadowej. Dzięki temu można oszacować zawartość aglikonów, które mogą być połączone z cukrami innymi niż glukoza lub formami niedostępnymi; próbki te mogą być standardami aglikonów.

Selektywna hydroliza enzymatyczna jest również często stosowana jako metoda obróbki wstępnej próbek plazmy, moczu i treści pokarmowej. Przy użyciu β -glukuronidazy/sulfatazy (z *H. pomatia*), sulfatazy (typu VIII) czy β -glukuronidazy (typu B-1: z bydlęcej wątroby) można odseparować aglikony od form glukuronidowych i sulfatowych [26].

3.1.2. SONIFIKACJA

Poddawanie próbek działaniu ultradźwięków może znacznie skrócić czas ekstrakcji oraz w dużej mierze ułatwić ten proces. Chen i in. [27] (Tab. 1) wykazali, iż w celu utrzymania koncentracji izoflawonów na stałym poziomie należy przeprowadzić sonifikację od 20 do 50 min. Długi czas tego procesu prowadzi do ubytku form acetylowych. Aby uniknąć hydrolizy form acetylowych (stymuluje ją wysoka temperatura), sonifikację należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej (tj. ok. 25°C).

3.1.3. REFLUXING - MROŻENIE

Wielu autorów zaleca oznaczanie izoflawonów po uprzednim poddaniu próbek procesowi mrożenia w zakwaszonym metanolu, w celu konwersji wszystkich form acetylowych i glikozydowych do prostych aglikonów. Po 60 minutowym wymrażaniu, wszystkie formy acetyloglikozydowe przechodzą do form glikozydowych lub aglikonów. Wydłużenie czasu wymrażania zwiększa wydajność konwersji glikozydów w kierunku aglikonów; dlatego też po 4 godzinach wymrażania w badanej próbce znajdują się tylko izoflawony w formie aglikonów. Ciekawym zjawiskiem odnotowanym przez Chena i in. [27] był brak stabilności aglikonów po 4 godzinach wymrażania; stężenie genisteiny zmniejszało się, przy czym pojawiał się na chromatogramie dodatkowy niezidentyfikowany pik. Dlatego też proces wymrażania należy optymalizować.

3.2. UŻYCIE STANDARDU WEWNĘTRZNEGO

W celu poprawienia dokładności analizy ilościowej niezbędnym jest zastosowanie standardu wewnętrznego, dzięki któremu możemy ocenić rozmiar straty analitu; błędy te mogą pojawiać się podczas przygotowywania próbki. Dobór IS w tych metodach utrudnia fakt, iż w materiałach roślinnych większość możliwych do użycia standardów wewnętrznych eluuje niemal jednocześnie wraz z endogennymi substancjami analizowanej próbki. Suplementy diety są zwykle mieszkanką ekstraktów z ziół zawierających liczne nieznanne komponenty. Dlatego znalezienie odpowiedniego standardu wewnętrznego, który nie ulegałby elucji w tym samym czasie co reszta związków znajdujących się w badanej próbce jest nie lada wyzwaniem. Co więcej, ważne jest, aby związek używany jako standard nie ulegał degradacji w trakcie hydrolizy katalizowanej kwasami lub zasadami.

Apigenina – flawonowy analog genisteiny oraz fluorescyna są jak podaje Griffith i Collison [28] szeroko stosowanym standardem wewnętrznym w analizach gradientowych HPLC. Krenn i in. [29] w analizie izoflawonów stosowali jednocześnie kilka różnych standardów wewnętrznych przy analizie próbek koniczyny łąkowej.

Delmonte i in. [23] (Tab. 1) zaobserwowali, że 2'-metoksyflawon oraz 6'-metoksyflawon nie eluują z innymi związkami pochodzenia izoflawonowego oraz wykazują wysokie odzyski po procesach hydrolizy. Związków tych użyli jako standardów wewnętrznych w metodach opracowanych przez innych badaczy (Tab. 1). Do analizy izoflawonów przy pomocy HPLC z detekcją UV stosuje się również flawon lub fluoresceinę, natomiast do HPLC sprzężonej ze spektrometrem mas (MS) jako standard wewnętrzny można zastosować deuterowaną genisteinę, daidzeinę, biochaninę lub formononetynę. W niektórych metodach pomijany jest standard wewnętrzny; szczególnie dotyczy to technik analitycznych wykorzystujących spektrometrię mas (np. LC/MS).

3.3. CHROMATOGRAFICZNE TECHNIKI OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

Znanych jest kilka technik analizy badanych izoflawonów. Są nimi chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia cieczowa (LC), niekiedy również, elektroforeza kapilarna (CE). Najczęściej stosowaną metodą oznaczania izoflawonów i ich pochodnych oraz metabolitów jest HPLC lub UHPLC. W związku z tym, iż związki te charakteryzują się dużą liczbą i różnorodnością podstawników wysokosprawną chromatografią cieczową w układzie odwróconych faz zapewnia najlepsze rozdzielanie izoflawonów. Najbardziej istotny jest wybór fazy ruchomej, którą może stanowić roztwór metanolu lub acetonitrylu z wodą. Ponieważ izoflawony są słabymi kwasami, w celu polepszenia ich retencji oraz zwiększenia rozdzielczości pików, fazę ruchomą zakwasza się 0,1–1% kwasem mrówkowym, kwasem octowym, kwasem trifluorooctowym, octanem lub mrówczanem amonu. Wyżej opisane rodzaje faz stosowane są w układzie faz odwróconych (RP-HPLC).

Dzięki obecności aromatycznych pierścieni oraz licznych podstawników możliwych jest kilka sposobów detekcji. Związki te posiadają dwa charakterystyczne zakresy absorpcji promieniowania z zakresu UV-VIS. Pierwszy z nich wynika z obecności pierścienia A i wynosi 240–285 nm (zakres UV); natomiast drugi zakres związany z obecnością pierścienia B zawiera się w zakresie 300–550 nm (zakres VIS). Przy oznaczaniu różnych grup izoflawonów stosuje się detektor z matrycą fotodiodową UV-DAD, który umożliwia rejestrację widm w szerokim zakresie UV-VIS w trakcie jednej analizy; pozwala to na bardziej selektywne oznaczanie analitów (tj. optymalizowanie wyboru analitycznej długości fali). W związku z obecnością elektroaktywnych grup fenolowych, fitoestrogeny ulegają utlenieniu, a ich potencjał utlenienia (najczęściej ok. 700 mV) pozwala na zastosowanie elektrochemicznego detektora (ED). Detektor ten charakteryzuje się wyższą czułością na izoflawony, rzadko stosuje się detektor fluorescencyjny (FL), gdyż tylko niewielka grupa tych związków wykazuje naturalną fluorescencję; są to izoflawony posiadające grupy hydroksylowe przy 3 atomie węgla. Najczulszym, najbardziej selektywnym i wszechstronnym detektorem jest spektrometr mas (MS). Stosując HPLC-MS uzyskujemy jednocześnie informacje o związku chemicznym, ilości, czasie retencji oraz masie cząsteczkowej i składzie pierwiastkowym analitu w badanej próbce. Takie połączenie stosuje się najczęściej w przypadku złożonych matryc.

Bez wątpienia kluczowym elementem chromatograficznego układu jest kolumna analityczna; od rodzaju jej wypełnienia czyli średnicy ziarna oraz długości i szerokości kolumny, zależy jej sprawność. Wypełnienie kolumny powinno zawierać homogeniczne i sferyczne cząsteczki, zapewniać wysoką stabilność ciśnieniową oraz dopuszczać szeroki zakres pH (1–11) używanych eluentów.

Analizy izoflawonów prowadzone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystując najczęściej kolumny C18 o długości 250 mm i średnicy ziarna od 4 do 5 μm . Kolumny te wypełnione są fazą oktadecylową osadzoną na podłożu krzemionkowym o średniej średnicy ziarna od 4 do 5 μm modyfikowaną fazą oktadecylową (tj. grupami funkcyjnymi zawierającymi 18 atomów węgla:

$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$); pozwala to na zadowalające rozdzielanie wszystkich izoflawonów w czasie ok. 60 min. W chwili obecnej wprowadza się wiele istotnych zmian w parametrach tego typu kolumn; ma to na celu polepszenie selektywności, rozdzielczości oraz skrócenie czasu analizy. Rozmiar średniej średnicy ziaren wypełnienia kolumny rzutuje na efekt przenoszenia masy oraz na optymalną prędkość liniową fazy ruchomej; w przypadku mniejszych ziaren wypełnienia odnotowuje się relatywnie mniejszy spadek sprawności przy użyciu wyższej od optymalnej prędkości linowej przepływu eluentu, niż ma to miejsce w przypadku ziaren wypełnienia o większej średnicy. Zatem, dla małych średnic ziaren wypełnienia, można stosunkowo „bezkarnie” stosować prędkości przepływu większe od optymalnego; pozwala to na skrócenia czasu analizy chromatograficznie.

Zmniejszenie średniej średnicy ziaren wypełnienia powoduje wzrost ciśnienia zwrotnego kolumny, co może być jedną z przyczyn awarii kolumn oraz innych elementów układu chromatograficznego. Przy wypełnieniu ziarnami o średnicy 3–5 μm , pojawiają się ograniczenia co do długości kolumny oraz szybkości przepływu eluentów. Ograniczenia te wynikają z limitu ciśnienia jakim charakteryzują się starsze układy HPLC. Wypełnienie o średniej średnicy ziarna poniżej 2 μm umożliwiają bardzo szybką analizę chromatograficzną; wymagają jednak zastosowania sprzętu ultra ciśnieniowego (UHPLC), który pozwoli na zastosowanie ciśnień do ok. 12000 bar. Nowoczesną technologią pozwalającą na uzyskanie lepszej selektywności, przy niższym ciśnieniu pracy chromatografu, jest użycie kolumn nowej generacji wypełnionych powierzchniowo porowatą krzemionką; technologia ta nosi nazwę „Fused-Core technology”. Jej istotą jest zastosowanie specjalnego złoża o sztywnym, nieporowatym rdzeniu, który pokrywa się cienką porowatą warstwą; to w niej zachodzi proces rozdzielania analitów. Dzięki temu ogranicza się niekorzystne efekty dyfuzji analitów w głąb rdzenia ziaren stanowiących wypełnienie kolumny. Faza ta charakteryzuje się bardzo wysoką sprawnością oraz nie generuje wysokich ciśnień. Szybkość oraz sprawność analizy chromatograficznej przy zastosowaniu złoża o średniej wielkości ziarna ok. 2,6 μm pakowanych techniką Fused-core jest podobna co kolumn tradycyjnych o średnicy ziarna poniżej 1,3 μm . Co więcej, kolumny te można bez obawy stosować w układach chromatograficznych typu UHPLC jak również w starszych HPLC [31].

Do zastosowania szybkich i rutynowych oznaczeń izoflawonów w żywności często poleca się metody ultrasprawnej/ultraciśnieniowej chromatografii cieczowej (UHPLC) z racji jej wysokiej wydajności. Fiechter i in. [32] opracowali metodę określenia całkowitego stężenia aglikonów w soi po enzymatycznej hydrolizie, w której to w ciągu 3 minut dokonano rozdziału wszystkich aglikonów.

Oczekiwana kolejność elucji dla związków izoflawonowych, przy użyciu kolumn C18 przedstawia się następująco: glukozydy izoflawonów pueraryna < daidzeina < glicytyna < genistyna; aglikony daidzeina < glicyteina < genisteina. Aglikony takie jak formononetyna i biochanina wymywane są najszybciej.

Wyższy procentowy udział czynnika polarnego w eluencie zapewnia szybszą elucję analitów; jednakże może to spowodować spadek rozdzielczości układu chromatograficznego. Ponadto, im analit jest mniej polarny, tym dłuższy będzie jego czas retencji. Zatem należy optymalizować parametry elucji gradientowej lub izokratycznej i/lub skład fazy ruchomej. Przykładem tego może być zoptymalizowana elucja biochaniny przy użyciu fazy ruchomej, którą stanowi roztwór metanolu w wodzie (85:100, v/v). Zastępując oktadecylowe grupy fazy stacjonarnej grupami bardziej polarnymi (np. fenylowymi lub cyjanowymi) można skutecznie eluować aglikony przy mniejszym udziale procentowym rozpuszczalnika polarnego [31]. Formy acetylo- i malonylo-glukozowe eluują pomiędzy glikozydami a aglikonami. Podsumowując, skłonność do przejawiania hydrofobowości, a co za tym idzie kolejność wymywania izoflawonów, zaczyna się od glikozydów poprzez malonyloglukozydy, acetyloglukozydy, a na końcu szeregu pojawiają się wolne (niehydratowane) aglikony [33].

PODSUMOWANIE

Skrócenie czasu analizy, obniżanie wartości granicy wykrywalności izoflawonów oraz stosowanie możliwie małej ilości odczynników i masy badanej próbki, prowadzi chemię analityczną w kierunku usprawnienia, miniaturyzacji i optymalizowania wydajności analiz. Najnowsze prace koncentrują się na badaniu szlaków metabolicznych izoflawonów, ich pochodnych oraz ich metabolitów pojawiających się w żywych organizmach. Z racji szerokiego zakresu występowania izoflawonów, ich zastosowania oraz znaczenia w medycynie, farmacji i żywieniu, metody detekcji tych związków powinny być nadal przedmiotem badań. Ponadto, w żywych organizmach funkcje fizjologiczne metabolitów fitoestrogenów nie są do końca poznane, również nie jest gruntownie poznany mechanizm ich powstawania w ustrojach żywych. Wszystko to skłania fizjologów oraz analityków do prowadzenia kolejnych prac usprawniających metody analityczne, które pozwoliłyby na jeszcze bardziej wiarygodne oznaczanie izoflawonów i ich pochodnych oraz metabolitów w materiałach biologicznych.

Tabela 1. Metody oznaczania izoflawonów przy użyciu HPLC
 Table 1. Analytical methods for the determination of selected isoflavonoids

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																																													
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glycityna acetylo- daidzyna acetylogli- cyna acetylo- daidzyna	<p>Material: Białko sojowe, żywność oraz odżywcze suplementy pochodze- nia sojowego</p> <p>Ekstrakcja: • 1 g próbki umieścić w pro- bówce, z nakrętką, o wymiarach 125 mm × 20 mm</p> <p>• dodać 6 ml wody dejonizowanej oraz 0,5 ml standardu wewnętr- znego – apigeniny (2000 µg/ml w MSO). Wymieszać.</p> <p>• ekstrakcja w mieszalniku obroto- wym przez 2 godziny</p> <p>• dodać 3,5 ml wody dejonizowa- nej i wymieszać</p> <p>• uzupełnić 50% roztworem acetonitrylu</p> <p>• wirować przez 10 min przy 2000 obrotów</p> <p>• ilość próbki przenoszona do naczynka uprzednio przefiltro- wać przez 0,45 µm filtr PVDF</p>	<p>1. Kolumna: YMC ODS-AM, 5 µm, 250 × 3 mm, Faza mobilna: A – 0,1 % (v/v) kwas octowy w wodzie B – 0,1% (v/v) kwas octowy w acetonitrylu</p> <p>Przepływ: 0,65 ml/min</p> <p>Temp. kolumny: 40°C</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Parametry elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>63</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>73</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. j.w.</p> <p>Parametry elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–5</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>71</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>44</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>47</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>57</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. Kolumna: Altima C18, 3 µm , Rocket 53 × 7 mm, Temp. kolumny: 40°C</p> <p>Przepływ: 3 ml/min</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Detekcja: 260 nm</p> <p>Faza mobilna: A: 0.1% roztwór kwasu octowego doprowadzony 25% wodnym roztwo- rem amoniaku do pH = 3,5. B: 100% acetonitryl</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–9</td> <td>73</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>71</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	90	10	60	70	30	63	10	90	73	90	10	Czas (min)	A	B	0–5	85	15	36	71	29	44	65	35	47	10	90	57	90	10	Czas (min)	A (%)	B (%)	0–9	73	27	13	71	29	15	90	10	Griffith i Collison [28]
Czas (min)	A	B																																														
0	90	10																																														
60	70	30																																														
63	10	90																																														
73	90	10																																														
Czas (min)	A	B																																														
0–5	85	15																																														
36	71	29																																														
44	65	35																																														
47	10	90																																														
57	90	10																																														
Czas (min)	A (%)	B (%)																																														
0–9	73	27																																														
13	71	29																																														
15	90	10																																														

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																					
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glicytyna acetylo- idzyna acetygli- cina acetylo- idzyna	<p>Materiał: Suplementy sojowe</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,2 grama oznaczanej próbki umieścić w 20 ml probówce • dodać 4 ml wody i 16 ml acetonitrylu. Mieszać wytrząsając. • przez 40 min sonifikować w 25°C • pobrać 1 ml próbki i wirować przez 10 min w 2000 xg • przefiltrowany supernatant przefiltrować przez PVFD 0.45 zlać do fiołka uzupełnić 80% acetonitrylem <p>Procedura ta skraca obsługę w trakcie przygotowywania próbki.</p>	<p>Kolumna: Luna C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm,</p> <p>Faza mobilna: (brak dokładnego sformułowania, odsyłamy do publikacji) A – acetonitryl B – 80% metanol w wodzie (v/v)</p> <p>Przepływ: 0,8 ml/min</p> <p>Program elucji:</p> <table> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>46</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>56</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	88	12	10	70	30	40	10	90	46	88	12	56	88	12	Chen [27]			
Czas (min)	A	B																						
0	88	12																						
10	70	30																						
40	10	90																						
46	88	12																						
56	88	12																						
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glicytyna	<p>Materiał: Napój owocowo-sojowy</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 g liofilizatu + 80% etanol zakwaszony 1M HCl • inkubacja w 80°C przez 1 h chłodzenie próbki i wytrząsanie przez 2 min • wirowanie 10 min, 12 000 xg w 4°C • supernatant pobrać, a resztę ponownie ekstrahować z 7,5 ml 80% etanolu i zlać do kolby miarowej którą następnie wypełniono 80% etanolem. • filtracja przez filtr 0,2 µm 	<p>Kolumna: C18, 3,5 µm, 150 × 3 mm, Przedkolumna, C18, 5 µm,</p> <p>Faza mobilna: A – woda/metanol (80:20); B – woda/metanol/acetonitrylu (40:40:20)</p> <p>Przepływ: 0,3 ml/min</p> <p>Nastrzyk: 20 µl</p> <p>Temperatura: kolumna – 37°C podajnik – 4° C</p> <p>Program elucji:</p> <table> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A (%)	B (%)	0	80	20	15	80	20	25	0	100	50	0	100	52	80	20	70	80	20	Morales de la Peña i in [34]
Czas (min)	A (%)	B (%)																						
0	80	20																						
15	80	20																						
25	0	100																						
50	0	100																						
52	80	20																						
70	80	20																						

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																		
daidzyna daidzeina genistyna genisteina glycytyna genistein	<p>Materiał: Soja i żywność pochodzenia sojowego.</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> ok. 1 g próbki zmieszać z 40 ml 80% metanolu (mieszanina ekstrakcyjna) wytrząsać w 65°C przez 2 godziny ochłodzić do temperatury pokojowej i dodać 3 ml 2M NaOH wytrząsać w wytrząsarce orbitalnej przez 10 min dodać 1 ml lodowatego kwasu octowego, wymieszać i uzupełnić do 50 ml mieszaniną ekstrakcyjną przefiltrować i pobrać 5 ml ekstraktu dodać 4 ml wody i uzupełnić do 10 ml metanolem, mieszaninę lekko wymieszać pobrać ok 1 ml ekstraktu do 1,5 ml próbówki Eppendorfa i wirować przez 5 min na 7000 xg tak oczyszczoną próbkę przetranszować do naczynka supernatnatu nie należy filtrować przez filtry membranowe 	<p>Kolumny: (brak danych producenta) C18 200 × 2,1mm C18 200 × 4,6mm</p> <p>Faza mobilna: A – woda-metanol-kwas octowy (88:10:2) B – metanol-kwas octowy (98:2)</p> <p>Przepływ: 0,4 ml/min dla kolumny 2,1 mm 1,5 ml/min dla kolumny 4,6 mm</p> <p>Czas analizy: 44,5 min</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>37</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>44,5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0,1	90	10	30	40	60	31	0	100	37	90	10	44,5	90	10	AOAC 2001.10 [25]
Czas (min)	A	B																			
0,1	90	10																			
30	40	60																			
31	0	100																			
37	90	10																			
44,5	90	10																			
daidzeina daidzeina genisteina genisteina glycytyna genistein	<p>Materiał: Żywność oraz suplementy diety pochodzenia sojowego</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1g produktów sojowych w wytarwanej zlewce z korkiem dodać standard wewnętrzny 0,5 ml, wymieszać dodać 8 ml acetonitrylu wymieszać dodać 5 ml czystej dejonizowanej wody i wymieszać kolejne kroki nie są konieczne dla próbek już rozpuszczonych mieszać na wytrząsarce, przez 60 min z przekręcaniem co 5 min. dodać 6,5 ml wody dejonizowanej – mieszać wirować przez 10 min w 200 xg supernatant, przefiltrować przy pomocy filtra strzykawkowego i przenieść do naczynek pomiarowych 	<p>Kolumna: ODS, C18; 5 µm rekomendowane wymiary: 250 × 3 mm lub 250 × 4,6 mm,</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Przepływ: 0,65 ml/min dla kolumny 3 mm 1,5 ml/min dla kolumny 4,6 mm</p> <p>Detekcja UV przy długości fali 260 nm Temperatura kolumny: 40°C</p> <p>Faza mobilna: A – H₂O z 0,05% H₃PO₄ B – 100 % acetonitryl</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>63</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>73</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	90	10	60	70	30	63	10	90	73	90	10	AOAC 2008.03 [35]			
Czas (min)	A	B																			
0	90	10																			
60	70	30																			
63	10	90																			
73	90	10																			

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.															
puerarina daidzina glycytina genistina malonylo- daidzina malonylo- glycytina malonylo- genistina acetylo- daidzina daidzeina acetylo- daidzina acetylogli- cyna glukozyd formone- tyny glyciteina calykosin acetyloge- nistina genisteina glukozyd biocha- niny A pratenseina pseudo- baptige- nina formono- netyna prunetina biocha- nina A	<p>Materiał: Suplementy diety i żywności pochodzenia sojowego, z ekstraktów koniczyny łąkowej oraz kudzu</p> <p>Ekstrakcja: Modyfikacja oficjalnej metody AOAC 2001.10 oraz metody zastosowanej przez Griffitha i Collisona, poprzez zastosowanie 1 ml standardu wewnętrznego (2mg/ml) 2'-metoksy-flawonu oraz 6'-metoksy-flawonu do obu metod.</p> <p>Hydroliza zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 ml ekstraktu do 5 ml kolby miarowej • dodać 300 µl 2 M NaOH. wirować przez 10 min • dodać 100 µl lodowatego CH₃COOH • dopełnić mieszaniną H₂O/MeCN (50:50) do całkowitej objętości 5 ml • roztwór przefiltrować przez 0,45 µm PTFE membranę <p>Hydroliza kwasowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 ml ekstraktu do zakręczanych próbek z 1 ml stężonego HCl • próbki przedmuchano azotem i ogrzewano w 80°C przez 2 godziny • do schłodzonych próbek w temperaturze pokojowej dodać 2 ml roztworu 50:5:45 NH₄OH (28–30% w H₂O) / lodowaty CH₃COOH/DMSO • roztwór przefiltrować przez 0,45 µm PTFE membranę 	<p>Kolumna: Waters Nova-Pak C18 150 × 3,9 mm, 4 µm.</p> <p>Czas: 100 min + 20 min</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Temp: 40°C</p> <p>Detekcja: skan: 200-400nm, 260nm przepływ: 1ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 0,1% kwasu octowego w wodzie; B – 0,1% kwasu octowego w acetonitrylu</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table> <p>Równowaga: 20 min</p>	Czas (min)	A	B	0	95	5	50	80	20	90	60	40	10	30	70	Delmonte i in. [23]
Czas (min)	A	B																
0	95	5																
50	80	20																
90	60	40																
10	30	70																

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																								
ekwol daidzeina dihydroda- idzeina ODMA genisteina dihydroge- nisteina glicyteina	<p>Materiał: Stinki tofu</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną próbki • 1 g zawiesiny dwukrotnie ekstrahować 5 ml <i>n</i>-heksanem, • dwukrotna ekstrakcja 5 ml octanu etylu • odparować octan w 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2 godziny • pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny roztworów A (18% metanolu, 1.8% octanu etylu, 0,04% fosforanu, 8 µg/ml EDTA-Na, reszta woda) i B (2% octanu etylu w metanolu) w proporcji 1:1 (v/v). 	<p>Kolumna: C18 UG120 250 × 4,6 mm</p> <p>Detekcja: 254 nm 280 nm – ekwol przepływ: 1 ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 18% metanolu, 1,8% octan etylu, 0,04% fosforanu oraz 8 µg/ml EDTA-Na w wodzie B – 2% octan etylu w metanolu</p> <p>Program elucji gradientowej: Udział solwentu B rośnie liniowo od 0 do 70% w fazie ruchomej</p>	Jou i in. [36]																								
daidzina glicytina genisteina malonylgli- citin malonylda- idzin malonylge- nistin acetylda- idzin acetylgeni- stin malonylgli- citin daidzeina genisteina glicyteina	<p>Materiał: soja odmiana żółta, mąka sojowa</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g próbki z 25 ml 50% etanolu, ekstrahować w 20°C przez 60 min; wieloczęstotliwościowa ekstrakcja (25 i 45 kHz) prowadzona w łaźni ultradźwiękowej • wirować próbki w 10°C przez 10 min przy obrotach 4000 rpm, stosując wirówkę Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tutlingen, Germany) • przefiltrować przez 0,2 µm nylonowy filtr strzykawkowy 	<p>Kolumna: Kinetex™ C18, 2,6 µm, 100 Å, 100 × 4,6 mm</p> <p>Czas: min. 12 min Nastrzyk: 10 µl Temp: 25–50°C</p> <p>Detekcja: skan: 200–400 nm, 254 nm przepływ: 2,7 ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 0,1% kwasu octowego w wodzie; B – 100% acetonitrylu</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>92</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>1,04</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>3,56</td> <td>83</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>4,56</td> <td>80,8</td> <td>19,2</td> </tr> <tr> <td>5,50</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6,50</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>7,50</td> <td>92</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table> <p>Równowaga: 2 min</p>	Czas (min)	A	B	0	92	8	1,04	85	15	3,56	83	17	4,56	80,8	19,2	5,50	50	50	6,50	0	100	7,50	92	8	Manchón i in. [30]; Rostagno i in. [7]
Czas (min)	A	B																									
0	92	8																									
1,04	85	15																									
3,56	83	17																									
4,56	80,8	19,2																									
5,50	50	50																									
6,50	0	100																									
7,50	92	8																									

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Klejdus, R. Mikelová, J. Petřlová, D. Potěšil, V. Adam, M. Stiborová, P. Hodek, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubáň, J. Agric. Food Chem., 2005, **53**, 5848.
- [2] R.J. Flechter, Brit. J. Nutr., 2003, **89**, 39.
- [3] J.S. Kim, Ch. S. Kwon, Nutr. Res., 2001, **21**, 947.
- [4] M.A. Van Erp-Baart, H.A. Brants, M. Kiely, A. Muligan, A. Turrini, C. Sermoneta, V. Kikkinen, L.M. Valsta, Br. J. Nutr., 2003, **89**, 25.
- [5] R. Tsuchihashi, S. Sakamoto, M. Kodera, T. Nohara, J. Kinjo, J. Nat. Med., 2008, **62**, 456.
- [6] V.R. Preedy, R.J. Baber, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 1, Royal Society of Chemistry, London, 2013.
- [7] M.A. Rostagno, A. Villares, E. Guillamón, A. Garcia-Laufente, J.A. Martinez, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 2.
- [8] A.M. Aura, Phytochem., 2008, **7**, 407.
- [9] D.A. Balantine, S.A. Wiseman, L.C.M. Bouwens, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1997, **37**, 693.
- [10] U. Breinholt, A. Hossaini, G.W. Syndsen, Food Chem. Toxicol., 2000, **38**, 555.
- [11] D. Malińska, A. Kiersztan. Post. Bioch., 2004, **50**, 182.
- [12] G. Gryniewicz, M. Gadzikowska, Post. Fit., 2003, **4**, 10.
- [13] L. Pilšáková, I. Riečanský, F. Jagla. Physiol. Res., 2010, **59**, 651.
- [14] E.K. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J.J. Bobilya, Nutr. Bioch., 2002, **3**, 572.
- [15] X. Liu, N. Suzuki, Y.R.S. Laxmi, Y. Okamoto, S. Shibusaki, Life Sci., 2012, **91**, 415
- [16] A. Arora, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Arch. Bioch. Biophys., 1998, **356**, 133
- [17] B.E. Merlz- Demlow, A.M. Duncan, K.E. Wangen, Am. J. Clin. Nutr., 2000, **71**, 1462.
- [18] K.H. Lee, E.M. Choi, Biol. Pharm. Bull., 2005, **28**, 1948.
- [19] H. Fathan, K. Wähälä, H. Adlercreutz H, J. Chromatogr., 2002, **777**, 261.
- [20] J.-T. Lin, *HPLC of Acyl Lipids*, HNB Publishig New York, 2005.
- [21] M. Szultka, K. Papaj, K. Rusin, W. Szeja, B. Buszewska, Trends Anal. Chem., 2013, **47**, 47.
- [22] K.D.R. Setchell, N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirschner, J.S.E. Heubi, Am. J. Clin. Nutr., 2002, **76**, 447.
- [23] P. Delmonte, J. Perry, J.I. Rader, J. Chromatogr. A, 2006, **1107**, 59.
- [24] V.R. Preedy, A. Zafra-Gomez, S. Capel-Cuevas, N.I. Dorival-Garcia, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 16, Royal Society of Chemistry, London 2013.
- [25] AOAC 2001.10, 2011, 118.
- [26] K. Ishii, K. Hosoda, T. Futura, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 11, Royal Society of Chemistry, London 2013.
- [27] L.J. Chen, X. Zhao, S. Plummer, J. Tang, D.E. Games, J. Chromatogr. A, 2005, **1082**, 60.
- [28] A.P. Griffith, M.W. Collison, J. Chromatogr. A, 2001, **913**, 397.
- [29] L. Krenn, I. Unterrieder, R. Rupprechter, J. Chromatogr. B, 2002, **777**, **123**.
- [30] N. Manchón, M. D`Arriago, Garcia-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Ramos A., Martinez J.A., Rostagno M.A., Talanta, 2010, **82**, 1986.
- [31] J. Valls, S. Millán, P.M. Marti, E. Borrás, J. Arola, J. Chromatogr. A. 2009, **1216**, 7143.
- [32] G. Fiechter, I. Opacak, B. Raba, H.K. Mayer, Food Research International. 2013, **50**, 586.
- [33] Q. Ma, M. Chen, H.-R. Yin, Z.-G. Shi, Y.-Q. Feng, J. Chromatogr. A. 2008, **61**, 1212 .
- [34] M. Morales de la Peña, L. Salvia-Trujillo, M.A. Rojas-Graü, O. Martin-Belloso, Innov. Food Sci. Emerg. Tech., 2010, **11**, 604.
- [35] AOAC 2008.03, 2011, 123.
- [36] H.-J. Jou, P.J. Tsai, J.-H. Tu, W.-H. Wu, J. Func. Food, 2013, **5**, 651.

PEKTYNY – WYSTĘPOWANIE, BUDOWA CHEMICZNA I WŁAŚCIWOŚCI

PECTINS – OCCURRENCE, CHEMICAL CONSTITUTION AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Hanna Pińkowska, Adrianna Złocińska*

*Katedra Technologii Chemicznej, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny,
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
ul. Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław
e-mail: adrianna.zlocinska@ue.wroc.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Źródła pektyn

2. Budowa chemiczna pektyn

2.1. Homogalakturonan

2.2. Ramnogalakturonan I

2.3. Ramnogalakturonan II

2.4. Ksylogalakturonan

2.5. Arabinan

2.6. Arabinogalaktany

3. Rodzaje pektyn

4. Właściwości fizykochemiczne pektyn i mechanizm żelowania

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Hanna Pińkowska w roku 1985 ukończyła studia na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Chemicznej tej uczelni. Specjalność – technologia chemiczna, chemia i technologia polimerów. W ostatnich latach szczególnym obiektem jej zainteresowań naukowo-badawczych stała się hydrotermalna konwersja biomasy do produktów użytecznych technicznie (wysokoprzetworzonych chemikaliów i produktów masowych – paliw). Jest autorem ponad 30 prac badawczych i przeglądowych.



Mgr inż. Adrianna Złocińska w roku 2008 ukończyła studia na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku naukowo-technicznym w Katedrze Technologii Chemicznej tej uczelni. Specjalność – technologia chemiczna, ochrona środowiska. Obecnie zajmuje się przerobem odpadowej biomasy, w tym wysłodków buraczanych do produktów użytecznych w warunkach pod- i nadkrytycznych.

ABSTRACT

Pectins are important polysaccharide structure constituents of plant middle lamellae and primary cell walls ensuring their water retention performance and the pH stability [1, 11]. Due to the high gelling, stabilising and thickening properties they are widely used in the food and pharmaceutical industry [3, 9]. Commercial pectin substances are extracted from the waste material, especially citrus peels (from orange, grapefruit, lemon and lime fruit), apple pomace and sugar beet pulp. The high concentration of pectins is found also in other fruits and vegetables, mainly soy hull, mango peels and sunflower heads [3, 11, 12, 14].

The properties of pectins result mainly from their chemical structure. The pectin backbone is primarily composed of homogalacturonan (Fig. 1), which is a linear polymer consisting of α -1 \rightarrow 4-linked D-galacturonic acid units, partially methyl-esterified or O-acetylated [3, 9]. Other structural elements of pectins are rhamnogalacturonan type I (Fig. 2) and type II (Fig. 3), xylogalacturonan (Fig. 5), arabinan (Fig. 6), arabinogalactan type I (Fig. 7) and type II (Fig. 8) [3, 5, 8].

The gelling property of pectins depends on the degree of methyl esterification of their carboxyl groups (DE). According to this parameter there are high ester pectins (DE > 50) and low ester pectins (DE < 50). The high ester pectins form gels in the presence of high sugar concentrations exceeding 55% and pH lower than 3.5, while in the case of low ester pectins the gelation process occurs even at low concentrations of sugar but the presence of divalent ions is required (e.g. calcium) [18, 21].

The aim of this study was a review of the available literature regarding the sources of pectins, their types, chemical structure and physicochemical properties.

Key words: high ester pectins, low ester pectins, homogalacturonan, rhamnogalacturonan, xylogalacturonan, gelation

Słowa kluczowe: pektyny wysokoestryfikowane, pektyny niskiestryfikowane, homogalakturnon, ramnogalakturnon, ksylogalakturnon, żelowanie

WPROWADZENIE

Pektyny są polisacharydami powszechnie występującymi w postaci blaszek środkowych w ścianach komórkowych i przestrzeniach międzykomórkowych roślin łądowych. W większości tych roślin, przede wszystkim dwuliściennych i niektórych jednoliściennych, zawartość pektyn stanowi do ok. 35% (w przeliczeniu na suchą substancję) [1–4]. W ścianach komórkowych roślin z rodziny wiechlinowatych pektyny występują w ilości ok. 2–10%, natomiast w zdrewniałych tkankach roślinnych ich udział masowy stanowi ok. 5% [3, 5].

Pektyny, będąc liniowymi polimerami, stanowią złożoną mieszaninę cukrów, do których należą przede wszystkim oligo- i polisacharydy. Pektyny zawierają głównie kwas D-galakturonowy oraz sacharydy takie jak L-ramnoza, L-arabinoza, D-galaktoza, D-ksyloza i L-fukoza [6–8]. Łańcuch polimerowy pektyn składa się z 300 do 1000 fragmentów kwasu D-galakturonowego, które powiązane są ze sobą wiązaniami α -1 \rightarrow 4 glikozydowymi [1]. Część grup karboksylowych kwasu D-galakturonowego w cząsteczce substancji pektynowej jest zestryfikowana grupami metylowymi [9]. Poszczególne monomery kwasu D-galakturonowego w cząsteczce pektynowej mogą być zastąpione resztami innych sacharydów.

Pektyny pełnią w roślinach funkcję jednego z podstawowych elementów strukturalnych. Pektyny wpływają m.in. na porowatość roślin, ich łądunek powierzchniowy, wartość pH, równowagę jonową oraz chronią je przed wysuszeniem. Poprzez akumulację fitoaleksyn – substancji wykazujących właściwości przeciwdrobnoustrojowe, pektyny aktywują również działanie systemu odpornościowego roślin [5, 10].

Pektyny są substancjami naturalnymi, które wykryto po raz pierwszy w 1790 r. w owocach tamaryndowca [10]. W 1825 r. Braconnot wyizolował pektyny z jabłek, opisał ich właściwości fizykochemiczne i nadał im nazwę pochodzącą od greckiego słowa „*pektos*” oznaczającego „krzepnąć, twardnieć” [6, 7, 10].

Pektyny wykazują zdolność żelowania, a także właściwości zagęszczające i emulgujące, które wykorzystywane są od dawna w przemyśle spożywczym do produkcji m.in. przetworów owocowych, wyrobów cukierniczych i mlecznych, ketchupów oraz majonezów.

Pektyny znajdują także coraz częściej zastosowanie w farmacji, medycynie i przemyśle kosmetycznym, gdzie wykorzystuje się ich reaktywność biochemiczną, dostępność, łatwość wyodrębniania i brak toksyczności. Unikalne właściwości funkcjonalne pektyn wynikają przede wszystkim z ich budowy chemicznej i pochodzenia. Mając na uwadze stale rozszerzający się zakres wykorzystania pektyn, istnieje potrzeba poznania ich skomplikowanej budowy chemicznej i niejednorodnej struktury, różnej w zależności od gatunku rośliny, z której zostały wyodrębnione.

Celem pracy był przegląd literatury dotyczącej pektyn, ich rodzajów, budowy chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych, w tym użytkowych.

1. ŹRÓDŁA PEKTYN

Największa ilość substancji pektynowych znajduje się w skórkach owoców cytrusowych (20–35% m/m¹), łupinach sojowych (25–30% m/m) [11, 12], główkach słoneczników – bez pestek (15–24% m/m) [13], burakach cukrowych (10–20% m/m) [11], skórkach mango (10–15% m/m) [14] oraz wyłokach jabłkowych (12% m/m) [11].

Substancje pektynowe pozyskuje się głównie z zewnętrznych (flawedo) i wewnętrznych (albedo) warstw skórek owoców cytrusowych (cytryn, pomarańczy, limonek, grejfrutów) i wyłoków jabłkowych otrzymywanych w produkcji soków pitnych oraz wysłodków buraczanych powstających po procesie wysładzania buraków cukrowych [15–18].

2. BUDOWA CHEMICZNA PEKTYN

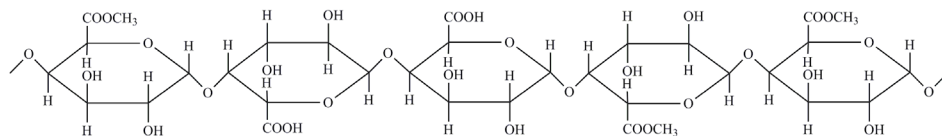
Najważniejszymi polisacharydami tworzącymi strukturę pektyn są homogalakturnon, ramnogalakturnon I, ramnogalakturnon II, ksylogalakturnon, arabinan, arabinogalakturnon I i arabinogalakturnon II [5, 19]. W cząsteczce substancji pektynowej układają się one naprzemiennie, formując w ten sposób obszary składające się z łańcuchów rozgałęzionych, heterogenicznych (ang. *hairy region*), które tworzą różne polisacharydy strukturalne i liniowych, homogenicznych (ang. *smooth region*) zbudowanych z połączonych ze sobą monomerów kwasu D-galakturnowego [5, 20, 21].

2.1. HOMOGALAKTURNON

Homogalakturnon (HG) jest dominującym rodzajem polisacharydu tworzącego strukturę cząsteczki pektyn występujących w ścianach komórkowych roślin. Stanowi ok. 60–65% udziału wszystkich zawartych w tkankach roślinnych substancji strukturalnych pektyn. Średnia masa molowa HG jest niezbyt duża i w zależności od źródła surowcowego może wynosić 16000–43000 [22, 23]. Cząsteczkę homogalakturnonu tworzy liniowy łańcuch polimerowy składający się z ok. 70–100 monomerów kwasu D-galakturnowego połączonych wiązaniami α -1 \rightarrow 4 glikozydowymi, według schematu: $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ (Rys. 1). Część grup karboksylowych znajdujących się przy szóstym atomie węgla w cząsteczce kwasu D-galakturnowego może być zestyfikowana metanolem, a stopień metylacji wynosi od 70 do 80%. Stopień metylacji grup karboksylowych oraz ich rozmieszcze-

1 Iloraz masy frakcji pektynowej do masy surowca, w którym frakcja pektynowa znajduje się.

nie w łańcuchu polimeru wpływa na właściwości fizyczne pektyn, przede wszystkim na ich zdolność do żelowania [5, 24, 25].



Rysunek 1. Fragment cząsteczki homogalakturnanu z wolnymi i metylowanymi grupami karboksylowymi [24, 25, 28]

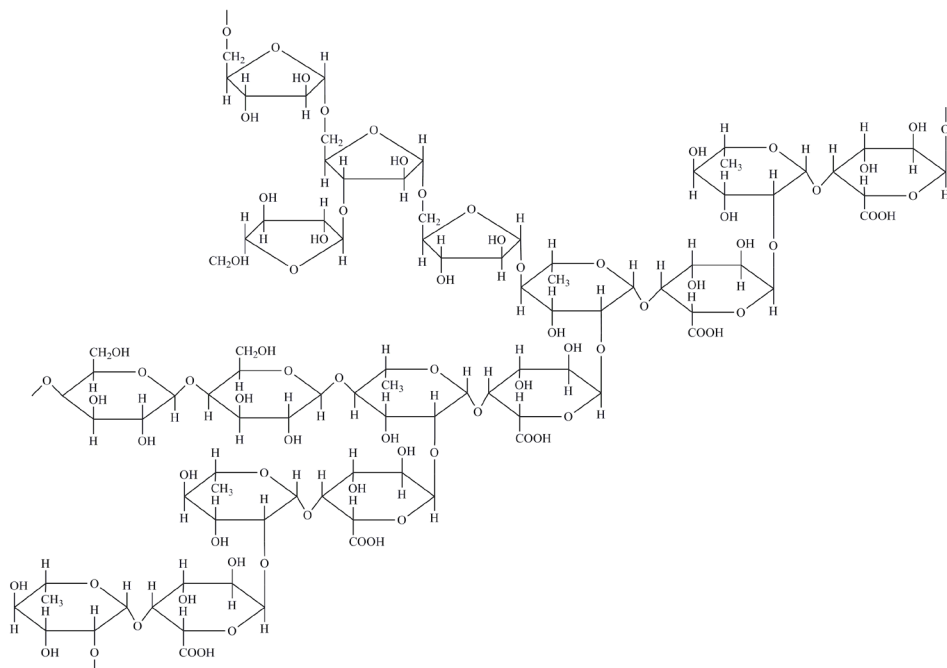
Figure 1. Partial structure of homogalacturonan with carboxyl and methylated carboxyl groups

Fragmenty łańcucha HG składające się z 7 do 20 niezestryfikowanych części kwasu D-galakturnowego wykazują zwiększoną zdolność do przyłączania jonów Ca^{2+} [26]. Ponadto homogalakturnan może być również częściowo O-acetylowany przy trzecim lub drugim atomie węgla [5, 19, 24, 25]. W znacznych ilościach acetylowane fragmenty łańcucha HG występują w korzeniach buraków cukrowych oraz w bulwach ziemniaków [26]. Homogalakturnan jest rozpuszczalny w wodzie oraz w środowisku alkalicznym, natomiast w środowisku lekko kwaśnym HG jest trudno rozpuszczalny [27]. Znaczne ilości HG znajdują się w ścianach pierwotnych i przestrzeniach międzykomórkowych ziemniaków oraz korzeniach buraków cukrowych. W ścianach komórkowych liści rzodkiewnika pospolitego znajduje się ok. 23% homogalakturnanu, w owocach pomidorów ok. 35%, a w owocach mango ok. 52% [26, 28].

2.2. RAMNOGALAKTURONAN I

Ramnogalakturnan I (RG I) jest rozgałęzionym polimerem, który stanowi od 20 do 35% struktury substancji pektynowych zawartych w tkankach roślinnych [4]. Średnia masa molowa RG I wynosi 200 000 [29]. Ramnogalakturnan I zbudowany jest z naprzemiennie połączonych co najmniej 100 reszt kwasu D-galakturnowego i L-ramnozy $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow)]_n$, w którym zazwyczaj reszty kwasowe nie mają dodatkowych łańcuchów bocznych zbudowanych z mono- lub disacharydów. Z kolei do fragmentów ramnozowych przy czwartym atomie węgla może być przyłączonych ok. 50 jednostek oligosacharydowych (np. reszt D-galaktozy, L-arabinozy i ich pochodnych). W zależności od źródła roślinnego i zastosowanej metody izolacji pektyn stopień rozgałęzionych reszt ramnozowych wynosi od 20 do 80% [5, 19, 26, 30]. W łańcuchu bocznym ramnozy występują liniowe lub rozgałęzione reszty $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranozylowe i/lub $\beta\text{-D}$ -galaktopiranozylowe (Rys. 2). Umieszczenie w łańcuchu oraz ich proporcje zależą od źródła roślinnego. Reszty $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranozylowe połączone w sposób $1\rightarrow 5$ tworzą łańcuch boczny, w którym przyłączone są reszty $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranozylowe przy drugim lub trzecim atomie węgla w ilości od 1 do 3. Galaktozylowe reszty połączone są w sposób $1\rightarrow 4$.

W łańcuchu bocznym RG I znajdują się również reszty kwasu ferulowego i kumarowego oraz reszty α -L-fukozyłowe, β -D-glukuronozyłowe i 4-O-metylowe reszty β -D-glukuronozyłowe [19].



Rysunek 2. Fragment cząsteczki ramnogalakturonanu I z arabinozowymi i galaktozowymi łańcuchami bocznymi [4, 43]

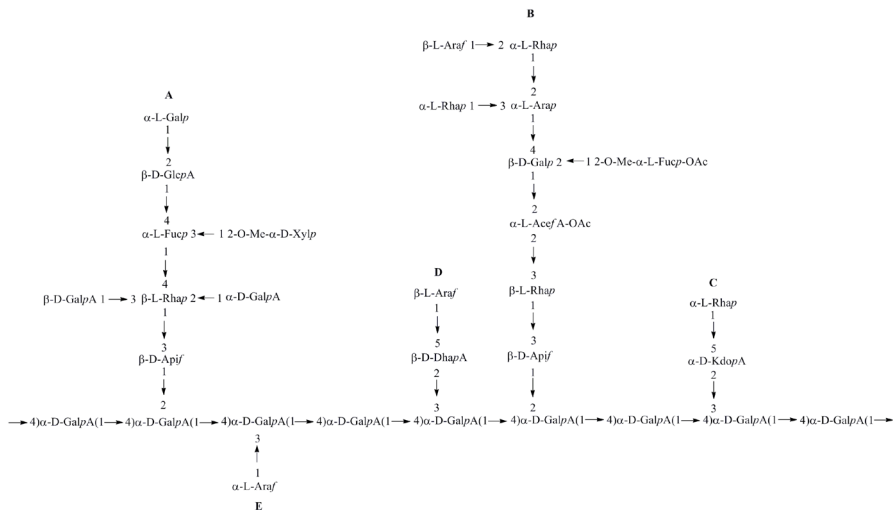
Figure 2. Partial structure of rhamnogalacturonan type I with arabinosyl and galactosyl side chains

W resztach kwasu D-galakturonowego przy atomie węgla drugim i/lub trzecim mogą występować grupy acetylowe [19]. W cząsteczkach ramnogalakturonanu I zawartych w skórkach cytrusów, liścienia czerwonej fasoli kidney, jabłkach oraz fasoli mung stwierdzono również obecność grup karboksylowych zestryfikowanych metanolem [10].

2.3. RAMNOGALAKTURONAN II

Ramnogalakturonan II (RG II) jest polisacharydem charakteryzującym się rozgałęzioną budową. RG II występuje w roślinnych ścianach komórkowych, stanowiąc do 10% substancji pektynowych. RG II charakteryzuje się małą średnią masą molową wynoszącą 5000–13000 [31, 32]. Zbudowany jest z 12 różnych reszt glikozylowych połączonych co najmniej 20 odmiennymi wiązaniami. Szkielet RG II składa się z łańcucha głównego zbudowanego z 8 do 15 reszt kwasu D-galakturono-

wego, częściowo zestryfikowanego metanolem oraz czterech łańcuchów bocznych (A, B, C, D) (Rys. 3).



Rysunek 3. Fragment cząsteczki ramnogalakturonanu II [4, 5, 31-33, 36]

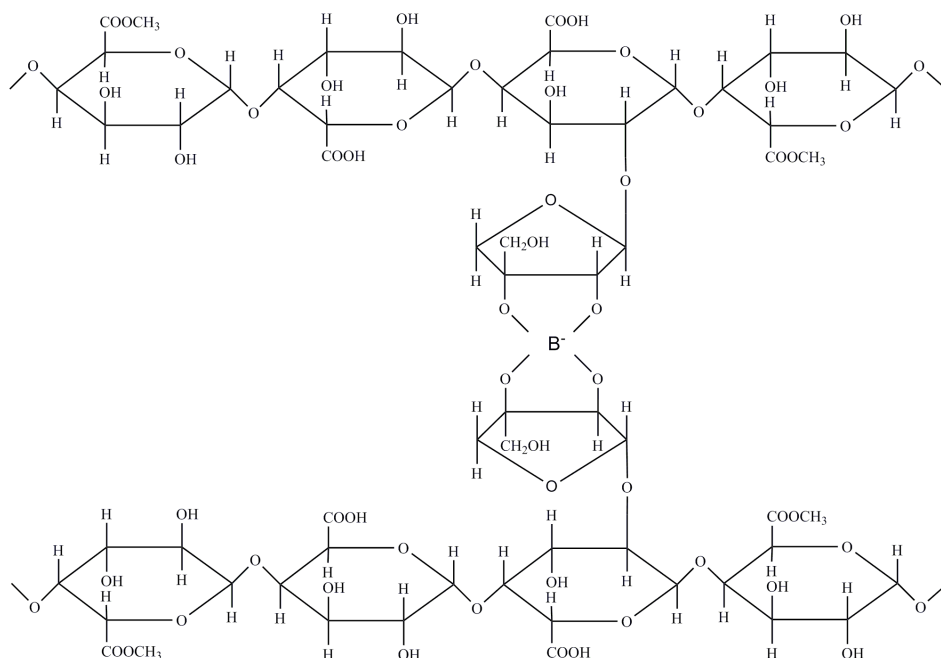
Galp – galaktopiranoza, GlcpA – kwas glukuronowy, Fucp – fukopiranoza, 2-O-Me-Xylp – 2-O-metylo-ksylopiranoza, GalpA – kwas galakturonowy, Rhap – ramnopiranoza, Araf – arabinofuranaza, DhapA – kwas 2-okso-3-deoksy-heptulozarowy, Arap – arabinopiranoza, AcefA – 3-C-karboksy-5-deoksy-L-ksyloza, Apif – 3-C-hydroksymetylo-β-D-erytroza, KdopA – kwas 2-okso-3-deoksy-D-manno-oktulozowy

Figure 3. Partial structure of rhamnogalacturonan type II

Wśród reszt glikozylowych tworzących łańcuchy boczne wyróżnia się fragmenty pochodzące m.in. od L-ramnozy, L-arabinozy, D-galaktozy i kwasu D-glukuronowego. Obecne są również fragmenty 2-O-metylo-L-fukozy (2-O-Me-Fucp), 2-O-metylo-D-ksylozy (2-O-Me-Xylp), 3-C-karboksy-5-deoksy-L-ksylozy (Acef), kwasu 2-okso-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (KdopA), 3-C-hydroksymetylo-β-D-erytrozy (Apif) oraz kwasu 2-okso-3-deoksy-heptulozarowego (DhapA)[26, 33–35], które wykrywane są rzadko w tkankach roślinnych jako samodzielne substancje i uważane za charakterystyczne dla cząsteczki RG II [34]. Łańcuch boczny A zbudowany jest z 2-O-metylo-D-ksylozy i oktasacharydów, B z 3-C-karboksy-5-deoksy-L-ksylozy, 2-O-metylo-L-fukozy i nonasacharydów, C z kwasu 2-okso-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego i disacharydów, natomiast łańcuch D z kwasu 2-okso-3-deoksy-heptulozarowego i disacharydów. Pozycja łańcuchów bocznych w szkielecie RG II nie jest do końca zbadana, jednak istnieją prace, w którym opisano częściowo możliwe rozmieszczenie. Stwierdzono, że w położeniu O-2 i O-3 w piątej i szóstej reszcie kwasu D-galakturonowego (od końca redukującego) może być przyłączony odpowiednio: łańcuch B i D, przy czym łańcuch C może być zlokalizowany przy trzecim lub czwartym, natomiast łańcuch A przy dziewiątym monomerze kwasu D-galakturonowego [34, 36]. W cząsteczce 3-C-karboksy-5-deoksy-L-

-kxylozy w pozycji O-3 oraz w cząsteczce 2-O-metylo-fukozy w pozycji O-3 lub O-4 mogą występować grupy acetylowe. W cząsteczce RG II występuje także pojedyncza reszta α -L-arabinofuranozy, która określa się tzw. piątym łańcuchem bocznym E. Przyłączona ona jest do siódmej lub ósmej reszty kwasu D-galakturonowego (licząc od końca redukującego) w położeniu O-3 [34].

Ramnogalakturonan II występuje w ścianach komórkowych jako dimer, który jest połączony za pomocą wiązań kowalencyjnych diestrami kwasu borowego pomiędzy resztami apiozy w łańcuchach bocznych A dwóch monomerów RG II (Rys. 4) [37]. Wytworzona w ten sposób siatka może wpływać na wielkość porów pierwotnych ścian komórkowych oraz na fizyczne właściwości tkanek roślinnych. Dimer RG II obecny jest przede wszystkim w tkankach owoców, a także w produktach ich przetworzenia np. w winie. Dimer boranowy RG II wykazuje zdolność do tworzenia kompleksów z kationami dwuwartościowymi (Pb^{2+} , Ba^{2+} i Sr^{2+}) oraz trójwartościowymi (La^{3+}) [36].



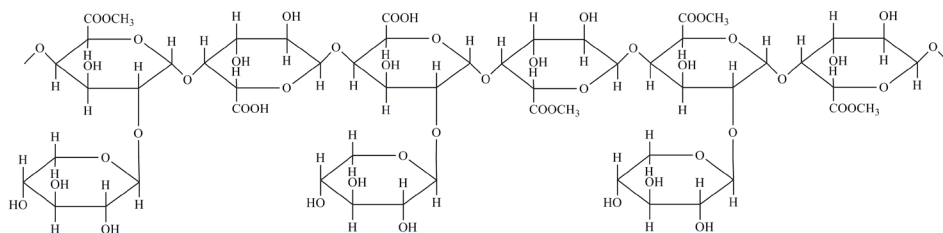
Rysunek 4. Fragment cząsteczki dimeru boranowego ramnogalakturonanu II [5, 37]

Figure 4. Partial structure of rhamnogalacturonan type II-borate dimer

RG II po raz pierwszy został wyizolowany za pomocą enzymu endopoligalakturonazy z wyhodowanych w zawiesinie tkanek jawora [4, 35, 38, 39]. Obecność RG II stwierdzono również w ryżu, cebuli, owocach kiwi, rzodkiewce, czosnku, wystodkach buraczanych, czerwonym winie, marchwi, jabłkach oraz pomidorach [38, 39].

2.4. KSYLOGALAKTURONAN

Ksylogalakturnan jest rozgałęzionym polimerem o średniej masie molowej wynoszącej 20000–30000. Łańcuch główny ksylogalakturnanu zbudowany jest z reszt kwasu D-galakturnowego połączonych wiązaniami α -1 \rightarrow 4 glikozydowymi, które najczęściej w położeniu C-3 podstawione są monomerami β -D-ksylozy (Rys. 5). Stopień przyłączenia podstawników ksylozylowych do kwasu D-galakturnowego w łańcuchu polimerowym zależy od źródła roślinnego i może wynosić od 20 do 100% [5, 10, 25]. Ksylogalakturnan może również zawierać metylowane grupy karboksylowe w resztach kwasu D-galakturnowego w ilości od 40 do 90% [10]. Reszty ksylozylowe mogą być przyłączone do kwasu D-galakturnowego wiązaniami 1 \rightarrow 4-glikozydowymi (w jabłkach), 1 \rightarrow 2- glikozydowymi (w soi) oraz 1 \rightarrow 2- i 1 \rightarrow 3-glikozydowymi (w grochu) [25].



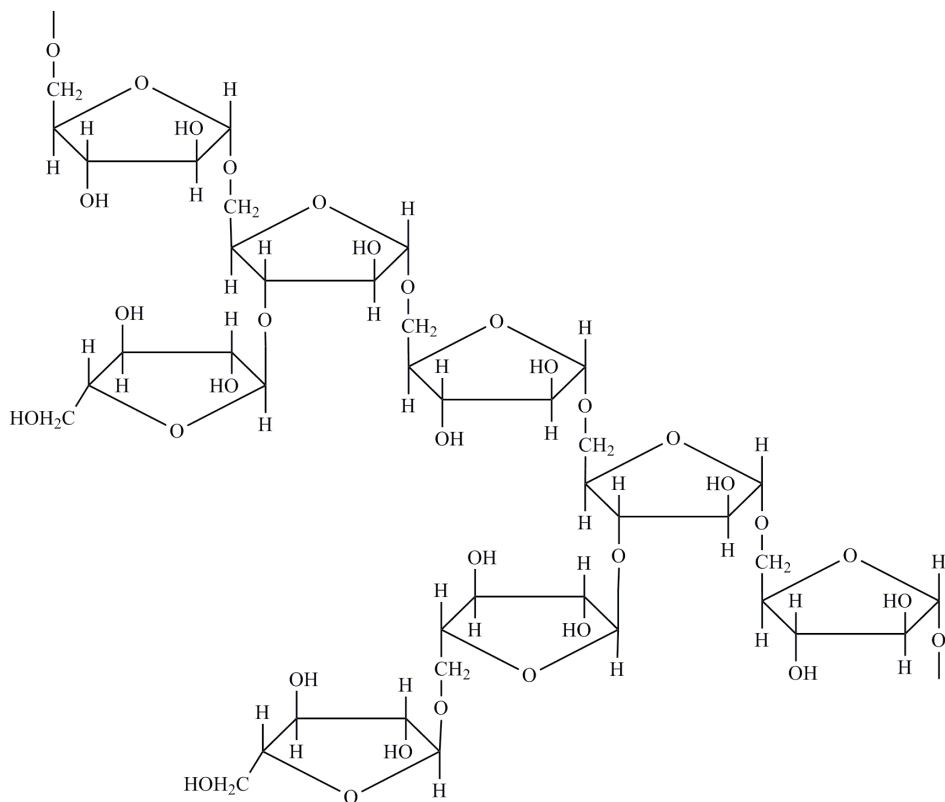
Rysunek 5. Fragment cząsteczki ksylogalakturnanu [25]

Figure 5. Partial structure of xylogalacturonan

Obecność ksylogalakturnanu stwierdzono w ścianach komórkowych arbuźów, jabłek, soi, grochu, cebuli, ziemniaków, pyłku sosny, nasionach bawełny oraz w łodygach i liściach rzodkiewnika pospolitego [40].

2.5. ARABINAN

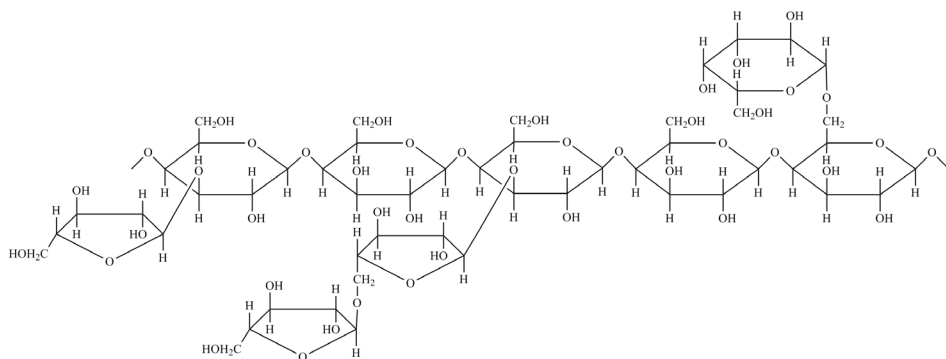
Średnia masa molowa arabinanu może wynosić do 10 000. Łańcuch główny arabinanu zbudowany jest z reszt α -L-arabinofuranozy, połączonych ze sobą wiązaniami 1 \rightarrow 5-glikozydowymi. Zawiera zazwyczaj pojedyncze reszty α -L-arabinofuranozy związane glikozydowo w sposób 1 \rightarrow 2 lub 1 \rightarrow 3 oraz podwójne reszty α -L-arabinofuranozy przyłączone wiązaniami 1 \rightarrow 3-glikozydowymi (Rys. 6) [5]. Znaczne ilości arabinanu, ok. 21% znajdują się w wysłódkach buraczanych [25, 41].



Rysunek 6. Fragment cząsteczki arabinanu [25]
 Figure 6. Partial structure of arabinan

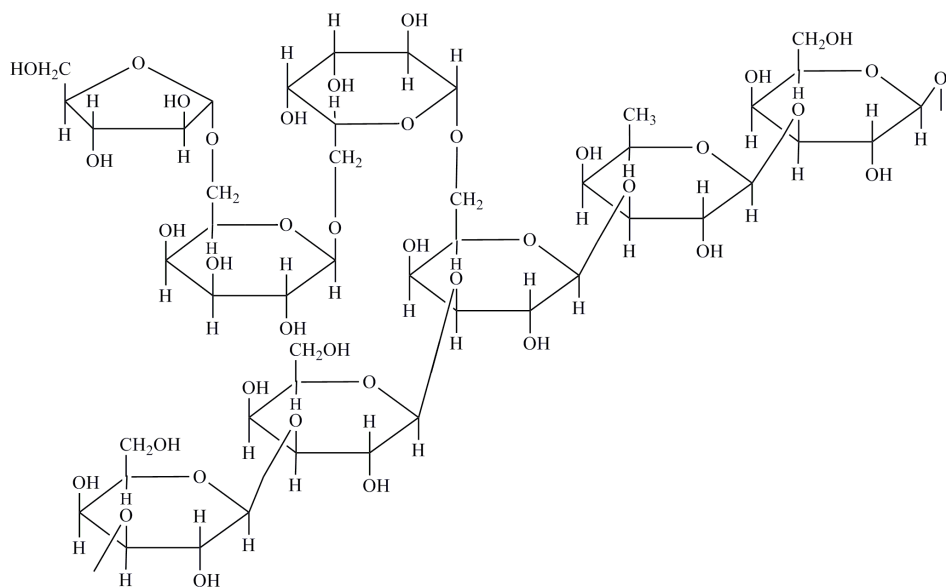
2.6. ARABINOGALAKTANY

Arabinogalaktany są polisacharydami o długich i mocno rozgałęzionych łańcuchach. Charakteryzują się średnią masą molową wynoszącą 10000–120000. Pod względem budowy chemicznej arabinogalaktany dzieli się na typ I i II. Szkielet arabinogalaktanu I (AG I) zbudowany jest z reszt β -D-galaktopiranozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Do łańcucha głównego w położeniu C-3 lub C-6 przyłączone są krótkie łańcuchy boczne (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinofuranozylowe. W pozycji C-6 reszty β -D-galaktopiranozowej stwierdzono również obecność β -D-galaktazy (Rys. 7). Przy końcu nieredukującym łańcuch AG I może być zakończony α -L-arabinopiranozą [5, 42–44].



Rysunek 7. Fragment cząsteczki arabinogalaktanu I [5, 25, 43]

Figure 7. Partial structure of arabinogalactan type I



Rysunek 8. Fragment cząsteczki arabinogalaktanu II [5, 43]

Figure 8. Partial structure of arabinogalactan type II

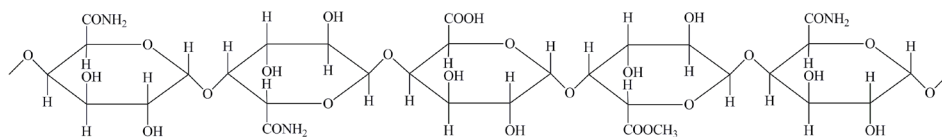
Arabinogalaktan II (AG II) zbudowany jest z reszt β -D-galaktopiranozy połączonych wiązaniami 1,3-glikozydowymi. Do łańcucha głównego przyłączone są w położeniu 1 \rightarrow 6 krótkie łańcuchy boczne składające się z reszt (1 \rightarrow 6) β -D-galaktozyliowych, które często zakończone są resztą α -L-arabinofuralozyliową: α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)] $_n$, gdzie $n = 1, 2, 3$ (Rys. 8). W mniejszym stopniu przy nieredukującym końcu łańcucha bocznego AG II występuje reszta β -L-arabinopiranozyliowa [5, 25, 44].

Arabinogalaktan II najczęściej wchodzi w skład białek arabinogalaktanowych bogatych w aminokwasy: prolinę, alaninę, serynę i treoninę. Związki te obecne są w różnych częściach roślin: korzeniach, liściach, łodygach, kwiatach i nasionach [5, 45].

3. RODZAJE PEKTYN

Pektyny klasyfikuje się ze względu na stopień zestyfikowania zawartych w nich grup karboksylowych, określający udział zestyfikowanych jednostek kwasu galakturonowego w stosunku do ogólnej liczby reszt tego kwasu. Stopień metylacji decyduje o właściwościach pektyn i mechanizmie żelowania. Według tego kryterium wyróżnia się pektyny wysokoestyfikowane – WE oraz niskoestyfikowane – NE. Pektyny WE, o stopniu metylacji wynoszącym $\geq 50\%$ i zawartości powyżej 8% grup metoksylowych, zlokalizowane są w całej powierzchni ścian komórkowych roślin. Komercyjnie pozyskiwane pektyny WE mają najczęściej stopień estyfikacji wynoszący 60–75%. Pektyny NE, o stopniu estyfikacji wynoszącej $< 50\%$ i zawartości grup metoksylowych $\leq 7\%$, występują w blaszkach środkowych, w rogach ścian komórkowych oraz w tkankach wokół przestrzeni powietrznych. Stosowane w produktach pektyny NE charakteryzują się stopniem estyfikacji wynoszącym 20–40% [8].

Pektyny WE występują w roślinach znacznie częściej, dlatego do celów przemysłowych pektyny NE pozyskuje się poprzez kontrolowaną deestyfikację grup karboksylowych pektyn WE. Przeprowadza się ją w środowisku zasadowym lub kwasowym. W przypadku zastosowania do deestyfikacji amoniaku, w odpowiednich warunkach reakcji, otrzymać można specyficzny rodzaj pektyn NE tzw. pektyny amidowane (Rys. 9), w których poszczególne grupy estrowe w łańcuchu pektynowym uległy amonolizie i zostały przekształcone w amidy [46]. Inną metodą otrzymywania amidowanych pektyn NE jest wykorzystanie różnych rodzajów amin w reakcji aminolizy [47].



Rysunek 9. Fragment cząsteczki niskoestyfikowanej pektyny amidowanej [57]

Figure 9. Partial structure of amidated low ester pectin

4. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE PEKTYN I MECHANIZM ŻELOWANIA

Pektyny są dostępne jako produkt handlowy w postaci białego, beżowego lub jasnobrązowego proszku. W smaku są lekko słodkawe, natomiast pozbawione są zapachu. Są dobrze rozpuszczalne w wodzie i nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych [3, 48]. Po dodaniu pektyn do wody następuje utworzenie z nich grudek poprzez szybkie uwodnienie. Grudki składają się z suchych skupisk pektyn otoczonych powłokami o wysokim stopniu uwodnienia. Późniejsze rozpuszczanie powstałych kompleksów jest znacznie utrudnione. Z tego powodu tworzy się mieszaniny pektyn z rozpuszczalnymi w wodzie substancjami transportującymi lub polepsza się ich zdolność do dyspersji [49]. W Tabeli 1 przedstawiono wymagania jakościowe i parametry fizykochemiczne pektyn jabłkowych wysokoestryfikowanych i niskoestryfikowanych amidowanych wytwarzanych w Zakładach Przemysłu Owocowo-Warzywnego „Pektowin” w Jaśle. Stopień estryfikacji jest bezpośrednio związany ze stopniem amidacji (im niższy stopień estryfikacji, tym wyższy stopień amidacji), co wynika ze sposobu otrzymywania pektyn NE. W przypadku pektyn WE temperatura żelowania (temperatura, w której rozpoczyna się proces tworzenia żelu) wzrasta wraz ze wzrostem ich stężenia, stopnia estryfikacji oraz z obniżaniem pH środowiska. W procesie żelowania pektyn NE temperatura żelowania jest wyższa również w niższym pH środowiska, w większym stężeniu ekstraktu i przy niższym stopniu estryfikacji [50–54].

Tabela 1. Wymagania jakościowe i parametry fizykochemiczne pektyn jabłkowych wysokoestryfikowanych (WE) i niskoestryfikowanych (NE) amidowanych

Table 1. Quality requirements and physicochemical parameters for apple high ester pectins (WE) and amidated low ester pectins (NE)

Wymagania	Rodzaj pektyn	
	WE	NE amidowane
Stopień estryfikacji [%]	58–71	28–40
Stopień amidacji [%]	–	12–23
Zawartość kwasu galakturonowego (w suchej masie) [%]	≤ 65	
Zdolność żelowania [°SAG] ¹⁾	150	100–120
Czas żelowania [min.]	8–15	–
Temperatura żelowania [°C]	< 60	–
pH 1%-owego roztworu	3,0	4,0
Stopień rozdrobnienia [mm]	< 0,5	
Ubytek masy po suszeniu [%]	≤ 12	
Zawartość popiołu [%]	≤ 1	
Wartość energetyczna w 100g pektyny [kcal (kJ)]	199 (806)	
Arsen [mg/kg]	≤ 3	
Ołów [mg/kg]	≤ 5	
Kadm [mg/kg]	≤ 1	

Wymagania	Rodzaj pektyn	
	WE	NE amidowane
Rtęć [mg/kg]	≤ 1	
Metale ciężkie [mg/kg]	≤ 20	
Bakterie tlenowe/1 g pektyny	≤ 1000	
Drożdże/1 g pektyny	≤ 50	
Pleśnie/1 g pektyny	≤ 50	
Bakterie grupy coli/1 g pektyny	Brak	
Bakterie Salmonella/25 g pektyny	Brak	

¹⁾ °SAG (ang. *Strain-induced alignment in a gel*) – jednostka miary zdolności żelowania wyrażająca masę węglowodanu przypadającą na jednostkę masy pektyn w galaretkie o standardowej sprężystości i składzie

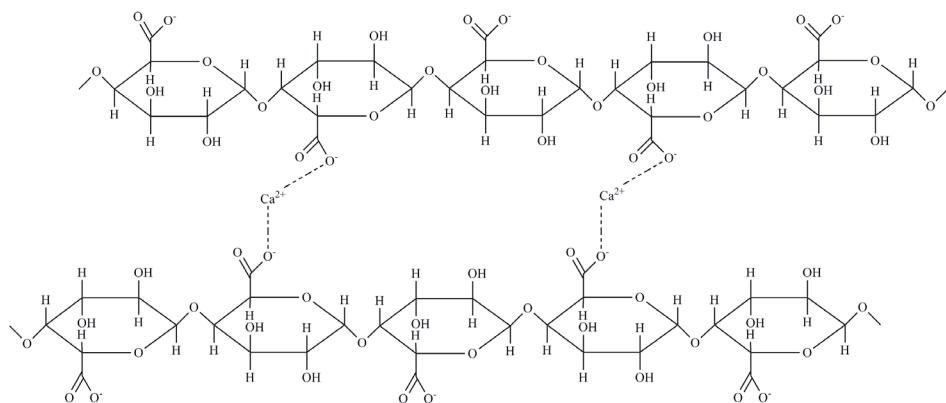
Ze względu na dostępność pektyn, dużą zawartość w surowcach roślinnych, możliwości i sposoby pozyskiwania, bezpieczeństwo stosowania oraz tworzenie różnorodnych żeli są one szczególnie cennym surowcem wykorzystywanym w różnych gałęziach przemysłu.

Proces żelowania polega na przejściu zolu (układu koloidalnego składającego się z fazy rozproszonej – cząsteczek ciała stałego i fazy rozpraszającej – cieczy) w żel. Przebieg żelowania jest uzależniony zarówno od rodzaju pektyn jak i zastosowanych parametrów procesowych. Wpływ na żelowanie mają różne czynniki, m.in.: środowisko pH, stężenie jonów metali, temperatura i długość łańcuchów polimerowych [56, 57].

Pektyny wysokoestryfikowane ulegają żelowaniu w podwyższonej temperaturze, gdy ich stężenie wynosi 0,3–2,0%, przy pH = 2,0–3,5, w obecności co najmniej 55% sacharydów, najczęściej sacharozy i fruktozy [18]. Cząsteczki wody skupiają się wokół cząsteczek sacharydów, co sprzyja zachodzeniu reakcji pomiędzy dwoma łańcuchami pektynowymi i tworzenie się wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi. W środowisku kwasowym odpychanie elektrostatycznie między łańcuchami pektynowymi (o ujemnym ładunku elektrycznym) ulega zmniejszeniu w wyniku protonowania grup karboksylowych [58]. Tworzenie żeli przebiega głównie poprzez hydrofobowe oddziaływania między grupami metylowymi i tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy niezdisocjowanymi grupami karboksylowymi i grupami hydroksylowymi [46, 58]. Żele otrzymane z pektyn WE charakteryzują się dobrą elastycznością i miękkością. Nie ulegają synerezie (wydzielaniu układu rozpraszającego i kurczeniu się żelu) i nie wykazują zdolności do powtórnego utworzenia żelu po obróbce termicznej (są nieodwracalne termicznie) [59].

Optymalną zdolność żelowania pektyny NE uzyskuje się w temperaturze pokojowej, przy pH = 2,0–6,0 i w obecności dwuwartościowych jonów metali, szczególnie jonów Ca²⁺ w ilości 0,01–0,1%. Do przebiegu reakcji nie jest wymagany dodatek sacharydów. W niektórych przypadkach dodaje się je w ilości 10–20% w celu uzyskania bardziej elastycznego żelu. Żelowanie pektyn NE polega na wytworzeniu wiązań jonowych pomiędzy grupami karboksylowymi w łańcuchach pektynowych a jonami wapnia. Łańcuchy homogalakturonanów są stosunkowo sztywne. Powią-

zanie dwóch łańcuchów pektynowych za pomocą pierwszego jonu Ca^{2+} ustawia je w pozycji naprzeciwko siebie, przez co wiązanie kolejnych jonów metali jest ułatwione. W ten sposób uzyskuje się produkt wykazujący odwracalność termiczną; po podgrzaniu, roztopieniu i ponownym ochłodzeniu pektyny NE są zdolne do powtórnego utworzenia żelu [46, 58–60]. Model (ang. „egg-box” model) przebiegu żelowania pektyn NE przedstawiono na Rysunku 10.



Rysunek 10. Mechanizm żelowania pektyn niskoestryfikowanych w obecności jonów Ca^{2+} [5, 28]
 Figure 10. Mechanism of gel formation by low ester pectins in the presence of calcium ions

Pektyny NE amidowane tworzą żele w obecności niewielkich ilości sacharydów (do ok. 15%) oraz jonów Ca^{2+} . Wykazują mniejszą wrażliwość na warunki pH i nadmiar jonów metali (nie ulegają strącaniu). Obecność grup amidowych w cząsteczkach pektyn wpływa na ich właściwości m.in. na zwiększenie elastyczności [61].

Im więcej w łańcuchu pektynowym występuje wolnych grup karboksylowych, tym większa jest możliwość utworzenia mostków wapniowych (również przy odpowiednim stężeniu jonów Ca^{2+}). Obecność połączeń z jonami wapniowymi wpływa na szybkość i stopień pęcznienia produktów zawierających pektyny. Pęcznienie zachodzi pod wpływem rozpuszczalnika, np. wody, który w wyniku dyfuzji przechodzi do cząsteczek pektyn, przy czym nadmierna ilość mostków wapniowych ogranicza stopień pęcznienia.

PODSUMOWANIE

Dokonano przeglądu literatury w zakresie rodzajów, właściwości fizykochemicznych i budowy chemicznej pektyn. Pochodzenie surowca determinuje skład chemiczny pektyn, zawierających złożone układy polisacharydów: homogalakturanu, ramnogalakturanu I i II, ksylogalakturanu, arabinanu i arabinogalaktanu I i II. Atrakcyjne właściwości użytkowe pektyn przyczyniają się do wzrostu zainteresowania nimi, liczby prac eksperymentalnych i przeglądowych poświęconym tym

związkom. Metody pozyskiwania pektyn z surowców roślinnych oraz możliwości ich zastosowania zostaną zaprezentowane w kolejnej pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S. Yeoh, J. Shi, T.A.G. Langrish, *Desalination*, 2008, **218**, 229.
- [2] G. Mesbahi, J. Jamalain, A. Farahnaky, *Food Hydrocolloid.*, 2005, **19**, 731.
- [3] P. Srivastava, R. Malviya, *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 2011, **2**, 10.
- [4] D. Mohnen, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, **11**, 266.
- [5] A.G.J. Voragen, G.-J. Coenen, R.P. Vorhoef, H.A. Schols, *Struct. Chem.*, 2009, **20**, 263.
- [6] K. Nowak, K. Mitka, *Przem. i Owoc.-Warz.*, 2004, **7-8**, 69.
- [7] W.G.T. Willats, J.P. Knox, J.D. Mikkelsen, *Trends Food Sci. Tech.*, 2006, **17**, 97.
- [8] B.M. Yapo, C. Robert, I. Etienne, B. Wathelet, M. Paquot, *Food Chem.*, 2007, **100**, 1356.
- [9] M.H. Canteri-Schemin, *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 2005, **48**, 259.
- [10] B.M. Yapo, *Carbohydr. Polym.*, 2011, **86**, 373.
- [11] U. Kalapathy, A. Proctor, *Food Chem.*, 2001, **73**, 393.
- [12] M.A. Monsoor, *Carbohydr. Polym.*, 2005, **61**, 362.
- [13] J. Mohammadzadeh, A.R. Sadeghi-Mahoonak, M. Yaghbani, M. Aalami, *World Appl. Sci. J.*, 2010, **8**, 21.
- [14] Z.U. Rehman, A.M. Salariya, F. Habib, W.H. Shah, *J. Chem. Soc. Pakistan*, 2004, **26**, 73.
- [15] P. Yujaeroen, U. Supjaroenkul, S. Rungrodnimitchai, *Thammasat Int. J. Sc. and Tech.*, 2008, **13**, 44.
- [16] M.L. Fishman, H.K. Chau, P.D. Hoagland, A.T. Hotchkiss, *Food Hydrocolloid.*, 2006, **20**, 1170.
- [17] S. Baissise, H. Ghannem, D. Fahloul, A. Lekbir, *World J. Dairy & Food Sci.*, 2010, **5**, 79.
- [18] V. Urias-Orona, A. Rascón-Chu, J. Lizardi-Mendoza, E. Carvajal-Millán, A.A. Gardea, B. Ramírez-Wong, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, **11**, 3686.
- [19] B.L. Ridley, M.A. O'Neill, D. Mohnen, *Phytochemistry*, 2001, **57**, 929.
- [20] B.B. Koubala, L.I. Mbome, G. Kansci, F. Tchouanguép Mbiapo, M.-J. Crepeau, J.-F. Thibault, M.-C. Ralet, *Food Chem.*, 2008, **106**, 1202.
- [21] E. Kliemann, K.N. De Simas, E.R. Amante, E.S. Prudêncio, R.F. Teófilo, M.M.C. Ferreira, R.D.M.C. Amboni, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2009, **44**, 476.
- [22] E. Bonnin, E. Dolo, A. Le Goff, J.F. Thibault, *Carbohydr. Res.*, 2002, **18**, 1687.
- [23] G.A. Morris, M.-C. Ralet, E. Bonnin, J.-F. Thibault, S.E., Harding, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **82**, 1161.
- [24] P.J.H. Daas, B. Boxma, A.M.C.P. Hopman, A.G.J. Voragen, H.A. Schols, *Biopolymers*, 2001, **58**, 1.
- [25] D. Wong, *Protein J.*, 2008, **27**, 30.
- [26] W.G.T. Willats, L. McCartney, W. Mackie, J.P. Knox, *Plant Mol. Biol.*, 2001, **47**, 9.
- [27] S.C. Fry, *Annual Plant Reviews*, 2011, **41**, 1.
- [28] K.H. Caffall, D. Mohnen, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1879.
- [29] M. McNeil, A.G. Darvill, P. Albersheim, *Plant Physiol.*, 1980, **66**, 1128.
- [30] M. Pauly, H.V. Scheller, *Planta*, 2000, **210**, 659.
- [31] G.R. Strasser, R. Amadó, *Carbohydr. Polym.*, 2002, **48**, 263.
- [32] S. Pérez, M.A. Rodríguez-Carvajal, T. Doco, *Biochimie*, 2003, **85**, 109.
- [33] M. Séveno, A. Voxeur, C. Rihouey, A.-M. Wu, T. Ishii, C. Chevalier, M.C. Ralet, A. Driouich, A. Marchant, P. Lerouge, *Planta*, 2009, **230**, 947.
- [34] B.M. Yapo, *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 2011 (B), **2011**, 1.
- [35] H. Hilz, P. Williams, T. Doco, H.A. Schols, A.G.J. Voragen, *Carbohydr. Polym.*, 2006, **65**, 521.

- [36] S. Vidal, T. Doco, P. Williams, P. Pellerin, W.S. York, M.A. O'Neill, J. Glushka, A.G. Darvill, P. Albersheim, *Carbohyd. Res.*, 2000, **326**, 277.
- [37] T. Matoh, *Plant Soil*, 1997, **193**, 59.
- [38] I.L. Novosel'skaya, N.L. Voropaeva, L.N. Semenova, S.S. Rashidova, *Chem. Nat. Compd.*, 2000, **36**, 1.
- [39] T. Doco, P. Williams, S. Vidal, P. Pellerin, *Carbohyd. Res.*, 1997, **297**, 181.
- [40] J. Zandleven, S.O. Sørensen, J. Harholt, G. Beldman, H.A. Schols, H.V. Scheller, A.J. Voragen, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 1219.
- [41] A. Oosterveld, G. Beldman, H.A. Schols, A.G.J. Voragen, *Carbohyd. Res.*, 1996, **288**, 143.
- [42] G.S. Kelly, *Altern. Med. Rev.*, 1999, **4**, 96.
- [43] B.S. Paulsen, *Phytochem. Rev.*, 2002, **1**, 379.
- [44] W.A. Hinz, R. Verhoef, H.A. Schols, J.-P. Vincken, A.G.J. Voragen, *Carbohyd. Res.*, 2005, **340**, 2135.
- [45] J. Letarte, E. Simion, M. Miner, K.J. Kasha, *Plant Cell Rep.*, 2006, **24**, 691.
- [46] A.C.K. Sato, P.R. Oliveira, R.L. Cunha, *Food Biophys.*, 2008, **3**, 100.
- [47] R.M. Uresti, N. López-Arias, J.A. Ramírez, M. Vázquez, *Food Technol. Biotech.*, 2003, **41**, 131.
- [48] X.Q. Shi, K.C. Chang, J.G. Schwarz, D. Wiesenborn, *Carbohyd. Polym.*, 1995, **27**, 171.
- [49] P. Sriamornsak, *Silpakorn University International Journal*, 2003, **3**, 206.
- [50] *Norma zakładowa Pektowin*, ZN-01/2005, www.pektowin.pl, [dostęp 02.2013].
- [51] *Norma zakładowa Pektowin*, ZN-02/2005, www.pektowin.pl, [dostęp 02.2013].
- [52] *Specyfikacja produktu. Pektyna jabłkowa*, www.pektowin.pl, [dostęp 02.2013].
- [53] *Specyfikacja produktu. Pektyna jabłkowa amidowana*, www.pektowin.pl, [dostęp 02.2013].
- [54] A. Mroszczyk, *Agro Industry*, 2011, **2**, 53.
- [55] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010.
- [56] P.W. Atkins, *Podstawy chemii fizycznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [57] M. Marudova, N. Jilov, *J. Food Eng.*, 2003, **59**, 177.
- [58] A. Zykwińska, C. Gaillard, M.-H. Boiffaard, J.-F. Thibault, E. Bonnin, *Food Hydrocolloid.*, 2009, **23**, 2468.
- [59] B. Waszkiewicz-Robak, *Agro Przem.*, 2005, **4**, 25.
- [60] J.C. Cabrera, A. Boland, J. Messiaen, P. Cambier, P. Van Cutsem, *Glycobiology*, 2008, **18**, 473.
- [61] F. Capel, T.N. Nicolai, D. Durand, P. Boulenger, V. Langendorff, *Food Hydrocolloid.* 2006, **20**, 901.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 kwietnia 2014

**ESTRY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH GLICYDOLU
ORAZ ESTRY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH
MONO-3-CHLOROPROPAN-1,2-DIOLU
– NOWE ZANIECZYSZCZENIA W OLEJACH
JADALNYCH**

GLYCIDYL FATTY ACID ESTERS AND
MONO-3-CHLOROPROPANE-1,2-DIOL FATTY ACID
ESTERS – NEW CONTAMINATION IN EDIBLE OILS

Magda Aniołowska*, Agnieszka Kita

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa
ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630, Wrocław
e-mail: magda.aniolowska@wnoz.up.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Mechanizm powstawania GE i estrów 3-MCPD w olejach jadalnych
2. Toksyczność GE i estrów 3-MCPD
3. Występowanie GE i estrów 3-MCPD w żywności
4. Ograniczenie powstawania GE i estrów 3-MCPD w żywności
5. Sposoby oznaczania zawartości GE i estrów 3-MCPD w żywności

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane





Mgr inż. Magda Aniołowska w roku 2011 ukończyła biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Obecnie jest doktorantką w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowywania Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu na kierunku technologia żywności i żywienia. Prowadzi badania nad wpływem parametrów technologicznych smażenia na zawartość estrów glicydylowych w olejach i smażonych produktach.



Dr hab. inż. Agnieszka Kita w roku 1995 ukończyła studia na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk rolniczych (1999) oraz doktora habilitowanego w zakresie technologii żywności i żywienia (2006) uzyskała na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Obecnie pracuje w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowywania Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu na stanowisku profesora nadzwyczajnego. Specjalność – technologia żywności i żywienia.

ABSTRACT

The aim of the review was to characterize and describe the physicochemical properties and methods for the determination of two types of compounds: 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acids esters (3-MCPD esters) and glycidyl fatty acids esters (GE) - new contaminants of food products, including vegetable fats.

This paper describes their structure, several possible mechanisms of reactions occurring during the refining of edible oils, leading to an increase of their content in the final product. It is suggested that these compounds are formed from acylglycerols, under the influence of high temperature [9]. The emphasis was put on the toxicity of the products of their deesterification-free 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and glycidol. Glycidol is genotoxic and has an effect on gene mutations and unscheduled DNA synthesis [17]. 3-MCPD is defined by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) as a genotoxic carcinogen [6, 19]. There are three transformation tracks leading to increased levels of 3-MCPD in foods: from 3-MCPD esters, GE and glycidol [14, 15]. The content of 3-MCPD esters and GE in food products was characterized and different processes involving their synthesis were described. Ways of reduction in food products regarding the aspects of raw materials as well as technology were discussed. Among refined vegetable oils, the largest quantities of 3-MCPD esters and GE were found in palm, corn and coconut oils [6, 25]. Finally, the direct and indirect methods of their determination in oils were described. There are new publications reporting on successive improvements of the existing methods for determination of 3-MCPD and its mono- and di-esters, as well as GE in edible oils [42, 43].

Unfortunately, there is still no universal determination method, which would be simple, affordable and accessible for a wider group, such as food producers, that would improve consumer safety.

Keywords: 3-MCPD fatty acid esters, glycidyl fatty acids esters, edible oils

Słowa kluczowe: 3-MCPD estry kwasów tłuszczowych, glicydylowe estry kwasów tłuszczowych, oleje jadalne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2-MCPD	- 2-monochloropropan-1,3-diol
3-MCPD	- 3-monochloropropan-1,2-diol
APCI	- jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
DAG	- diacyloglicerol
GE	- estry glicydylowe kwasów tłuszczowych
GC-MS	- chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS	- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-TOFMS	- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu
LOQ	- granica oznaczalności
MAG	- monoacyloglicerol
SIM	- tryb monitorowania pojedynczych jonów
TAG	- triacyloglicerol
TDI	- tolerowane dzienne pobranie (ang. <i>Tolerable Daily Intake</i>)
WKT	- wolne kwasy tłuszczowe

WSTĘP

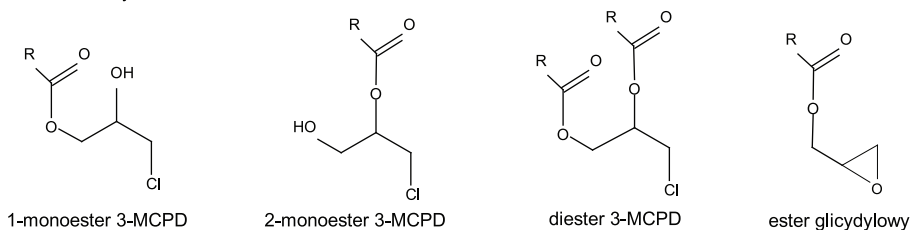
Procesy technologiczne, zwłaszcza obejmujące wysokotemperaturową obróbkę termiczną, mogą prowadzić do powstania w żywności niepożądanych związków chemicznych. W odniesieniu do tłuszczów i produktów uzyskiwanych z ich udziałem są to zarówno izomery *trans* kwasów tłuszczowych jak i liczne produkty degradacji tłuszczu powstające zwłaszcza podczas smażenia – między innymi akrylamid [1]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na nową grupę związków – estry kwasów tłuszczowych i 3-monochloropropan-1,2-diolu (3-MCPD) jak i towarzyszące im estry glicydylowe (GE), których obecność stwierdzono w różnego rodzaju tłuszczach rafinowanych oraz produktach uzyskanych z ich udziałem. W odpowiednich warunkach może dochodzić do ich deestryfikacji i uwolnienia wolnego 3-MCPD oraz glicydolu, które ze względu na właściwości toksyczne są związkami niepożądanymi w żywności.

1. MECHANIZM POWSTAWANIA GE I ESTRÓW 3-MCPD W OLEJACH JADALNYCH

Estry glicydylowe, traktowane jako prekursory estrów 3-MPCD, powstają podczas rafinacji – zwłaszcza w trakcie dezodoryzacji [2]. Dezodoryzacja (odwanianie) to ostatni etap procesu rafinacji mający na celu usunięcie z olejów substancji nadających nieprzyjemny smak i zapach, wolnych kwasów tłuszczowych (rafinacja fizyczna), a także wrażliwych na działanie ciepła barwników. Równocześnie usuwane są także związki pożądane takie jak sterole i tokoferole (w olejach roślinnych), co obniża wartość żywieniową tłuszczu. Najpopularniejszą metodą dezodoryzacji jest odwanianie destylacyjne (z przegrzaną parą wodną) podczas którego stosuje się temperatury od 200 do nawet 270°C [3].

GE różnią się pod względem strukturalnym, a także pod kątem możliwości przyłączania reszt kwasów tłuszczowych (Rys. 1). Mogą istnieć tylko jako monoestry, a ich różnorodność strukturalna związana jest z rodzajem reszt kwasów tłuszczowych połączonych z glicydołem [4, 5]. Natomiast estry 3-MCPD, to mieszanina diestrów oraz monoestrów, w której mogą występować różne reszty kwasów tłuszczowych. Monoestry zawierają jeden kwas tłuszczowy, natomiast diestry mogą składać się z dwóch różnych kwasów tłuszczowych. Preferencyjnie najwięcej tworzy się diestrów [6]. Przedmiotem badań większości badaczy stały się estry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zarówno nasyconych takich jak palmitynowy (C16:0) i stearynowy (C18:0) oraz nienasyconych, jak oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2) i linolenowy (C18:3). Do rzadkości należą prace, w których podjęto się analizy estrów innych kwasów tłuszczowych np. laurynowego (C12:0) i mirystynowego (C14:0) [7, 8].

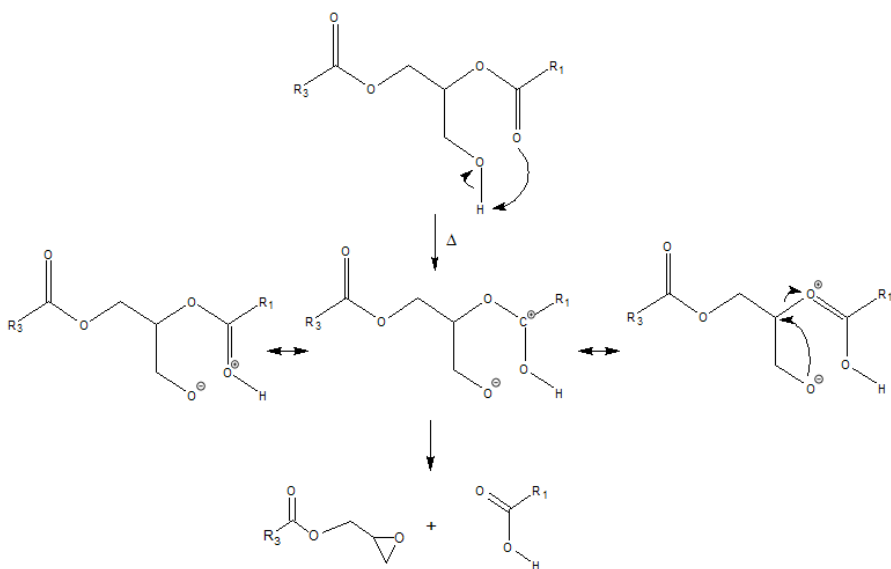
R - łańcuch alkilowy



Rysunek 1. Struktura GE i 3-MCPD [4]

Figure 1. Structure of GE and 3-MCPD [4]

Mechanizm powstawania GE nie jest dokładnie poznany. Sugeruje się, że związki te powstają z diacylogliceroli (DAG). Pod wpływem działania wysokich temperatur w DAG dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania, które w konsekwencji prowadzi do eliminacji jednej z reszt kwasów tłuszczowych. Eliminacja ta, może być zainicjowana przez przeniesienie protonu z grupy hydroksylowej na wycynalną grupę karboksylową (Rys. 2). Powstały acylooksoniowy jon pośredni może ulec dalszemu przekształceniu poprzez migrację ładunku, powodując uwolnienie kwasu tłuszczowego. Pierścień oksiranowy może być utworzony przez reakcję nukleofilowej grupy alkoksylowej. Teoretycznie, reakcja może zachodzić z udziałem zarówno 1,2 - jak i 1,3-DAG [9].

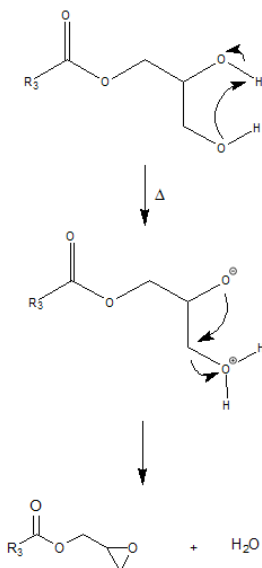


Rysunek 2. Proponowany mechanizm powstawania GE z diacyloglicerolu w wysokiej temperaturze [9]

Figure 2. The proposed mechanism of formation of GE from diacylglycerol at high temperature [9]

W olejach roślinnych, a szczególnie oleju palmowym, prócz DAG obecne są również w niewielkiej ilości monoacyloglicerole (MAG). Biorąc pod uwagę sto-

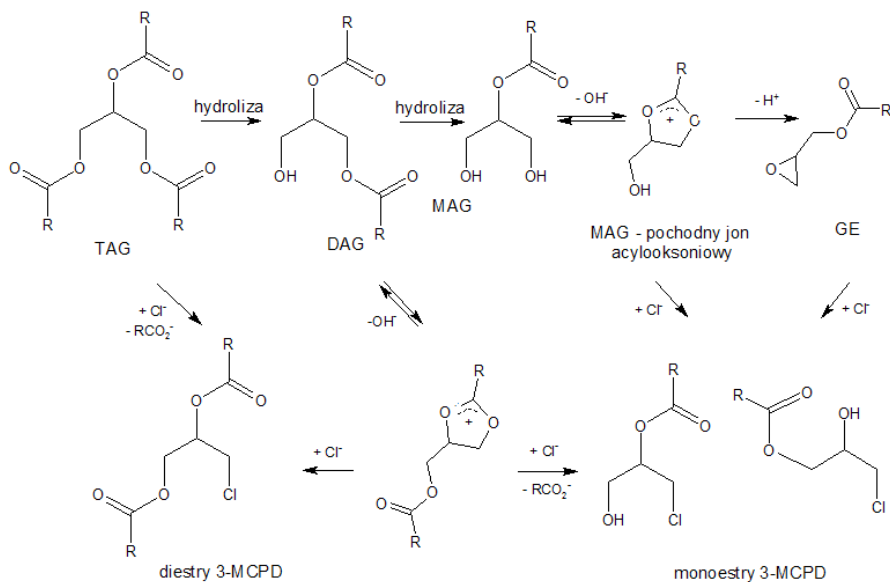
sunkowo duże ilości GE w rafinowanym oleju palmowym, zaproponowano, że GE mogą tworzyć się także z MAG w wyniku dehydratacji cieplnej diolu wicynalnego (Rys. 3). W odróżnieniu od DAG, reakcja ta jest możliwa jedynie z 1(3)-MAG, znanym również jako α -MAG. MAG może być również rozkładany do glicerolu i nasyconego kwasu tłuszczowego z udziałem lipazy MAG (E.C. 3.1.1.34). Jednak biorąc pod uwagę niski ciężar cząsteczkowy glicydotu prawdopodobnie zostaje on usunięty częściowo podczas dezodoryzacji w wyniku działania wysokiej próżni ok. 2 mbara [9].



Rysunek 3. Proponowany mechanizm powstawania GE z monocyloglicerolu w wysokiej temperaturze [9]
 Figure 3. The proposed mechanism of formation of GE from monoacylglycerol at high temperature [9]

Analizując mechanizm tworzenia estrów 3-MPCD w olejach podczas rafinacji stwierdzono, że we wcześniejszych etapach dochodzi do powstania GE, które następnie w obecności jonów chlorkowych mogą ulegać dalszym przekształceniom do estrów 3-MPCD [4]. Zaproponowano kilka możliwych mechanizmów ich powstawania (Rys. 4). W najpopularniejszym z nich założono, że etapem pośrednim jest powstanie jonu acylooksoniowego w wyniku eliminacji cząsteczki wody pochodzącej z MAG [5, 6, 10]. W reakcji tej jon pośredni przekształca się w kwasowym środowisku w cząsteczkę GE, po czym następuje otwarcie pierścienia epoksydowego glicydotu w obecności jonów chlorkowych, w wyniku czego mogą powstać estry 2-MPCD lub 3-MPCD [11]. Inną możliwością jest przegrupowanie wewnątrzcząsteczkowe DAG, z usunięciem grup hydroksylowych [5, 10]. W przypadku obecności jonów chlorkowych dalsza reakcja prowadzi do powstania monoestrów 3-MPCD. Kolejną rozpatrywaną możliwością w tym mechanizmie jest reakcja pochodzącego

z DAG pośredniego jonu acylooksoniowego z jonami chlorkowymi, prowadząca do powstania diestru 3-MCPD [5, 6].



Rysunek 4. Możliwe drogi powstawania GE i estrów 3-MCPD z acylogliceroli [6]

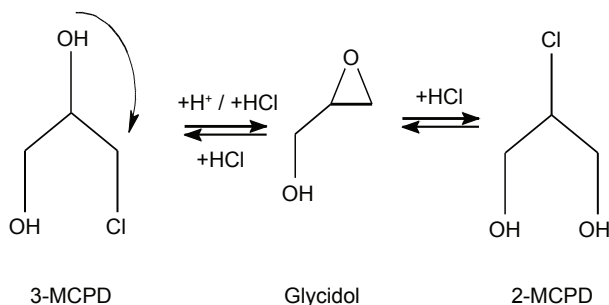
Figure 4. Possible formation pathways of GE and 3-MCPD esters from acylglycerols [6]

Stwierdzono, że istnieje silna korelacja pomiędzy powstawaniem estrów, a składem chemicznym rafinowanego oleju, w tym zawartością MAG i DAG, wolnych kwasów tłuszczowych, a także chlorków pochodzenia organicznego i nieorganicznego oraz fosfolipidów. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu GE i estrów 3-MCPD są warunki procesu odwaniania, zwłaszcza wysoka temperatura i czas trwania [6, 11, 12]. Tempo formowania GE zwiększa się znacznie po przekroczeniu temperatury 200°C, osiągając najwyższy poziom w temperaturze 240°C. Z kolei do powstawania estrów 3-MCPD dochodzi w temperaturze 200°C, przy czym jej podwyższenie nie wpływa na zwiększenie zawartości estrów w oleju [12, 13].

2. TOKSYCZNOŚĆ GE I ESTRÓW 3-MCPD

Zarówno GE jak i estry 3-MCPD nie wykazują właściwości toksycznych w odniesieniu do organizmów ludzkich i zwierzęcych. Zakłada się jednak, że pod wpływem działania enzymów przewodu pokarmowego mogą one ulegać nawet 100% hydrolizie do wolnego glicydołu i 3-MCPD. Ponadto w obecności jonów chlorkowych może dochodzić do konwersji glicydołu do 3-MCPD. Zakłada się, że przekształcenie to jest odwracalne. Wykazano, że w układach modelowych wraz ze zwiększaniem temperatury rośnie stosunek 2-MCPD do 3-MCPD, co sugeruje

istnienie przemian pomiędzy tymi związkami z występowaniem glicydolu jako produktu pośredniego (Rys. 5) [14, 15].



Rysunek 5. Wzajemna konwersja 3-MCPD i glicydolu [5]

Figure 5. The mutual conversion of 3-MCPD and glycidol [5]

Do uwolnienia chloropropanoli może dochodzić podczas przetwarzania i przechowywania żywności, szczególnie w warunkach niskiego pH i podwyższonej temperatury oraz podczas hydrolizy katalizowanej lipazą w trakcie trawienia w jelicie cienkim [4].

Możliwe są zatem trzy ścieżki przemian prowadzących do zwiększenia zawartości 3-MCPD w żywności: z estrów 3-MCPD, GE oraz glicydolu.

Glicydol i 3-MCPD należą do związków o określonym działaniu toksykologicznym, w tym mutagennym i rakotwórczym. Glicydol to powszechnie używany w przemyśle monomer o bardzo szerokim zastosowaniu. Używany jest w detergentach, kosmetykach, preparatach farmaceutycznych i w przemyśle chemicznym [16]. W żywności glicydol znalazł zastosowanie w produkcji emulgatorów stosowanych w produkcji margaryn, mixów i lodów. Jego działanie genotoksyczne opiera się m.in. na mutacjach genowych i nieplanowanej syntezie DNA. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IRAC) glicydol zaliczany jest do grupy kancerogenów (grupa 2) i mutagenów (grupa 3), a także do związków szkodliwych dla rozrodczości (grupa 2) [17]. Kancerogenność glicydolu dotyczy przede wszystkim ośrodkowego układu nerwowego oraz płciowego u mężczyzn [6, 18].

3-MCPD będący zanieczyszczeniem żywności, określany jest przez Wspólny Komitet FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA) mianem genotoksycznego kancerogenu [6, 19]. Na jego szkodliwe działanie narażone są w szczególności nerki, ośrodkowy układ nerwowy, a także jądra co może przekładać się na zanik płodności u mężczyzn. Dopuszczalne dzienne pobranie tego szkodliwego związku (TDI) wynosi 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała [4, 6, 12].

3. WYSTĘPOWANIE GE I ESTRÓW 3-MPCD W ŻYWNOSCI

3-MPCD po raz pierwszy jako zanieczyszczenie żywności został zidentyfikowany w 1978 roku w roślinnych hydrolizatach białkowych (ang. *hydrolysed vegetable proteins*, HVP) i produktach pochodnych, takich jak sosy sojowe [20]. Obecność estrów 3-MPCD, a następnie towarzyszących im GE, stwierdzono w większych ilościach kilka lat temu w rafinowanych olejach jadalnych. Warunki w jakich powstają w produktach spożywczych nie są w szczegółach dotąd poznane. Zakłada się, że w żywności prekursorami 3-MPCD są związki lipidowe i chlorowodór. Wyniki badań modelowych sugerują, że 3-MPCD może tworzyć się m.in. z glicerolu i innych alkoholi wielowodorotlenowych (po rozpadzie lipidów), z alkoholu alilowego, chloru (także z NaCl) i podchlorynów zawartych w wodzie wodociągowej, lipidów oraz z fosfolipidów, węglowodanów i wreszcie z epichlorhydrin migrujących z torebek do herbaty, filtrów do kawy, osłonek do wędlin, serów i różnych opakowań papierowych [21].

Większość procesów stosowanych podczas przetwarzania żywności (np. hydroliza kwasem solnym białek roślinnych) jak i jej przygotowania bezpośrednio do spożycia (np. pieczenie, wędzenie, grillowanie, obróbka mikrofalowa itd.) stosowanych w przemyśle spożywczym i w gospodarstwach domowych stwarza dogodne warunki do powstawania chloropropanoli i ich prekursorów [22, 23].

W kolejnych badaniach stwierdzono obecność estrów 3-MPCD w produktach wytworzonych na bazie tłuszczów rafinowanych, a także w innych poddanych obróbce termicznej w wysokich temperaturach, takich jak: produkty zbożowe, prażona kawa, ryby wędzone, produkty mięsne, mleczne, a także w sosach na bazie białek roślinnych otrzymywanych na drodze hydrolizy kwasowej, np. sojowych (Tab. 1) [4, 6].

Tabela 1. Zawartość estrów 3-MPCD w wybranych produktach spożywczych [24]

Table 1. The content of 3-MPCD esters in selected food products [24]

Produkt spożywczy	Estry 3-MPCD [mg/ kg]
oleje rafinowane	0,150
pieczywo chrupkie	0,420
skórka chleba	0,547
ciemna mąka	0,580
kawa zbożowa	0,721
pączki	1,210
frytki	6,100

Wśród rafinowanych olejów roślinnych największe ilości GE i estrów 3-MPCD stwierdzono w oleju palmowym, kukurydzianym i kokosowym (do 6,3 mg/kg) (Tab. 2). Z kolei najmniejszą ilością charakteryzował się olej rzepakowy [6, 25].

Tabela 2. Zawartość GE i estrów 3-MPCD w rafinowanych olejach jadalnych [mg/kg] [25]
 Table 2. Content of GE and 3-MPCD esters in refined edible oils [mg/kg] [25]

Oleje rafinowane	GE [mg/kg]	Estry 3-MPCD [mg/ kg]
palmowy	0,3–6,3	1,0–5,8
kukurydziany	0,6	1,7
kokosowy	0,5	0,6
sojowy	0,5	0,9
z nasion palmy oleistej	0,5	1,7
słonecznikowy	0,4	1,0
rzepakowy	< 0,1	0,4

Podjęto również badania nad określeniem składu GE występujących w rafinowanych olejach. W badaniach porównawczych prowadzonych w 17 różnych ośrodkach badawczych z całego świata z zastosowaniem techniki LC-MS wykazano, że zawartość GE była skorelowana ze składem kwasów tłuszczowych analizowanych olejów (Tab. 3) [26].

Tabela 3. Zawartość GE oznaczona przez 17 laboratoriów w trakcie badań porównawczych [26]
 Table 3. Contents of GE determined by 17 laboratories during comparative studies [26]

Oleje rafinowane	GE [mg/kg]				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
palmowy	2,34	0,50	5,11	1,33	< LOQ
kukurydziany	0,20	< LOQ	0,82	1,49	< LOQ
sojowy	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,48	< LOQ
rzepakowy	< LOQ	< LOQ	0,45	< LOQ	< LOQ

4. OGRANICZANIE POWSTAWANIA GE ORAZ ESTRÓW 3-MCPD W ŻYWNOSCI

Najlepszym sposobem ograniczenia powstawania chloropropanoli w hydrolizatach białek roślinnych jest zastąpienie hydrolizy kwasowej hydrolizą enzymatyczną. Taka modyfikacja umożliwia zwiększenie pH produktów o wysokiej zawartości wody, co zapobiega tworzeniu się szkodliwych substancji i ich prekursorów. W odniesieniu do produktów wędzonych wykazano, że dodatek węgla sodu do komory wędzarniczej zmniejsza powstawanie chloropropanoli. W przypadku pieczywa, w którym omawiane związki powstają podczas pieczenia, zawartość ich można zredukować przez optymalizację receptury – zwłaszcza udziału cukru. W badaniach wykazano, że duży dodatek cukru przyczynia się do znacznej syntezy glicerolu. Innym sposobem ograniczenia ilości powstających 2-MCPD i 3-MCPD jest stosowanie pieczenia z użyciem pary [27].

Poszukując sposobów ograniczenia lub eliminacji tej niepożądanego grupy związków z żywności rozpatrywano zagadnienia związane z jakością surowca,

a także parametrami technologicznymi. Analizując surowce olejarские, największe prawdopodobieństwo występowania GE i estrów 3-MCPD w końcowym produkcie dają palma oleista i kokosowa oraz kukurydza. Duże zróżnicowanie w jakości oleju palmowego związane jest zarówno z surowcem, na który wpływ mają takie czynniki jak klimat, rodzaj gleby i nawożenia oraz genotyp rośliny, jak i sposób przetwarzania surowca, zwłaszcza parametry rafinacji [11, 12].

Powstawanie GE i estrów 3-MCPD jest silnie skorelowane z obecnością ich prekursorów w oleju surowym, w tym wolnych kwasów tłuszczowych i DAG. Dowiedziono, że większą ilością produktów hydrolizy TAG charakteryzowały się oleje produkowane z miąższu w porównaniu z olejami otrzymanymi z nasion [11]. Stwierdzono, że zawartość DAG i WKT powyżej 3–4% w przetwarzanym surowcu zwiększa istotnie zawartość estrów w otrzymanym oleju rafinowanym. Stąd też, jednym ze sposobów ograniczania powstawania GE i estrów 3-MCPD może być skrócenie czasu i optymalizacja drogi pomiędzy zbiorem surowca a kolejnymi etapami przetwarzania [12, 28]. W przypadku palmy oleistej istotne jest, aby owoce zbierane były w optymalnym stopniu dojrzałości, co zapobiega opadaniu i obtłuczeniom [28]. Po zbiorze, w możliwie jak najkrótszym czasie, który nie powinien przekraczać 24 h, kiście palmy oleistej poddawane są sterylizacji [29]. Pozwala to na zahamowanie przemian hydrolitycznych związanych z intensywną działalnością lipaz znajdujących się w owocach, aktywujących się po odcięciu kiści, a przez to na ograniczenie powstawania wolnych kwasów tłuszczowych i DAG [29, 30]. Inną możliwością obniżenia poziomu DAG jest uprawa specjalnych gatunków roślin oleistych o obniżonej aktywności lipaz lub poprzez enzymatyczną estryfikację DAG do TAG [11]. Do prekursorów niezbędnych przy tworzeniu estrów 3-MPCD należą także związki zawierające chlor, naturalnie występujące w surowcu lub pobierane przez roślinę z gleby i pestycydów. Ich poziom w oleju surowym zależy od genotypu rośliny, rodzaju gleby i stosowanych pestycydów. Ilość chlorków oraz innych prekursorów w oleju surowym może być zredukowana dzięki zastosowaniu wstępnego etapu przygotowującego olej do obróbki, takiego jak przemywanie oleju przed rafinacją wodą pozbawioną chloru w temperaturze 100°C przez 20 min [11, 12].

W odniesieniu do olejów jadalnych poddawanych rafinacji kluczową rolę odgrywają parametry dezodoryzacji. Jednym z efektów tego procesu jest „wybielanie cieplne” – najbardziej widoczne podczas obróbki oleju palmowego, którego celem jest rozkład termiczny karotenów. Degradacja cieplna karotenu jest bardzo powolnym procesem w temperaturze 210°C, podczas gdy w $T > 260^\circ\text{C}$ trwa tylko kilka minut. Z tego względu powszechnie dezodoryzację oleju palmowego prowadzi się w wysokich temperaturach, co pozwalało na istotne skrócenie czasu procesu. Uwzględniając niekorzystne zmiany związane z tworzeniem GE i estrów 3-MCPD, w ostatnich latach zmodyfikowano parametry prowadzenia procesu odwaniania [12, 24]. Ze względu na wykazaną zależność przede wszystkim pomiędzy temperaturą procesu, a ilością powstających estrów zaproponowano łagodniejsze warunki prowadzenia dezodoryzacji poprzez obniżenie „obciążenia cieplnego” (czasu prze-

bywania oleju w wysokiej temperaturze). Obecnie typowe warunki prowadzenia procesu dezodoryzacji oleju jadalnego to:

- niższa temperatura ($< 200^{\circ}\text{C}$) dla olejów wrażliwych na ciepło (np. masło kakaowe, olej z ryb), aby uniknąć zbyt dużej degradacji kwasów tłuszczowych omega-3 (olej rybny) i negatywnego wpływu na właściwości krystalizacji (masło kakaowe),
- wyższe temperatury (ok. 260°C) – wybielania cieplne (np. fizyczna rafinacja oleju palmowego) [31].

W celu zredukowania zawartości estrów 3-MCPD i GE w rafinowanych olejach początkowo zaproponowano obniżenie temperatury dezodoryzacji ($230\text{--}240^{\circ}\text{C}$). Hrnčirik i van Duijn (2011) wykazali jednakże, że nawet w stosunkowo niskich temperaturach dezodoryzacji (230°C), chemicznie lub fizycznie rafinowany olej palmowy może zawierać duże ilości GE (na poziomie około 2 mg/kg). Zauważyli ponadto, że ich zawartość może zwiększać się wykładniczo wraz z wydłużaniem czasu i zwiększaniem temperatury dezodoryzacji [25, 32]. W badaniach prowadzonych przez Destaillets i in. (2012) analizowano wpływ temperatury w zakresie od 180 do 240°C (z przyrostem co 20°C) na zawartość GE w oleju palmowym. Wykazano, że w temperaturze poniżej 200°C tworzenie GE było minimalne. Istotne zwiększenie zawartości obserwowano w temperaturze powyżej $220\text{--}230^{\circ}\text{C}$, osiągając poziom ok. $1,8\text{ mg/kg}$ GE w 240°C [9]. W innych badaniach również stwierdzono zawartość GE na poziomie ok. 2 mg/kg , w oleju palmowym dezodoryzowanym w temperaturze 230°C dłużej niż jedną godzinę. Badania te potwierdzają konieczność zmiany parametrów procesu rafinacji zwłaszcza poprzez obniżenie maksymalnej temperatury oraz obciążenia cieplnego. Jednym z zaproponowanych rozwiązań jest prowadzenie dezodoryzacji dwustopniowej, w której wysoką temperaturę powyżej 250°C stosuje się tylko przez kilka pierwszych minut, a następnie do końca procesu (przez kilkadziesiąt minut) utrzymywana jest temperatura 200°C . Zaletą tego rozwiązania jest nie tylko zmniejszenie zawartości estrów, ale również ilości izomerów *trans* kwasów tłuszczowych [12].

Drugim ważnym aspektem mającym wpływ na zawartość chloropropanoli i ich estrów w olejach jest obecność jonów chlorkowych w środowisku reakcji. Ich eliminacja poprzez zwrócenie uwagi na jakość wody używanej w procesie rafinacji stanowi jeden z kluczowych elementów modyfikacji prowadzącej do zmniejszenia zawartości tej grupy zanieczyszczeń na etapie produkcji. Kolejną modyfikacją dotyczącą etapu dezodoryzacji może być wprowadzenie dodatku chemicznych substancji pomocniczych. Szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie diacetonu, charakteryzującego się niską ceną, nietoksycznością oraz możliwością całkowitego usunięcia z procesu dzięki niskiej temperaturze wrzenia. W trakcie reakcji diaceton przyłącza związki chloru, co pomaga zredukować do 50% ilość estrów. Dodatek kwasu cytrynowego lub szczawiowego do pary wodnej również wpływa na zmniejszenie ilości GE. Produkty tej reakcji są usuwane pod postacią kondensatu. Dodatkowo estry 3-MPCD można usunąć absorpcyjnie stosując zeolit, tuż po procesie rafinacji.

Alternatywną metodą może być także zastosowanie kondensacyjnych komór próżniowych, w których estry glicydotu oddziela się od oleju wraz z kondensatem [28].

5. SPOSOBY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI GE I ESTRÓW 3-MCPD W ŻYWNOSCI

Obecność GE w olejach roślinnych stwierdzono przypadkowo w badaniach mających na celu określenie pochodzenia 3-MCPD i jego estrów z kwasami tłuszczowymi. Weißhaar i Perz (2010) w badaniach ukierunkowanych na identyfikację prekursorów tych związków wykazali, że badane oleje charakteryzowały się stosunkowo dużą zawartością GE [25]. Z kolei Masukawa i in. (2010) analizując oleje pobrane z sieci handlowej w Japonii stwierdzili, że GE obecne były w każdej badanej próbce [34]. Weißhaar i Perz (2010) opracowali metodę pośrednią, stosując GC-MS do ilościowego oznaczenia GE proponując dwa różne sposoby przygotowania próby (opcja A oraz B), które zostały przyjęte jako jedna z metod standardowych DGF (Deutsche Gesellschaft für Fachkrankenpflege und Funktionsdienste). Opcja A polega na oznaczeniu poziomu 3-MCPD oraz sumy jego prekursorów czyli estrów 3-MCPD oraz GE. Opcja B pozwala z kolei na oznaczenie estrów 3-MCPD po całkowitej eliminacji GE w procesie przygotowania próbki poprzez zastosowanie kwasu siarkowego. Poziom GE oblicza się jako różnicę między tymi dwoma oznaczeniami (od wyniku uzyskanego stosując opcję A odejmuje się wynik otrzymany w opcji B) [33].

Okazało się jednak, że analiza estrów MCPD i GE w olejach roślinnych metodą pośrednią proponowaną przez DGF dawała niespójne wyniki ze względu na zróżnicowane warunki wysolenia. W kolejnych badaniach wykazano, że w trakcie analizy dochodzi do rozkładu i ponownego tworzenia MCPD. W odpowiedzi, opracowano metodę bezpośredniej analizy GE w olejach roślinnych z wykorzystaniem LC-TOFMS [34]. Stosując LC-TOFMS oznaczono z powodzeniem także estry 3-MCPD w wielu różnych próbach olejów [35]. Shimizu i in. (2010) również zwrócili uwagę na błąd w proponowanej metodzie pośredniej, stwierdzając że oznaczana zawartość GE jest niedoszacowana, gdy oleje zawierają relatywnie duże ilości GE i/lub acylogliceroli, które są również częściowo analizowane. Wyniki otrzymane stosując proponowane metody bezpośrednie porównano z metodą DGF. Okazało się, że stosując metodę DGF wyniki były wyższe niż przy użyciu techniki LC-TOFMS. W metodzie pośredniej obecność estrów MCPD i GE stwierdzono w każdej analizowanej próbce olejów roślinnych. Natomiast w metodzie porównawczej nie stwierdzono obecności monoestrów MCPD, a diestry MCPD zidentyfikowano tylko w niektórych próbach zawierających olej palmowy [36].

W tym samym czasie, Shiro i in. (2011) opracowali metodę bezpośredniego oznaczenia ilościowego pięciu GE (kwasu palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego i linolenowego) w oleju z wykorzystaniem kombinacji podwójnego oczyszczania z użyciem SPE i za pomocą LC-MS [37]. Podobną technikę zasto-

sowali Blumhorst i in. (2011) dokonując dalszych jej modyfikacji [7]. W kolejnych badaniach Masukawa i in. (2011) opracowali metodę ilościowego oznaczenia GE w olejach jadalnych przy użyciu spektrometru masowego z pojedynczym kwadrupolem - instrumentu, który jest niedrogi i łatwy w obsłudze, a przygotowanie próbki wymaga dwóch ekstrakcji w fazie stałej i odparowania rozpuszczalnika [38]. Metoda ta została następnie po raz kolejny zmodyfikowana [39] w celu poprawy sposobu przygotowania próbki i wykorzystania jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) w połączeniu z LC-MS pracującym w trybie selektywnego monitorowania jonu (SIM). Po wprowadzeniu zmian, w 2012r. metoda została przyjęta przez American Oil Chemists' Society, jako technika standardowa [40]. Wadą tej metody jest stosowanie systemu izokratycznego zamiast liniowego gradientu proponowanego przez Granvogl i Schieberle (2011) [41]. Wciąż pojawiają się nowe publikacje donoszące o kolejnych udoskonaleniach istniejących metod pozwalających na oznaczenia 3-MCPD, jego mono- i diestrów, a także GE w olejach jadalnych [42, 43].

UWAGI KOŃCOWE

Od kilku lat uwaga badaczy z całego świata skupiona jest na GE oraz estrach 3-MCPD jako nowopoznanych zanieczyszczeniach żywności, w tym olejów jadalnych. Mimo ciągłej pracy nad poszerzeniem wiedzy w zakresie mechanizmów ich powstawania, istnieje wiele zagadnień wymagających dalszego poznania. Brak udowodnionego negatywnego wpływu GE oraz estrów 3-MCPD na ludzi i zwierzęta nie oznacza, że można bagatelizować ich obecność w produktach spożywczych. Wciąż brakuje uniwersalnej metody oznaczania, która byłaby prosta, tania oraz dostępna dla szerszego grona np. producentów żywności, co przyczyniłoby się do poprawy bezpieczeństwa konsumentów. Przedmiotem szczególnego zainteresowania powinny stać się również dalsze ich przemiany wynikające m.in. z obróbki ciepłej żywności np. podczas smażenia. Dostarczyłoby to kolejnych odpowiedzi na pytania odnośnie sposobów ograniczania występowania GE oraz estrów 3-MCPD, a także produktów ich hydrolizy w olejach jadalnych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Tajner-Czopek, *Wpływ zabiegów technologicznych na właściwości frytek ziemniaczanych i zawartość akrylamidu*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2011.
- [2] F. Pudiel, P. Benecke, P. Fehling, A. Freudenstein, B. Matthaus, A. Schwaf, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 368.
- [3] PN-A-86908:2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Rafinowane oleje roślinne.
- [4] G. Eisenbrand, S. Guth, M. Habermeyer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **112**, 158.
- [5] A.K.K. Rahn, V.A. Yaylayan, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 323.

- [6] N. Bakhiya, K. Abraham, R. Gurtler, K.E. Appel, A. Lampen, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, **55**, 509.
- [7] M.R. Blumhorst, P. Venkatasubramanian, M.W. Collison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 1275.
- [8] M. Dubois, A. Tarres, T. Goldmann, G. Loeffelmann, A. Donaubauer, W. Seefelder, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 12291.
- [9] F. Destailats, B.D. Craft, M. Dubois, K. Nagy, *Food Chem.*, 2012, **131**, 1391.
- [10] B.D. Craft, M. Dubois, K. Nagy, F. Destailats, *Food Chem.*, 2012, **132**, 73.
- [11] C.G. Hamlet, L. Asuncion, J. Velisek, M. Dolezal, Z. Zelinkova, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 279.
- [12] A. Freudenstein, B. Matthäus, F. Pudel, T. Rudolph, *Advances in Research and Technology of Rape-seed Oil*, WNUMK, Toruń 2011.
- [13] B.D. Craft, A. Chiodini, J. Garst, M. Granvogl, *Food Addit. Contam. A*, 2013, **30**(1), 46.
- [14] J. Velíšek, M. Doležal, C. Crews, T. Dvořák, *CJFS*, 2002, **20**, 161.
- [15] C.G. Hamlet, P.A. Sadd, *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 46.
- [16] B. Schilter, G. Scholz, W. Seefelder, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 309.
- [17] *IARC Monographs on the Evaluation of Carcino-genic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 77, Lyon 2000.
- [18] Federal Institute for Risk Assessment (BfR) Initial evaluation of the assessment of levels of glycidol fatty acid esters detected in refined vegetable fats (in German) [online] [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: http://www.bfr.bund.de/cm/349/initial_evaluation_of_the_assessment_of_levels_of_glycidol_fatty_acid_esters.pdf
- [19] Oświadczenie Panelu Naukowego ds. Zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym (CONTAM) na wniosek Komisji Europejskiej, dotycząca estrów 3-MCPD [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1048.pdf>
- [20] H. Gawarska, D. Sawilska-Rautenstrauch, A. Starski, K. Karłowski, *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.*, 2009, **60**(3), 213.
- [21] W. Seefelder, G. Scholz, B. Schilter, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 319.
- [22] B. Matthäus, F. Pudel, P. Fehling, K. Vosmann, A. Freudenstein, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 380.
- [23] Z. Zelinkova, B. Svejkovska, J. Velisek, M. Dolezal, *Food Addit. Contam. A*, 2006, **23**, 1290.
- [24] R. Weißhaar, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 304.
- [25] R. Weißhaar, R. Perz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2010, **112**, 158.
- [26] M.R. Blumhorst, M.W. Collison, R. Cantrill, H. Shiro, Y. Masukawa, S. Kawai, K. Yasunaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2013, **90**, 493.
- [27] M. Dolezal, J. Velisek, *Proceedings of Chemical Reactions in Foods II*, Praga, 1992.
- [28] B.D. Craft, K. Nagy, W. Seefelder, M. Dubois, F. Destailats, *Food Chem.*, 2012, **132**, 73.
- [29] A. Southworth, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1985, **62**(2), 250.
- [30] Y.M. Choo, A.S.H. Ong, C.K. Ooi, *Developments In Oils and Fats*, Chapman & Hall, Liverpool, 1995.
- [31] Komisja Europejska, Zintegrowane zapobieganie zanieczyszczeniom i ich ograniczanie. Dokument referencyjny na temat najlepszych dostępnych technik w przemyśle spożywczym. [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: [http://ippc.mos.gov.pl/ippc/custom/BREF_spozy\(1\).pdf](http://ippc.mos.gov.pl/ippc/custom/BREF_spozy(1).pdf)
- [32] K. Hrciric, G. van Duijn, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 374.
- [33] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft: DGF Standard Method C III 18 (2009) Determination of ester-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD esters) and 3-MCPD forming substances in fats and oils by means of GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (Germany).

- [34] Y. Masukawa, H. Shiro, S. Nakamura, N. Kondo, N. Jin, N. Suzuki, N. Ooi, N. Kudo, *J. Oleo Sci.*, 2010, **59**(2), 81.
- [35] T.D. Haines, K.J. Adalf, R.M. Pierceall, I. Lee, P. Venkitasubramanian, M.W. Collison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 1.
- [36] M. Shimizu, N. Kudo, H. Shiro, K. Yasunaga, Y. Masukawa, Y. Katsuragi, Yasumasu T., *JOCS*, 2010, **59**(10), 535.
- [37] H. Shiro, N. Kondo, N. Kibune, Y. Masukawa, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 356.
- [38] Y. Masukawa, H. Shiro, N. Kondo, N. Kudo, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 15.
- [39] A. Becalski, S. Y. Feng, B. P.-Y. Lau, T. Zhao, *ABC*, 2012, **403**, 2933.
- [40] AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10, *Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils*, Approved 2012.
- [41] M. Granvogl, P. Schieberle, Quantitation of glycidyl esters via stable isotope dilution analysis. [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: http://www.aocs.org/files/resourcespdf/3_aocs_cinnati_030511.pdf
- [42] S. MacMahon, E. Mazzol., T. H. Begley, G. W. Diachenko, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 4737.
- [43] S. MacMahon, T.H. Begley, G.W. Diachenko, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk. Assess.*, 2013, **30**(12), 2081.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 czerwca 2014

SŁONECZNIK BULWIASTY ŹRÓDŁEM CENNYCH SUROWCÓW DLA PRZEMYSŁU, SZCZEGÓLNI SPOŻYWCZEGO, KOSMETYCZNEGO I FARMACEUTYCZNEGO

JERUSALEM ARTICHOKE AS A SOURCE OF
VALUABLE RAW MATERIAL, ESPECIALLY FOR FOOD,
PHARMACEUTICAL AND COSMETIC INDUSTRIES

Marek Chyc¹, Jan Ogonowski²

¹*Laboratorium Analiz Specjalnych, Centrum Badań i Analiz, Grupa Azoty
ul. Kwiatkowskiego 8, 33-101 Tarnów
e-mail: marek.chyc@grupaazoty.com*

²*Katedra Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych,
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej,
Instytut Chemii i Technologii Organicznej, Politechnika Krakowska,
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
e-mail: jogonow@pk.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Charakterystyka słonecznika bulwiastego
2. Wydzielanie i oczyszczanie inuliny
 - 2.1. Podstawowe informacje
 - 2.2. Wydzielanie inuliny
 - 2.3. Otrzymywanie inuliny wysokocząsteczkowej
 - 2.4. Oczyszczanie inuliny
3. Inne substancje obecne w słoneczniku bulwiastym
 - 3.1. Surowce do produkcji biopaliw
 - 3.2. Produkcja dioli
4. Kierunki przetwórstwa słonecznika bulwiastego
 - 4.1. Przemysł spożywczy
 - 4.2. Przemysł kosmetyczny
 - 4.3. Przemysł farmaceutyczny

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Marek Chyc jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, specjalność: nowoczesna synteza i fizykochemia organiczna (2004). Po ukończeniu studiów zatrudniony w Zakładach Azotowych w Tarnowie-Mościcach w Laboratorium Związków Fluoroorganicznych, obecnie pracuje jako specjalista analityk w Grupie Azoty w Laboratorium Analiz Specjalnych. Zawodowo zajmuje się chemią analityczną ze szczególnym uwzględnieniem technik separacyjnych stosowanych w przemyśle chemicznym. Reprezentuje Grupę Azoty w Polskim Komitecie Normalizacyjnym w komitetach technicznych ds. Gazów Technicznych i Gazownictwa.

prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski ukończył Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach w roku 1969. Pracuje w Katedrze Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych (kierownik Katedry) Politechniki Krakowskiej. Prowadzi badania w obszarze katalizy, technologii chemicznej, technologii produktów małowadźonowych oraz chemii i technologii kosmetyków.

ABSTRACT

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) is a native plant to North America. Its tubers were adopted as a source of food and inulin [3]. The substances obtained from tuber, shoots and flowers can be used in medicine, cosmetics or food industry as a valuable food additive. Inulin is extracted from jerusalem artichokes. It is a white, odorless, soluble powder with a slightly sweet taste and no aftertaste. It contains a mixture of oligosaccharides and polysaccharides which are composed of fructose units connected by β (2-1) links (Fig. 1). Almost every molecule is terminated by a glucose unit. The typical total number of fructose and glucose units in inulin is 30-35. The potential of jerusalem artichoke as a source for inulin, a natural polymer that may provide dietary health benefits for obesity, diabetes, increased calcium and magnesium absorption [41–43], while promoting the growth of beneficial intestinal bacteria and several other health issues and the possible use of the crop for biofuels [17], pharmacy and cosmetics and plastics manufacturers is drawing recent interest. The health benefits of inulin provide numerous opportunities to develop functional foods in various sectors such as dairy, bakery, beverage, cereals and cereal bars, supplements, confectionary, ice cream, infant formulas, fat spreads. Inulin cannot be digested by the digestive enzymes nor broken down by the gastric acids in the human digestive system. Therefore, these non-digestible carbohydrates function as insoluble fibers. However, dietary fibers influence the consistency of stomach and bowel content, the rate of discharge from the stomach and intestines and thus the rate at which nutrients and other desirable undesirable substances are absorbed. Furthermore they have an intensive effect on human bowel movements. This makes dietary fibers an essential part of our daily menu. Several methods for inulin extraction from Jerusalem artichoke tubers have been described in this paper [7, 11, 14]. For instance, ultrafiltration can reduce the purification procedure due to convenience and rapidity (fewer steps), thus showing a promising prospect for industrial purposes [24, 29, 31].

Keywords: jerusalem artichoke, inulin, pharmaceutical industry, cosmetics industry, food industry

Słowa kluczowe: słonecznik bulwiasty, inulina, przemysł farmaceutyczny, przemysł kosmetyczny, przemysł spożywczy

WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się wzrost znaczenia surowców odnawialnych dla celów przemysłowych. Zaletą stosowania surowców naturalnych, jako półproduktów dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego jest możliwość pozyskiwania różnorodnych substancji chemicznych, często mających interesujące właściwości biologiczne. Istotny jest również aspekt ekonomiczny, tak jak to ma miejsce w przypadku przetwórstwa słonecznika bulwiastego znanego również pod nazwą topinambur. W języku polskim obie te nazwy są popularne i powszechnie stosowane. W niniejszym artykule zostaną przedstawione informacje dotyczące możliwości zastosowania słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) jako źródła odnawialnych półproduktów dla wielu różnych zastosowań, szczególnie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym.

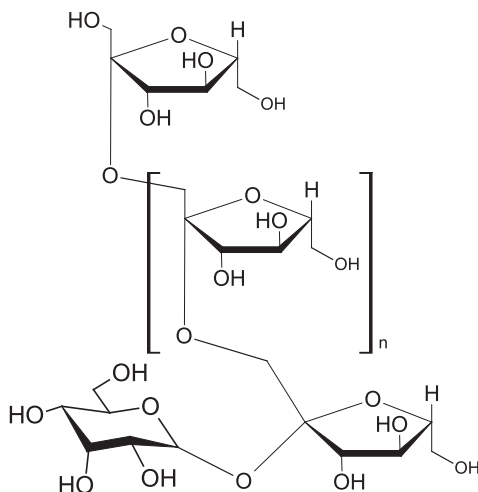
Tematyka pozyskiwania surowców na bazie słonecznika bulwiastego (*topinamburu*) jest obecnie bardzo aktualna, o czym świadczy duża liczba najnowszych doniesień literaturowych i patentowych z kraju i ze świata. Wiele informacji literaturowych dotyczących kierunków pozyskania produktów pochodzących z przetwórstwa tej rośliny jest znanych od wielu lat, jednak publikowanych jest dużo nowych, oryginalnych prac z tego zakresu. Nowe spojrzenie na tematykę produktów pozyskiwanych z surowca jakim jest słonecznik bulwiasty wniósł rozwój technik analitycznych i biotechnologicznych, sprawiając, że różnorodność zastosowań otrzymanych produktów ciągle wzrasta.

1. CHARAKTERYSTYKA SŁONECZNIKA BULWIASTEGO

Słonecznik bulwiasty (topinambur) jest rośliną pochodzącą z Ameryki Północnej. Sprowadzony do Europy w XVII wieku jako roślina ozdobna, jadalna i pastewna, jest zdolny do produkcji znacznej ilości biomasy. Na ziemię Polskie topinambur został sprowadzony w 1730 roku i jest obecnie uważany za obcy gatunek inwazyjny, którego hodowli należy zaniechać na obszarach chronionych, gdyż może się rozprzestrzeniać w niekontrolowany sposób [1].

Topinambur to roślina, z której na skalę przemysłową pozyskuje się inulinę. Już w 1804 niemiecki uczyony Rose jako pierwszy wyizolował inulinę z materiału roślinnego, którą określał nazwą „szczególna substancja pochodzenia roślinnego”, jednak nie określono składu chemicznego tego polisacharydu [2]. Obecnie wiadomo, że inulina to nierozgałęziony polisacharyd o 30–35 jednostkach cukrowych (średnia masa cząsteczkowa 5000 Da) połączonych wiązaniami β -1,2-glikozydowymi, jak to przedstawiono na rysunku 1. Inulina należy do grupy fruktanów i jest cennym prebiotykiem hamującym rozwój patogennych bakterii w jelitach i wspomagających funkcjonowanie bifidobakterii zdolnych do enzymatycznej hydrolizy wiązania β -1,2-glikozydowego. Dzięki licznym badaniom udało się odkryć wiele istotnych

zastosowań tej substancji, której zawartość w bulwach topinamburu jest stosunkowo wysoka i wynosi 14–19% [3].



Rysunek 1. Wzór chemiczny inuliny
Figure 1. Chemical structure of inulin

Inulina jest magazynowana także w korzeniach i bulwach niektórych innych roślin (cykoria, dalia, mniszek, cebula) pełniąc rolę materiału budulcowego części roślin oraz stanowi zapas węglowodanów, głównie fruktozy dla rośliny. Zawartość jednostek fruktozowych w inulinie jest zmienna dla różnych gatunków roślin, wieku sadzonki, pory roku i może się zawierać w granicach 71–94% [4].

2. WYDZIELANIE I OCZYSZCZANIE INULINY

2.1. PODSTAWOWE INFORMACJE

Inulina jest obecnie podstawowym surowcem, dla którego przetwarza się słonecznik bulwiasty. Zawartość inuliny w bulwach rośliny zmienia się w okresie wegetacyjnym i osiąga wartość maksymalną jesienią, kiedy najdogodniej jest pozyskiwać surowiec [4]. Inulina jest produktem przemysłowym, a jej produkcją i przetwórstwem zajmuje się wiele firm chemicznych. Pierwsza półtechniczna instalacja produkcji inuliny powstała w 1920 roku w Niemczech, w 1927 roku uruchomiono instalację przemysłową. Proces otrzymywania inuliny technicznej przebiega analogicznie do procesu produkcji cukru z buraków cukrowych i na tej technologii oparta jest większość instalacji przemysłowych, głównych producentów tego fruktanu, takich jak: Grupa Orafiti (Belgia, 70% światowej produkcji), Shandong East Che-

mical Industry (Chiny), Vijay Chemical Corporation (Indie), Synergy Vaccines Inc. (USA), Beta Pure Foods (Kanada), Predilife (Meksyk), Dr. Paul Lohmann (Niemcy), Brenntag Nederland B. V. (Holandia), Chemofarma Chemikalien (Austria)¹.

Od czasu uruchomienia pierwszej instalacji przemysłowej zmienił się przede wszystkim sposób oczyszczania ekstraktu zawierającego inulinę. Surowy ekstrakt zawiera proste cukry, oligosacharydy (3–9 jednostek cukrowych) i polisacharydy (>9 jednostek cukrowych). Największe znaczenie użytkowe mają polisacharydy o wysokim stopniu polimeryzacji, izolowane głównie z części podziemnych słonecznika bulwiastego, cykorii i agawy meksykańskiej. Przetwórstwo bulw słonecznika składa się z następujących etapów:

- wstępne oczyszczanie bulw z ziemi,
- rozdrabnianie surowca roślinnego,
- ekstrakcja pulpy wodą w temperaturze 60–90°C,
- strącanie składników białkowych, pektynowych i innych,
- klarowanie roztworu,
- usuwanie zabarwienia roztworu,
- rafinacja surowego ekstraktu,
- zateżnianie ekstraktu,
- suszenie inuliny,
- dodatkowe procesy oczyszczania (ultrafiltracja membranowa, wymiennicze jonowe, kolumny z węglem aktywowanym).

2.2. WYDZIELANIE INULINY

Podstawowym kryterium technologii jest efektywne wyodrębnienie inuliny z materiału roślinnego, a następnie oczyszczenie produktu, stosownie do kierunku dalszego zastosowania. Jako produkt przemysłowy pochodzenia naturalnego inulina wydzielana jest z roztworu o złożonej matrycy, którą należy oddzielić od produktu finalnego, będącego mieszaniną homologów o różnej liczbie jednostek cukrowych. Obecność zanieczyszczeń może mieć negatywny wpływ zarówno na jej smak, barwę, jak również na właściwości przetwórcze. W przypadku zastosowań spożywczych, np. do produkcji słodczy, pieczywa, jogurtów, zawartości oligosacharydów nie ma znaczenia. Dla celów produkcji flokulantów, surfaktantów, czy produktów farmaceutycznych, skład inuliny, stopień polimeryzacji, rozkład średniej masy molowej będzie miał istotne znaczenie dla produktu końcowego [5–7].

Obecnie stosowanych jest szereg operacji jednostkowych dla optymalizacji składu i wydajności produkcji inuliny. Poniżej przedstawiono główne etapy występujące w większości współczesnych rozwiązań technologicznych w tym zakresie. Podstawowym sposobem wyodrębniania inuliny z materiału roślinnego jest eks-

¹ Wg www.chemindustry.com.

trakcja rozpuszczalnikowa. Dogodnym ekstrahentem jest woda. Rozpuszczalność inuliny silnie zależy od temperatury, natomiast dodatek do wody rozpuszczalników organicznych, np. etanolu umożliwia selektywne wytrącenie produktu z roztworu. W temperaturze pokojowej rozpuszczalność inuliny jest znikomo mała, podczas gdy w temperaturze 90°C roztwór nasycony zawiera 35% (m/v) fruktantu [7]. Z tej przyczyny większość technologii ekstrakcji inuliny stosuje ekstrakcję wodą w podwyższonej temperaturze, co czyni ten proces tanim i ekologicznym. Stosowane przemysłowo technologie różnią się głównie temperaturą i czasem prowadzenia ekstrakcji. Parametry technologiczne procesu mogą się różnić w zależności od tego czy surowką jest rozdrobiona bulwa topinamburu czy wysuszony i sproszkowany surowiec.

Ważnym czynnikiem warunkującym przebieg ekstrakcji inuliny jest odczyn roztworu. W przypadku, gdy $\text{pH} < 6$ następuje hydroliza inuliny, w wyniku której powstają cukry proste i oligosacharydy [8]. Aby ograniczyć niepożądane procesy hydrolizy do procesu ekstrakcji dodawany jest wodorotlenek sodu, a ekstrakcję prowadzi się około 60 minut. Dla skrócenia czasu ekstrakcji może być zastosowana ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, wówczas możliwe jest skrócenie czasu procesu do 25 minut i obniżenie temperatury ekstrakcji do 37°C [9].

Innym przykładem wydajnego procesu ekstrakcji inuliny, charakteryzującym się zwiększeniem wydajności o około 14%, względem klasycznych metod ekstrakcyjnych jest trójstopniowa ekstrakcja z homogenicznego surowca roślinnego. Metoda ta poza wydajnym zwiększeniem wydajności pozwala uzyskać produkt dobrej jakości [10].

2.3. OTRZYMYWANIE INULINY WIELKOCZĄSTECZKOWEJ

Dla uzyskania inuliny o najwyższych walorach użytkowych konieczne jest jej oczyszczenie i frakcjonowanie oraz selektywne wytrącanie z roztworu macierzystego. W przypadku, gdy pożądanym produktem jest inulina o wysokim stopniu polimeryzacji i wąskim przedziale rozkładu mas cząsteczkowych, konieczne jest zastosowanie szeregu zabiegów technologicznych. W przypadku pozyskiwania inuliny z bulw dalii otrzymuje się inulinę o średniej masie cząsteczkowej 7000 Da, podczas gdy inulina wyodrębniona z bulwy topinamburu w technologii skierowanej na produkt wielkocząsteczkowy ma średnią masę cząsteczkową około 10000 Da [7]. Pozyskiwanie inuliny w klasyczny sposób z zastosowaniem korzeni cykorii dostarczą inulinę o średniej masie cząsteczkowej 6200 Da, natomiast bulwy topinamburu jedynie 3400 Da [11, 12]. Według specyfikacji producentów, handlowo dostępna inulina otrzymywana z korzenia cykorii charakteryzuje się średnią masę cząsteczkową około 5000 Da. Podstawową metodą frakcjonowania inuliny dla uzyskania produktu o dużych masach cząsteczkowych i wąskim ich rozkładzie jest wytrącanie polisacharydów z zastosowaniem acetonu, acetonitrylu bądź alkoholi. Dla otrzymania inuliny z topinamburu zalecane jest stosowanie etanolu i acetonu, podczas

gdy dla większości metod wytrącania inulin lepsze rezultaty uzyskuje się stosując acetonitryl i aceton [13].

Krystalizacja inuliny może być prowadzona poprzez ochłodzenie roztworu do temperatury 2–10°C, po której wytrącony osad jest sączony bądź wirowany, albo poprzez suszenie rozpryskowe, dzięki któremu można otrzymać wysuszony produkt o uziarnieniu 50–350 µm [14]. Stopień polimeryzacji inuliny zawartej w bulwach wzrasta wraz z wiekiem roślin, dlatego inulinę wielkocząsteczkową otrzymuje się z bulw roślin kilkuletnich, co wpływa na cenę surowca [15].

2.4. OCZYSZCZANIE INULINY

Głównymi zanieczyszczeniami inuliny są: cukry proste, oligomery glukozy i fruktozy, substancje białkowe, pektyny, tłuszcze, kwas uronowy oraz barwniki. Dla usunięcia z ekstraktu substancji niecukrowych skutecznym rozwiązaniem jest mieszanie ekstraktu z wodą wapienną. Proces prowadzi się w temperaturze 85°C przez 45 minut, następnie całość jest kierowana na filtr, który ma za zadanie usunięcie z ekstraktu cząstek stałych o uziarnieniu przekraczającym 125 µm. Kolejnym etapem jest kilkustopniowa karbonizacja przeprowadzana przez barbotowanie roztworu gazowym ditlenkiem węgla, po którym następuje wirowanie mieszaniny. Karbonizacja składników roztworu jest prowadzona kilkustopniowo w różnych przedziałach pH, aby zapobiec wtórnemu rozpuszczaniu się powstałych osadów w czasie stopniowej neutralizacji roztworu [11].

Dodatek do ekstraktu związków wapnia (głównie $\text{Ca}(\text{OH})_2$) i magnezu (MgSO_4), pozwala usunąć barwę roztworu oraz przyspiesza klarowanie się mieszaniny [14]. Innym sposobem usuwania związków barwnych z ekstraktów zawierających inulinę jest ich oczyszczanie z udziałem kolumn adsorpcyjnych z wypełnieniem w postaci węgla aktywowanego i jonitów (głównie celulozowych żywic jonowymiennych, DEAE [7, 11]).

Fracjonowanie składników zawartych w ekstrakcie roślinnym można skutecznie prowadzić przez zastosowanie technik membranowych, mikrofiltracji oraz nanofiltracji. Wymienione techniki pozwalają uzyskać produkt o bardzo wysokiej czystości i wąskich frakcjach mas molowych, np. 5000–6000 Da [16].

3. INNE SUBSTANCJE OBECNE W TOPINAMBURZE

3.1. SUROWCE DO PRODUKCJI BIOPALIW

Słonecznik bulwiasty to roślina, która jest zdolna do efektywnego wytwarzania biomasy, dzięki czemu naziemne części roślin mogą, po wysuszeniu, być stosowane jako paliwo stałe w kotłach opalanych biomasą. Wartość opałowa słomy otrzymanej

po wysuszeniu części naziemnych słonecznika bulwiastego wynosi 15,9 MJ/kg [17]. W polskich warunkach produkcja biomasy na bazie słonecznika bulwiastego nie jest tak efektywna jak w krajach o cieplejszym klimacie, jednak wskaźniki ekonomiczne pozwalają na jego zastosowanie do celów energetycznych. Z punktu widzenia produkcji biopaliw, topinambur jest rośliną bardzo uniwersalną, gdyż przetworzenie biomasy pozwala na uzyskanie biogazu i składników paliw ciekłych. Dla polskich warunków klimatycznych najlepszą wydaje się być odmiana *Helianthus tuberosum* L., która dostarcza 38–75 MJ/ha zielonej masy, przy stosunkowo niewielkich nakładach pracy i nakładach inwestycyjnych (sadzonki, nawozy). Koszty założenia i prowadzenia plantacji omawianej rośliny są relatywnie niskie i konkurencyjne względem innych upraw, np. kukurydzy [17].

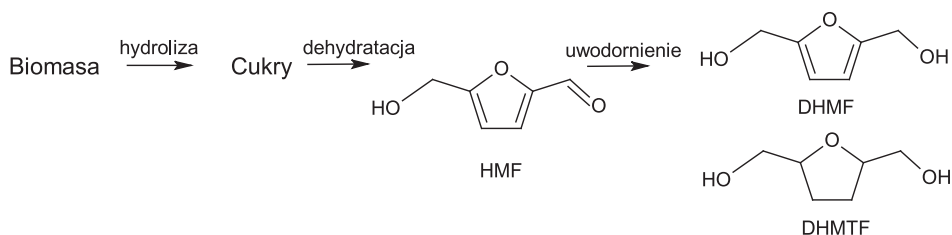
Uprawa i przetwórstwo biomasy na bazie topinamburu dostarcza 3000–5000 m³/ha biogazu, co w przeliczeniu na energię stanowi 65–135 GJ/ha [17, 18]. Zawartość metanu w biogazie wyprodukowanym z biomasy słonecznika bulwiastego zawiera się w przedziale 57–76% [18]. Tak wysokie wskaźniki produkcji energii odnawialnej poprzez biogaz, stawiają topinambur w czołowie roślin dla celów produkcji biogazu dla polskich warunków klimatycznych, gdyż zarówno bulwy jak i łodygi są przydatne do produkcji biopaliw.

Słonecznik bulwiasty to również surowiec do produkcji składników paliw ciekłych takich jak bioetanol, biobutanol, dimetylofuran. Wskaźnik produkcji bioetanolu na bazie biomasy topinamburu w warunkach polskich wynosi 2,6 m³/ha [19]. Surowcem do produkcji bioetanolu mogą być bulwy i łodygi. Stopień konwersji cukrów w procesie fermentacji wynosi około 60%, zaś wskaźnik efektywności produkcji bioetanolu przy zastosowaniu drożdży *Kluyveromyces marxianus* CBS 1555 wynosi 0,25 g/g suchej masy roślinnej, [20].

Zawartość tłuszczów w bulwach i łodygach topinamburu jest niewystarczająca do produkcji biodiesla, gdyż ich zawartość w części naziemnej rośliny wynosi 3,8% s.m. [21]. Za pomocą metod biotechnologicznych możliwe jest przetworzenie cukrów zawartych w roślinie przez bakterie z wytworzeniem tłuszczów, które następnie mogą być surowcem do produkcji estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych. Dla produkcji biooleju na bazie topinamburu można z powodzeniem zastosować bakterie *Cryptococcus* sp. Proces biotechnologicznej konwersji cukrów do lipidów, po uprzednim trawieniu chemicznym biomasy, przebiega wydajnie i szybko – 1,7 g/dm³/24 h (szybciej niż przy zastosowaniu samej glukozy). Olej otrzymany tą metodą ma wysoką liczbę cetanową (LC-58), a niską liczbę jodową (IJ-56), dzięki czemu paliwo jest odporne na degradację oksydacyjną [22].

3.2. PRODUKCJA DIOLI

Łodygi topinamburu mogą stanowić surowiec do produkcji furfuralu i 2,5-hydroksymetykofurfuralu (HMF) [22, 23] oraz 2,5-dihydroksymetylenofuranu (DHMF) i 2,5-dihydroksymetylenotetrahydrofuranu (DHMTF), jak to zilustrowano na Rysunku 2 [24].



Rysunek 2. Synteza dioli na bazie biomasy bogatej w cukry
Figure 2. Diols synthesis based on biomass rich in the sugars

Zarówno DHMF jak i DHMTF są ważnymi substratami przy produkcji polikondensacyjnych, w tym poliestrów o wysokiej odporności termicznej. Monomery te na chwilę obecną są wytwarzane głównie w oparciu o produkty petrochemiczne. Zasady zrównoważonego rozwoju wymagają poszukiwań alternatywnych źródeł surowców nieodnawialnych również w produkcji tworzyw konstrukcyjnych, co jest możliwe dzięki opisanym reakcjom katalitycznym, jak to zilustrowano na Rysunku 2.

Topinambur może być również surowcem do produkcji glikoli: etylenowego, propylenowego i butylenowego, przy czym selektywność powstawania glikolu etylenowego jest znacząco większa niż pozostałych. Glikol etylenowy jest stosowany, między innymi, do produkcji poli(tereftalanuetylenu) oraz jest używany jako nośnik ciepła (pompy ciepła, systemy solarne). Surowcem do syntezy glikolu mogą być łodygi rośliny. Dogodnym układem katalitycznym reakcji jest mieszanina tlenu wolframu(VI) i niklu Raneya, a reakcję prowadzi się w temperaturze 245°C pod ciśnieniem 6 MPa [24].

4. KIERUNKI PRZETWÓRSTWA TOPINAMBURU

Znanych jest wiele doniesień literaturowych dotyczących możliwości zastosowania produktów przetwórstwa topinamburu. Wiele spośród nich jest w fazie intensywnych badań laboratoryjnych i aplikacyjnych, jednak potencjał możliwości praktycznego zastosowania surowców pozyskanych z topinamburu jest imponujący. Poniżej przedstawiono kilka wybranych kierunków praktycznego zastosowania substancji otrzymywanych z topinamburu, które mają znaczenie praktyczne.

4.1. PRZEMYSŁ SPOŻYWCZY

Aktualnie przemysł spożywczy to największy odbiorca inuliny wytwarzanej na bazie słonecznika bulwiastego. Preparaty błonnika pokarmowego (do których zalicza się inulina) stanowią około 25% liczby sprzedawanych dodatków do żywności w USA. Obserwuje się systematyczny wzrost udziału inuliny w rynku dodatków do produktów spożywczych. Od 1999 roku osiągnął on wartość 120%.

Inulina może być zamiennikiem cukrów prostych oraz tłuszczów dla różnych produktów spożywczych. Dodatek inuliny polepsza właściwości reologiczne jogurtów, zwiększając trwałość powstałej emulsji oraz jest źródłem pożywienia dla kultur bakteryjnych. Badania wskazują, że szczepy bakteryjne stosowane w produkcji jogurtów bardzo dobrze przyswajają inulinę, co obserwuje się silnym wzrostem liczebności kolonii [25].

Zastosowanie inuliny podczas wypieku chleba również pozytywnie wpływa na jego walory jakościowe. Inulina (szczególnie o niskim stopniu polimeryzacji) może być stosowana jako spulchniacz przy wypieku pieczywa, a jej dodatek do mąki w ilości 2–12% korzystnie wpływa na wypiek chleba, powodując wzrost objętości bochenków i zmniejsza twardość produktu [26].

Podczas wypieku ciastek można ograniczyć ilość tłuszczów nawet o 50%, zastępując tłuszcz inuliną. Ograniczenie ilości tłuszczów użytych do produkcji ciastek nie wpływa negatywnie na smak wyrobów. Zmiana receptury ciastek skutkuje obniżeniem ich wartości kalorycznej i zawartości cholesterolu, ciastka są bardziej chrupiące i spulchnione, przy czym obniża się ich twardość [27].

Podobnie jak w przypadku wyrobów cukierniczych i wypieku chleba, gdzie dodatek polisacharydu powoduje polepszenie struktury wyrobów, inulina ma właściwości, które pozwalają na jej zastosowanie przy produkcji niskotłuszczowych majonezów bezcholesterolowych. Stwierdzono, że inulina nie ma właściwości stabilizujących emulsje majonezowe, jednak w połączeniu z gumą guar występuje efekt synergistyczny w odniesieniu do trwałości wytworzonych emulsji [28].

Produkty zawierające inulinę są alternatywą dla osób na diecie. Dlatego inulina z powodzeniem może zastępować sacharozę w diecie, np. diabetyków i osób po leczeniu chemioterapią. Preparaty zawierające inulinę i inne substancje słodzące, np. acesulfam K (E950) to popularne składniki słodzików dietetycznych [29].

Inulina stanowi istotny składnik czekolad i cukierków o obniżonej wartości kalorycznej [30], co w dobie problemów z nadwagą, szczególnie u dzieci, ma bardzo duże znaczenie społeczne.

4.2. PRZEMYSŁ KOSMETYCZNY

Przemysł kosmetyczny to potencjalnie duży odbiorca produktów na bazie topinamburu. Ekstrakty z bulw słonecznika zawierają pewne ilości witamin, minerałów i innych substancji pożądaných w produkcji, np. kremów kosmetycznych. Podobnie

jak przy produkcji majonezów czy jogurtów zastosowanie inuliny nadawało wyrobom odpowiednią konsystencję, ograniczało rozwój szkodliwych drobnoustrojów, tak i w produkcji kosmetyków wymienione właściwości są bardzo pożądane.

Inulina i jej pochodne będące surfaktantami mogą być stosowane do produkcji mydeł antybakteryjnych, skutecznych przy usuwaniu zarówno gram ujemnych jak i gram dodatnich bakterii oraz wirusów. Obecność inuliny w kosmetykach nadaje im właściwości odżywcze dla skóry oraz pozwala na stabilizację emulsji w przypadku kosmetyków płynnych [31].

Surowcem do produkcji kremów wygładzających i regenerujących skórę mogą być łodygi i bulwy słonecznika. Ekstrakty pozyskane z *Helianthus tuberosus L.* mają właściwości przeciwgrzybicze i odkażające, co jest cechą pożądaną wielu kosmetyków, w tym toników i maseczek do skóry. W badaniach nie stwierdzono działania alergizującego preparatów zawierających ekstrakty ze słonecznika bulwiastego, takich jak toniki dla mężczyzn czy mleczka i balsamy do ciała dla kobiet [32], pomimo że roślina wytwarza wiele związków alleopatycznych, takich jak kumaryna, kwas kumarynowy, kwas salicylowy, *p*-hydroksybenzaldehyd, kwas cytrynowy, pinorezynol, wanilinę, loliolid [33, 34]. Fruktany (w tym inulina) znalazły zastosowanie w produkcji szamponów. Zaletą zastosowania fruktanów i ich pochodnych, jako składników szamponów jest możliwość wyeliminowania ze składu kosmetyku jonowych środków powierzchniowo czynnych, co ma znaczenie dla ochrony środowiska naturalnego, gdyż inulina jest produktem biodegradowalnym [35]. Estrы kwasów karboksylowych i inuliny nadają szamponom i odżywkom do włosów odpowiednią konsystencję dzięki właściwościom powierzchniowo czynnym. Najlepsze właściwości powierzchniowo czynne spośród estrów inuliny ma palmitynian inuliny, którego 1% roztwór wodny wykazuje napięcie powierzchniowo czynne 30 mN/m [36].

Inulina i jej pochodne stosowane są w produkcji kremów do pielęgnacji skóry, jako filtry promienochronne, składniki przeciwtrądzikowe, składniki przeciwzapalne, środki łagodzące podrażnienia, nawet dla skóry wrażliwej [37]. W połączeniu z właściwościami powierzchniowo czynnymi estrów, inulina stanowi przyszłościowy surowiec dla przemysłu kosmetycznego.

4.3. PRZEMYSŁ FARMACEUTYCZNY

Inulina jest prebiotykiem, czyli substancją odpowiedzialną za prawidłowe funkcjonowanie flory bakteryjnej jelit oraz może być synbiotykiem w połączeniu z odpowiednimi szczepami bakterii, np. *Bacillus subtilis*. Substancja ta reguluje ukrwienie i perystaltykę jelit oraz stymuluje jelitowy układ immunologiczny [38]. Inulina jest ważnym składnikiem diety, dlatego stosuje się preparaty inulinowe w różnych typach diety, jak również w preparatach zmniejszających apetyt pacjenta. Efekt zmniejszenia łaknienia zaobserwowano podając pacjentom propionian inuliny pomiędzy posiłkami w ilościach od 100–250 mg [39]. W przemyśle farmaceu-

tycznym fruktany są stosowane jako substancje pomocnicze przy produkcji leków. W przypadku niektórych kompozycji farmaceutycznych stwierdzono działanie synergiczne składników leków przeciwnowotworowych zawierających inulinę [40]. Inulina jest składnikiem pomocniczym do produkcji maści, np. maści na opryszczkę i maści na gojenie ran.

Stwierdzono również, że związek ten zwiększa przyswajalność i stabilizuje poziom wapnia i magnezu w organizmie oraz wpływa na mineralizację kości. Zwiększona przyswajalność wapnia ma istotne znaczenie w profilaktyce i leczeniu osteoporozy jak również niedoboru magnezu wynikającego ze stresu i picia dużych ilości kawy [41–43].

PODSUMOWANIE

Słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus L.*) to w Polsce stosunkowo mało znana roślina, uprawiana amatorsko. Ze względu na niewielkie wymagania uprawy i szeroki zakres zastosowań produktów pozyskiwanych z topinamburu (głównie inuliny), należy uznać tą roślinę za perspektywiczne źródło odnawialnych surowców chemicznych. Wiele ośrodków badawczych, w tym kilka polskich, koncentruje się obecnie na rozwoju technologii wyodrębniania i przetwarzania surowców na bazie topinamburu. Na chwilę obecną Polska importuje inulinę, głównie wytwarzaną na bazie korzeni cykorii, topinamburu i agawy, gdyż nie ma w naszym kraju rozwiniętych upraw zorientowanych na produkcję inuliny, a co z tym jest związane brak jest również przetwórstwa w tym zakresie. Wzrost zapotrzebowania na tzw. żywność funkcjonalną oraz kosmetyki funkcjonalne pozwala przypuszczać, że podobnie jak w krajach zachodniej Europy i USA, również w Polsce obserwować będziemy systematyczny wzrost zainteresowania inuliną.

Obecnie, gdy coraz więcej mówi się o komercjalizacji nauki i poszukiwaniu specjalistycznych produktów na bazie tanich, łatwo dostępnych i odnawialnych surowców przy użyciu technologii przyjaznej środowisku (zielona chemia i biała biotechnologia) tematyka surowców chemicznych na bazie topinamburu wydaje się być bardzo aktualna, z uwagi na to, że światowa produkcja inuliny w 2007 roku wyniosła 350 000 Mg/rok [44] i od wielu lat wykazuje wzrastającą tendencję.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] <http://www.iop.krakow.pl/ias/gatunki/100> [data dostępu 6.04.14].
- [2] M. Roberfroid, J. Nutr., 2007, **137**, 830.
- [3] R.S. Sigh, R.P. Sigh, Food Technol. Biotechnol., 2010, **48**(4), 435.
- [4] R. Kowalski, J. Wierciński, Pol. J. Food Nut. Sci., 2004, **13**, 349.
- [5] C.V., Stevens, A. Meriggi, M. Peristeropoulou, P.P. Christov, K. Booten, B. Levecke, A. Vandamme, N. Pittevilis, T.F. Tadros, Biomacromolecules, 2001, **2**(4), 1256.
- [6] P.V. Luu, D.W. White, M.A. Sturm, Patent, US 7803746, 2010.

- [7] A.C. Apolinario, B.P. Damasceno, M.E. Beltrado, A. Passoa, A. Converti, J.A. Silva, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **101**, 368.
- [8] S.N. Ronkart, C.S. Blecker, H. Fourmanoir, C. Hougnyes, C. Deroanne, J. C van Herck, M. Paquot, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **606**, 81.
- [9] E. Milani, A. Koocheki, Q.A. Golimovahhed, *Int. J. Foot Sci. Technol.*, 2011, **46**, 1699.
- [10] B. Li, X.J. Meng, L.W. Sun, *J. Med. Plant Res.*, 2012, **6**, 876.
- [11] E. Hellwege, R. Peters, J. Pikling, Patent US 7959962, 2011.
- [12] B.H. Azis, B. Chin, M.P. Deacon, S.E. Harding, G.M. Pavlov, *Carbohydr. Polym.*, 1999, **38**, 231.
- [13] Y. Ku, O. Jansen, C.J. Oles, E.Z. Lazar, J.I. Rader, *Food Chem.*, 2003, **81**, 125.
- [14] F. Meuser, I. Bauer, E. Hellwege, J. Pilling, Patent EP 2027161, 2007.
- [15] J. Arizon, S. Mordel, A. Gschaedler, P. Monsan, *Food Chem.*, 2010, **122**, 123.
- [16] V.D. Artemyev, V.Y. Pavlovna, Patent EP 2698387, 2014.
- [17] T. Piskier, *Inżynieria Rolnicza*, 2006, **11**(86), 359.
- [18] G. Maj, W. Piekarski, T. Słowik, *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, 2013, **2**, 59.
- [19] W. Majtkowski, *Problemy Inżynierii Rolniczej*, 2006, **14**, 25.
- [20] S. Kim, C.H. Kim, *Renewable Energy*, 2014, **65**, 83.
- [21] I.B. Gunnarsson, S.E. Svensson, E. Johansson, D. Karakashev, I. Angelidaki, *Industrial Crops and Products*, 2014, **56**, 231.
- [22] M. Sung, Y.H. Seo, S. Han, J. Han, *Biosource Technol.*, 2014, **155**, 77.
- [23] H. Cei, C. Li, A. Wang, T. Zhang, *Catalysis Today*, 2014, **234**, 59.
- [24] L. Zhou, J. Pang, A. Wang, T. Zhang, *Chinese J. Catalysis*, 2013, **34**, 2041.
- [25] T. Pasephol, F. Sherkat, *J. Funct. Foods*, 2013, **1**, 311.
- [26] R. Ziobro, J. Korus, L. Juszczak, *J. Food Eng.*, 2013, **116**, 21.
- [27] A. Żbikowska, J. Rutkowska, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, **58**, 113.
- [28] K. Jędrzejkiewicz, A. Florowska, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5**(54), 346.
- [29] A.C. Ludan, Patent WO 118481, 2006.
- [30] R.P. Aidoo, F. Repypere, E.O. Efoakwa, K. Dewetinck, *Trends in Food Sci. Technol.*, 2013, **32**, 84.
- [31] P.V. Luu, D.W. White, M.A. Sturm, Patent US 7803746, 2010.
- [32] T. Keri, J. Kristof, Patent US 4855137, 1989.
- [33] F. Tesio, L.A. Weston, A. Ferrero, *Scientia Horticulturae*, 2011, **129**, 361.
- [34] L. Pan, M.R. Sinden, A.H. Kennedy, H. Chai, L.E. Watson, T.L. Graham, A.D. Kinghorn, *Phytochemistry Letters*, 2009, **2**, 15.
- [35] B. Levecké, K. Booten, Patent EP 1893170, 2008.
- [36] S. Ehrhardt, A.H. Begli, M. Kunz, L. Scheiwe, Patent US 5877144, 1999.
- [37] A. Rathjens, L. Danoux, Patent US 0191087, 2003.
- [38] E. Trafalska, K. Grzybowska, *Wiad. Lek.*, 2004, **57**(9-10), 491.
- [39] G. Frost, D. Morrison, T. Preston, Patent WO 020344, 2014.
- [40] A. Frippiant, M. Roberfroid, H. Taper, L.J. Van, Patent EP 1079840, 2002.
- [41] F. J. Vila Pahi, J. Escaich Ferrer, A.L. Verbruggen, J. Vergas Milano, R. Ruhi Roura, C.R. Alaez Ver-son, Patent WO 084610, 2005.
- [42] L.L. Legete, W. Lee, B.R. Martin, J.A. Story, J.K. Campbell, C.M. Weaver, *J. Food Sci.*, 2013, **77**(4), 88.
- [43] L. Holloway, S. Moyniham, S.A. Abrams, K. Kent, A.R. Hsu, A.L. Friedland, *British J. Nut.*, 2007, **97**, 365.
- [44] L. Monnier, M. Hanefeld, O. Schnell, C. Collete, D. Owens, *Diabetes Metab.*, 2013, **39**(2), 111.

METODA O-ACYLOIZOPEPTYDOWA W SYNTEZIE PEPTYDÓW

O-ACYL ISOPEPTIDE METHOD IN PEPTIDE SYNTHESIS

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. Strategie stosowane w syntezy peptydów o trudnych sekwencjach
2. O-Acyloizopeptydy
3. Zastosowanie metody O→N-acyloizopeptydowej w syntezy peptydów

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 Śródków 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 dwóch 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

Proteins are macromolecules that carry out most of the biochemical functions of the cell, which strongly depend on the secondary and tertiary structure, defined by the amino acid sequence of a polypeptide chain. The importance of peptides and proteins in biology and medicine inspired chemists to develop strategies for their synthesis.

The main limitation to the preparation of long peptides is their tendency to aggregation, what makes the coupling and deprotection reaction ineffective, and purification of the compounds difficult. Inter- and intramolecular interactions, hydrophobic character, the presence of multiple hydrogen bonds significantly affect the secondary structure of peptides, making further extension of the peptide chain very difficult.

Undesirable aggregation process may be disrupted by reduction of hydrophobic interactions. For this purpose, various methods are used, based on the implementation of specific modifications to the peptide chain, affecting its secondary structure. These methods include, for example, incorporation of pseudoproline building blocks [5] and proximity induced peptide ligation [6, 7].

In some cases, it is convenient to extend the amino acid side chain to form isopeptides (Fig. 1) [14–16]. Depsipeptides can be created with the natural amino acids such as cysteine, serine, threonine, tyrosine, or tryptophan. The basic requirement is the presence of β -hydroxyamino component.

The presence of a depsipeptide moiety in place of an amide bond significantly change the secondary structure of native peptide and prevents from aggregation, leading to higher yields of desired compounds [18]. In the solution phase peptide synthesis, this method is free from racemization [19]. Isodipeptide units can be successfully applied in SPPS for the synthesis of “difficult sequence”-containing peptides [19].

In this paper, many examples of effective use of *O*-acylisopeptides method in peptide synthesis are discussed.

Keywords: *O*-acyloisopeptides, *O*→*N*-migration, difficult sequence-containing peptides

Słowa kluczowe: *O*-acyloizopeptydy, *O*→*N*-migracja, peptydy zawierające trudne sekwencje

WPROWADZENIE

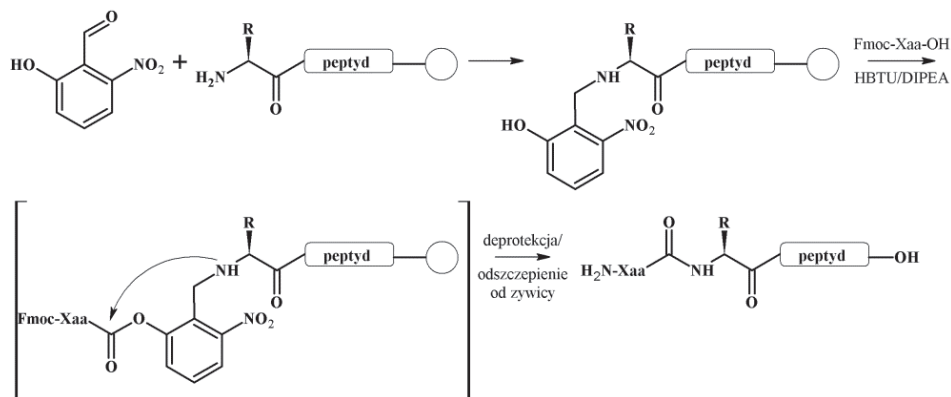
Białka to makrocząsteczki, które są odpowiedzialne za większość funkcji biochemicznych komórki. Biologiczna rola poszczególnych białek zależy ściśle od ich struktury drugo- i trzeciorzędowej, która jest zdefiniowana przez sekwencję aminokwasową łańcucha polipeptydowego. Znaczenie peptydów i białek w biologii i medycynie inspirowało chemików do rozwijania strategii ich syntezy.

Metody otrzymywania polipeptydów zostały znacznie rozszerzone w ciągu kilku ostatnich dekad [1], zwłaszcza od momentu wprowadzenia przez Merrifielda syntezy na nośniku stałym [2] oraz zastosowania syntezy automatycznej. Jednak SPPS nie może zaspokoić rosnącego zapotrzebowania na syntezę dużych polipeptydów lub białek, ponieważ najlepiej nadaje się do syntezy łańcuchów peptydowych mających mniej niż 50 reszt aminokwasowych.

Główną przeszkodą w otrzymywaniu długich peptydów jest tendencja do ich agregacji, w wyniku której reakcje sprzęgania i usuwania grup ochronnych są mało wydajne, a oczyszczanie związków jest bardzo trudne. Między- i wewnątrzcząsteczkowe interakcje, hydrofobowy charakter, obecność wielu wiązań wodorowych wpływają w znacznym stopniu na strukturę drugorzędową peptydów, utrudniając dalsze wydłużanie łańcucha peptydowego. Dlatego też synteza peptydów o trudnych sekwencjach jest ostatnio przedmiotem badań wielu zespołów [3, 4].

1. STRATEGIE STOSOWANE W SYNTEZIE PEPTYDÓW O TRUDNYCH SEKWENCJACH

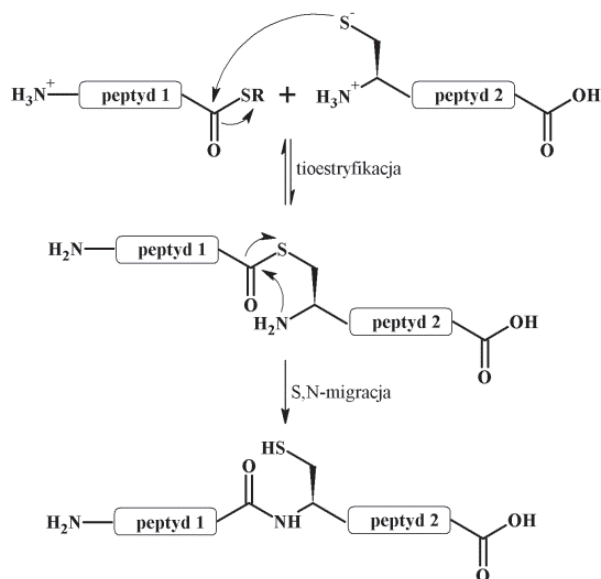
Niepożądany proces agregacji może zostać zakłócony w wyniku zmniejszenia hydrofobowych oddziaływań. Do tego celu stosowane są różne metody, polegające na wprowadzeniu konkretnych modyfikacji do łańcucha peptydowego, wpływających na jego strukturę drugorzędową. Do metod tych zaliczamy m.in. inkorporację pseudoprolinowych bloków budulcowych [5] oraz różnego typu substancji pomocniczych np. reszty 2-hydroksy-4-metoksybenzylowej (Hmb) [6]. Obecność substancji pomocniczych zakłóca strukturę drugorzędową, powstałą w wyniku oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych, co ułatwia reakcję *N*-acylowania. Metoda ta została zapoczątkowana przez Brennera i wsp. ponad 60 lat temu [7]. Ostatnio, Miranda i wsp. opisali zastosowanie pomocniczego 2-hydroksy-6-nitrobenzylu (Hnb), dla poprawy efektywności i wydajności syntezy peptydów na fazie stałej, zawierających sterycznie zawadzone aminokwasy, szczególnie β -rozgałęzione reszty [8]. W wyniku redukcyjnego alkilowania, odpowiedni benzaldehyd jest przyłączony do peptydu związanego z żywicą, a następnie wolna grupa hydroksylowa jest acylowana Fmoc-aminokwasem lub peptydem aktywowanym HBTU. *O*→*N* Migracja reszty acylowej prowadzi do utworzenia wiązania amidowego (Schemat 1).



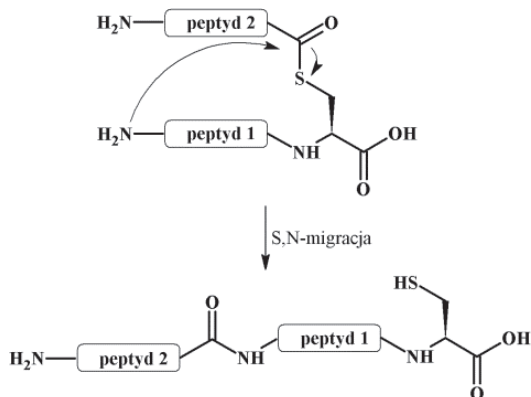
Schemat 1. Ligacja peptydu indukowana substancją pomocniczą
 Scheme 1. Proximity induced peptide ligation

Wprowadzono także strategie polegające na sprzęganiu fragmentów otrzymanych na fazie stałej i/lub w roztworze w celu ułatwienia syntezy dużych polipeptydów [9, 10]. Jedną z metod kondensacji fragmentów w roztworze, która zrewolucjonizowała syntezę peptydów jest natywna ligacja chemiczna (NCL) (Schemat 2a). Pojęcie NCL wprowadzono już w 1953 roku [11], ale metoda ta znalazła szerokie zastosowanie dopiero od 1994, kiedy to została wykorzystana w syntezie interleukiny-8, odpowiedzialnej za proliferację komórek B podczas odpowiedzi immunologicznej [12]. NCL polega na chemoselektywnym sprzęganiu dwóch fragmentów peptydowych, gdzie jeden z nich zawiera aktywowany C-terminały tioester, a drugi odblokowaną *N*-końcową resztę cysteiny. Ich połączenie prowadzi do uzyskania natywnego peptydu. Siłą napędową reakcji NCL jest większa termodynamiczna trwałość wiązania amidowego niż tioestrowego, która występuje w zakresie neutralnego pH [13]. Generalnie, NCL oznacza międzycząsteczkową ligację z udziałem dwóch cząsteczek (Schemat 2a), natomiast wewnątrzcząsteczkowa ligacja, często nazywana acylomigracją, występuje, gdy grupa acylowa migruje z *O*, *N*, *S*→*N* w izopeptydzie (Schemat 2b).

a)

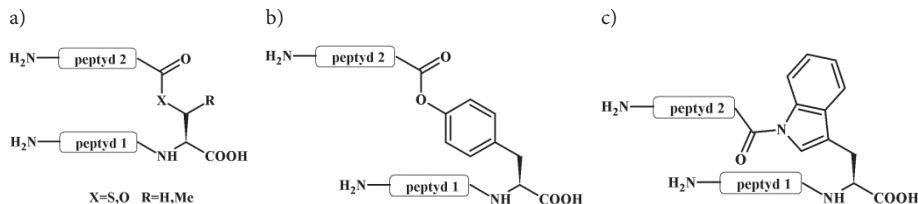


b)



Schemat 2. (a) Międzycząsteczkowa ligacja chemiczna, (b) Wewnątrzcząsteczkowa ligacja chemiczna
 Scheme 2. (a) Intermolecular chemical ligation, (b) Intramolecular chemical ligation

W przypadku kondensacji fragmentów, *N*-końcowy fragment peptydowy sprzężany jest z *C*-końcowym fragmentem, a następnie proces ten powtarzany jest aż do momentu osiągnięcia docelowego peptydu. W niektórych przypadkach, w których występuje problem z rozpuszczalnością w pełni odblokowanego natywnego peptydu lub występują problemy w efektywnym sprzężeniu segmentów, należy wykorzystać inne alternatywne metody. W takich przypadkach wygodniej jest wydłużać łańcuch boczny aminokwasu, zamiast przedłużania łańcucha głównego, tworząc izopeptydy (Rys. 1) [14]. Depsipeptydy mogą być tworzone na takich naturalnych aminokwasach jak cysteina, seryna, treonina, tyrozyna czy tryptofan. Dalsza część pracy poświęcona zostanie najczęściej stosowanym w syntezie *O*-acyloizopeptydom.

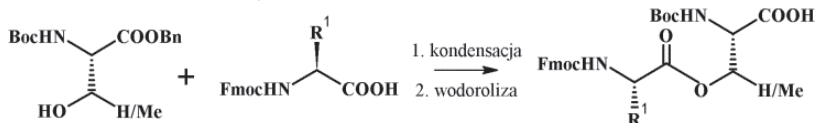


Rysunek 1. (a) Izopeptyd cysteiny/seryny/treoniny, (b) izopeptyd tyrozyny, (c) izopeptyd tryptofanu
 Figure 1. (a) Cysteine/serine/threonine isopeptide, (b) tyrosine isopeptide, (c) tryptophan isopeptide

2. O-ACYLOIZOPEPTYDY

Szybka, łatwa i nieodwracalna transformacja *O*-acyloizopeptydu do natywnego peptydu określana jest jako metoda „click” [15] lub „switch” [16]. Podstawowym wymogiem jest obecność składnika β -hydroksyaminowego. Białkowe aminokwasy Ser, Thr, Tyr i nienaturalne aminokwasowy np. Pns (kwas (2*R*,3*S*)-3-amino-2-hydroksy-4-fenylbutanowy), α -alkiloseryny spełniają ten podstawowy wymóg. W przypadku syntezy peptydów na fazie stałej, wiązanie estrowe utworzone jest pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu i grupą β -hydroksylową drugiego takiego jak np. Ser/Thr. Dalsze wydłużanie łańcucha peptydowego prowadzi się w regularny sposób. Po otrzymaniu pełnej sekwencji aminokwasowej peptyd odszczepia się od żywicy i usuwa grupę ochronną na Ser/Thr w celu uzyskania jednostki *O*-acylo-izopeptydowej, która w warunkach fizjologicznych (pH 7,4) np. w peroksyboranie(III) sodu (PBS) w temperaturze pokojowej ulega *O*→*N* wewnątrzcząsteczkowej migracji reszty acylowej. W konsekwencji otrzymuje się pożądaną peptyd [17]. Obecność ugrupowania depsiptydowego w miejscu wiązania amidowego nie powoduje tworzenia niepożądanych pofałdowań struktury drugorzędowej, które mogłyby prowadzić do agregacji.

Kiso i in. [18] wykazali że obecność reszt *O*-acylowych znacząco zmienia strukturę drugorzędową natywnego peptydu. *O*-Acyloizopeptydy są bardziej hydrofilowe i łatwiejsze do oczyszczenia metodą HPLC, niż odpowiadające im macierzyste peptydy. W tym samym zespole otrzymana została biblioteka 40 jednostek *O*-acyloizodipeptydowych o ogólnej strukturze Boc-Ser/Thr(Fmoc-AA)-OH (Schemat 3). Autorzy oznaczyli czystość enancjomeryczną otrzymanych depsiptydów metodą HPLC przez porównanie z wzorcami Boc-Ser/Thr(Fmoc-D-Xaa)-OH [19]. Badania wykazały, że metoda *O*-acyloizopeptydowa, w przypadku syntezy w roztworze, jest metodą wolną od racemizacji.

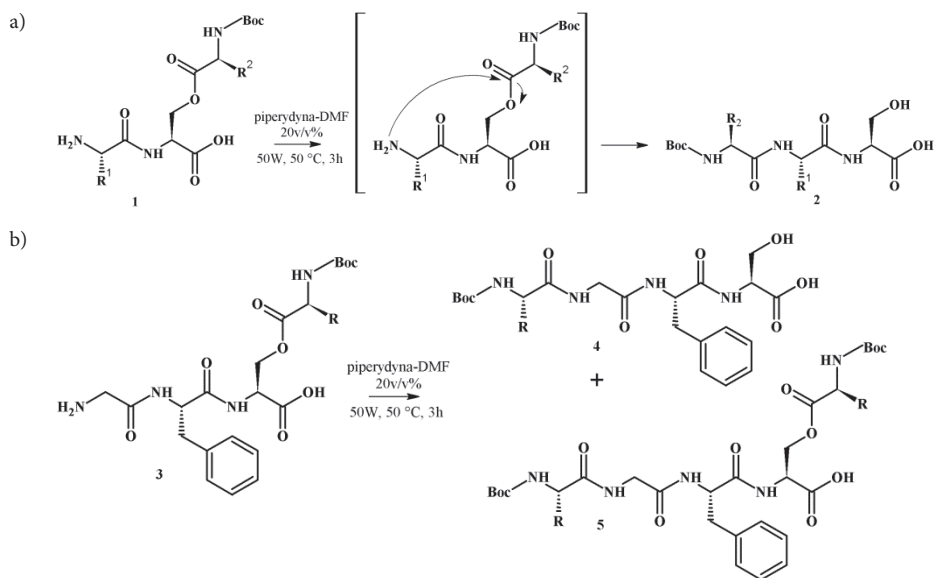


Schemat 3. Synteza jednostek *O*-acyloizopeptydowych [Boc-Ser/Thr(FmocXaa)-OH]
 Scheme 3. Synthesis of *O*-acyl isopeptide units [Boc-Ser/Thr(FmocXaa)-OH]

N-Końcowe izopeptydy serynowe szybko generują odpowiadające im natywne peptydy przez *O*→*N* wewnątrzcząsteczkową migrację reszty acylowej przez 5-cio członowy stan pośredni [20]. Zaobserwowano również klasyczne przesunięcie *O*→*N* reszty acylowej poprzez 8- i 11-członowe cykliczne stany przejściowe [21].

O→*N* Migrację w *O*-acyloizopeptydach (**1** i **3**) można prowadzić w bezwodnych warunkach w celu uniknięcia hydrolizy estru, w mieszaninie piperydyna-DMF (20% v/v), przy wspomaganiu promieniowania mikrofalowego w 50°C, MW 50W, 1 h (Schemat 4). Za pomocą metody HPLC-MS potwierdzono powstawanie pożądaných wewnątrzcząsteczkowych produktów ligacji (odpowiednio **2** i **4**), a także produktu *bis*-acylowania **5**, powstałych przez 8- i 11-członowe stany przejściowe.

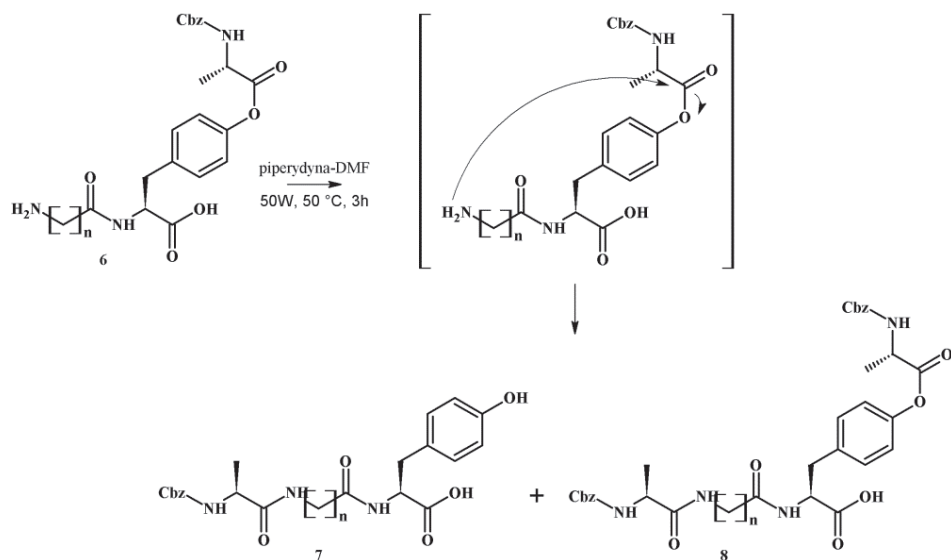
Ligacja związku **3** została zbadana również w warunkach wodnych (pH = 7,6, stężenie buforu 1 M, MW 50°C, 50 W, 1 h). Wyniki analizy HPLC-MS wskazywały na obecność tylko niewielkiej ilości produktu ligacji **4**, główny pik odpowiadał masie związku **3**, pozbawionego grupy Boc.



Schemat 4. Ligacja chemiczna izopeptydów seryny *via*: (a) 8-członowy stan przejściowy, (b) 11-członowy stan przejściowy

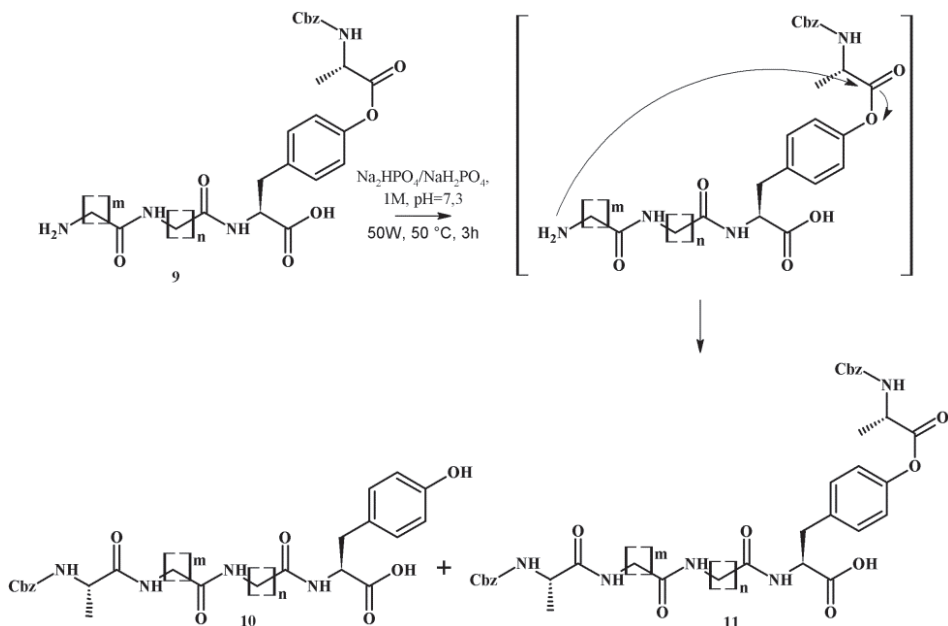
Scheme 4. Chemical ligation of serine isopeptide *via*: (a) 8-membered transition state, (b) 11-membered transition state

Izopeptyd tyrozyny **6** ($n = 1-3$) służył jak narzędzie do badania ligacji poprzez 12-14-członowe cykliczne stany przejściowe (Schemat 5).

Schemat 5. Ligacja chemiczna izopeptydu tyrozyny **6**Scheme 5. Chemical ligation of tyrosine isopeptide **6**

Próby ligacji izopeptydu tyrozyny **6** w warunkach wodnych zakończyły się niepowodzeniem. Jednakże, gdy reakcję prowadzono w warunkach promieniowania mikrofalowego (pH 7,3, stężenie buforu 1M, MW 50°C, 50 W, 3 h) (Schemat 5) otrzymano produkt wewnątrzcząsteczkowej O→N-acylomigracji **7** (85%), zanieczyszczony *bis*-acylowanym związkiem **8** (10%) oraz nieprzereagowanym substratem **6** (5%). Wyniki wskazują, że O→N-acylomigracja poprzez 12- i 14-członowe cykliczne stany przejściowe jest bardziej preferowana niż międzycząsteczkowe acylowania przebiegające poprzez 13-członowe cykliczne stany przejściowe.

Izopeptyd **9** ($m = 1-3$, $n = 1-3$) został wykorzystany do badania O→N wewnątrzcząsteczkowej migracji poprzez 15-19-członowe cykliczne stany przejściowe (Schemat 6) [22].

Schemat 6. Ligacja chemiczna izopeptydu tyrozyny **9**Scheme 6. Chemical ligation of tyrosine isopeptide **9**

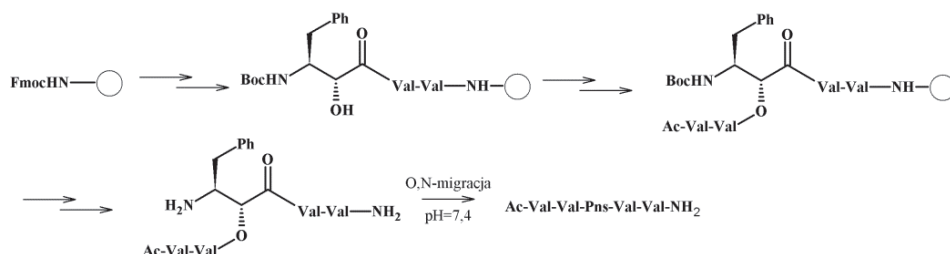
W środowisku wodnym (pH = 7,3), 12-, 13- i 14-członowe stany przejściowe nie prowadzą do produktów ligacji [23]. Wykazano, że w mieszaninie piperydyna-DMF, atakujący nukleofil jest całkowicie deprotonowany, a ligacja zachodzi z wysokimi wydajnościami sięgającymi 97%.

Ligacja izotetrapeptydu tyrozyny **9** w warunkach wodnych prowadzi do otrzymania oczekiwanego produktu ligacji **10** (87–100%, Schemat 6), któremu towarzyszyły nieznaczne ilości produktów międzycząsteczkowego *bis*-acylowania **11** oraz śladowe ilości nieprzereagowanego substratu **9**.

3. ZASTOSOWANIE METODY $O \rightarrow N$ -ACYLOIZOPEPTYDOWEJ W SYNTEZIE PEPTYDÓW

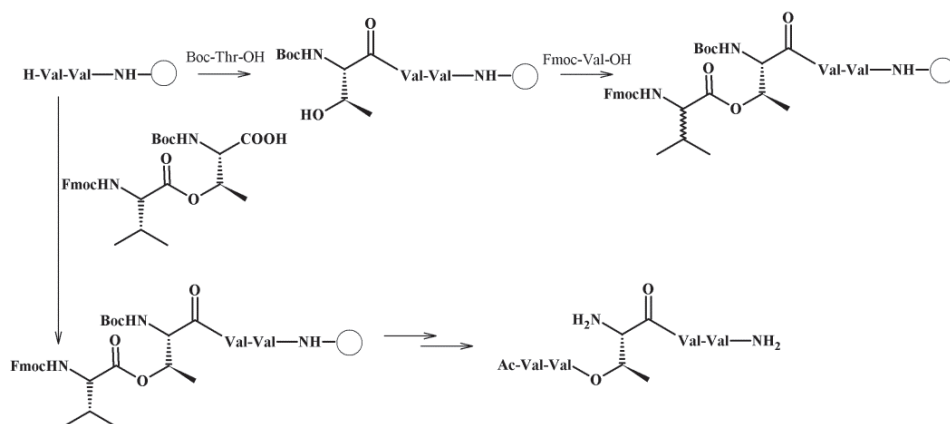
Podczas badań nad prolekami przeciwnowotworowymi paklitakselem i docetakselem, Kiso i in. stwierdzili, że obecność reszty *O*-acylowej zamiast *N*-acylowej, zwiększa rozpuszczalność produktu pośredniego. W łatwy sposób otrzymali depsi-peptyd, który w końcowym etapie poddali $O \rightarrow N$ -wewnątrzcząsteczkowej migracji otrzymując zaprojektowany związek [24, 25]. Wyniki te zostały poparte obserwacjami Fujii i wsp., którzy poprzez $O \rightarrow N$ -migrację otrzymali izoestry dipeptydów z grupą hydroksyetyloaminową (HDIs). Peptydomimetyki te wykorzystywane są w syntezie inhibitorów β -sekreazy [26].

Użycie tej metody pozwoliło otrzymać pentapeptyd Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂ [27]. W przypadku zastosowania standardowej procedury wydłużania łańcucha peptydowego, Kiso i wsp. otrzymali mieszaninę związków, a oczyszczanie peptydu przy użyciu HPLC okazało się niezwykle problematyczne ze względu na słabą rozpuszczalność. Zaprojektowany peptyd wyodrębnili z bardzo słabą wydajnością (6,9%). Zastosowanie metody *O*-acyloizopeptydowej podniosło wydajność do 57,6% (Schemat 7).



Schemat 7. Synteza pentapeptydu Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂ przy wykorzystaniu metody *O*-acyloizopeptydowej
Scheme 7. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of pentapeptide Ac-Val-Val-Pns-Val-Val-NH₂

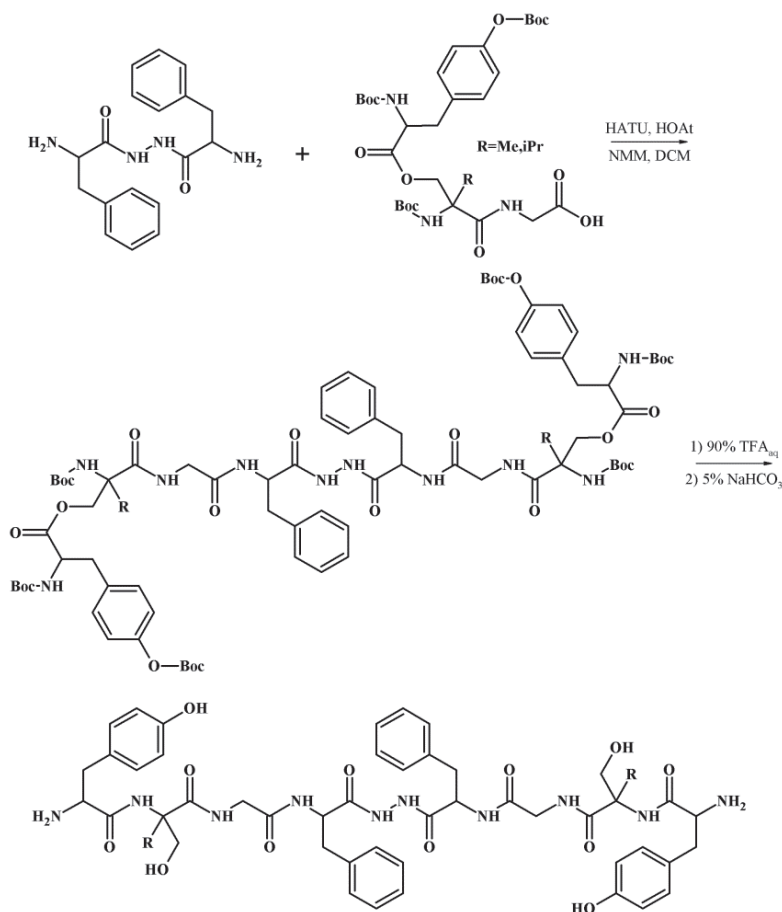
Boc-Pns-OH sprzęgano do dipeptydylożywicy, a następnie acylowanie grupy β -hydroksylowej Boc-Pns przeprowadzono stosując Fmoc-Val. Po otrzymaniu pożądananej sekwencji, grupę Fmoc usunięto i wolną grupę aminową zacetylowano. Po odszczepieniu od żywicy i usunięciu grupy Boc otrzymano depsiptyd o 100% czystości HPLC, który był ok. 500-krotnie lepiej rozpuszczalny w wodzie niż natywny peptyd. Związek przechowywany był w 4°C przez okres 1 miesiąca bez degradacji. Izopeptyd poddano migracji (< 5 minut) w PBS o pH = 7,4, stężeniu 1 mg/ml.



Schemat 8. Synteza pentapeptydu Ac-ValValThrValVal-NH₂ przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
Scheme 8. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of Ac-ValValThrValVal-NH₂

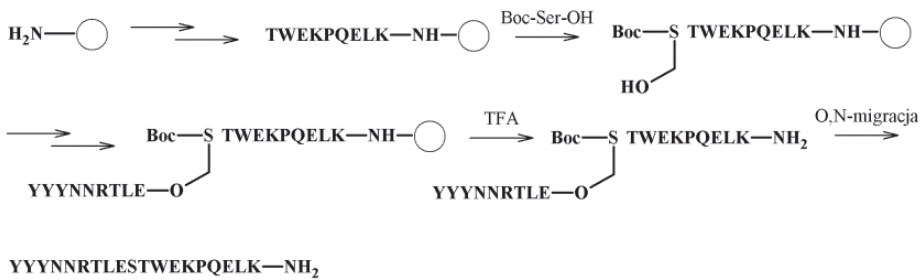
Podczas syntezy metodą $O \rightarrow N$ -acyloizopeptydową Ac-Val-Val-Thr-Val-Val-NH₂, Kiso i in. zaobserwowali powstawanie niepożądanego epimeru izopeptydu, Thr(Ac-Val-D-Val)Val-Val-NH₂ x TFA (około 21%), obok peptydu o pożądanej sekwencji [28]. Racemizacja Val spowodowana była małą szybkością estryfikacji na fazie stałej. Autorzy opracowali nową strategię, pozwalającą uniknąć epimeryzacji. Depsipeptyd Boc-Ser/Thr(Fmoc-Xaa-OH) otrzymali w roztworze i następnie wykorzystali w SPPS (Schemat 8).

Także analogi Leu-enkefaliny zawierające α -podstawione seryny w miejscu glicyny w pozycji 2 zostały otrzymane przy wykorzystaniu metody depsipeptydowej z wysokimi wydajnościami [29]. W przypadku klasycznej syntezy, ze względu na dużą zawadę przestrzenną dipodstawionych aminokwasów, co utrudnia acylowanie ich funkcji aminowej, pożądane produkty otrzymuje się z dużo niższymi wydajnościami. Identyczne podejście wykorzystano do syntezy analogów bifaliny, modyfikowanej w pozycjach 2, 2' (*R*)- lub (*S*)- α -metylo(izopropilo)seryną (Schemat 9) [30].



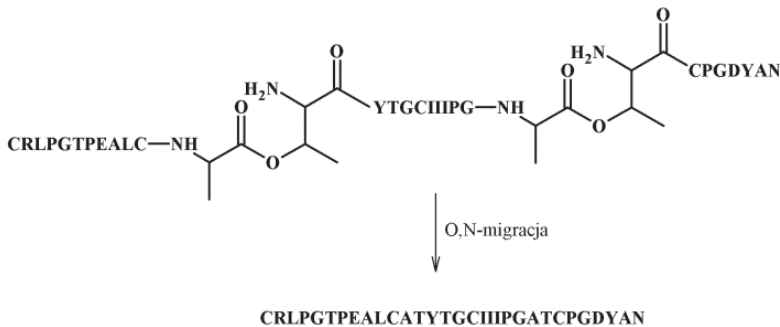
Schemat 9. Synteza analogów bifaliny przy wykorzystaniu metody O -acyloizopeptydowej
 Scheme 9. O -Acyl isopeptide method for the synthesis of biphalin analogs

Carpino i in. wykorzystali metodę depsiptydową do syntezy 37-aminokwasowej domeny WW FBP28, która przyjmuje formę trzyniciowej antyrównoległej β -kartki [31]. Nawet krótki fragment tego peptydu Y¹⁹-K³⁷ uznawany jest za niezwykle trudny w syntezie. Wprowadzenie wiązania depsiptydowego w pozycji E²⁷-S²⁸ rozwiązało problemy z agregacją, a po etapie migracji peptyd otrzymano z wysoką wydajnością, porównywalną do tej uzyskanej strategią pseudoprolinową (Schemat 10). Po wbudowaniu Boc-Ser-OH funkcja hydroksylowa Ser acylowana była Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, w obecności *N*-metyloimidazolu (NMI). Pozostałe aminokwasy przyłączano standardowo. Powstały depsiptyd odszczepiono od żywicy przy użyciu kwasu trifluorooctowego (TFA) i poddano *O*→*N* migracji. Obecność pożądanego produktu potwierdzono za pomocą spektrometrii mas.



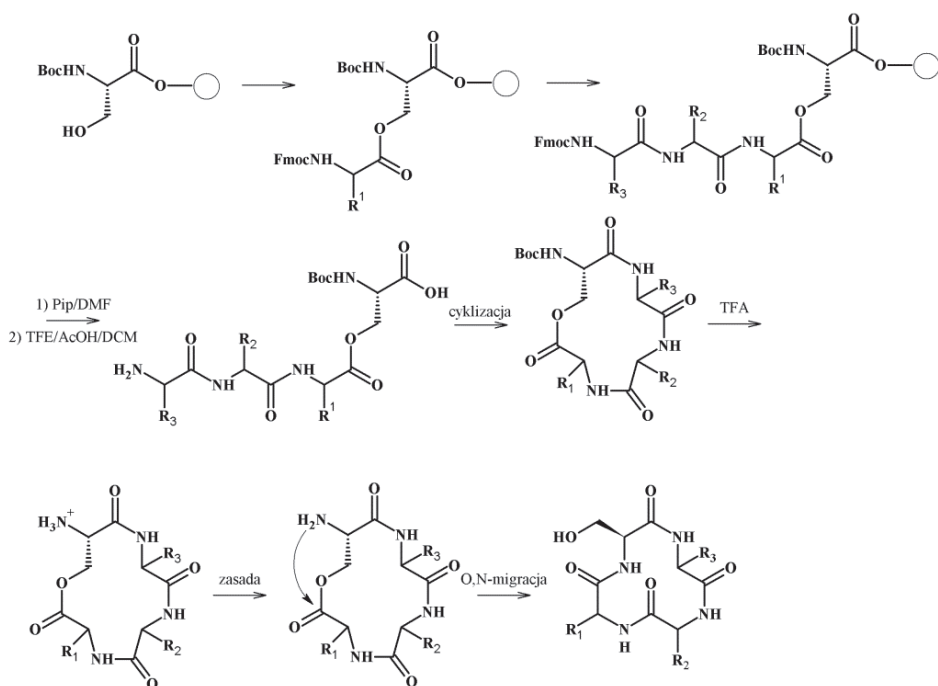
Schemat 10. Synteza fragmentu domeny WW FBP28 przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
Scheme 10. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of FBP28 WW domain fragment

Carpino i wsp. użyli jednostek depsiptydowych w automatycznej syntezie izopeptydów [31]. To pozwala uniknąć *O*-acylowania na żywicy, które jest niewygodne i podatne na racemizację. Otrzymany depsiptyd Boc-Thr(Fmoc-Ala)-OH wykorzystano w zautomatyzowanej syntezie 31-meru C-terminalego fragmentu krabiny (Schemat 11). Podczas syntezy fragmentu 16–46, depsiptyd wprowadzono w pozycję 27–28 i 38–39. W końcowym etapie przeprowadzono *O*→*N* migrację otrzymując zaprojektowany fragment 16–46 krabiny.



Schemat 11. Synteza fragmentu krabiny przy wykorzystaniu metody *O*-acylo izopeptydowej
Scheme 11. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of crambin fragment

Strategię *O*-acyloizopeptydową, wolną od racemizacji, wykorzystano do syntezy wielu peptydów, w tym A β 1-42 [32]. Skuteczność stosowania metody izopeptydowej potwierdzono w syntezie peptydów amyloidowych [33], które są składnikami złogów amyloidowych w mózgu u pacjentów z chorobą Alzheimera. Peptyd A β 1-42 jest uważany za jeden z najtrudniejszych peptydów do syntezy. Skłonność do ulegania agregacji uniemożliwia przeprowadzenie wielu badań biologicznych. Trudności te zostały przezwyciężone przez opracowanie metody umożliwiającej dostarczenie peptydu do odpowiedniego celu biologicznego w monomerycznej formie. Otrzymany metodą *O*-acyloizopeptydową, rozpuszczalny w wodzie depsipeptyd, analog A β 1-42 w warunkach fizjologicznych przekształcał się do odpowiedniego peptydu. Wiązanie estrowe wprowadzono pomiędzy Gly²⁵ i Ser²⁶, pozostałą sekwencję zsyntezowano stosując standardowe protokoły. Po odszczepieniu od żywicy, a następnie deprotekcji grupy Boc-Ser²⁶, otrzymany *O*-acyloizopeptyd A β 1-42 był z łatwością oczyszczony metodą HPLC.



Schemat 12. Synteza cyklicznych peptydów przy wykorzystaniu metody *O*-acyloizopeptydowej
Scheme 12. *O*-Acyl isopeptide method for the synthesis of cyclic peptides

Topologia makrocyklicznych peptydów zmniejsza ich podatność na atak egzozymaz i endopeptydaz. Dlatego cykliczne peptydy są atrakcyjnym przedmiotem badań w chemii leków. Wankomycyna, cyklosporyna, oksytocyny i wazopresyny są dobrze znanymi cyklicznymi lekami peptydowymi [34]. W zależności od posiadanych grup funkcyjnych, peptyd może być cyklizowany na cztery sposoby: głowa do ogona

(C-koniec do *N*-końca), głowa-łańcuch boczny, łańcuch boczny-ogon lub łańcuch boczny-łańcuch boczny.

Amblard i wsp. opisali syntezę cyklicznego peptydu przy wykorzystaniu cyklizacji głowa-ogon [35]. Liniowy depsiptyd zawierający resztę seryny został otrzymany na fazie stałej. Po usunięciu z żywicy, przeprowadzono wewnątrzcząsteczkową cyklizację przez aktywację *C*-terminalnej *O*-acyloseryny. Po odblokowaniu funkcji aminowej seryny przeprowadzono *O*→*N*-migrację w cyklicznym depsiptydzie otrzymując cykliczny peptyd (Schemat 12).

PODSUMOWANIE

Ligacja peptydów przy użyciu metody *O*-acyloizopeptydowej, zbliżonej pod wieloma względami do metody pseudoprolinowej, posiada wiele zalet, m.in.:

- lepsza rozpuszczalność izopeptydów w wodzie, ze względu na obecność dodatkowej protonowanej grupy aminowej, co ułatwia ich oczyszczanie,
- stabilność acyloizopeptydów w obojętnych lub słabo zasadowych warunkach, w postaci roztworu w DMSO lub w postaci stałej po liofilizacji,
- *O*-*N*-acylomigracja zachodzi ilościowo w krótkim okresie czasu w łagodnych warunkach zasadowych,
- obecność wiązania depsiptydowego zapobiega niepożądanym agregacji,
- większe wydajności deprotekcji i sprzęgania w syntezie SPPS spowodowane obecnością jednostki *O*-acyloizopeptydowej,
- możliwość ligacji chemicznej przy użyciu białkowych aminokwasów takich jak cysteina, seryna, tyrozyna i tryptofan.

Metoda ta umożliwia otrzymanie z wysokimi wydajnościami peptydów o trudnych sekwencjach zawierających sterycznie zawadzone aminokwasy, cyklicznych peptydów, długich peptydów posiadających tendencję do agregacji. Zalety metody acyloizopeptydowej sprawiają, że coraz częściej metoda ta jest „metodą z wyboru” w syntezie peptydów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V. Muralidharan, T. Muir, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 429.
- [2] (a) R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149; b) S. Kent, *Biopolymers*, 2010, **94**, 4.
- [3] (a) L. Carpino, E. Krause, C. Sferdean, M. Schumann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 7519; (b) W. Meuterms, S. Golding, G. Bourne, L. Miranda, M. Dooley, P. Alewood, M. Smythe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 9790.
- [4] S. Panda, C. Hall, A. Oliferenko, A. Katritzky, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1076.
- [5] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9218.
- [6] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 369.

- [7] M. Brenner, J. Zimmermann, J. Wehrmuller, P. Quitt, A. Hartmann, W. Schneider, U. Beglinger, *Helv. Chim. Acta*, 1957, **40**, 1497.
- [8] L. Miranda, W. Meutermans, M. Smythe, P. Alewood, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 5460.
- [9] (a) V. Pattabiraman, J. Bode, *Nature*, 2011, **480**, 471; (b) C. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 10030.
- [10] (a) J. Monbaliu, A. Katritzky, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11601; (b) L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melny, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 7001.
- [11] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. Lang, H. Lau, W. Schafer, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1953, **583**, 129.
- [12] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science*, 1994, **266**, 776.
- [13] S. Kent, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 338.
- [14] P. Geurink, F. Oualid, A. Jonker, D. Hameed, H. Ovaa, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 293.
- [15] (a) Y. Sohma, Y. Kiso, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1549; (b) M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Noguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 2542.
- [16] (a) M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucedo, G. Tuchscherer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 4172; (b) J. Hentschel, E. Krause, H. Borner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7722.
- [17] (a) Y. Sohma, Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, M. Sasaki, T. Kimura, Y. Kiso, *Biopolymers*, 2004, **76**, 344; (b) H. Wang, T. Kakizawa, A. Taniguchi, T. Mizuguchi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 4881.
- [18] Y. Sohma, T. Yoshiya, A. Taniguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Biopolymers*, 2007, **88**, 253.
- [19] T. Yoshiya, A. Taniguchi, Y. Sohma, F. Fukao, S. Nakamura, N. Abe, N. Ito, M. Skwarczynski, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1720.
- [20] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.*, 2004, 124.
- [21] M. El Khatib, M. Elagawany, F. Jabeen, E. Todadze, O. Bol'shakov, L. Khelashvili, S. El-Feky, A. Asiri, A. Katritzky, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 4836.
- [22] V. Popov, S. Panda, A. Katritzky, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7455.
- [23] S. Panda, A. Oliferenko, H. Marwani, A. Katritzky, *Mendeleev Commun.*, 2014, **24**, 75.
- [24] (a) M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Noguchi, M. Kimura, Y. Hayashi, Y. Hamada, T. Kimura, Y. Kiso, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 2655; (b) Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Kiso, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 3782.
- [25] M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Kimura, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 4441.
- [26] H. Tamamura, T. Hori, A. Otaka, N. Fujii, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 577.
- [27] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.*, 2004, 124.
- [28] Y. Sohma, A. Taniguchi, M. Skwarczynski, T. Yoshiya, F. Fukao, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3013.
- [29] M. Horikawa, Y. Shigeri, N. Yumoto, S. Yoshikawa, T. Nakajima, Y. Ohfuné, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 2027.
- [30] O. Frączak, A. Lasota, A. Leśniak, A. Lipkowski, A. Olma, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2014, DOI: 10.1111/cbdd.12305
- [31] I. Coin, R. Dolling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. Sferdean, L. Carpino, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 6171.
- [32] (a) A. Taniguchi, T. Yoshiya, N. Abe, F. Fukao, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Pept. Sci.*, 2007, **13**, 868; (b) Y. Sohma, A. Taniguchi, T. Yoshiya, Y. Chiymori, F. Fukao, S. Nakamura, M. Skwarczynski, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, Y. Kiso, *J. Pept. Sci.*, 2006, **12**, 823.

-
- [33] Y. Sohma, Y. Chiyomori, M. Kimura, F. Fukao, A. Taniguchi, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Bio-org. Med. Chem.*, 2005, **13**, 6167.
- [34] C. White, A. Yudin, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 509.
- [35] J. Lécaillon, P. Gilles, G. Subra, J. Martinez, M. Amblard, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4674.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lipca 2014

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.



Międzynarodowy Kongres Młodych Chemików „YoungChem2014” jest dwunastą już edycją cieszącą się dużym powodzeniem wydarzenia, organizowanego, co roku przez studentów Politechniki Warszawskiej. Członkowie Chemicznego Koła Naukowego „Flogiston” starają się, aby YoungChem znajdował się w pierwszej lidze konferencji chemicznych w Europie. Od samego początku Kongres Młodych Chemików jest wydarzeniem organizowanym przez studentów i dla studentów (w tym magistrantów, doktorantów, doktorów, itp.). Jego głównym celem jest stworzenie okazji dla młodych i ambitnych naukowców do zaprezentowania przez międzynarodową publiczność obszaru ich badań, do uczestnictwa w wykładach prowadzonych przez znanych i szanowanych profesorów, do spotkania z przedstawicielami wielu firm przemysłu chemicznego oraz oczywiście do integracji. Od 2003 YoungChem ewoluował od skromnego kongresu dla studentów z Polski i sąsiednich krajów przez Europejski Kongres do międzynarodowej konferencji, która każdego roku przyciąga ponad 110 uczestników z 25 krajów z całego świata. Tegoroczna edycja Międzynarodowego Kongresu Młodych Chemików „YoungChem2014” odbędzie się **w dniach 08.10–12.10. w Szczecinie**. Jest to wspaniała okazja, do zawarcia nowych przyjaźni, międzynarodowych wymian studenckich oraz promocji badań naukowych. Gośćmi tegorocznej konferencji będą m.in. prof. Lee Cronin z Uniwersytetu Glasgow, prof. Sijbren Otto z Uniwersytetu Groningen, prof. Jorge Gascon z Uniwersyteku Zaragoza, prof. Steve Liddle z Uniwersytetu Nottingham oraz prof. Joachim Thiem pracujący na Uniwersytecie w Hamburgu. W związku z tym, że 2014 rok jest Międzynarodowym Rokiem Krystalografii zaprosiliśmy także prof. Marię Gdaniec, która jest przewodniczącą Komitetu Krystalografii PAN. Pełni także funkcję kierownika Zakładu Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tematyka wystąpień prezentowanych w trakcie Konferencji Młodych Chemików YoungChem obejmuje różnorakie dziedziny chemii m.in: krystalografię, chemię analityczną i środowiskową, chemię fizyczną, metaloorganiczną, nieorganiczną, syntezę i katalizę organiczną oraz nanotechnologię. Szczegółowe informacje dotyczące tegorocznej konferencji znajdują się na stronie internetowej: youngchem.com

12th Young Chem

INTERNATIONAL CONGRESS OF YOUNG CHEMISTS
8TH - 12TH OCTOBER 2014
SZCZECIN, POLAND

WE WELCOME AND INVITE ALL YOUNG CHEMISTS TO THE 12TH EDITION OF THE INTERNATIONAL CONGRESS OF YOUNG CHEMISTS

PROF. LEE CRONIN
UNIVERSITY OF GLASGOW

PROF. JOACHIM THIEM
UNIVERSITY OF HAMBURG

PROF. SJIBREN OTTO
UNIVERSITY OF GRONINGEN

PROF. STEPHEN LIDDLE
NOTTINGHAM UNIVERSITY

PROF. JORGE GASCON
DELFT UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

PROF. MARIA GDANIEC
ADAM MICKIEWICZ UNIVERSITY

PROF. MASAHIRO YAMASHITA
TOHOKU UNIVERSITY

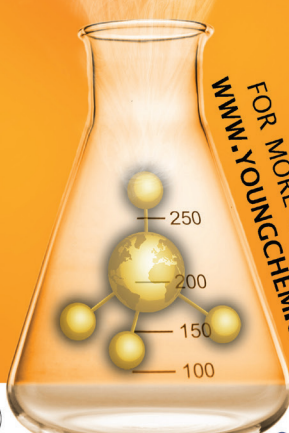
THE CONFERENCE FEE OF 250€ INCLUDES:
4 NIGHTS IN *** HOTEL IN SZCZECIN CITY
CONFERENCE MATERIALS • SIGHTSEEING TRIP
FULL MEAL AND BANQUET

ORAL PRESENTATIONS IN 5 CATEGORIES:

- ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY
- BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY
- ORGANOMETALLIC CHEMISTRY AND MATERIAL SCIENCE
- SUPRAMOLECULAR CHEMISTRY AND NANOTECHNOLOGY
- ORGANIC SYNTHESIS AND CATALYSIS

POSTER SESSIONS

FOR MORE INFO VISIT:
WWW.YOUNGCHEM.COM



ORGANIZATOR



CHEMICAL SCIENTIFIC SOCIETY "FLOGISTON",
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMISTRY,
NOAKOWSKIEGO ST. 3/301,
00-664 WARSAW,
TEL/FAX: +48 22 284 78 03
MAIL: YOUNGCHEM2014@GMAIL.COM

SPONSORS

WIADOMOŚCI
chemiczne

Thieme



SPRAWOZDANIE Z VIII KOPERNIKAŃSKIEGO SEMINARIUM DOKTORANCKIEGO



W dniach 25–27 czerwca 2014 w Chomiąży Szlacheckiej k. Żnina w ośrodku „Gród Piasta” odbyło się VIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, organizowane przez Wydział Chemii UMK.

W Seminarium udział wzięło 112 doktorantów reprezentujących nauki chemiczne, biologiczne, medyczne, fizyczne oraz techniczne. Podczas 3-dniowego seminarium zostało wygłoszonych 68 wystąpień naukowych i zaprezentowano 89 posterów. Łącznie Jury przyznało 16 nagród za najlepsze komunikaty ustne i postery. Sponsor Generalny konferencji PerkinElmer przyznał dodatkowo 3 nagrody rzeczowe i 1 wyróżnienie. Przybyli do nas doktoranci z Uczelni oraz Jednostek Badawczych z całej Polski.

Przybyłych Gości przywitał Dziekan WCh UMK – Prof. dr hab. Edward Szłyk, po którym wystąpili Przedstawiciele Władz Miasta Żnina i Gminy Gąsawa. Następnie Uczestnicy wzięli udział w wykładzie inauguracyjnym „Nanostruktury hybrydowe: od pytań podstawowych do zastosowań w fotowoltaice, konwersji energii i sensoryce” zaprezentowanym przez honorowego gościa prof. UMK dr hab. Sebastiana Maćkowskiego z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UMK w Toruniu. Po wykładzie prezentację „Usługi badawcze w badaniach naukowych” przedstawił Kierownik Pracowni Analiz Instrumentalnych Wydziału Chemii UMK dr Grzegorz Trykowski. Następnie zaprezentowali się przedstawiciele firmy PerkinElmer – Sponsora Generalnego konferencji oraz firmy Alchem.

W ramach programu integracyjnego pierwszego dnia konferencji Doktoranci uczestniczyli w uroczystej kolacji oraz pokazie Teatru Ognia na plaży nad Jeziorem Chomiąskim. Drugiego dnia Seminarium, w ramach integracji Uczestnicy ujawnili swoje talenty wokalne podczas wieczorku karaoke, połączonego z konsumpcją tradycyjnych potraw z grilla. Tego samego wieczora zapłonęło także ognisko. Ostatniego dnia wręczono nagrody i wyróżnienia.

Nagrodzono komunikaty wygłoszone przez Piotra Sosnowskiego, Macieja Malinowskiego, Kornelię Kadac, Justynę Pers, Martę Hetman oraz Tatianę Guellard. Dla Anny Motyl, Anny Filipiak-Szok, Judyty Rećko, Karoliny Kaczmarskiej, Macieja Koźlika, Aleksandry Augustyniak oraz Mateusza Raźny zostały przyznane nagrody za najlepsze prezentacje posterowe. Wśród osób wyróżnionych za najlepszą prezentację ustną i posterową znaleźli się Adriana Przerwa, Krzysztof Karpiński oraz Dawid Mikulski. Nagrody od firmy PerkinElmer odebrali Bartłomiej Fedorczyk,

Magdalena Bisztyga i Kamila Duś-Szachniewicz, zaś wyróżnienie zdobył Damian Gromowski.

Organizatorzy pragną złożyć serdeczne podziękowania J.M. Rektorowi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika - prof. dr hab. Andrzejowi Tretynowi, Dziekanowi Wydziału Chemii UMK - prof. dr hab. Edwardowi Szłykowi, PTChem Oddziałowi Toruńskiemu, SITPChem, Marszałkowi Województwa Kujawsko-Pomorskiego - Piotrowi Całbeckiemu, Prezydentowi Miasta Torunia - Michałowi Zaleskiemu, Wójtowi Gminy Gąsawa - Zdzisławowi Kuczma, Burmistrzowi Miasta Żnina - Leszkowi Jakubowskiemu, Staroście Żnińskiemu - Zbigniewowi Jaszczukowi, Samorządowi Doktorantów UMK, Stowarzyszeniu na Rzecz Rozwoju WCh, Sponsorowi Generalnemu firmie PerkinElmer, Zakładowi Produkcyjnemu Marwit, Grupie Polpharma, firmom Alchem Grupa Sp. z o.o., FOSS, LGC Standards, Linegal Chemicals Sp. z o.o., LipoPharm.pl hplc.com.pl, MERCK, StatSoft, Nestle oraz SHIM-POL A.M. Borzymowski za wsparcie konferencji i ufundowanie nagród. Szczególne podziękowania składamy również Patronom Honorowym oraz Medialnym, w tym Wiadomościom Chemicznym.

Profesor Szłyk wraz z organizatorami pragnie serdecznie podziękować Jurorom: dr hab. Urszuli Kielkowskiej, dr Marzannie Kurzawie i dr Marcinowi Cichoszowi (nauki chemiczne), dr hab. Grażynie Dąbrowskiej, dr Joannie Czarneckiej oraz dr Andrzejowi Wiśniewskiemu (nauki biologiczne i medyczne), a także dr Annie Zawadzkiej, prof. dr hab. Stanisławowi Koterowi i dr Przemysławowi Płóciennikowi (nauki fizyczne i techniczne) za pracę nad oceną wystąpień doktorantów.

Po konferencji młodzi adepci nauki mają możliwość zaprezentowania wyników swoich badań na łamach piątego zeszytu z serii Copernican Letters. Organizatorzy serdecznie zapraszają do wzięcia udziału w IX Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim w dniach 24–26 czerwca 2015 roku.

mgr Marta Plaskacz-Dziuba
Wydział Chemii UMK w Toruniu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. 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 substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

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

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

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

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

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

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

REGULAMIN 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 „Wiadomości 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 autorów 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

Michał GŁADYSZ, Jan MILECKI: Zastosowania „click chemistry” w modyfikacjach nukleozydów i oligonukleotydydów	617
Beata SWINAREW, Andrzej Szymon SWINAREW: MALDI – metoda do zastosowań w analizie strukturalnej polimerów	645
Ilona BACHANEK, Marian CZAUDERNA: Izoflawony – struktura, aktywność biologiczna oraz metody oznaczania przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej	663
Hanna PIŃKOWSKA, Adrianna ZŁOCIŃSKA: Pektyny – występowanie, budowa chemiczna i właściwości	685
Magda ANIOŁOWSKA, Agnieszka KITA: Estry kwasów tłuszczowych glicydołu oraz estry kwasów tłuszczowych mono-3-chloropropan-1,2-diolu – nowe zanieczyszczenia w olejach jadalnych	703
Marek CHYC, Jan OGONOWSKI: Słonecznik bulwiasty źródłem cennych surowców dla przemysłu, szczególnie spożywczego, kosmetycznego i farmaceutycznego	721
Oliwia FRĄCZAK, Aleksandra OLMA: Metoda O-acyloizopeptydowa w syntezie peptydów	735
Informacje	753

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAZĄ SIĘ:

Monika BAKIERSKA, Agnieszka CHOJNACKA: Akumulatory litowe jako współczesne systemy magazynowania energii	
Marta Agnieszka Molenda: Syntetyczne odpowiedniki fosfoenolopirogronianu, czyli jak naśladować biosyntezę kwasów ulozonowych	
Artur Jarema WÓJCIK: Wielowarstwowe filmy polimerowe otrzymanywane metodą LbL – warstwa po warstwie (ang. <i>Layer-by-layer</i>): rozwój i zastosowanie	
Joanna CZULAK, Andrzej TROCHIMCZUK, Anna JAKUBIAK-MARCINKOWSKA: Polimery z odciskiem molekularnym jako biomimetyki metaloenzymów	