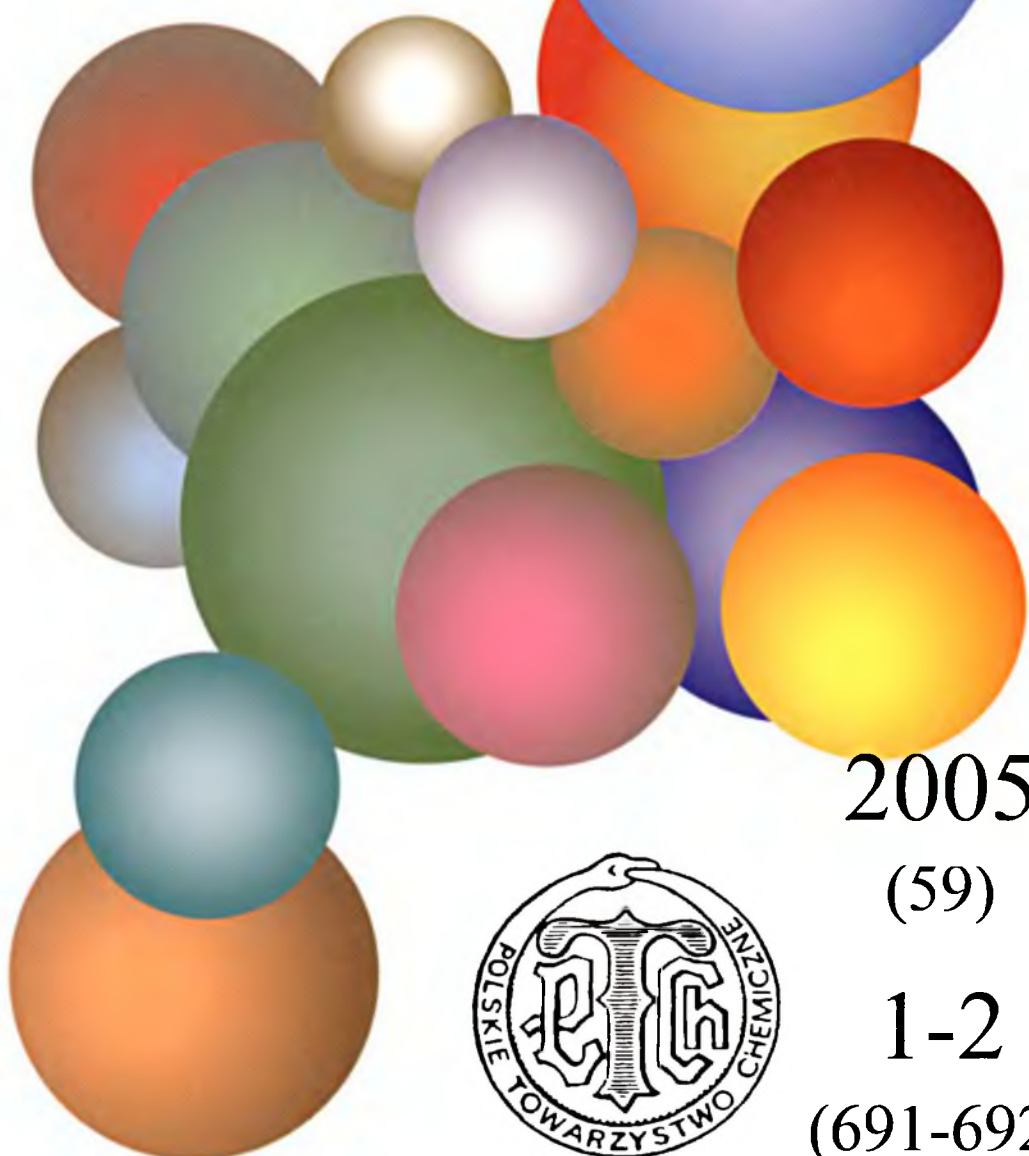


A 1263 1

DL. 3

WIADOMOSCI *chemiczne*



2005

(59)

1-2

(691-692)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAZEJOWSKI, JÓZEF CEYNOWA,
JACEK GAWROŃSKI, JACEK KUJEŃSKI, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JACEK MŁOCHOWSKI, PIOTR PANETH, LEONARD M. PRONIEWICZ,
WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, JAN ZAWADIAK

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, ADOLF KISZA,
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMIŃ, MIROŚLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. 375 73 89, tel./fax 322 14 06

INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

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

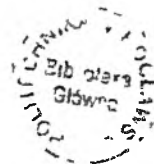
© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2003

ISBN 83-2292084-9

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym 2005

Przygotowanie do druku i druk: Firma Wydawnicza K-2, ul. Konopnickiej 6, 00-491 Warszawa, tel./fax: (22) 628-97-66

SZKOŁA SPEKTROSKOPII MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO



Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest jedną z najbardziej uniwersalnych technik analitycznych, znajdującą szerokie zastosowanie w bardzo wielu i bardzo zróżnicowanych dyscyplinach naukowych takich jak fizyka, chemia, biologia strukturalna czy medycyna. Dzięki postępowi technologicznemu jaki nastąpił w ostatnich latach (coraz „silniejsze” magnesy nadprzewodzące, techniki cyfrowe, lepsza jakość podzespołów elektronicznych) spektroskopia NMR stwarza możliwość zarówno precyzyjnej analizy struktury jak i procesów dynamicznych układów o dużym stopniu złożoności. Nie należy jednak zapominać, że oprócz specyficznych i *stricte* naukowych problemów, spektroskopia NMR jest również jednym z najczęściej wykorzystywanych narzędzi w rutynowej pracy chemików do oceny postępu reakcji, wydajności czy wstępnej analizy produktów. Dzisiaj trudno sobie wyobrazić sprawnie funkcjonujące badania chemiczne bez ciągłego dostępu do spektrometrów NMR.

Bogactwo możliwych zastosowań spektroskopii NMR powoduje, że liczba użytkowników jest znacząca i z każdym rokiem rośnie. Nowe pokolenie chemików, czasami z wyboru czasami z konieczności dołączają do społeczności NMR-owej. Głównie z myślą o nich postanowiliśmy zorganizować „Szkołę Spektroskopii NMR”. Nasza inicjatywa jest próbą reaktywacji idei z lat 70. ubiegłego stulecia, kiedy to prof. Andrzej Ejchart i prof. Lech Kozerski zajmowali się propagowaniem bardzo wtedy młodej dziedziny jaką była spektroskopia NMR jądra ^{13}C . Program naszej „reaktywowanej” szkoły, zgodnie z wymogami współczesnej spektroskopii NMR jest znacznie szerszy i obejmuje wiele zagadnień.

W wykładzie wprowadzającym dr hab. Wiktor Koźmiński zaprezentował podstawowe techniki eksperymentalne, omówił ideę spektroskopii dwuwymiarowej, problemy detekcji sygnału. Na podstawie wielu przykładów pokazał w jaki sposób można planować eksperymenty NMR i jak je interpretować. Prof. Adam Gryf-Keller omówił kluczowe zagadnienia związane ze stereochemią i rolą badań NMR-owych w analizie stereoizomerów. Dwie bardzo ważne klasy związków, kwasy nukleinowe i białka zostały omówione przez doc. dr hab. Zofię Gdaniec i prof. Andrzeja Ejcharta. Wykład o dynamice układów molekularnych w kontekście badań NMR-owych został wygłoszony przez prof. Stefana Jankowskiego. W ostatnim okresie coraz bardziej widoczne jest zainteresowanie badaniami w fazie stałej za pomocą spektroskopii NMR. W wykładzie zamykającym zajęcia naszej szkoły prof. Iwona Wawer omówiła rozwiązania metodologiczne pozwalające rejestrować widma wysokiej rozdzielczości w ciele stałym jak również przedstawiła szereg interesujących zastosowań sekwencji CP/MAS.

W jednodniowych zajęciach szkoły uczestniczyło ok. 100 osób z całej Polski, głównie studenci i doktoranci choć wśród uczestników licznie reprezentowani byli również pracownicy naukowci o dłuższym stazu naukowym. Nieoczekiwana dla nas

frekwencja jest potwierdzeniem konieczności podejmowania tego typu inicjatyw i zachętą do organizacji kolejnych szkół NMR-owych.

W imieniu komitetu organizacyjnego wykładowcom naszej szkoły chciałbym wyrazić wdzięczność za trud włożony w przygotowanie wykładów zarówno w formie ustnej jak i pisemnej. Bez ich ogromnego wysiłku nasze przedsięwzięcie nie mogłoby zakończyć się sukcesem.

Marek Potrzebowski
Przewodniczący sekcji
Magnetycznego Rezonansu PTCh

Wszystkie prace wpłynęły do Redakcji 19 października 2004.

**ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII JĄDROWEGO
REZONANSU MAGNETYCZNEGO
W BADANIACH ODDZIAŁYWAŃ
MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH
LIGANDÓW ORGANICZNYCH
I BIOCZĄSTECZEK**

APPLICATION OF NUCLEAR MAGNETIC
RESONANCE TO STUDY INTERMOLECULAR
INTERACTIONS OF ORGANIC LIGANDS
AND BIOMOLECULES

Wojciech Bocian^a, Lech Kozerski^{*a,b}

^a *Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego,
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa*

^b *Instytut Chemii Organicznej, Polska Akademia Nauk,
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa*



Wojciech Bocian urodził się w 1964 roku w Ostrowi Mazowieckiej. Studia na wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego ukończył w 1989 r. i rozpoczął pracę jako asystent w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk. Studia doktoranckie odbył pod opieką profesora Lecha Stefaniaka. W 1995 roku za swoje osiągnięcia naukowe otrzymał stypendium dla młodych naukowców Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. W 1996 roku obronił pracę doktorską pod tytułem „Związki mezojonowe typu A, struktura i zależności spektralne”, uzyskując stopień doktora chemii. W latach 1996–1998 przebywał na stypendium podoktorskim na Uniwersytecie Indiana, Bloomington USA. W 1999 roku rozpoczął pracę na stanowisku adiunkta w Instytucie Leków, obecnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, w którym pracuje do dnia dzisiejszego.

Jest autorem około trzydziestu publikacji naukowych z dziedziny badań strukturalnych i fizykochemicznych, metodami spektroskopowymi w tym głównie NMR oraz metodami obliczeniowymi takimi, jak obliczenia *ab initio*, DFT i mechaniki molekularnej. Jego zainteresowania naukowe obejmują biochemię strukturalną i funkcjonalną, oraz fizykochemię i chemię strukturalną.



Prof. Lech Kozerski pracuje w Instytucie Chemii Organicznej PAN od 1965 roku a od 1995 również w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego.

Jego zainteresowania badawcze koncentrują się wokół zastosowań spektrometrii NMR w chemii organicznej. Obiekty badań stanowią cząsteczki z ogólnej syntezy organicznej lecz również cząsteczki bioorganiczne, takie jak peptydy i oligonukleotydy. W ostatnim dziesięcioleciu szczególne zainteresowanie badawcze skierowane było na kompleksy metali z ligandami organicznymi, zastosowanie efektu izotopowego w spektroskopii NMR w roztworze, struktury biocząsteczek oraz badanie oddziaływań między cząsteczkowych pomiędzy ligandami organicznymi, lekami a biocząsteczkami.

ABSTRACT

The title problem is reviewed in the three main areas of general interest to chemists, biochemists and biologists, i.e. mutual interactions of small molecules, ligand to biomolecule binding and interactions of biomolecules. Physical phenomena, specific and nonspecific, such as hydrogen bonding, self association, hydrophobic interactions, *etc.*, are shown as being defined by NMR spectral parameters in solution and solid state.

Diversity of hydrogen bonding encountered in nature is exemplified by the interaction of acetic acid with Watson-Crick vs Hoogsteen faces of adenosine, studied by DNMR in organic solvent at low temperatures. The complementarity of solid state NMR to solution studies of defining the nature of hydrogen bonding is presented in the case of genistein interaction with nitrogen bases.

Application of a title method is presented for searching the geometry of complexes formed of organic ligands and biological molecules. General protocol for searching the geometry of complex is presented for the case of topotecan (TPT) interaction with duplex octamer and nicked decamer duplexes of DNA.

Interaction of biomolecules is presented for the case of duplex octamer DNMR study showing effects of base pairing and stacking on the δ ^1H values and insulin aggregation as studied by Pulse Field Gradient NMR spectroscopy leading to relating the radius of molecular aggregate with the diffusion constants.

In conclusion it is stated that various NMR techniques in solid and liquid state, coupled with X-ray and MS, constitute modern tool of structural biology in pursue of disclosing functions of biomolecules expressed by their interactions.

Keywords: intermolecular interactions, biomolecules, organic ligands, drugs, NMR

Słowa kluczowe: oddziaływania międzycząsteczkowe, biocząsteczki, ligandy organiczne, leki, NMR

WPROWADZENIE

Poznanie sekwencji ludzkiego genomu spowodowało zdeterminowany i bardziej ukierunkowany rozwój badań nad produktami jego ekspresji, dziesiątkami tysięcy białek o nieznannej strukturze i funkcji. To odkrycie uświadomiło społeczności nauki rozległość obszaru niewiedzy. Jeśli pojęcia proteomiki i genomiki strukturalnej były znane już wcześniej, to ostatnie pięćdziesiąt lat wykreowało kierunki proteomiki i genomiki funkcjonalnej. Funkcje cząsteczek biologicznych stają się pierwszoplanowym celem badań biologicznych na poziomie komórki. Poznanie tych funkcji umożliwia zrozumienie patologii funkcjonalnej transmitowanej z komórki do dysfunkcji tkanki i żywego organizmu. Funkcje cząsteczek biologicznych w organizmach żywych realizowane są poprzez ich wzajemne oddziaływania, bądź przez oddziaływania z zewnętrznymi ligandami organicznymi, np. w procesie chemioterapii lub innych ingerencji z udziałem związków chemicznych. Na podstawie dotychczasowej wiedzy w tym obszarze można stwierdzić, że oddziaływania te stanowią wyjątkowo specyficzny język komunikowania się cząsteczek w procesie ich funkcjonowania i dlatego poznanie tego języka jest szczególnie ważne dla zrozumienia funkcjonowania materii ożywionej.

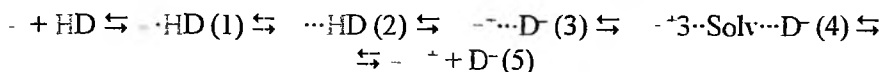
Badania fizykochemiczne stwarzają wyjątkowe możliwości śledzenia tych oddziaływań na poziomie atomowym. Umożliwiają zdefiniowanie oddziaływań wiążących i niewiążących, które stanowią elementy wzajemnego rozpoznania cząsteczek chemicznych i biochemicznych. Nowoczesna strategia rozwiązywania zagadnień biologicznych opiera się na komplementarnym zastosowaniu przynajmniej spektroskopii masowej, ES-MS [1], NMR i krystalografii, obejmujących trzy stany skupienia. Spektroskopia NMR odgrywa w tych badaniach wyjątkową rolę, umożliwiając badania w środowisku fizjologicznym oraz wyodrębnionych cząsteczek biologicznych w ciele stałym. Poniżej przedstawione są wybrane podstawowe zagadnienia z tego obszaru badań metodą NMR. Dotyczą one zjawisk fizycznych i chemicznych jakie mogą być badane metodą NMR.

ODDZIAŁYWANIA WZAJEMNE MAŁYCH CZĄSTECZEK

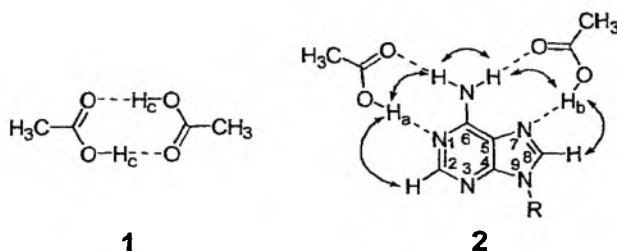
Wiązanie wodorowe jest jednym z najważniejszych oddziaływań, które determinują tworzenie silnych kompleksów. Przyczyną jest niewątpliwie różnorodność wiązań wodorowych, pod względem siły wiązania oraz charakteru kwasowo-zasadowego donora i akceptora. Ilustruje to ogólnie Równ. 1, w którym występują:

- (1) kompleks molekularny pomiędzy donorem HD i akceptorem
- (2) wiązanie wodorowe wewnątrz kompleksu,
- (3) wiązanie wodorowe wewnątrz pary jonowej,
- (4) wiązanie wodorowe wewnątrz pary jonowej z udziałem rozpuszczalnika,
- (5) wolne jony.

Równanie 1



Kozerski przedstawił możliwość zastosowania efektu izotopowego deuteru w rezonansie ^{13}C do określenia położenia równowagi wykorzystując zawartość deuteru w rozpuszczalnikach organicznych zawierających labilne protony (np. $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{D}$) [2]. Limbach opisał zastosowanie klasycznej techniki DNMR do zlokalizowania położenia protonu w wiązaniu wodorowym badając oddziaływanie adenozyny z kwasem octowym w temperaturach ok. 120°K [3].

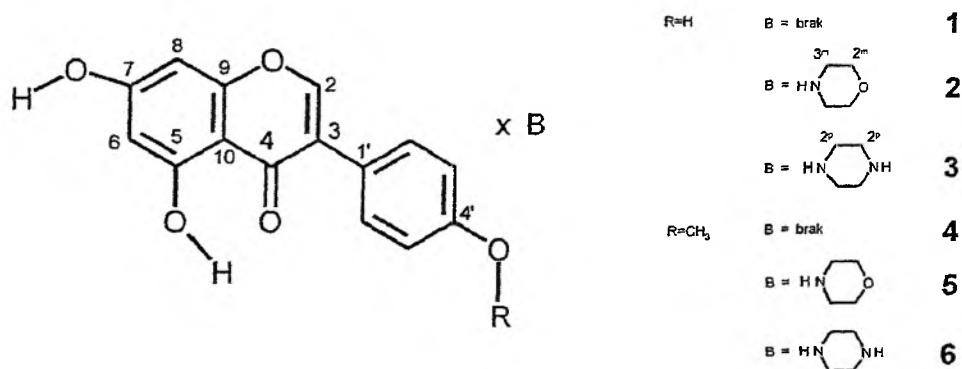


Rysunek 1. Oddziaływania kwasu octowego z adenozyną po stronie Watsona-Cricka i Hoogsteena

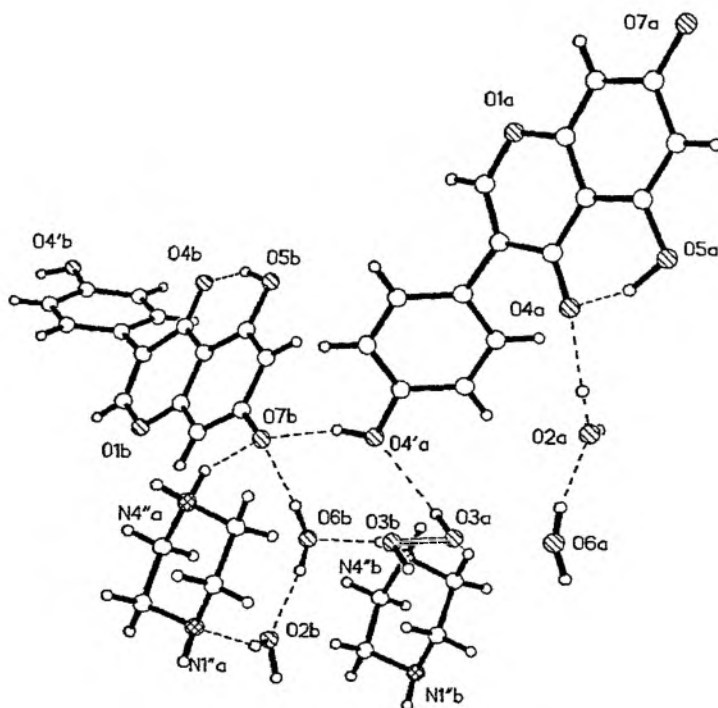
W tej temperaturze protony $\text{H}_{\text{a,b,c}}$ są w zakresie wolnej wymiany w dimerze 1 i w kompleksie 2 kwasu octowego z adenozyną (Rys. 1). Interpretując widma NOESY autorzy zidentyfikowali protony 1-H_c w dimerze kwasu octowego i odróżnili protony 2-H_a od 2-H_b w kompleksie kwasu z adenozyną. Interpretacja widm DNMR w zakresie $150\text{--}120^\circ\text{K}$ umożliwia oszacowanie różnicy w dynamice kompleksowania strony Watsona-Cricka ($\text{N}_1\text{--}\text{N}_6$) od strony Hoogsteena (N_7, N_9).

Kozerski i wsp. [4] badali w rezonansie ^1H i ^{13}C wiązania wodorowe jakie tworzą się pomiędzy genisteiną i aminami o różnej wartości pK (Rys. 2) w aspekcie przewidywania funkcji jakie mogą pełnić grupy fenolowe tej grupy związków w oddziaływaniach z biocząsteczkami. Genisteina, w szczególności jest interesującym obiektem badań w tym aspekcie, ponieważ wykazuje wiele właściwości biologicznych [5] i jest stosowana również jako dodatek do zdrowej żywności.

Pełny opis typu występujących wiązań wodorowych w roztworze jest możliwy z komplementarnym zastosowaniem rezonansu w ciele stałym i wykorzystania informacji z badań krystalograficznych samej genisteiny, 1 [6] oraz jej kompleksów z aminami, 2 [7], 3 (Rysunek 3).



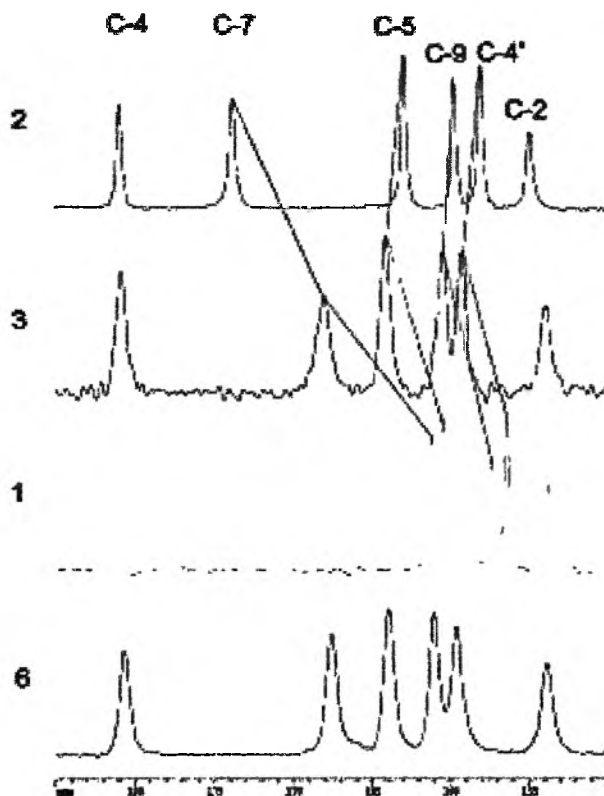
Rysunek 2 Badane kompleksy genisteiny 1 i biochaniny 6



Rysunek 3 Struktura krystalograficzna kompleksu 3 z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi do tlenu O7b

Jak to wynika z jednej ze struktur krystalograficznych zbadanych kompleksów (Rys. 3), występują w nich cztery typy wiązań wodorowych tworzonych przez grupy fenolowe: wiązanie wodorowe wewnątrzcząsteczkowe ($O4a \cdots O5aH$) wiązania międzycząsteczkowe typu ($O7b \cdots O4'aH$), wiązanie wodorowe wewnątrz pary jonowej powstałej po protonowaniu aminy grupą fenolową ($O7b \cdots N4''aH$) oraz wiąza-

nie wodorowe poprzez cząsteczkę rozpuszczalnika (ang. *solvent separated ion pair*) wewnątrz pary jonowej ($O7b \cdots O6bH \cdots N4^+ \cdots bH$). Te wiązania wodorowe wnoszą swój indywidualny wkład do wartości przesunięcia chemicznego, δ , atomów węgla związanych z grupami fenolowymi, C-07b, C-05b, C-04'b, jak to zilustrowano na Rys. 4 w porównaniu do widma genisteiny.



Rysunek 4 Widma ^{13}C NMR w ciele stałym badanych kompleksów 1–3, 6 z zaznaczonymi zmianami wartości przesunięć chemicznych atomów węgla z grupami fenolowymi uczestniczącymi w wiązaniach wodorowych

Porównanie struktur krystalograficznych genisteiny z jej kompleksami z aminami stwarza warunki do oceny wkładu poszczególnych typów wiązań wodorowych do przesunięcia chemicznego atomów węgla związanych z grupami fenolowymi w widmach ^{13}C w ciele stałym. Te informacje są wykorzystane do interpretacji zmian wartości przesunięcia chemicznego ^{13}C tych atomów węgla w roztworze pod wpływem tworzonych wiązań wodorowych i są pomocne w rozróżnianiu wiązań wodorowych wewnątrz cząsteczkowych i międzycząsteczkowych oraz deprotonowania grupy fenolowej. Niezależnym potwierdzeniem tej analizy było zasto-

wanie efektu izotopowego deuteru na wartości $\delta^{13}\text{C}$ rozpatrywanych atomów węgla, które umożliwia również ocenę położenia równowagi prototropowej w badanych kompleksach w roztworach.

ODDZIAŁYWANIA LIGANDÓW ORGANICZNYCH Z BIOCZĄSTECZKAMI

Głównym i już klasycznym wykorzystaniem spektroskopii NMR w biologii strukturalnej jest wyznaczenie struktur biocząsteczek w roztworze, w tym kompleksów ligand organiczny–biocząsteczka [8,9,10]. Ogólny protokół postępowania zawiera zazwyczaj następujące elementy:

1. badanie stałych asocjacji obydwu oddziaływujących cząsteczek [11],
2. sprawdzenie występowania oddziaływania międzycząsteczkowego rutynową techniką, np. wykorzystując eksperyment dyfuzyjny [12],
3. wyznaczenie stechiometrii kompleksu (krzywa Joba),
4. wyznaczenie stałych wiązania [13],
5. uzyskanie danych eksperymentalnych (ang. *experimental constraints*) takich jak odległości międzyprotonowe (NOE) [14], kąty torsyjne, orientacja wiązań atomowych w przestrzeni za pomocą resztkowych stałych sprzężeń dipolarnych (ang. *residual dipolar coupling techniques*) [15],
6. wyznaczenie struktury z wykorzystaniem więzów eksperymentalnych metodami obliczeniowymi, np. (ang. *simulated annealing*).

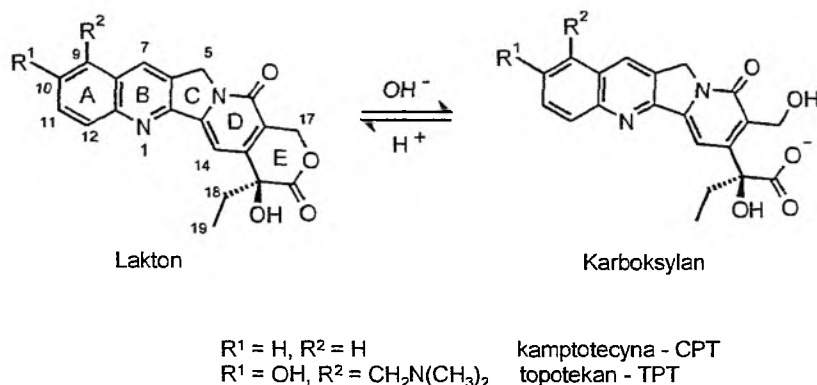
Postępowanie powyższe prowadzi do rezultatów, które są uzależnione od ilości i jakości więzów eksperymentalnych. Ponadto, zwykle wymagane jest aby odpowiedni kompleks posiadał ściśle zdefiniowaną pojedynczą strukturę, oraz wystarczająco dużą stałą trwałości, tak aby pozbyć się wszelkich efektów dynamicznych w widmach NMR. Najlepiej jest gdy ligand związany jest z biocząsteczką kowalencyjnie.

Aktualny stan badań funkcji biocząsteczek wymaga znacznie precyzyjniejszego wyznaczenia geometrii kompleksów, w tym również dla słabo oddziaływujących ligandów i/lub posiadających dynamikę prowadzącą do współistnienia kilku konformacji kompleksu.

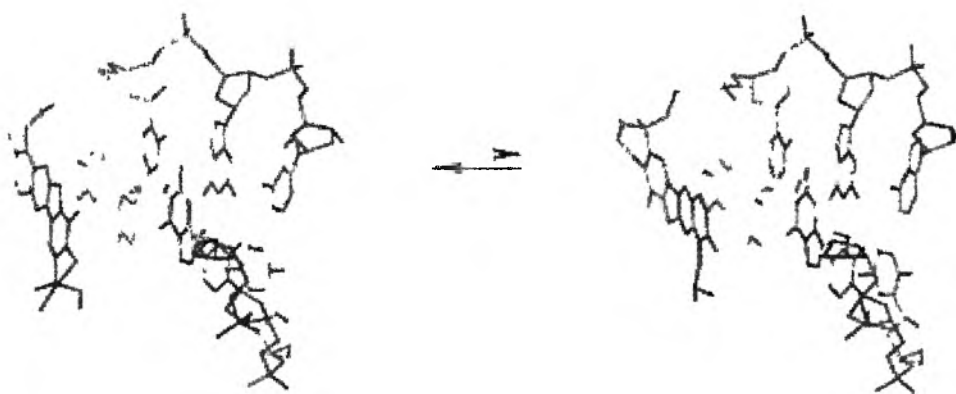
Jest to aktualnie jeden z priorytetowych kierunków zastosowania NMR, między innymi w proteomice funkcjonalnej [16]. W tym kierunku Bocian, Kozerski i wsp. [17] badali oddziaływanie kamptotecyny i pochodnych z oligomerami DNA (Rys. 5).

Badania prowadzono metodą komplementarnego zastosowania spektroskopii NMR, w tym pomiarów efektów NOE i zmian przesunięć chemicznych, z technikami modelowania molekularnego: dynamika molekularna w roztworze, obliczenia parametrów termodynamicznych kompleksowania oraz obliczenia zmian przesunięć chemicznych ^1H NMR. Metoda ta pozwoliła wyznaczyć i wyselekcjonować

struktury o największych populacjach kompleksu TPT:DNA, dla modelu wielo konformacyjnego.

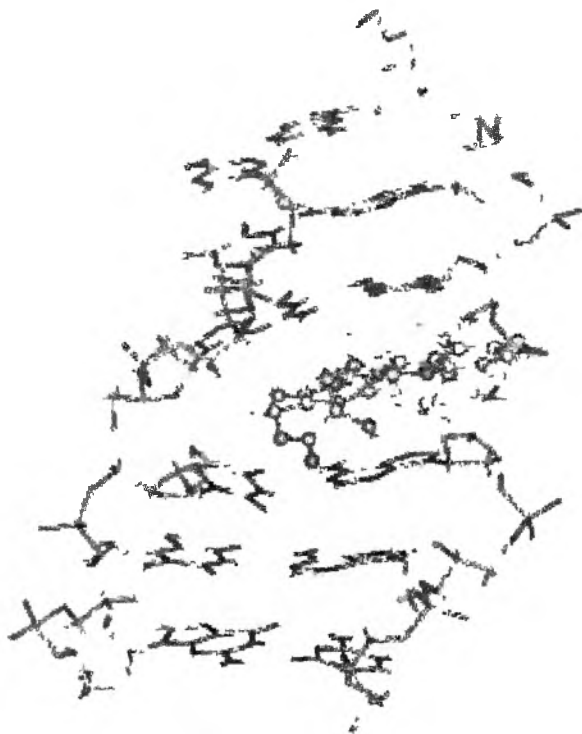


Rysunek 5 Badane inhibitory topozomerazy I, kamptotecyna (CPT) i topotekan (TPT) stosowany w leczeniu klinicznym. Równowaga lakton-karboksylian jest obserwowana w roztworach fizjologicznych. Formą aktywną biologicznie jest lakton.



Rysunek 6 Dwie najbardziej prawdopodobne struktury w modelu wielokonformacyjnym kompleksu TPT:DNA (przedstawiono tylko zewnętrzną parę GC z dupletu oktameru d(GCG-ATCGC)₂)

Powiązanie zaawansowanych obliczeń dynamiki molekularnej ze spektroskopią NMR pozwoliło Bocianowi i wsp. [18] precyzyjnie wyznaczyć strukturę słabozwiązanego kompleksu TPT:DNA dla dekameru DNA z przerwą nicią (patrz Rys. 7). Było to możliwe nawet w obecności silnych efektów dynamicznych w widmach NMR, związanych z odwracalnością procesu kompleksowania. Efekty te wywołały silne poszerzenie, a często w konsekwencji brak lub też znaczne zafalszowanie objętości wielu istotnych sygnałów NMR, co uniemożliwia wyznaczenie struktury takiego kompleksu metodami klasycznymi.



Rysunek 7 Fragment struktury kompleksu TPT DNA

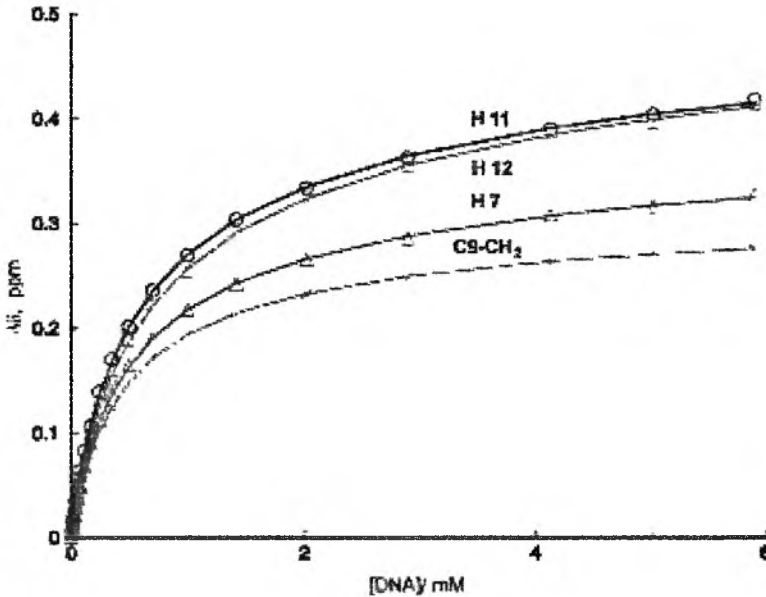
W obu powyższych pracach dane eksperymentalne NMR zastosowano głównie w procesie walidacji poprawności, czy też wyboru najbardziej uprzywilejowanych struktur, spośród wielu obliczonych teoretycznie w drodze precyzyjnej i długotrwałej symulacji dynamiki molekularnej (10 ns symulacje uwzględniające cząsteczki wody). Selekcji właściwych struktur dokonano na podstawie porównania obliczonych z eksperymentalnymi w wartościami uśrednionych efektów NOE oraz zmian przesunięć chemicznych ^1H NMR. Jako dodatkowej informacji użyto zmian wartości obliczonej energii swobodnej kompleksu metodą MM-PBSA (ang. *Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*).

Postępowanie powyższe zmienia klasyczny protokół wyznaczenia struktury wg przedstawionego wyżej protokołu, przede wszystkim uniezależniając w dużym stopniu końcowe struktury od jakości więzów eksperymentalnych i wzbogacając go w istotne informacje o dynamice kompleksów. Postępowanie to zmienia i rozszerza dotychczas stosowany schemat badań struktury oddziaływań ligand-biocząsteczka o następujące elementy:

6. modelowanie przestrzeni konfirmacyjnej kompleksu metodą precyzyjnej dynamiki molekularnej (MD),

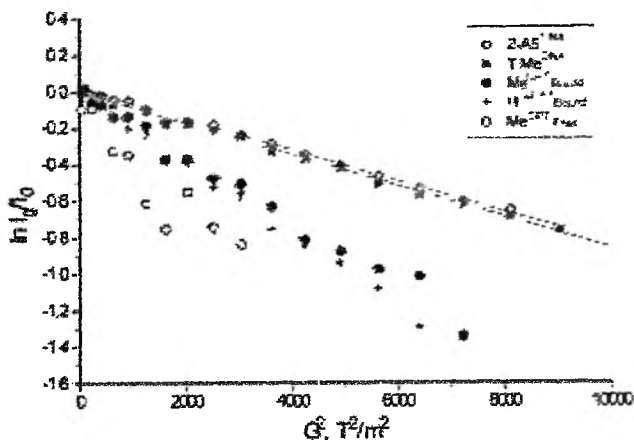
7. wyznaczenie teoretycznych wartości NOE dla struktur z dynamiki molekularnej,
8. selekcja struktur z użyciem więzów eksperymentalnych.

Oprócz zastosowania do określania struktury, spektroskopia NMR jest również wygodnym narzędziem do wyznaczania stałych wiązania i wartości parametrów termodynamicznych kompleksów ligand–biocząsteczka. Metodą miareczkowania ligandu biocząsteczką i pomiarem zmian przesunięć chemicznych Bocian i wsp. [17] wyznaczyli stałą wiązania TPT:DNA zakładając obecność autoasocjacji TPT zgodnej z modelem isodesmicznym oraz dimeryzacji DNA [19,20] (Rys. 8).



Rysunek 8 Izoterma wiązania kompleksu TPT DNA

W tej samej pracy autorzy prezentują również inną metodę pomiaru stałych wiązania kompleksów, opartą na pomiarach współczynników dyfuzji metodą PFG-NMR (Rys. 9) [21].



Rysunek 9 PFG-NMR, nachylenie prostych proporcjonalne jest do współczynników dyfuzji wolnego DNA, wolnej kamptotecyny (CPT) i kompleksu CPT DNA

Spektroskopię NMR wykorzystuje się również coraz częściej w badaniach przesiewowych (ang. *screening*) [22] oddziaływania ligandów, w tym zwłaszcza potencjalnych leków, z białkami. Metody pozwalające zidentyfikować te oddziaływania można podzielić na dwie główne kategorie:

- 1) monitorujące sygnały NMR pochodzące z ligandu,
- 2) monitorujące sygnały NMR pochodzące z białka.

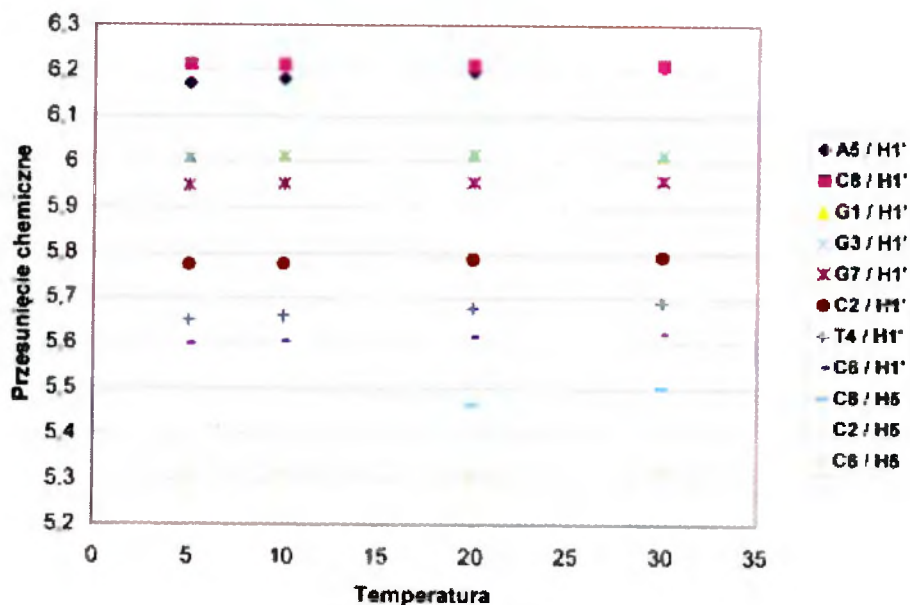
Metody należące do pierwszej kategorii, wykorzystują zwykle duże różnice w szybkości rotacji i translacji małej cząsteczki (ligandu) w stanie wolnym i w stanie związanym z dużą białkiem. W spektroskopii NMR różnice te obserwuje się badając zmiany wartości czasów relaksacji T_1 i T_2 oraz zmiany współczynnika dyfuzji. Czasem wykorzystuje się również wewnątrzcząsteczkowy lub międzycząsteczkowy transfer magnetyzacji. Zaletą metod monitorujących ligand jest to, że wymagają relatywnie niewielkich ilości nie znaczonej białka, oraz umożliwiają przebadanie wielu ligandów w trakcie jednego eksperymentu, istnieje jednak niebezpieczeństwo nie wykrycia ligandów bardzo silnie związanych z białkiem.

Metody z kategorii drugiej, monitorujące białko, wymagają zwykle użycia wzbogaconych izotopowo białek (^{13}C i ^{15}N). Dają jednak możliwość uzyskania cennych informacji strukturalnych, takich jak miejsce wiązania ligandu, oraz informacji o naturze oddziaływań. Metody te bazują głównie na pomiarach zmian przesunięć chemicznych oraz na pomiarach wykorzystujących transfer polaryzacji.

WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIA BIAŁEK

Wzajemne oddziaływania cząsteczek biologicznych są podmiotem genomiki i proteomiki funkcjonalnej, kierunków badań biologicznych rozwijanych szczegól-

Identyfikacja takich różnic jest łatwa w eksperymencie DNMR ponieważ silne parowanie zasad, w powiązaniu z oddziaływaniami warstwowymi, przejawia się zmianą wartości przesunięć chemicznych protonów aromatycznych w kierunku mniejszych wartości [23] i na Rys. 11 przedstawiony jest wykres zależności wybranych wartości przesunięć chemicznych protonów aromatycznych i rybozy $H1'$ od temperatury dla badanego oktameru.

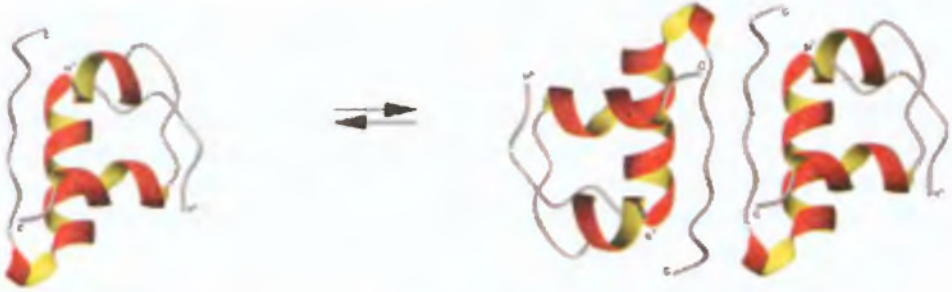


Rysunek 11. Zależność wybranych wartości przesunięć chemicznych oktameru $d(GCGTACGC)_2$ od temperatury

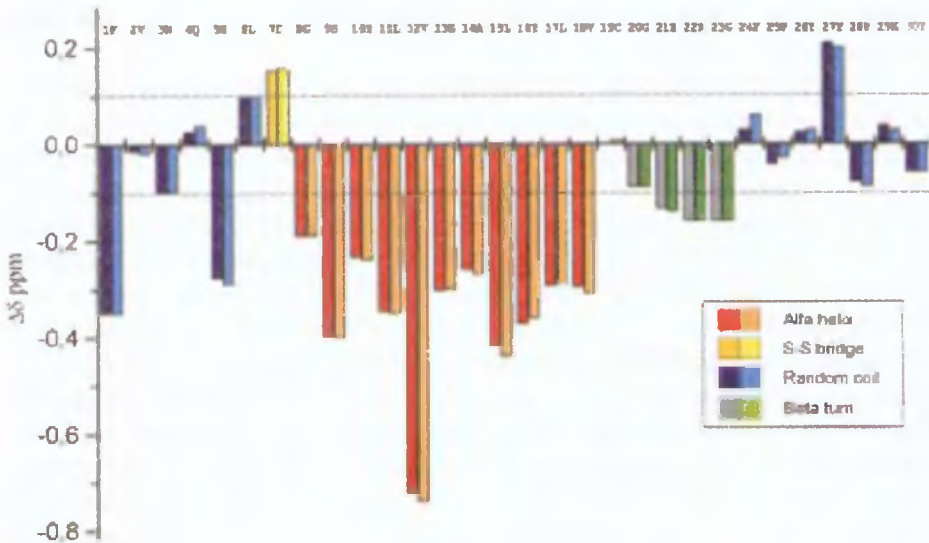
Z przedstawionego wykresu wynika, że zależności wartości przesunięć chemicznych od temperatury są niewielkie i mają podobny charakter, niezależny od położenia pary zasad w łańcuchu. Można zatem wnioskować, że w badanym zakresie temperatur istnieje silne parowanie zasad w dupleksie.

Wartości przesunięć chemicznych w cząsteczkach biologicznych są źródłem unikalnych informacji dotyczących zarówno stereochemii jak i struktury czwartorzędowej w roztworze [24]. W przypadku insuliny ludzkiej najprostsze oddziaływanie międzycząsteczkowe jakim jest, przedstawiona na Rys. 12, agregacja monomeru w roztworze do struktury dimeru, można monitorować poprzez obserwację wartości przesunięć chemicznych protonów $H\alpha$ w jednostkach B24 -B28. Wartości przesunięć chemicznych tych protonów są charakterystyczne dla określonego motywu struktury drugorzędowej. Rozpoznanie takiego motywu strukturalnego odbywa się poprzez obliczenie inkrementu CSI [25,26] (ang. *Chemical Shift Index*) odejmując od znalezionej wartości δH^α wartość przesunięcia chemicznego takiego samego

protonu w peptydzie o strukturze kłębaka statystycznego. Zakres zmian wartości $\delta H\alpha$ kłębaka statystycznego jest ustalony na ± 0.1 ppm. Zaobserwowanie takiego samego znaku indeksu CSI dla czterech jednostek występujących po sobie, świadczy o istnieniu motywu strukturalnego, np. α -helisy lub β -kartki. Znak inkrementu zależy od występującego motywu i jest ujemny dla $\delta H\alpha$ w α -helisie. Wykres taki dla łańcucha β przedstawiony jest na Rys. 13.



Rysunek 12. Dimeryzacja insuliny ludzkiej w roztworze wodnym w wyniku oddziaływań hydrofobowych wzdłuż C-terminalnej części łańcuchów B dwóch struktur monomerycznych, w których jednostki B24 - B28 tworzą motywy β -kartki



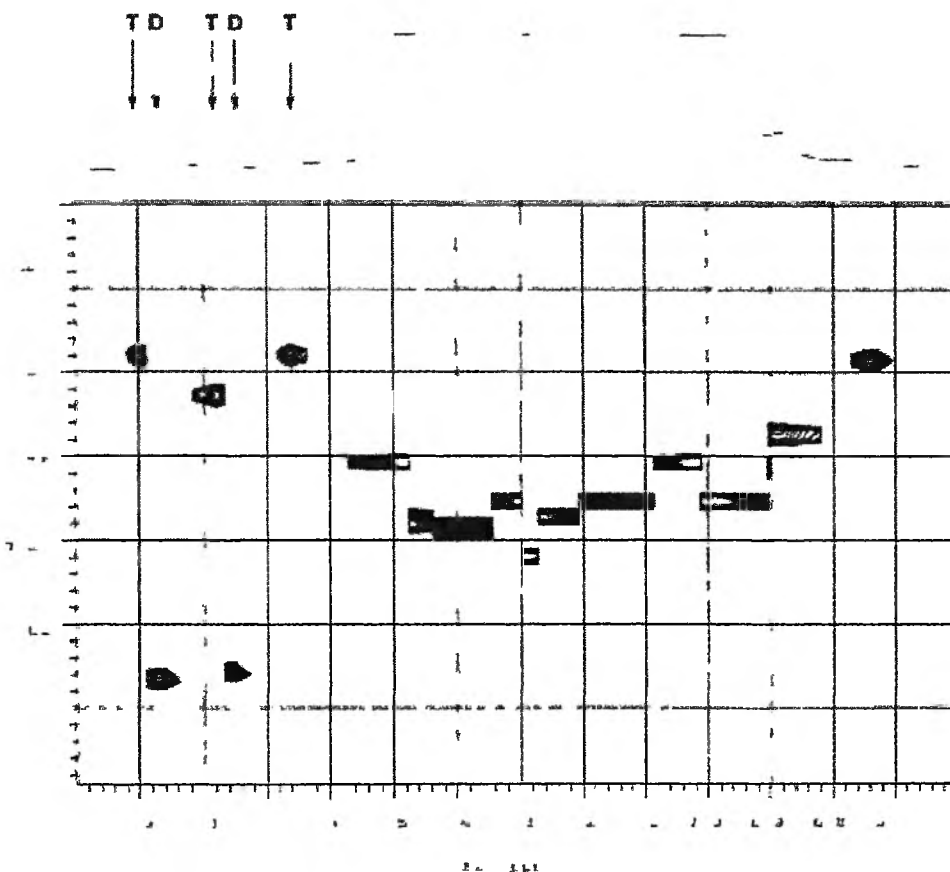
Rysunek 13. Wykres analizy CSI dla atomów $H\alpha$ łańcucha B insuliny ludzkiej. Inkrementy CSI przedstawione są dla dwóch różnych roztworów insuliny ludzkiej dla porównania powtarzalności rejestracji przesunięć chemicznych. Linia przerywana równoległa do osi rzędnych wyznacza granice zmienności $\delta H\alpha$ w kłębku statystycznym

Z wykresu tego wynika, że w łańcuchu B znajduje się motyw α -helisy B8–B18 ponieważ inkreментy CSI mają ten sam znak dla wszystkich jednostek w tym zakresie i zmieniają znak (lub mają wartości bliskie 0) na końcach motywu strukturalnego (jednostki B7 i B19). Natomiast w badanych insulinach przedstawionych na Rys. 12 w zakresie B24–B28 wartości inkrementów CSI są nieregularne i nie wykraczają poza zakres charakterystyczny dla wartości kłębka statystycznego co wskazuje na to, że ta część łańcucha ma właściwie strukturę nieregularną. Badane insuliny nie mają więc elementu β -karkty w tym zakresie i są insulinami monomerycznymi, w odróżnieniu od insuliny przedstawionej na Rys. 12, która ma strukturę dimeru.

Ta prosta analiza wartości $\delta H\alpha$ umożliwia więc ocenę stanu agregacji białka w badanych warunkach w roztworze. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że analiza taka może nie być wystarczająca do ustalenia stanu agregacji w roztworze jeżeli np. cząsteczka monomeru jest w równowadze z dimerem a proces wymiany jest szybki w skali czasu NMR i obserwuje się uśrednione wartości przesunięć chemicznych.

W ostatniej dekadzie, wykorzystując szerokie zastosowanie cewek gradientowych w konstrukcji sond wysokiej rozdzielczości, rozwinięto metodę wyznaczania współczynników dyfuzji do badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych. Metoda ta jest szczególnie przydatna do badania oddziaływań dużych cząsteczek biologicznych (DNA, RNA, białka, peptydy) z niskocząsteczkowymi ligandami organicznymi (patrz wyżej). Niemniej, może również być przydatna do rozróżnienia agregatów insulinowych, np. dimeru i tetramery [27].

Na Rys. 14, w projekcji na oś odciętych, przedstawione jest widmo insuliny ludzkiej w warunkach, w których równocześnie w roztworze występują dimer i tetramer w równowadze, w zakresie wolnej wymiany w skali czasu NMR. Ponieważ widmo wykonane jest w D_2O , możliwe jest obserwowanie protonów C2-H histydyn B5 i B10 w zakresie 7,5 ppm. Ze względu na symetrię C_2 w dimerze obserwujemy tylko 2 sygnały C2-H dla obu histydyn a 4 sygnały w liniowym tetramerze zawierającym płaszczyznę symetrii C_s . Przypisania sygnałów obydwu agregatom dokonuje się na podstawie widma 2D DOSY [28,29] (ang. *Diffusion Ordered Spectroscopy*), przedstawionym na Rys. 14, jako wyniku eksperymentu pomiaru współczynników dyfuzji widocznych na osi rzędnych dla poszczególnych sygnałów. Dimer i tetramer różnią się znacznie współczynnikami dyfuzji ze względu na różnicę parametrów hydrodynamicznych jako pochodnej różnej średnicy białka globularnego dimeru i tetramery. Należy zwrócić uwagę, że prawidłowe wartości współczynników dyfuzji w tym eksperymencie można wyznaczyć jedynie dla sygnałów obydwu indywidualów chemicznych, które są dobrze wyodrębnione i nie pokrywają się z innymi sygnałami, w szczególności pochodzącymi od indywiduum o innym współczynniku dyfuzji. Pokrywanie się wzajemnie takich sygnałów zaburza prawidłowe wartości współczynnika dyfuzji, jak to wyraźnie widać na Rys. 14.

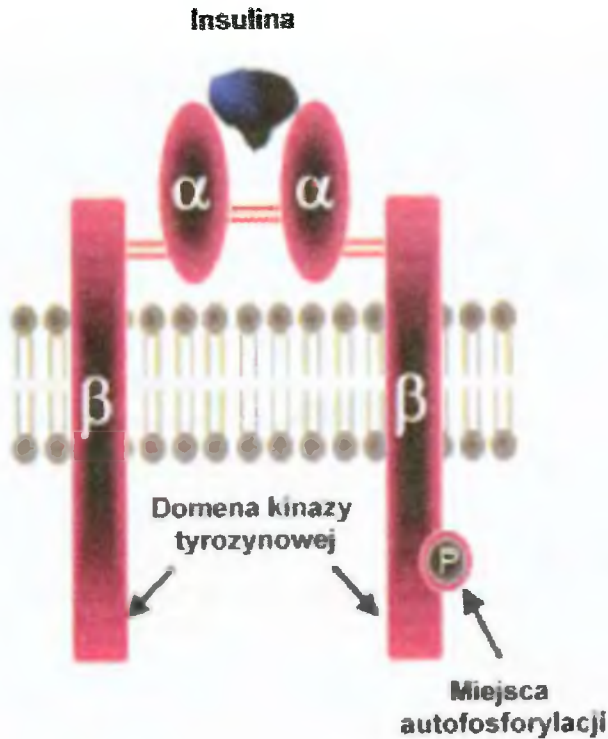


Rysunek 14 Widmo 2D DOSY insuliny ludzkiej w D_2O wyróżniające współczynniki dyfuzji dla dimeru (D) i tetramery (T). Zaznaczone sygnały pochodzą od protonów H^+ w jednostkach B10 i B5. Linia przy wartości 7,78 ppm zawiera dwa pokrywające się sygnały tetramery.

Przykładem ilustrującym elementy współdziałania białek kreujące ich funkcję jest oddziaływanie insuliny z receptorem insulinowym [30] przedstawione na Rys 15. Należy zwrócić uwagę na fakt, że wiązanie insuliny jest podstawowym elementem uruchamiającym działanie enzymów wewnątrz komórkowych, natomiast konformacja monomeru insuliny, właściwa dla wiązania z receptorem, nie jest poznana i jest obiektem badań NMR [31, 32, 33].

Receptor insuliny jest białkiem transmembranowym, heterotetramerem składającym się z 2 podjednostek α i dwóch podjednostek β , łącznie, z 1340 jednostek aminokwasowych (480 kD). Wiązanie insuliny z podjednostkami α części zewnątrzkomórkowej receptora inicjuje aktywność łańcuchów β , specyficzną autofosforylację tyrozyn w ściśle określonych domenach łańcuchów β zwanych kinazami tyrozynowymi. Ten proces jest początkiem kaskady sygnałów wewnątrz komórkowych, rezultatem której jest prawidłowy metabolizm glukozy i utrzymanie jej właściwego

poziomu we krwi [34]. Powyższy przykład opisuje oddziaływanie trzech cząsteczek biologicznych: insuliny, receptora insulinowego oraz błony komórkowej.



Rysunek 15 Oddziaływanie receptora insulinowego z insuliną inicjujące kaskadę sygnałów wewnątrz komórkowych

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej wybrane zagadnienia zastosowania NMR w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych sygnalizuje wykorzystanie metody na poziomie współrzędnych atomowych w roztworach. Jest to naturalny, i najbardziej kreatywny model badania materii w aspekcie poznania języka żywej materii, ważny nie tylko ze względów poznawczych ale głównie użytkowych, jak np. dla racjonalnego projektowania leków i poznania mechanizmu ich działania. Wagę tych zagadnień podkreślają dwie przyznane w ostatnim dziesięcioleciu nagrody Nobla (R.R. Ernst, K. Wüthrich). Naturalnie komplementarną techniką jest zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym, przeżywającego ostatnio burzliwy okres rozwoju. Połączenie tych technik, uzupełnione przez badania krystalograficzne (X-Ray) i spektroskopię mas (MS), cechuje prawdziwie multidyscyplinarną i nowo-

czesną strategię badań biologii molekularnej. Należy tu podkreślić szczególne znaczenie technik nano-spray ESI MS, które w ostatnich latach owocują unikalnymi dla biologii wynikami badań dynamiki niezwiązanych kowalencyjnie agregatów białkowych i ich kompleksów z ligandami organicznymi [35, 36, 37].

Naturalne rozszerzenie badań NMR na poziom komórkowy jest również możliwe i stosowane (np. opisane wyżej badanie inicjującego działania insuliny na funkcję receptora insulinowego, IR, w procesie regulacji prawidłowego metabolizmu glukozy).

Szczególnie spektakularne i wybiegające w przyszłość zastosowanie NMR dotyczy obrazowania tkanek (MRI – ang. *Magnetic Resonance Imaging*), stosowane w lecznictwie otwartym, oraz technika MRS (ang. *Magnetic Resonance Spectra*) analizy widm NMR tkanek *in vivo* lub płynów ustrojowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Fabris, C. Fenselau, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 384.
- [2] L. Kozerski, *Org. Magn. Reson.*, 1982, **20**, 194.
- [3] E.M. Basilio Janke, H.-H. Limbach, K. Weisz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2135.
- [4] L. Kozerski, B. Kamiński, R. Kawęcki, Z. Urbańczyk-Lipkowska, W. Bocian, E. Bednarek, J. Sitkowski, K. Zakrzewska, K.T. Nielsen, P.E. Hansen, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3578.
- [5] a) K. Polkowski, A.P. Mazurek, *Acta Polon. Pharm. Drug Res.*, 1994, **57**, 135; b) P. Fiedor, L. Kozerski, J.Cz. Dobrowolski, R. Kawęcki, K. Biniecki, J. Pachecka, W. Rowiński, A.P. Mazurek, *Transplantation Proceedings*, 1998, **30**, 357; c) A.P. Mazurek, K. Biniecki, L. Kozerski, *US Patent*, 1997, **5**, 637, 703; d) F.M. Uckun, W.E. Evans, C.J. Forsyth, K.G. Waddick, L.T. Ahlgren, L.M. Chelström, A. Burkhardt, J. Bolen, D.E. Myers, *Science*, 1995, **267**, 886; e) R.A. Dixon, D. Ferreira, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 205; f) T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 5592; g) J. Markovits, S. Junqua, F. Goldwasser, A.-M. Venuat, C. Luccioni, J. Beaumatin, J.-M. Saucier, A. Bernheim, A.J. Sablon, *Biochem. Pharmacology*, 1995, **50**, 177; h) A. Constantinou, K. Kiguchi, E. Huberman, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 2618; i) P.S. Fiedor, M. Maksymowicz, K. Biniecki, L. Kozerski, R. Kawęcki, J.Cz. Dobrowolski, J. Pachecka, P. Arango, W. Rowiński, A. P. Mazurek, *Congress of European Society for Artificial Organs, Warsaw, October 17–19, 1996 (Abstract no. 196)* p. 3.
- [6] M. Breton, G. Precigoux, Ch. Courseille, M. Hospital, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, 1975, **31**, 921.
- [7] A.P. Mazurek, L. Kozerski, J. Sadlej, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, J.Cz. Dobrowolski, J.K. Maurin, K. Biniecki, J. Witowska, P. Fiedor, J. Pachecka, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 1998, 1223
- [8] M.S. Searle, *Progress in NMR Spectroscopy*, 1993, **25**, 403.
- [9] a) H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1755; b) S. S. Wijmenga, M. Kruithof, C.W. Hilbers, *J. Biomol. NMR*, 1997, **10**, 337.
- [10] a) A.N. Lane, *Methods Enzymol.*, 2001, **340**, 252; b) M.A. Keniry, R.H. Shafer, *Methods Enzymol.*, 1995, **261**, 575.
- [11] a) J.-Sh. Chen, R.B. Shirts, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 1643; b) H.K.S. Tan, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1994, **90**, 3521; c) L. Fielding, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 6151.
- [12] a) A. Gafni, Y. Cohen, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 120; b) O. Mayzel, Y. Cohen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1901.
- [13] K.A. Connors, *Binding Constants*, J. Wiley & Sons, New York 1987, rozdz. 4.

- [14] D. Neuhaus, M.P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publishers, New York 1989, s. 1.
- [15] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 2001, **20**, 365.
- [16] K. Lindorff-Larsen, S. Kristjansdottir, K. Teilum, W. Fieber, Ch.M. Dobson, F.M. Poulsen, M. Vendruscolo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3291.
- [17] W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, A. Pietrzyk, M. P. Williamson, P.E. Hansen, L. Kozerski, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 5776.
- [18] W. Bocian, R. Kawęcki, E. Bednarek, J. Sitkowski, M.P. Williamson, P.E. Hansen, L. Kozerski, praca w przygotowaniu.
- [19] M.P. Williamson, T. Asakura, *J. Magn. Reson. Series B*, 1993, **101**, 63.
- [20] N.J. Baxter, M.P. Williamson, T.H. Lilley, E. Haslam, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1996, **92**, 231.
- [21] A.R. Waldeck, P.W. Kuchel, A.J. Lennon, B.E. Chapman, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1997, **30**, 39.
- [22] B.J. Stockman, C. Dalvit, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2002, **41**, 187
- [23] A.H.-J. Wang, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, **2**, 361.
- [24] E.R.P. Zuiderweg, *Biochemistry*, 2002, **41**, 1.
- [25] S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5490.
- [26] D.S. Wishart, C.G. Bigam, A. Holm, R.S. Hodges, B.D. Sykes, *J. Biomol. NMR*, 1995, **5**, 67.
- [27] M. Lin, C. Larive, *Anal. Biochem.*, 1995, **229**, 214.
- [28] C.S. Johnson, *J. Magn. Reson.*, 1993, **A102**, 214.
- [29] E.J. Cabrita, S. Berger, P. Bräuer, J. Kärgler, *J. Magn. Reson.*, 2002, **157**, 124.
- [30] R.Z.-T. Luo, D.R. Beniac, A. Fernandez, C.C. Yip, F.P. Ottensmeyer, *Science*, 1999, **285**, 1077.
- [31] Q.-X. Hua, S.N. Gozani, R.E. Chance, J.A. Hoffman, B.C. Frank, M.A. Weiss, *Nat. Struct. Biol.*, 1995, **2**, 129.
- [32] X. Chang, M.M. Jorgensen, P. Bardrum, J.J. Led, *Biochemistry*, 1997, **36**, 9409.
- [33] D. Keller, R. Clausen, K. Josefsen, J.J. Led, *Biochemistry*, 2001, **40**, 10732.
- [34] R. Cahill Jr, *Diabetes*. 1971, **20**, 785.
- [35] H. Hernández, C.V. Robinson, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 46685.
- [36] E.J. Nettelton, P. Tito, M. Sunde, M. Bouchard, Ch.M. Dobson, C.V. Robinson, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 1053.
- [37] J.A. Loo, *Mass Spectrometry Rev.*, 1997, **16**, 1.

STRATEGIE NMR WYZNACZANIA STRUKTUR BIAŁEK W ROZTWORZE

NMR STRATEGIES FOR THE PROTEIN STRUCTURE DETERMINATION IN SOLUTION

Andrzej Ejchart

*Instytut Biochemii i Brofizyki PAN,
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa*

Abstract
Wstęp
Budowa i konformacja białek
Więzy strukturalne
Przesunięcia chemiczne w białkach
Strategie wyznaczania struktur białek
Perspektywy
Piśmiennictwo cytowane



Andrzej Ejchart ukończył Wydział Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w roku 1966. Doktorat w dziedzinie spektroskopii NMR obronił w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie – 1970, a habilitował się w dziedzinie fizycznej chemii organicznej na Politechnice Łódzkiej – 1984. Tytuł profesora nauk biologicznych otrzymał w roku 2003. W okresie 1981–1997 blisko 10 lat pracował w laboratoriach NMR w USA, Niemczech i Holandii. Obecnie jest kierownikiem Środowiskowego Laboratorium NMR w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Jest autorem lub współ-

autorem ponad 80 prac naukowych oraz współautorem dwóch monografii z dziedziny spektroskopii NMR: *Spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C* , wspólnie z prof. L. Kozerskim (PWN, Warszawa 1980, 2 wyd. 1988) oraz *NMR w cieczech. Zarys teorii i metodologii*, wspólnie z prof. A. Gryff-Kellerem (Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, 2004).

Główna tematyka badawcza: badanie struktury i dynamiki układów biologicznych metodami spektrometrii NMR.

ABSTRACT

A number of reasons have hindered the use of NMR spectroscopy as a tool for the protein structure determination. Recently, the advance in the NMR equipment, spectral techniques and isotope labelling has resulted in an enormous growth of NMR-determined protein structures.

After a brief presentation of protein structure and conformation several types of NMR-derived constraints and the characteristic features of chemical shifts in proteins are discussed. Short-range, distance and dihedral angle constraints are valuable, but cumulative errors can appear when successive constraints are used to determine spatial relationship of remote parts of a protein. Therefore, long-range constraints derived from residual dipolar couplings are highly complementary to the short-range constraints.

Modern strategies to the NMR-based protein structure determination depend on the size of studied biomolecules. Small proteins ($M_{cz} < 10$ kDa) can be studied with the use of two-dimensional (2D) ^1H NMR techniques. Medium size proteins ($M_{cz} < 30$ kDa) require double isotopic labeling $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ and multidimensional (3D and 4D) heteronuclear techniques. There is no well established strategy to the structure determination of large proteins ($M_{cz} > 30$ kDa) yet. The most promising approaches take advantage of triple isotopic labeling $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ and the transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY), both resulting in the reduction of signal width.

Keywords: NMR spectrometry, protein structure in solution, NMR structural constrains

Słowa kluczowe: spektrometria NMR, struktury białek w roztworach, więzy strukturalne NMR

WSTĘP

Większość ważnych biologicznie pierwiastków, węgiel, azot, wodór czy fosfor, posiada trwałe izotopy, których jądra obdarzone spinem charakteryzują się wąskimi sygnałami w widmach magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Oddziaływania międzyjądrowe, które są czule nawet na małe zmiany struktury i konformacji cząsteczki, wpływają na położenia, kształty i intensywności sygnałów NMR [1, 2]. Dzięki temu spektroskopia NMR stwarza możliwości otrzymywania w roztworach struktur cząsteczek o dużej dokładności. Dynamicznie rozwijające się w ostatnich latach badania NMR białek z jednej strony stwarzają możliwości porównywania struktur białek otrzymanych w kryształach i roztworze, zaś z drugiej strony umożliwiają badania takich białek, które nie krystalizują.

Ogromny potencjał badawczy spektroskopii NMR na razie nie znajduje odbicia w liczbie struktur dostępnych w bazach danych; mniej niż 14% struktur białek zdeponowanych w Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) zostało wyznaczonych w oparciu o dane uzyskane przy pomocy NMR. Taki stan rzeczy został spowodowany przez szereg przyczyn i warto wymienić podstawowe powody, które hamowały dotychczas szerokie wykorzystanie NMR w wyznaczaniu przestrzennych struktur białek [3].

Niska czułość spektroskopii NMR. Obecnie typowa ilość białka potrzebna do badań NMR wynosi około $0,5 \mu\text{M}$ czyli o kilka rzędów wielkości więcej niż ilość potrzebna do pomiarów optycznych czy w spektrometrii mas. Ponadto białko nie powinno podlegać agregacji przy stężeniach rzędu 1 mM/l .

Czasochłonność pomiarów NMR. Białko musi być stabilne w roztworze w temperaturze pokojowej co najmniej przez kilkanaście dni.

Sygnały w widmach białek poszczególnych izotopów są silnie ponakładane. Na przykład w białku składającym się z 200 reszt aminokwasowych należy oczekiwać około 1200 sygnałów izotopu ^1H , 1000 sygnałów izotopu ^{13}C i ponad 200 sygnałów izotopu ^{15}N występujących w wąskich przedziałach częstości.

Bardzo silny sygnał rozpuszczalnika jakim jest woda utrudnia obserwację widm ^1H NMR, zwłaszcza ważnego diagnostycznie obszaru sygnałów H_α .

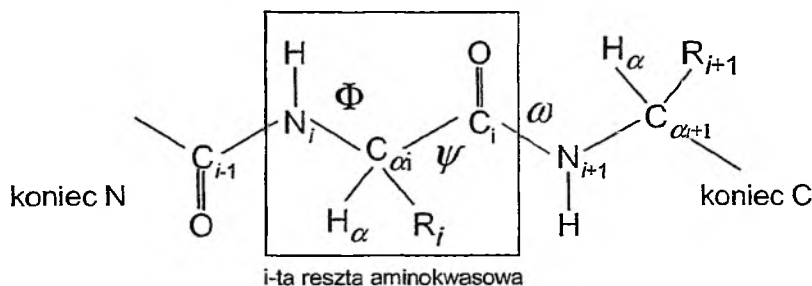
W dużych białkach sygnały ulegają poszerzeniu tracąc strukturę subtelną ze względu na wolniejszą reorientację dyfuzyjną.

Więzy strukturalne otrzymane z widm NMR są niejednoznaczne, co powoduje, że ich liczba musi być znacznie większa od liczby konformacyjnych stopni swobody.

Obecnie większość tych niekorzystnych właściwości widm NMR została przezwyciężona dzięki ogromnemu postępowi jaki dokonał się w budowie spektrometrów, projektowaniu nowych technik pomiarowych, znakowaniu izotopowym oraz procedurach komputerowych służących do otrzymania więzów strukturalnych i wykorzystaniu ich w obliczeniach strukturalnych. Dlatego w ostatnich latach liczba zdeponowanych w PDB struktur białek otrzymanych w oparciu o dane NMR rośnie lawinowo.

BUDOWA I KONFORMACJA BIAŁEK

Białka są biopolimerami zbudowanymi z aminokwasów, cząsteczek chemicznych mających ogólną strukturę daną wzorem $RCH(NH_2)COOH$, gdzie R – to podstawnik nazywany łańcuchem bocznym. W skład wszystkich białek wchodzi dwadzieścia podstawowych aminokwasów i jedynie nieliczne z białek zawierają ponadto zmodyfikowane aminokwasy nie należące do wspomnianej dwudziestki [4]. Aminokwasy w białkach są połączone wiązaniami peptydowymi tworząc łańcuch polipeptydowy, który umownie dzieli się na łańcuch główny (szkielet) i łańcuchy boczne (Rys. 1).

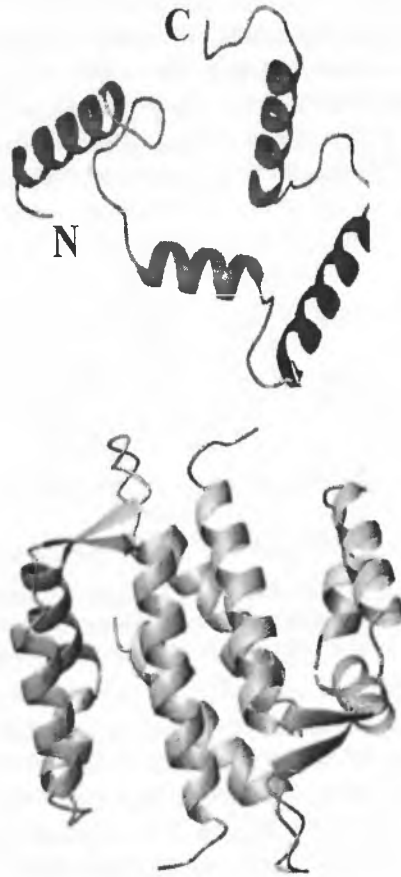


Rysunek 1. Fragment łańcucha polipeptydowego zbudowanego z reszt aminokwasowych połączonych wiązaniami peptydowymi. Łańcuch główny składa się z powtarzającej się sekwencji atomów $N-C_{\alpha}-C'$, R_i – łańcuchy boczne, Φ , Ψ , ω – kąty torsyjne określające konformację łańcucha głównego

Sekwencja reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym określa strukturę pierwszorzędową białka, która jest wyznaczana metodami biochemicznymi. Konformacja łańcucha głównego jest zdefiniowana przez trzy kąty torsyjne Φ , Ψ i ω dla każdej reszty aminokwasowej. Białka charakteryzują się tym, że odcinki łańcucha głównego posiadają lokalne struktury periodyczne jak helisy czy struktury β o określonych wartościach kątów torsyjnych [5, 6]. Ten pierwszy poziom przyjmowania przez białko końcowej struktury natywnej (zwijania białka) nosi nazwę struktury drugorzędowej. Struktura przestrzenna całej cząsteczki białka zbudowanego z pojedynczego łańcucha polipeptydowego jest nazywana strukturą trzeciorzędową. W przypadku białek zbudowanych z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego (białek multimerycznych) wzajemne ułożenie łańcuchów w strukturze finalnej określa strukturę czwartorzędową [4]. Wszystkie wymienione poziomy zwijania białka są przedstawione na Rys. 2.

Szczegół oddziaływań odpowiada za przyjęcie przez białko końcowej konformacji. Są to zarówno wiązania kowalencyjne jak i oddziaływania nickowalencyjne dyspersyjne i elektrostatyczne, będące skutkiem oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, a także odgrywających ważną rolę oddziaływań cząsteczki białka z cząsteczkami rozpuszczalnika.

GSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQT
 ELSGFLDAQKDADAVIDKVMKELDEDGDGEVDFQEYVVL
 VAALTVACNFFWENS



Rysunek 2. Różne poziomy budowy białka przedstawione na przykładzie homodimerycznego białka S100A1.

Łańcuch polipeptydowy jest zbudowany z 93 reszt aminokwasowych, których sekwencja (struktura pierwszorzędowa) jest pokazana w górnej części rysunku. Najważniejsze elementy struktury drugorzędowej, cztery długie α -helisy, bez uwzględnienia ich wzajemnej orientacji są przedstawione schematycznie w środkowej części rysunku. W części dolnej przedstawiono wzajemne położenie drugorzędowych elementów struktury w podjednostce (struktura trzeciorzędowa) oraz względną orientację dwóch podjednostek (struktura czwartorzędowa)

WIĘZY STRUKTURALNE

Budowa przestrzenna cząsteczki składającej się z N atomów jest jednoznacznie zdefiniowana przez $3N - 6$ współrzędnych wewnętrznych takich jak długości wiązań, kąty walencyjne i kąty dwuścienne. Dla długości wiązań i kątów walencyjnych,

które najczęściej nie zależą znacząco od zmian konformacyjnych, przyjmuje się wartości standardowe otrzymane innymi niż spektroskopia NMR, metodami doświadczalnymi. Do wyznaczenia pozostają kąty dwuściennie, których w reszcie aminokwasowej jest średnio pięć. Kąty te muszą zostać wyznaczone w oparciu o więzy strukturalne otrzymywane z danych znajdujących się w widmach NMR.

Widma NMR pozwalają na wyznaczenie kilku rodzajów więzów strukturalnych. Do najważniejszych i najczęściej wykorzystywanych zaliczają się odległości pomiędzy protonami otrzymywane z pomiarów jądrowego efektu Overhausera (NOE) [5]. Również często wykorzystywane są wycinalne stałe sprzężenia spinowego pozwalające na bezpośrednie obliczenie odpowiedniego kąta dwuściennego z zależności Karplusa [7, 8]. Istnienie wiązania wodorowego może być eksperymentalnie potwierdzone obserwacją sprzężeń spinowych przez te wiązania [9]. Wymienione rodzaje więzów zaliczają się do więzów krótkozasięgowych dających jedynie informacje o strukturze lokalnej. Zasięg efektu NOE w białkach nie przekracza 0,5 nm a długość wiązania wodorowego jest jeszcze mniejsza. Przy wyznaczaniu wzajemnej orientacji odległych fragmentów cząsteczki ma miejsce kumulowanie się błędów, którymi obarczone są poszczególne więzy krótkozasięgowe.

Badania prowadzone w rozpuszczalnikach anizotropowych pozwalają na wyznaczenie niecałkowicie uśrednionych przez ruchy dyfuzyjne sprzężeń dipolowych określanych w takim przypadku terminem resztkowych sprzężeń dipolowych. Ponieważ wszystkie obserwowane w cząsteczce resztkowe sprzężenia dipolowe zostają wyznaczone względem jednego molekularnego układu współrzędnych zdefiniowanego przez osie główne tensora dyfuzji cząsteczki, więc odległości pomiędzy wektorami łączącymi pary sprzężonych dipolowo jąder nie wpływają na dokładność wyznaczenia ich wzajemnej orientacji [10–14]. Jest to właściwość odróżniająca ten typ więzów od więzów krótkozasięgowych.

Żaden z wymienionych rodzajów więzów nie jest jednoznaczny. Proton H_A odległy o odcinek d od innego protonu H_B o znanym położeniu może znajdować się na powierzchni sfery o promieniu d , której środek wyznacza proton H_B . Do jednoznacznego określenia położenia protonu H_A potrzebna jest znajomość czterech odległości od różnych odpowiednio względem siebie zlokalizowanych protonów o znanych położeniach. Jednej wartości wycinalnej stałej sprzężenia mogą odpowiadać cztery różne wartości kąta dwuściennego i do usunięcia tej niejednoznaczności potrzebna jest znajomość dwóch lub trzech różnych sprzężeń wycinalnych posiadających wspólne wiązanie centralne. Spełnienie takiego warunku nie zawsze jest możliwe. Również dana wartość resztkowego sprzężenia dipolowego nie odpowiada jednemu kierunkowi odpowiedniego wektora międzyjądrowego i możliwe kierunki tworzą powierzchnie dwóch stożków eliptycznych. Z tych powodów dokładność wyznaczenia struktury przestrzennej rośnie z liczbą więzów. Powszechnie uważa się, że powinno ich być ponad 10 na jedną resztę aminokwasową.

PRZESUNIĘCIA CHEMICZNE W BIAŁKACH

W badaniach NMR białek oprócz przesunięć chemicznych protonów ^1H istotną rolę odgrywają również przesunięcia izotopów ^{15}N i ^{13}C . Położenia sygnałów w krótkich łańcuchach peptydowych, nie posiadających struktury drugorzędowej, są mało zróżnicowane. Natomiast w białkach posiadających strukturę trzecio- lub czwartorzędową zróżnicowanie jest znacznie większe i często charakterystyczne dla lokalnej struktury drugorzędowej. Typowe przedziały przesunięć chemicznych w białkach zostały zebrane w Tab. 1. Bardziej szczegółowe dane dotyczące przesunięć chemicznych ^1H i ^{13}C oparte na analizie danych NMR otrzymanych dla 13 białek zostały opublikowane przez Kraulisa [15].

Tabela 1. Charakterystyczne przedziały wartości przesunięć chemicznych izotopów ^1H , ^{15}N i ^{13}C w białkach diamagnetycznych

Jądro	Przedział [ppm]
H_N	7,0–10,0
H_arom	6,0–9,0
H_α (W)	9,5–10,5
H_α , H_β (S, T)	3,5–5,5
H_β , H_γ ...	0,3–4,0
N szkieletu, N_α (N), N_α (Q)	105–130
C'	170–182
C_arom ^{a)}	85–140
C_α , C_β (S, T), C_δ (P)	48–72
C_α (G)	40–48
C_β , C_γ ...	10–45

^{a)} nie obejmuje nieobserwowanych w widmach korelacyjnych $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ czwartorzędowych atomów węgla

Systematyczne odchylenia przesunięć chemicznych jąder H_α i C_α od przyjmowanych za punkt odniesienia przesunięć chemicznych tych jąder w odpowiednich resztach aminokwasowych znajdujących się łańcuchu nie mającym określonej struktury (stopiona globula) są wykorzystywane w metodzie CSI (ang. *chemical shift index*) do identyfikacji helis i struktur β [16, 17]. Również bazująca na wartościach przesunięć chemicznych metoda TALOS pozwala na przewidywanie lokalnej konformacji szkieletu białka [18].

Analizując podane w Tab. 1 wartości przesunięć chemicznych należy zwrócić uwagę na dwie ich cechy. Przedział przesunięć chemicznych szkieletowych proto-

nów amidowych H_N jest szeroki i oprócz tego znajdują się w nim jedynie protony aromatyczne fenyloalaniny, tyrozyny, histydyny i tryptofanu, które nie są sprzężone spinowo z pozostałymi protonami w resztach tych aminokwasów. Dlatego protony H_N znajdujące się na początku układów spinowych, które w aminokwasach są liniowe lub słabo rozgałęzione, stanowią dogodny punkt wyjściowy wielu procedur wykorzystywanych przy wyznaczaniu więzów strukturalnych. Drugą ważną cechą przesunięć chemicznych w białkach jest bardzo duża różnica pomiędzy przesunięciami chemicznymi szkieletowych węgli karbonylowych C' oraz węgli C_α i alifatycznych węgli łańcuchów bocznych. Dzięki temu możliwe jest niezależne, semiselektywne wzbudzenie jednego z tych przedziałów, co odgrywa ważną rolę w wielu technikach heterojądrowych stosowanych przy pomiarach białek znakowanych izotopem ^{13}C .

STRATEGIE WYZNACZANIA STRUKTUR BIAŁEK

Postępowanie zmierzające do wyznaczenia konformacji cząsteczki, niezależnie od jej wielkości, zawsze musi składać się z trzech kroków:

1. przypisanie sygnałów,
2. identyfikacja więzów strukturalnych,
3. generowanie struktur, w których spełnione są więzy doświadczalne.

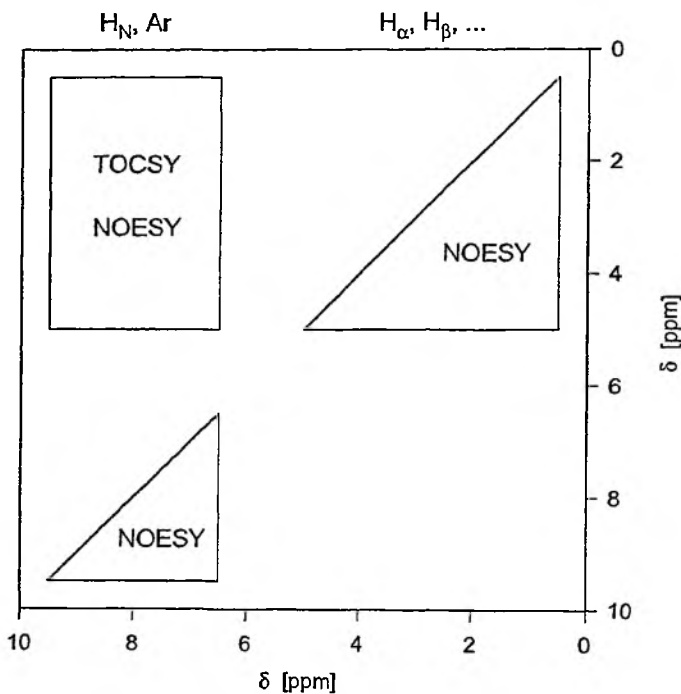
Postępowanie w pierwszych dwóch krokach zależy od wielkości badanego białka. Natomiast postępowanie w trzecim kroku jest określone przez rodzaj i liczbę dostępnych więzów [19, 20].

Do badania małych białek, o masach cząsteczkowych $M_{cz} < 10$ kDa, wystarczające jest wykorzystanie przesunięć chemicznych 1H i ich korelacji w dwuwymiarowej (2D) spektroskopii NMR [5, 19–21]. W białkach, których masy cząsteczkowe przekraczają 10 kDa nasilają się dwa efekty: rośnie liczba sygnałów, których szerokości zwiększają się, co jest konsekwencją coraz szybszej poprzecznej magnetycznej relaksacji jądrowej wynikającej z coraz wolniejszej dyfuzji rotacyjnej. Rosnąca liczba coraz szerszych sygnałów zwiększa ich nakładanie się, co uniemożliwia identyfikację sygnałów oraz wyznaczenie sprzężeń spinowych.

Metodami, które pozwalają pokonać te trudności jest znakowanie izotopowe. Omówienie obszernej problematyki znakowania izotopowego białek, wykraczającej poza zakres tej pracy, można znaleźć w odrębnych publikacjach [22–24]. Należy jednak wspomnieć, że białka można znakować jednorodnie, segmentowo lub selektywnie. Białka o masach cząsteczkowych $M_{cz} < 30$ kDa znakuje się jednorodnie izotopami ^{15}N i ^{13}C . Przystaje to jednak być wystarczające dla białek cięższych, które wymagają również częściowego deuterowania i selektywnego znakowania ^{13}C grup metylowych. Do badania białek znakowanych izotopowo wykorzystuje się szereg heterojądrowych technik 3D i 4D [20, 25–27].

Małe białka, $M_{cz} < 10$ kDa

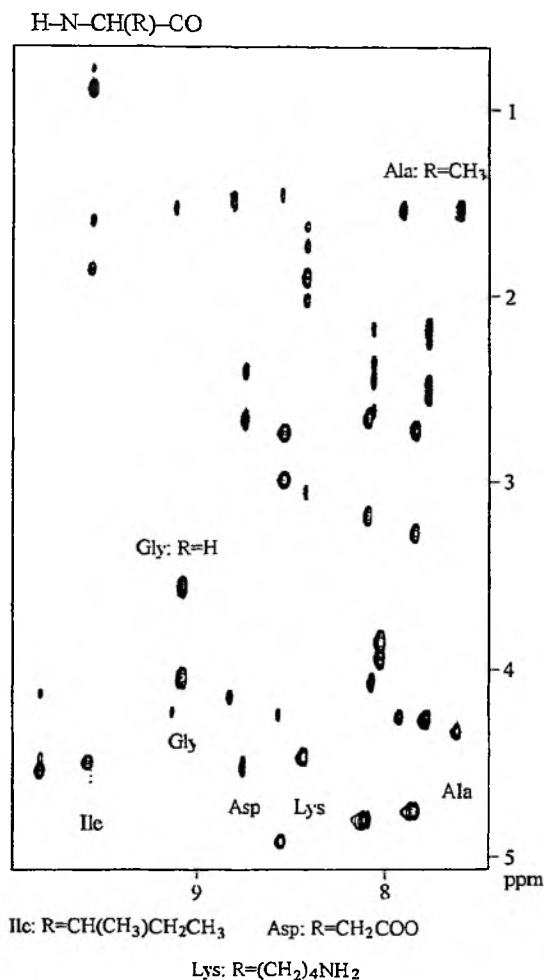
Przypisanie sygnałów ^1H i identyfikacja więzów strukturalnych w małych białkach opiera się na dwuwymiarowych widmach TOCSY (ang. *total correlation spectroscopy*) [28, 29], COSY (ang. *correlation spectroscopy*) [30] oraz NOESY (ang. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) [31] i składa się z trzech kroków. Na Rys. 3 przedstawiono schematycznie te obszary widm korelacyjnych, w których znajdują się najważniejsze informacje strukturalne.



Rysunek 3. Najważniejsze obszary widm TOCSY i NOESY wykorzystywane przy wyznaczaniu struktur przestrzennych małych białek

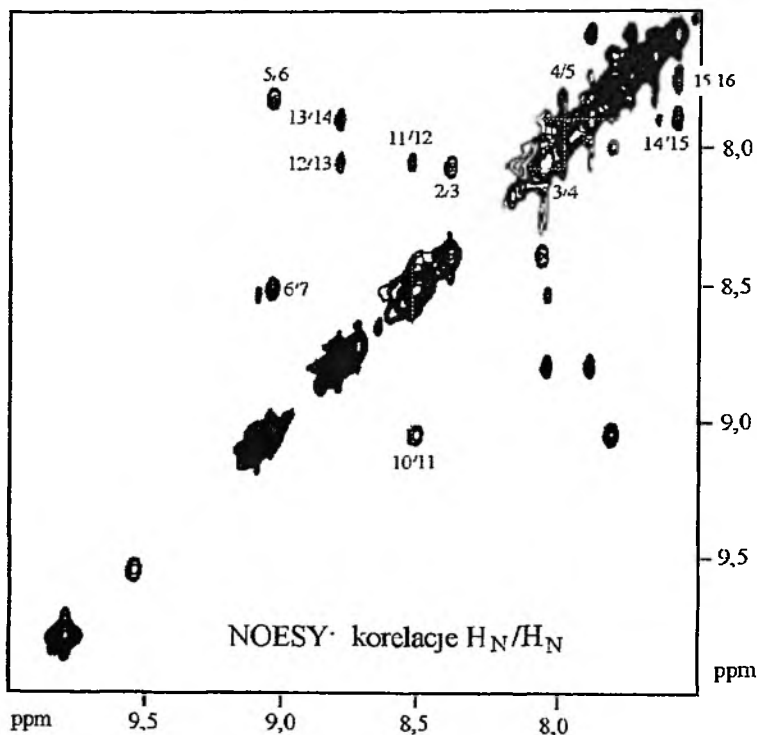
Pierwszy krok całej procedury, to identyfikacja układów spinowych poszczególnych reszt aminokwasowych otrzymana w oparciu o korelacje przekazywane przez wiązania chemiczne. Do tego wykorzystywane są techniki TOCSY (ang. *total correlation spectroscopy*) i COSY (ang. *correlation spectroscopy*). Takie widma dostarczają informacje o przesunięciach chemicznych jąder wchodzących w skład poszczególnych układów spinowych, lecz nie pozwalają rozróżnić reszt tego samego typu (np. dwóch alanin) lub reszt o takiej samej symetrii układu spinowego (np. tyrozyny i kwasu asparaginowego zawierających czterospinowy fragment $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CO})-\text{CH}_2-$). Ponieważ protony aromatyczne i grupa metylowa w metioninie nie są sprzężone z pozostałymi protonami w resztach aminokwasowych, więc na tym etapie ich syg-

nały zazwyczaj nie mogą być połączone z pozostałymi sygnałami reszty, do której należą. Wykorzystanie fragmentu widma TOCSY do pogrupowania sygnałów i identyfikacji układów spinowych przedstawiono na przykładzie heksadekapeptydu na Rys. 4 [32, 33].



Rysunek 4. Fragment widma TOCSY wykonanego dla heksadekapeptydu o sekwencji Ac-D-K-D-G-D-G-Y-I-S-S-A-A-E-A-A-A-Q-NH₂. W sekwencji znajdują się takie pojedyncze reszty jak lizyna (Lys, K) czy izoleucyna (Ile, I), których układy spinowe odróżniają się od pozostałych i dzięki temu mogą być jednoznacznie przypisane na tym etapie analizy danych. Również możliwe jest pogrupowanie sygnałów należących do każdej z pięciu alanin (Ala, A) czy dwóch glicyn (Gly, G), ale sygnałów tych nie można przypisać konkretnym położeniom w sekwencji. Kwas glutaminowy (Glu, E) i glutamina (Gln, Q) mają takie same układy spinowe niewymieniających się protonów, co nie pozwala na rozróżnienie pomiędzy tymi dwoma resztami. Jeszcze większa niejednoznaczność pojawia się w przypadku trzech kwasów asparaginowych (Asp, D), tyrozyny (Tyr, Y) i seryny (Ser, S). Układy spinowe reszt tych aminokwasów są złożone z czterech protonów H_N, H_α, H_{β1} i H_{β2}. Co prawda serynę można zidentyfikować dzięki znacznie większym niż w pozostałych resztach tej grupy przesunięciom chemicznym protonów H_β, ale pozostałych reszt nie można przypisać jednoznacznie

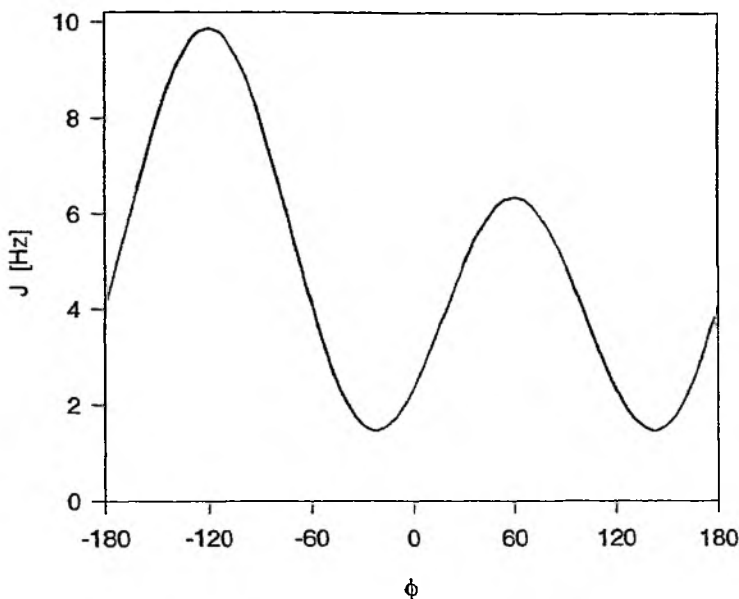
W drugim kroku procedury dokonuje się przypisań sekwencyjnych poszczególnych reszt aminokwasowych w oparciu o korelacje przekazywane przez oddziaływania dipolowe, które pojawiają się w widmach NOESY pomiędzy niesprzęzonymi spinowo, ale znajdującymi się blisko w przestrzeni protonami sąsiadujących reszt H'_N/H_{N+1} oraz H'_α/H_{N+1} . Postępowanie takie jest zaprezentowane na Rys. 5. W widmach NOESY pojawiają się również intraresydualne (ang. *intraresidual*) korelacje pomiędzy protonami H_β i protonami aromatycznymi, co pozwala jednoznacznie przypisać te ostatnie.



Rysunek 5 Część widma NOESY wykonanego dla heksadekapeptydu o sekwencji podanej na Rys. 4. Na widmie zaznaczono korelacje sekwencyjne H'_N/H_{N+1} . Jeden fragment przypisany sekwencyjnie zaczyna się od jednoznacznie przypisanego sygnału H_N w reszcie K2 i dochodzi do Y7. Drugi fragment przypisany daje sekwencję A-A-E/Q-A-A-E/Q. W znanej strukturze pierwszorzędowej jest tylko jeden taki fragment A10-A11-E12-A13-A14-A15-Q16. Pozostałe trzy reszty można przypisać jednoznacznie.

W trzecim kroku dokonuje się szczegółowej identyfikacji wszystkich korelacji interresydualnych występujących w widmie NOESY. Intensywności sygnałów korelacyjnych są przeliczane na odległości pomiędzy protonami i stanowią więzy strukturalne wykorzystywane przy generowaniu struktur [5]. Informacje te są uzupełniane wartościami kątów dwuściennych obliczanych z wicynalnych stałych sprzężeń

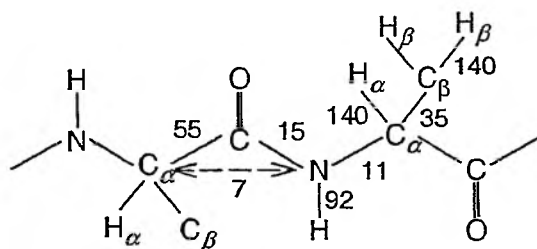
spinowych ${}^3J(\text{H}_\beta, \text{H}_\alpha)$, dla których najbardziej wiarygodną parametryzację równania Karplusa przedstawiono na Rys. 6 [34].



Rysunek 6. Zależność wicynalnej stałej sprzężenia spinowego ${}^3J(\text{H}_\beta, \text{H}_\alpha)$ od kąta dwuściennego ϕ . W równaniu Karplusa mającym postać $J = A\cos^2\phi + B\cos\phi + C$, współczynniki przyjmują następujące wartości: $A = +6,51$ Hz, $B = -1,76$ Hz oraz $C = +1,60$ Hz [34]. Ze względu na przyjętą definicję kąta ϕ zachodzi relacja $\varphi = \phi + 60^\circ$.

Średnie białka, $10 \text{ kDa} < M_r < 30 \text{ kDa}$

Białka o masach z przedziału 10–30 kDa do badań NMR znakuje się jednorodnie izotopami ${}^{15}\text{N}$ i ${}^{13}\text{C}$. Przypisania sygnałów ${}^1\text{H}$, ${}^{15}\text{N}$ i ${}^{13}\text{C}$ są wykonywane w oparciu o wielojądrowe, wielowymiarowe techniki, w których do skorelowania sygnałów wykorzystuje się duże, heterojądrowe sprzężenia spinowe [20, 25] (Rys. 7).



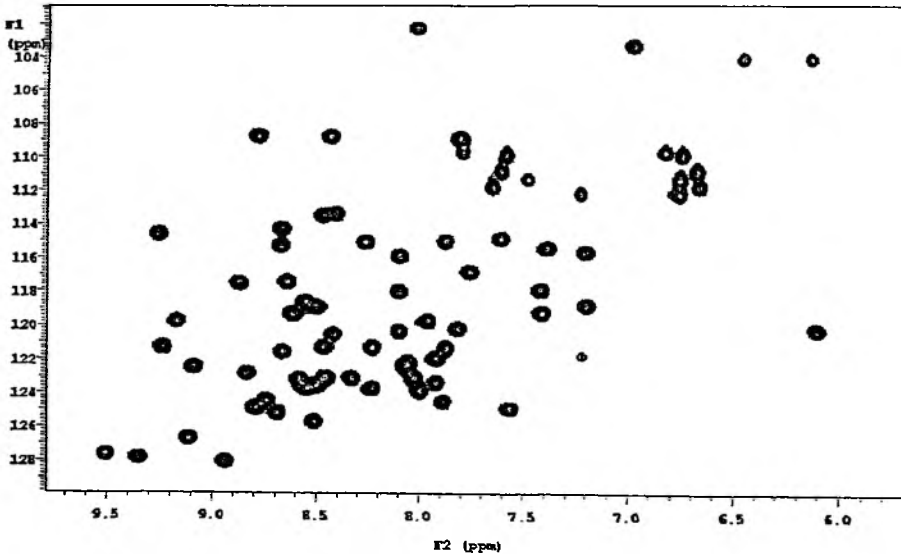
Rysunek 7. Fragment łańcucha polipeptydowego z zaznaczonymi wartościami heterojądrowych sprzężeń spinowych wykorzystywanych do przypisania sygnałów w ${}^{15}\text{N}/{}^{13}\text{C}$ podwójnie znakowanych białkach. Wszystkie wartości podano w Hz

W Tab. 2 zebrano najczęściej stosowane do tego celu techniki. Aby zapewnić największą dostępną czułość, sekwencje te zaczynają się i kończą na jądрах ^1H .

Tabela 2. Najważniejsze sekwencje heterojądrowe wykorzystywane do przypisania sygnałów w widmach NMR jąderek ^1H , ^{15}N i ^{13}C szkieletu i łańcuchów bocznych podwójnie znakowanych białek. Jest przyjęte, że w nazwach sekwencji umieszcza się w nawiasach te jądra, których przesunięcia chemiczne nie są rejestrowane aczkolwiek są one wykorzystywane do przekazania magnetyzacji. W drugiej kolumnie wyróżniono jądra, których przesunięcia chemiczne są mierzone a symbolami f_i oznaczono odpowiedni wymiar w widmie.

Górnym wskaźnik oznacza kolejność reszty aminokwasowej w sekwencji.

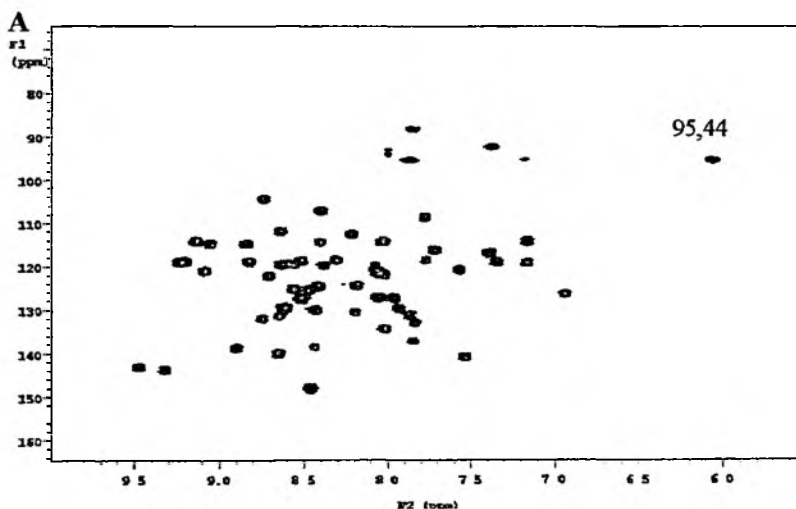
Nazwa sekwencji	Droga przeniesienia magnetyzacji	Grupy przesunięć chemicznych
$^{15}\text{N}^i\text{H}$ HSQC	$\text{H}_N \rightarrow \text{N}(f_1) \rightarrow \text{H}_N(f_2)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}$
HNCO	$\text{H}_N^{(i)} \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_1) \rightarrow \text{C}^{(i-1)}(f_2) \rightarrow \text{N}^{(i)} \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}^{(i-1)}$
HN(CO)CA	$\text{H}_N^{(i)} \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_1) \rightarrow \text{C}^{(i-1)} \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i-1)}(f_2) \rightarrow \rightarrow \text{C}^{(i-1)} \rightarrow \text{N}^{(i)} \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}^{(i-1)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}$
HNCA	$\text{H}_N^{(i)} \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_1) \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i)} / \text{C}_\alpha^{(i-1)}(f_2) \rightarrow \text{N}^{(i)} \rightarrow \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}_\alpha^{(i)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}$
HN(CA)CO	$\text{H}_N^{(i)} \rightarrow \text{N}^{(i)} \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i)} / \text{C}_\alpha^{(i-1)} \rightarrow \text{C}^{(i)} / \text{C}^{(i-1)}(f_1) \rightarrow \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i)} / \text{C}_\alpha^{(i-1)} \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_2) \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}^{(i)}, \text{C}_\alpha^{(i)}, \text{C}^{(i-1)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}$
CBCA(CO)NH	$\text{H}_\alpha^{(i-1)} / \text{H}_\beta^{(i-1)} \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i-1)} / \text{C}_\beta^{(i-1)}(f_1) \rightarrow \text{C}^{(i-1)} \rightarrow \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_2) \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}^{(i)}, \text{C}_\alpha^{(i)}, \text{C}_\beta^{(i)}, \text{C}^{(i-1)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}, \text{C}_\beta^{(i-1)}$
HBHA (CBCACO)NH	$\text{H}_\alpha^{(i-1)} / \text{H}_\beta^{(i-1)}(f_1) \rightarrow \text{C}_\alpha^{(i-1)} / \text{C}_\beta^{(i-1)} \rightarrow \text{C}^{(i-1)} \rightarrow \rightarrow \text{N}^{(i)}(f_2) \rightarrow \text{H}_N^{(i)}(f_3)$	$\text{H}_N^{(i)}, \text{N}^{(i)}, \text{C}^{(i)}, \text{C}_\alpha^{(i)}, \text{C}_\beta^{(i)}, \text{C}^{(i-1)}, \text{C}_\alpha^{(i-1)}, \text{C}_\beta^{(i-1)}, \text{H}_\alpha^{(i-1)}, \text{H}_\beta^{(i-1)}$



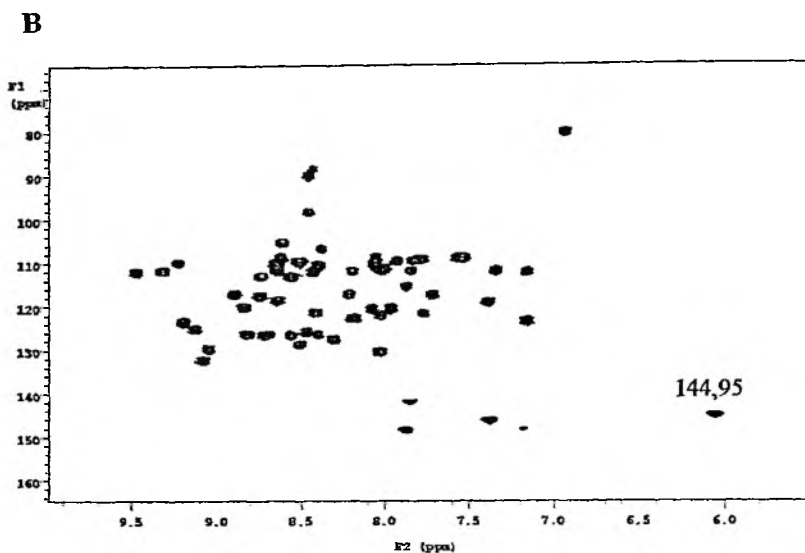
Rysunek 8. Dwuwymiarowe widmo $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC korelujące przesunięcia chemiczne jąderek ^1H i ^{15}N grup amidowych przez stałą sprzężenia spinowo-spinowego $^1J(\text{N},\text{H})$, które wykonano dla podwójnie znakowanej ubikwityny, białka liczącego 76 reszt aminokwasowych. Każda grupa amidowa jest na widmie reprezentowana przez jeden sygnał korelacyjny. Na osi F1 znajdują się przesunięcia chemiczne ^{15}N a na osi F2 – przesunięcia chemiczne $^1\text{H}_N$

Ponadto we wszystkich wymienionych technikach do korelacji wykorzystuje się jądra protonu i azotu grup amidowych. Wynika to ze znacznego zróżnicowania przesunięć chemicznych tych jąder oraz bardzo słabej korelacji pomiędzy nimi. Ilustruje to Rys. 8, na którym przedstawiono dwuwymiarowe widmo zawierające korelacje omawianych przesunięć chemicznych w białku ubikwitynie. Nakładanie sygnałów korelacyjnych jest zanedbywalnie małe. Odrębne techniki stosuje się do przypisań sygnałów grup metylowych [35–37] i aromatycznych [38, 39].

Ponieważ całkowity czas rejestracji widma wielowymiarowego rośnie potęgowo z liczbą wymiarów, więc jego skrócenie odgrywa ważną rolę, szczególnie w przypadku białek o ograniczonym czasie trwałości. Jedną z najbardziej obiecujących metod pozwalających na znaczne skrócenie czasu rejestracji widma bez degradacji rozdzielczości jest metoda zredukowania wymiarowości (ang. *reduced dimensionality* – RD) [40–42]. W widmach RD informacje o n przesunięciach chemicznych są zakodowane w 2^n widmach dwuwymiarowych. Przykład trójwymiarowego widma HN(CO)CA zredukowanego do dwóch wymiarów jest przedstawiony na Rys. 9. Pomiar widma 2D HN(CO)CA-RD trwa kilkakrotnie krócej niż klasycznego widma 3D HN(CO)CA.



Rysunek 9



Rysunek 9. Widma HN(CO)CA o zredukowanej wymiarowości dla podwójnie znakowanej ubikwiny. Widma pozwalają na skorelowanie przesunięć chemicznych jąder ^1H i ^{15}N grup amidowych z przesunięciami chemicznymi C_α poprzedzającej reszty aminokwasowej (patrz Tab. 2). Każde z widm zawiera sygnały korelacyjne o częstościach będących za każdym razem inną kombinacją liniową częstości jąder „zredukowanych”, w tym przypadku ^{15}N i C_α . Przez częstości jąder rozumie się różnice pomiędzy częstościami rezonansowymi i nośnymi wyrażone w Hz; widmo A zawiera sumę częstości, a widmo B – różnicę. Przykład liczbowy przedstawiony dla sygnału o najmniejszej wartości przesunięcia chemicznego H_α (najbardziej na prawo) korelującego reszty Gly35-Ile36 pozwala zrozumieć ideę zredukowanej wymiarowości

$$\delta(^{15}\text{N}) = [\delta_1(^{15}\text{N}) + \delta_2(^{15}\text{N})]/2 = (95,44 + 144,95)/2 = 120,19.$$

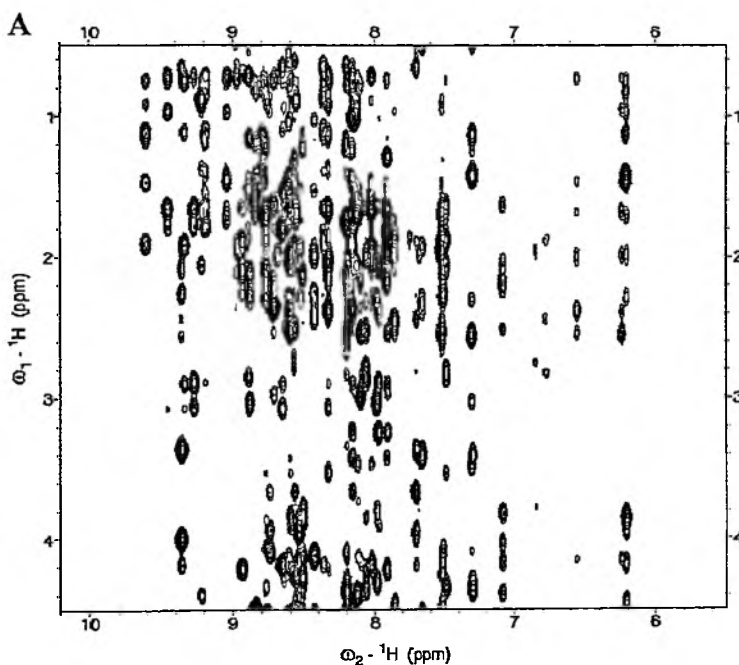
$$\delta(^{13}\text{C}) = \delta_f(^{13}\text{C}) + [\delta(^{15}\text{N}) - \delta_1(^{15}\text{N})][f(^{15}\text{N})/f(^{13}\text{C})],$$

gdzie $\delta_f(^{13}\text{C})$ oznacza położenie częstości nośnej impulsu węglowego na skali przesunięć chemicznych, w tym przypadku ustawione przy 56,00 ppm, zaś $f(^{15}\text{N})/f(^{13}\text{C})$ jest stosunkiem częstości rezonansowych dwóch izotopów wynoszącym 0,404. Ostatecznie $\delta(^{13}\text{C}) = 56,00 + (120,19 - 144,95)0,404 = 46,00$

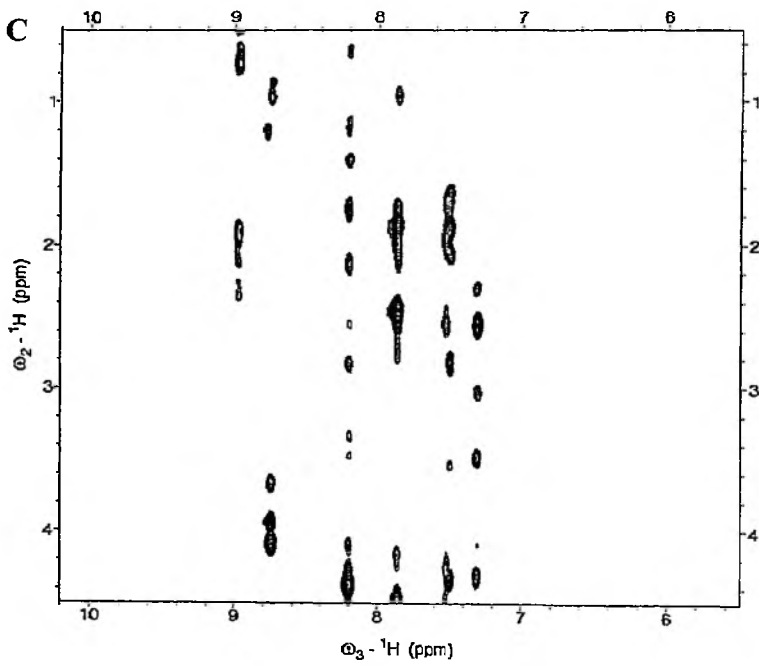
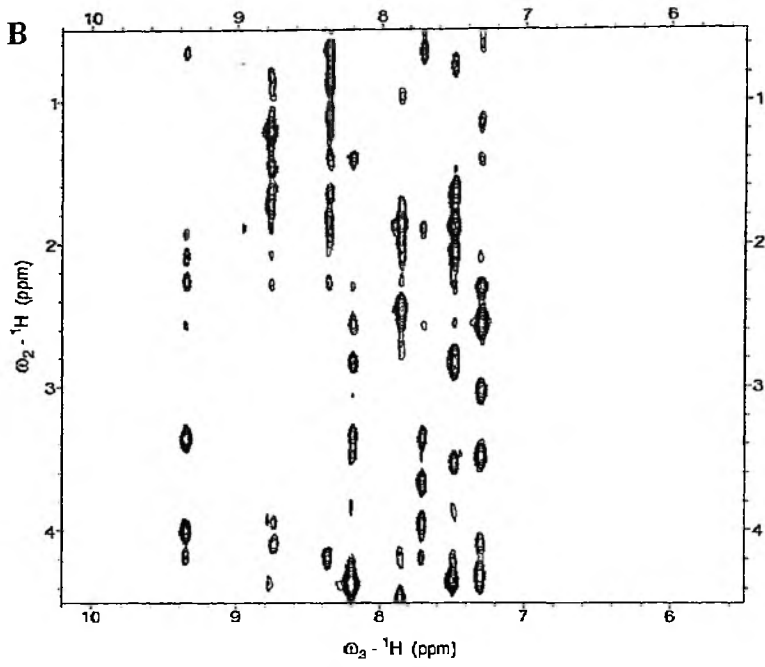
Dwuwymiarowe widma NOESY średnich białek mają tak dużą liczbę sygnałów korelacyjnych, że ich pełna identyfikacja staje się niemożliwa. Dlatego korzystając z obecności izotopów ^{15}N i ^{13}C widma dwuwymiarowe rozciągają się w trzecim i ewentualnie w czwartym wymiarze stosując redagowanie izotopowe (Tab. 3), dzięki czemu każdy sygnał korelacyjny jest identyfikowany nie przez dwa a przez trzy lub cztery przesunięcia chemiczne, co w znaczący sposób zmniejsza nakładanie się sygnałów. Fragment trójwymiarowego ^{15}N -redagowanego widma NOESY jest przedstawiony na Rys. 10. Izotopowo redagowane widma NOESY stanowią podstawowe źródło informacji strukturalnych dostarczając dane o odległościach pomiędzy protonami w białkach [20, 26, 27].

Tabela 3. Sekwencje wykorzystywane do redagowania izotopowego widm NOESY jednorodnie znakowanych $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ białek. W drugiej kolumnie wyróżniono jądra, których przesunięcia chemiczne są mierzone a symbolami f_i oznaczono odpowiedni wymiar w widmie

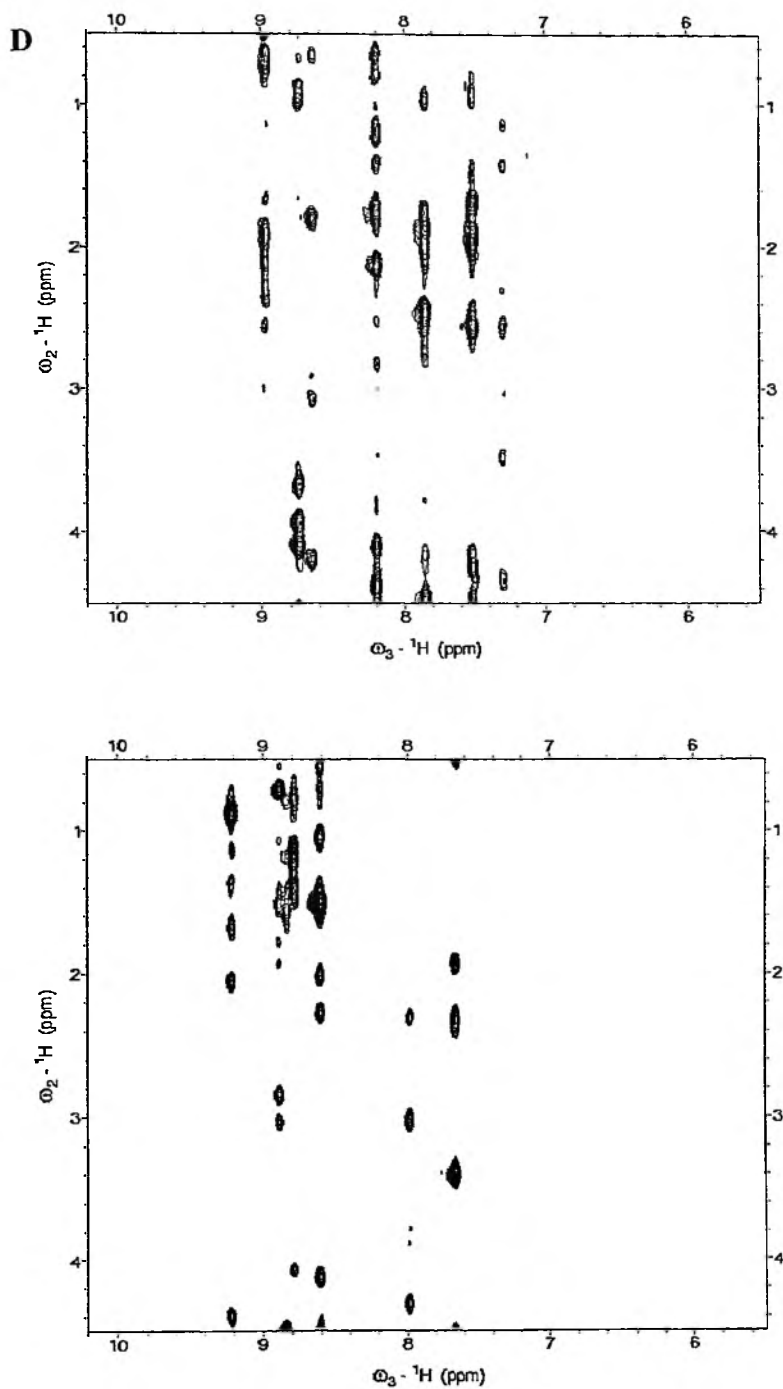
Rodzaj sekwencji	Droga przeniesienia magnetyzacji	Korelacje NOE
3D NOESY-HMQC	$\mathbf{H}(f_1) \rightarrow \text{H}_\text{N} \rightarrow \text{N}(f_2) \rightarrow \mathbf{H}_\text{N}(f_3)$	$\text{H}_\text{N}/\text{H}_\text{N}$, $\text{H}_\text{C}/\text{H}_\text{N}$
3D HMQC-NOESY-HMQC	$\text{H}_\text{N} \rightarrow \text{N} \rightarrow \mathbf{H}_\text{N}(f_1) \rightarrow \text{H}_\text{N} \rightarrow \text{N}(f_2) \rightarrow \mathbf{H}_\text{N}(f_3)$	$\text{H}_\text{N}/\text{H}_\text{N}$
4D HMQC-NOESY-HMQC	$\text{H}_\text{C} \rightarrow \text{C}(f_1) \rightarrow \mathbf{H}_\text{C}(f_2) \rightarrow \text{H}_\text{C} \rightarrow \text{C}(f_3) \rightarrow \mathbf{H}_\text{C}(f_4)$	$\text{H}_\text{C}/\text{H}_\text{C}$



Rysunek 10. Fragment ^{15}N -redagowanego widma NOESY zarejestrowanego dla ubikwityny. Widmo A jest standardowym widmem 2D NOESY, a widma B–E przekrojami widma ^{15}N -redagowanego 3D NOESY przy przesunięciach chemicznych ^{15}N odpowiednio: 116,2 ppm, 116,9 ppm, 117,4 ppm i 126,0 ppm. Silnie ponakładane w widmie 2D sygnały korelacyjne można jednoznacznie przypisać po rozciągnięciu wzdłuż trzeciego wymiaru – ^{15}N



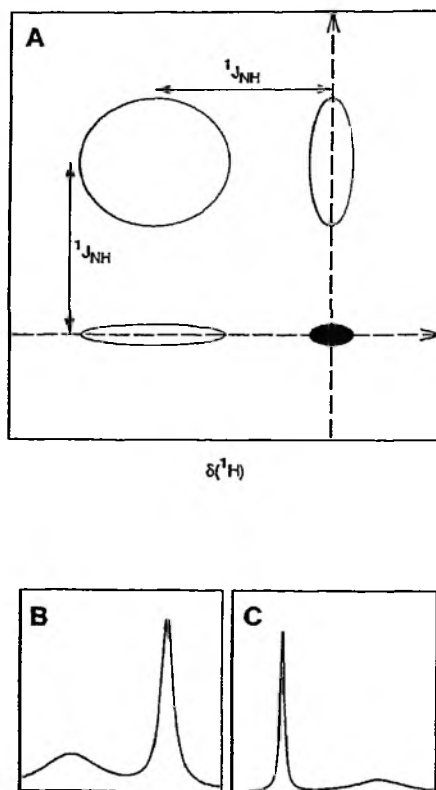
Rysunek 10. Ciąg dalszy



Rysunek 10. Ciąg dalszy

Duże białka, $M_{cz} > 30$ kDa

Dotychczas nie opracowano konkretnej strategii otrzymywania kompletnych wiązków strukturalnych w dużych białkach. W prowadzonych obecnie badaniach stosuje się dwa rodzaje zabiegów mających za zadanie poprawę rozdzielczości. Jednym jest deuterowanie protonów niewymieniających się, co powoduje spowolnienie relaksacji poprzecznej jąder ^{13}C prowadzące do zwężenia ich sygnałów o rząd wielkości [27]. Pewnym mankamentem deuterowania jest brak informacji o przesunięciach chemicznych protonów H_α . Drugim zabiegiem jest stosowanie techniki TROSY (ang. *transverse relaxation optimized spectroscopy*) [43, 44], wykorzystującej zjawisko interferencji dwóch mechanizmów relaksacji, dipolowej i anizotropii przesunięcia chemicznego, dla jąder ^{15}N grup amidowych. Na skutek interferencji składowe nieodsprężonego sygnału korelacyjnego $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ różnią się szerokościami półkwowymi. W technice TROSY rejestruje się jedynie największą składową (Rys. 11).



Rysunek 11 Schematyczne przedstawienie nieodsprężonego sygnału korelacyjnego $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ w dużym białku (A) oraz przekroje wzdłuż przerywanych linii (B, C) Składowe różnią się szerokościami półkwowymi ze względu na interferencję mechanizmów relaksacji dipolowej i anizotropii przesunięcia chemicznego. W technice TROSY rejestruje się jedynie największą składową sygnału

W efekcie oprócz rozdzielczości poprawia się również stosunek sygnału do szumów pomimo tego, że następuje zmniejszenie intensywności integralnej sygnałów korelacyjnych.

Badanie zdeuterowanych białek przy wykorzystaniu technik wymienionych w Tab. 2 zmodyfikowanych tak, by uwzględnić zjawisko interferencji, znacznie przesuwa granicę stosowalności spektroskopii NMR. Np. możliwe było przypisanie ponad 90% sygnałów H_N , N, C_α i C_β w kompleksie białkowym o masie cząsteczkowej 64 kDa [45].

Znakowanie $^{15}N/^{13}C/^2H$ z podstawieniem 1H_N oraz 1H w grupie metylowej δ -Ile oraz grupach metylowych waliny i leucyny pozwala na zidentyfikowanie następujących korelacji NOE: H_N/H_N , H_N/Me i Me/Me . Korelacje te okazują się wystarczające do otrzymania dość dokładnej struktury przestrzennej.

PERSPEKTYWY

Należy oczekiwać, że postęp w badaniach strukturalnych białek będzie przebiegał kilkutorowo. Jedną z jego przyczyn będzie stała poprawa parametrów spektrometrów NMR. Silniejsze pola magnetyczne spowodują, że zwiększeniu ulegną zarówno rozdzielczość spektralna jak i czułość metody. Ponadto czułość znacznie wzrasta przy stosowaniu sond niskotemperaturowych, w których cewka odbiorcza pracuje w temperaturze kilkunastu kelwinów. W efekcie do badań NMR potrzebna będzie mniejsza ilość substancji. Inną przyczyną będzie doskonalenie metod biotechnologicznych pozwalających produkować taniej i wydajniej różnorodnie znakowane izotopowo białka. Wreszcie rozwój metod badawczych optymalizujących pomiary NMR makromolekuł jak np. TROSY będzie dopełniał gamy środków oddanych do dyspozycji badaczy zajmujących się strukturą białek. Niedawno pojawiły się doniesienia, że segmentowe znakowanie $^{15}N/^{13}C$ w połączeniu z deuterowaniem i techniką TROSY umożliwi badanie białek o masach cząsteczkowych ponad 100 kDa [46].

PODZIĘKOWANIE

Autor dziękuje dr Igorowi Zhukowowi z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za udostępnienie widm ubikwityny, które zostały wykorzystane przy wykonaniu rysunków 8–10.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H. Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. 3rd revised edition*, VCH Publishers Inc., Weinheim, 1999.
- [2] A. Ejchart, A. Gryff-Keller, *NMR w cieczech. Zarys teorii i metodologii*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
- [3] I. Zhukov, A. Ejchart, *Polimery*, 2003, 48, 28.
- [4] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 1997, rozdz. 2.
- [5] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986.
- [6] D.A. Case, H.J. Dyson, P.E. Wright, [w:] *Methods in Enzymology*, red. T.L. James, N.J. Oppenheimer, tom 239, Academic Press, London 1994, s. 392.
- [7] J. Rizo, L.M. Gierasch, [w:] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, red. D.M. Grant, R.K. Harris, tom 6, John Wiley, Chichester 1996, s. 3517.
- [8] A. Ejchart, *Bull. Pol. Ac.: Chem.*, 1999, 47, 1.
- [9] A.J. Dingley, F. Cordier, V.A. Jaravine, S. Grzesiek, [w:] *BioNMR in Drug Research*, red. O. Zerbe, Wiley-VCH, Weinheim 2003, s. 207.
- [10] J.H. Prestegard, J.R. Tolman, H.M. Al-Hashimi, M. Andrec, [w:] *Biological Magnetic Resonance*, red. N.R. Krishna, L.J. Berliner, tom 17, Kluwer, New York 1999, s. 311.
- [11] E. Brunner, *Concepts Magn. Reson.*, 2001, 13, 238.
- [12] A. Bax, G. Kontaxis, N. Tjandra, [w:] *Methods in Enzymology*, red. T.L. James, V. Dötsch, U. Schmitz, vol. 339, Academic Press, San Diego 2001, s. 127.
- [13] E. de Alba, N. Tjandra, *Prog. NMR Spectrosc.*, 2002, 39, 175.
- [14] A. Bax, *Protein Sci.*, 2003, 12, 1.
- [15] P.J. Kraulis, *J. Mol. Biol.*, 1994, 243, 696.
- [16] D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards, *Biochemistry*, 1992, 31, 1647.
- [17] D.S. Wishart, B.D. Sykes, *J. Biomol. NMR*, 1994, 4, 171.
- [18] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 1999, 13, 289.
- [19] R. Kaptein, R. Boelens, R.M. Scheek, W.F. van Gunsteren, *Biochemistry*, 1988, 27, 5389.
- [20] G.M. Clore, A.M. Gronenborn, [w:] *Biological Magnetic Resonance*, red. N.R. Krishna, L.J. Berliner, tom 16, Kluwer, New York 1998, s. 3.
- [21] H.J. Dyson, G.P. Gippert, D.A. Case, A. Holmgren, P.E. Wright, *Biochemistry*, 1990, 29, 412.
- [22] L.-Y. Lian, D.A. Middleton, *Prog. NMR Spectrosc.*, 2001, 39, 171.
- [23] H. Patzelt, N. Goto, H. Iwai, K. Lundstrom, E. Fernholz, [w:] *BioNMR in Drug Research*, red. O. Zerbe, Wiley-VCH, Weinheim 2003, s. 1.
- [24] D. Cowburn, T.W. Muir, [w:] *Methods in Enzymology*, red. T.L. James, V. Dötsch, U. Schmitz, vol. 339, Academic Press, San Diego 2001, s. 41.
- [25] A. Bax, *Acc. Chem. Res.*, 1993, 26, 131.
- [26] V. Dötsch, [w:] *BioNMR in Drug Research*, red. O. Zerbe, Wiley-VCH, Weinheim 2003, s. 79.
- [27] L.E. Kay, [w:] *Methods in Enzymology*, red. T.L. James, V. Dötsch, U. Schmitz, vol. 339, Academic Press, San Diego 2001, s. 174.
- [28] L. Braunschweiler, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1983, 53, 521.
- [29] A. Bax, D.B. Davies, *J. Magn. Reson.*, 1985, 65, 355.
- [30] W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1976, 64, 2229.
- [31] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1979, 71, 4546.
- [32] A. Ejchart, M. Siedlecka, H. Sticht, A. Bierzyński, *Bull. Pol. Ac.: Chem.*, 1998, 46, 1.
- [33] M. Siedlecka, G. Goch, A. Ejchart, H. Sticht, A. Bierzyński, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 903.
- [34] G.W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 7772.

- [35] S. Grzesiek, J. Anglister, A. Bax, *J. Magn. Reson.*, 1993, **B101**, 114.
- [36] T.M. Logan, E.T. Olejniczak, R. Xu, S.W. Fesik, *FEBS Lett.*, 1992, **314**, 413
- [37] G.T. Montelione, B.A. Lyons, S.D. Emerson, M. Tashiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10974.
- [38] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6527.
- [39] T. Yamazaki, J.D. Kay, L.E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 11054.
- [40] T. Szyperski, G. Wider, J.H. Bushweller, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9307.
- [41] W. Koźmiński, I. Zhukov, *J. Biomol. NMR*, 2003, **26**, 157.
- [42] B. Bersch, E. Rossy, J. Covčs, B. Brutscher, *J. Biomol. NMR*, 2003, **27**, 57.
- [43] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 12366.
- [44] M. Slazmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 13585.
- [45] X. Shan, K.H. Gardner, D.R. Muchandaram, N.S. Rao, C.H. Arrowsmith, L.E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6570.
- [46] G. Wider, K. Wüthrich, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, **9**, 594.

SPEKTROSKOPIA NMR W BADANIACH STRUKTURALNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH. CZEŚĆ I.

NMR SPECTROSCOPY IN STRUCTURAL STUDIES OF NUCLEIC ACIDS. PART I.

Zofia Gdaniec

*Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

Abstract

Wstęp

1. Synteza RNA i DNA
2. Parametry strukturalne kwasów nukleinowych
3. Przypisanie sygnałów dla cząsteczek o naturalnej zawartości izotopów
4. Strategia przypisywania sygnałów dla cząsteczek znakowanych izotopowo
 - 4.1. Przypisanie protonów w nukleozasadach
 - 4.2. Przypisanie sygnałów pochodzących od pierścienia cukrowego
 - 4.3. Korelacja sygnałów pierścienia cukrowego i zasady
 - 4.4. Sekwencyjne przypisanie reszt cukrowych z wykorzystaniem korelacji heterojądrowych wzdłuż szkieletu fosforocukrowego
5. Technika TROSY
6. Obserwacja sprzężeń skalarnych poprzez wiązania wodorowe
7. Resztkowe sprzężenia dipolowe (RDC) w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Zofia Gdaniec jest absolwentką fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała na Wydziale Chemii UAM. Obecnie jest docentem w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Od szeregu lat zajmuje się spektroskopią NMR kwasów nukleinowych, w szczególności RNA. Prowadzone przez nią badania dotyczą ustalania metodami spektroskopii NMR struktury funkcjonalnie istotnych fragmentów RNA oraz ich oddziaływania z jonami metali.

ABSTRACT

NMR spectroscopy is a powerful method that allows determination of the structure and dynamics of nucleic acids and their complexes in solution with atomic resolution. A major breakthrough in the structure determination of nucleic acids by NMR was introduction of advanced and efficient methods for the labeling of RNA and DNA with ^{13}C and ^{15}N and development of multidimensional, heteronuclear NMR techniques analogous to those used in protein NMR spectroscopy.

The resonance assignment is a crucial step in the NMR study. A spectrum must be assigned before useful structural information can be extracted. The assignment of RNA is considerably more difficult than for DNA of similar size. This is mainly due to the much narrower spectral dispersion of the H2', H3', H4' and H5'/5'' ribose protons relative to DNA. The methodology for sequential assignment of nucleic acids via homonuclear NMR techniques relies on the assumption of helical structure and therefore fails in the case of nonhelical structures, that is typical of RNA.

Development of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeling techniques has afforded heteronuclear multidimensional experiments that utilize the favorable properties of ^{13}C and ^{15}N nuclei such as large one- and two-bond heteronuclear scalar coupling constants and large chemical shift dispersion. These experiments provide increased sensitivity of double and triple resonance experiments and help in overcoming the problem of severe spectral overlap.

Progress in novel NMR methods stimulated also a design of experiments for conformation-independent sequential assignment. In nucleic acids, experiments that correlate base resonances among themselves as well as with sugar resonances allow unambiguous spectral assignment for the structures, where the conventional NOE-based methods may not be applied. Assignments of highly overlapped sugar resonances are facilitated enormously by the application of correlated experiments based on ^{13}C - ^{13}C transfer. Additionally, triple resonance experiments allow correlation of neighboring nucleotides through the phosphodiester backbone.

The arsenal of existing methods in structure calculations of nucleic acids by NMR spectroscopy has recently been extended. For example, NMR methods have been developed to detect and measure scalar couplings via hydrogen bonds. The information about hydrogen bonds provides very useful restraints for structural determination, especially in case of noncanonical motifs.

Furthermore, the use of methods that introduce anisotropic environments for nucleic acids in solution allows the measurement of residual dipolar couplings (RDC). RDCs yield orientation, rather than distance-based constraints. The RDCs contain global structural information on nucleic acids that cannot be obtained by standard solution NMR techniques. These constraints can both improve the local structure of nucleic acids and provide novel data on the global structure.

Another NMR technique, TROSY, has been introduced to effectively suppress transverse relaxation of ^1H - ^{15}N and ^1H - ^{13}C moieties. TROSY selects exclusively the narrow line of a ^1H - ^{15}N doublet or ^1H - ^{13}C multiplet, yielding improved spectral resolution and increased sensitivity of NMR experiment.

Recent advances in solution NMR techniques provide tools for structural studies of large (> 30 residues) nucleic acids molecules.

Keywords: NMR spectroscopy, DNA and RNA, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ isotopic labeling, assignment strategy

Słowa kluczowe: spektroskopia NMR, DNA i RNA, znakowanie izotopowe $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, strategia przypisywania sygnałów

WSTĘP

Biomolekularna spektroskopia NMR jest obecnie jedyną metodą eksperymentalną pozwalającą na ustalenie struktury przestrzennej makrocząsteczek w roztworze z rozdzielczością atomową. Ma to szczególnie duże znaczenie dla rozwiązywania realnych zagadnień biochemicznych np. prób powiązania struktury cząsteczek z ich funkcją w komórce. Zaletą ustalania struktur DNA i RNA metodami NMR jest ponadto możliwość rejestrowania funkcjonalnie istotnych zmian konformacyjnych cząsteczki, opis ich dynamiki oraz analiza procesów wiązania ligandów.

Postęp w dziedzinie spektroskopii NMR kwasów nukleinowych, zarówno DNA i RNA, dokonał się nie tylko dzięki konstrukcji coraz to nowocześniejszych spektrometrów wyposażonych w potężne magnesy nadprzewodzące (21,14 T – 900 MHz dla ^1H), ale także dzięki rozwojowi wielowymiarowych technik heterojądrowych. Nieustannie pojawiają się coraz to nowe techniki pomagające pokonać niedoskonałości tych stosowanych dotychczas. Postęp w dziedzinie spektroskopii NMR kwasów nukleinowych był również możliwy dzięki opracowaniu metod enzymatycznej syntezy RNA i, dużo później, DNA [1–6] pozwalających na otrzymywanie cząsteczek całkowicie znakowanych izotopami ^{13}C , ^{15}N i ^2H oraz postępowi w dziedzinie syntezy chemicznej sekwencyjnie specyficznego znakowania fragmentów RNA [7]. Struktury kwasów nukleinowych otrzymywane metodami NMR są z coraz większą precyzją i dokładnością i mogą konkurować z najnowszymi osiągnięciami metod krystalograficznych. Chociaż całkowita liczba struktur 3D kwasów nukleinowych otrzymanych na podstawie danych NMR i zdeponowanych w bazie PDB (~600) jest wciąż zdecydowanie mniejsza niż liczba zdeponowanych w niej białek (> 3200), to statystyki dotyczące ilości pojawiających się nowych struktur DNA i RNA wykazują stały wzrost (<http://www.rcsb.org/>). Trudności w ustalaniu struktur kwasów nukleinowych metodami NMR, w stosunku do białek, wynikają między innymi ze znacznie większej degeneracji przesunąć chemicznych spowodowanej małą różnorodnością jednostek nukleotydowych, w porównaniu z ilością reszt aminokwasowych występujących w białkach. Ilość atomów wodoru w DNA i RNA w stosunku do wszystkich atomów w cząsteczce jest również bardziej niekorzystna dla kwasów nukleinowych. Skutkuje to potencjalnie mniejszą ilością dostępnych więzów, a w konsekwencji mniejszą dokładnością otrzymanych struktur.

Ustalenie struktury przestrzennej biomolekuł metodami spektroskopii NMR jest procesem złożonym składającym się z wielu etapów, z których najważniejsze to:

- a) przygotowanie próbek,
- b) zebranie danych eksperymentalnych, procesowanie widm NMR,
- c) przypisanie jak największej liczby sygnałów rezonansowych ^1H , ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P ,
- d) otrzymanie danych strukturalnych w formie więzów odległościowych proton–proton (wielkości NOE), więzów dla kątów torsyjnych (wartości stałych sprzężenia), więzów kierunkowych (RDC),
- e) wyznaczenie struktur przestrzennych zgodnych z danymi NMR.

W niniejszym artykule przedstawione zostaną jedynie problemy dotyczące dostępnych obecnie sposobów otrzymywania kwasów nukleinowych na potrzeby spektroskopii NMR oraz strategie przypisywania sygnałów w widmach cząsteczek zarówno o naturalnej zawartości izotopów jak i całkowicie znakowanych ^{13}C i/lub ^{15}N . Pokróćce omówione zostaną także ostatnie osiągnięcia w metodologii dla multijądrowej spektroskopii NMR, które stanowią źródło nowych jakościowo informacji.

Zagadnienia dotyczące otrzymywania więzów strukturalnych oraz metod obliczeniowych stosowanych w celu ustalenia struktur kwasów nukleinowych metodami NMR będą przedmiotem odrębnej pracy (część II).

1. SYNTEZA RNA I DNA

Niewątpliwą zaletą spektroskopii NMR jest jej unikalna zdolność pozwalająca na określanie struktury biomolekuł w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Eksperymenty NMR wymagają dostępu do miligramowych ilości materiału o bardzo wysokiej czystości. W przypadku badań prowadzonych dla cząsteczek o większej masie konieczne jest posiadanie preparatów całkowicie, częściowo lub/i selektywnie znakowanych izotopami ^{13}C i ^{15}N . Obecnie na potrzeby badań NMR stosuje się dwie różne strategie otrzymywania fragmentów kwasów nukleinowych o określonej sekwencji. Są to: chemiczna synteza na podłożu stałym w oparciu o metodę fosforynoamidową oraz synteza enzymatyczna *in vitro*.

Chemiczna synteza oligonukleotydów, stosowana standardowo od lat 80. ubiegłego stulecia [8] jest procesem cyklicznym składającym się z kilku etapów, w efekcie którego po każdym cyklu przyłączana jest kolejna reszta nukleotydowa. Ze względu na zawadę przestrzenną grupy ochronnej funkcji hydroksylowej 2'-OH, wydajność jednego cyklu syntezy RNA jest znacznie niższa (96–97%) niż syntezy DNA (98–99%). Ogranicza to dostęp do fragmentów RNA o długości około 30 reszt nukleotydowych.

Idea enzymatycznej syntezy RNA na potrzeby NMR jest stosunkowo prosta [9, 10] i stosuje się ją rutynowo w wielu laboratoriach [11–13]. Opiera się ona o reakcję transkrypcji *in vitro* na syntetycznych matrycach DNA, przy udziale polimerazy T7 z wykorzystaniem rybonukleozydo-5'-trifosforanów (rNTP). Izotopowo znakowane rNTP otrzymuje się zazwyczaj z komórek *E. coli* hodowanych na pożywkach zawierających, jako źródło węgla i azotu, wyłącznie izotopy ^{13}C i/lub ^{15}N . Wyizolowany z komórek RNA jest hydrolizowany do rybonukleozydo-5'-monofosforanów, a następnie pożądaną rNTP otrzymuje się w procesie enzymatycznej fosforylacji nukleozydomonofosforanów NMP. Wadą enzymatycznej metody syntezy oligorybonukleotydów jest warunek narzucany na minimalną długość syntetyzowanego łańcucha (kilkanaście reszt nukleotydowych).

Otrzymanie na drodze syntezy enzymatycznej znakowanych izotopowo cząsteczek DNA o określonej sekwencji na potrzeby spektroskopii NMR jest znacznie trudniejsze. Do niedawna większość eksperymentów heterojądrowych dla DNA wyko-

nywana była albo na naturalnej zawartości izotopu ^{13}C lub stosując specyficznie ^{15}N i/lub ^{13}C znakowane oligonukleotydy otrzymywane metodami syntezy chemicznej. Do tej pory zaproponowano dwie fundamentalnie różne strategie enzymatycznej syntezy znakowanych izotopowo cząsteczek DNA. Pierwsze z tych podejść wykorzystuje dupleksy DNA z niesparowanym, jednoniciowym końcem służącym jako matryca dla syntezy komplementarnej nici o wymaganej sekwencji [5]. Dotychczas dla syntezy znakowanych DNA zaproponowano dwie różne polimerazy: polimerazę DNA I [5, 14] i polimerazę Taq [15]. Drugie podejście polega na amplifikacji metodą PCR tandemowych powtórzeń wybranych sekwencji [4, 6]. Wadą tej metody jest to, że produktem reakcji jest dupleks (> 25 par zasad), składający się z dwóch nici jednakowej długości.

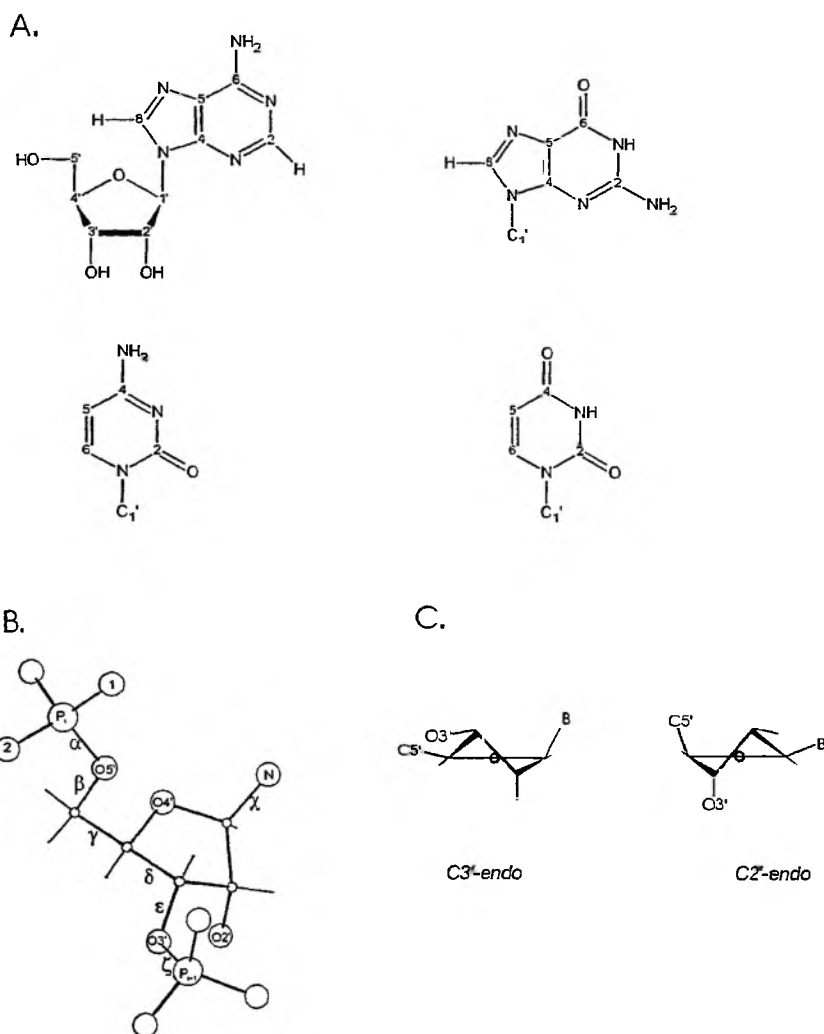
Niezwykle wysokie koszty syntezy chemicznej cząsteczek RNA całkowicie znakowanych izotopowo ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) sprawiają, że synteza enzymatyczna jest obecnie metodą z wyboru. Natomiast selektywne znakowanie wybranych atomów węgla i azotu w cząsteczce można otrzymać jedynie na drodze syntezy chemicznej. Podejście to rozwijane jest w naszej Pracowni.

Znakowane izotopami ^{13}C i/lub ^{15}N fosforynoamidy DNA są dostępne handlowo i chociaż również bardzo kosztowna, synteza chemiczna całkowicie znakowanych izotopowo cząsteczek DNA jest obecnie możliwa.

2. PARAMETRY STRUKTURALNE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Konformację cząsteczek DNA i RNA można jednoznacznie określić przez wyznaczenie dla każdej jednostki nukleotydowej sześciu kątów torsyjnych szkieletu fosforocukrowego, kąta *N*-glikozydowego definiującego względne położenie zasady i reszty cukrowej (Rysunek 1B), oraz kąta fazowego pseudorotacji określającego konformację pierścienia cukrowego. W strukturze podwójnej helisy B-DNA deoksyryboza przyjmuje konformację $\text{C}2'$ -*endo*, natomiast typową konformacją rybozy w helikalnych strukturach A-RNA jest forma $\text{C}3'$ -*endo* (Rysunek 1C).

Podstawowym źródłem informacji w ustalaniu struktury biomolekuł metodami spektroskopii NMR są więzy odległościowe otrzymane na podstawie wielkości efektu NOE, oraz sprzężenia skalarnie, których analiza dostarcza więzów dla kątów torsyjnych. Znajomość jak największej liczby kontaktów NOE oraz sprzężeń skalarnych pozwala na wyznaczenie struktury cząsteczki z większą dokładnością i precyzją. Z uwagi na dużo mniejszą liczbę strukturalnie istotnych więzów NOE, więzy katowe otrzymane na podstawie analizy sprzężeń stanowią dla kwasów nukleinowych dużo cenniejsze źródło dodatkowych informacji niż ma to miejsce w analizie białek. Skalarne stałe sprzężenia dostarczają również informacji o istnieniu różnych form konformacyjnych będących w równowadze oraz o ich populacji.

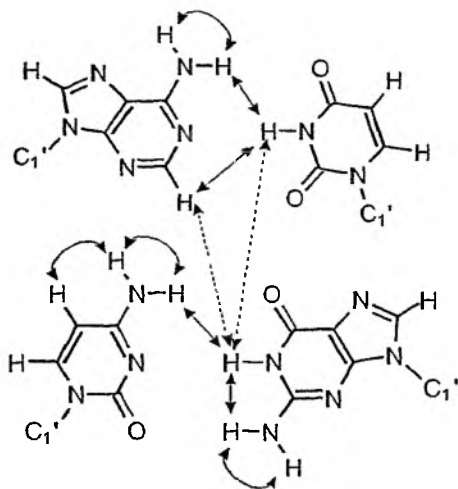


Rysunek 1. A) Struktura i numeracja atomów oraz B) oznaczenie kątów torsyjnych w kwasach nukleinowych. C) Najczęściej spotykane konformacje pierścienia rybozy $C3'$ -endo i $C2'$ -endo

Spośród sześciu kątów torsyjnych szkieletu fosforocukrowego (α , β , γ , δ , ϵ i ζ), wielkości dwóch kątów torsyjnych α i ζ nie da się oszacować bezpośrednio z pomiarów wycinalnych stałych sprzężenia, gdyż nie istnieje odpowiedni izotop tlenu o spinie $1/2$. Jedynym źródłem potencjalnych więzów dla tych kątów mogą być przesunięcia chemiczne jąder ^{31}P .

3. PRZYPISANIE SYGNAŁÓW DLA CZĄSTECZEK O NATURALNEJ ZAWARTOŚCI IZOTOPÓW

Przypisywanie sygnałów w widmach kwasów nukleinowych polega na analizie kontaktów NOE i sprzężeń skalarnych [16–20]. Procedury wykorzystywane do przypisywania sygnałów w widmach NMR są bardzo podobne dla cząsteczek DNA i RNA, a opisane poniżej metody będą dotyczyły głównie cząsteczek RNA.



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie par Watsona-Cricka A-U i C-G. Strzałki pokazują możliwe oddziaływania NOE dla danej pary zasad (linia ciągła) oraz między sąsiednimi parami zasad (linia przerywana)

Analizę widm cząsteczek kwasów nukleinowych rozpoczyna się od przypisania sygnałów iminowych i aminowych reszt nukleozydowych w widmach 2D NOESY. Typowe kontakty NOE, w które zaangażowane są protony iminowe i aminowe obserwowane w helikalnych strukturach A-RNA, przedstawione są na Rysunku 2. Ponieważ w kwasach nukleinowych protony iminowe i aminowe ulegają szybkiej wymianie z otaczającą je wodą, dlatego widma kwasów nukleinowych wykonuje się w zwykłej wodzie z niewielkim dodatkiem wody ciężkiej (6–10% D_2O). Na podstawie analizy oddziaływań NOE dla protonów wymieniających otrzymuje się informację o tworzących się parach zasad, a tym samym o strukturze drugorzędowej badanej cząsteczki. W kolejnym kroku sygnały protonów $H6/H8$ przypisywane są na podstawie analizy intra- i internukleotydocywnych połączeń NOE obserwowanych w regionie $H6/H8-H1'$ widma NOESY (100% D_2O), a wyznaczających tak zwaną sekwencyjną ścieżkę NOE. Typowa dla regularnej struktury A-RNA sekwencyjna ścieżka NOE oraz przykładowy fragment widma z zaznaczoną ścieżką przedstawione są na Rysunku 3.

nem H3' jednej reszty nukleotydowej z końca 5', a atomem fosforu następnej reszty. Korelacje intranukleotydowe pomiędzy jądrem ^{31}P a protonami H4', H5' i H5'', chociaż o stosunkowo małej intensywności, są często obserwowane i stanowić mogą dodatkową pomoc w identyfikacji sygnałów pierścienia cukrowego.

Ogromną wadą opisaną powyżej strategii jest niejednoznaczność przypisań opartych na sekwencyjnych kontaktach NOE, które wymagają założenia co do konformacji elementów strukturalnych badanej sekwencji. Należy pamiętać, że metodologia przypisywania sygnałów w oparciu o korelacje NOE jest prawdziwa tylko dla regularnych, helikalnych regionów A-RNA i B-DNA. Ostatnio wykryto takie zależności także dla lewoskrętnej helisy Z-RNA [21].

4. STRATEGIA PRZYPISYWANIA SYGNAŁÓW DLA CZĄSTECZEK ZNAKOWANYCH IZOTOPOWO

Dla przypisania sygnałów rezonansowych kwasów nukleinowych całkowicie znakowanych izotopami ^{13}C i ^{15}N zaproponowano do tej pory wiele różnych eksperymentów, a obszerny ich opis można znaleźć w pracach przeglądowych [18–23].

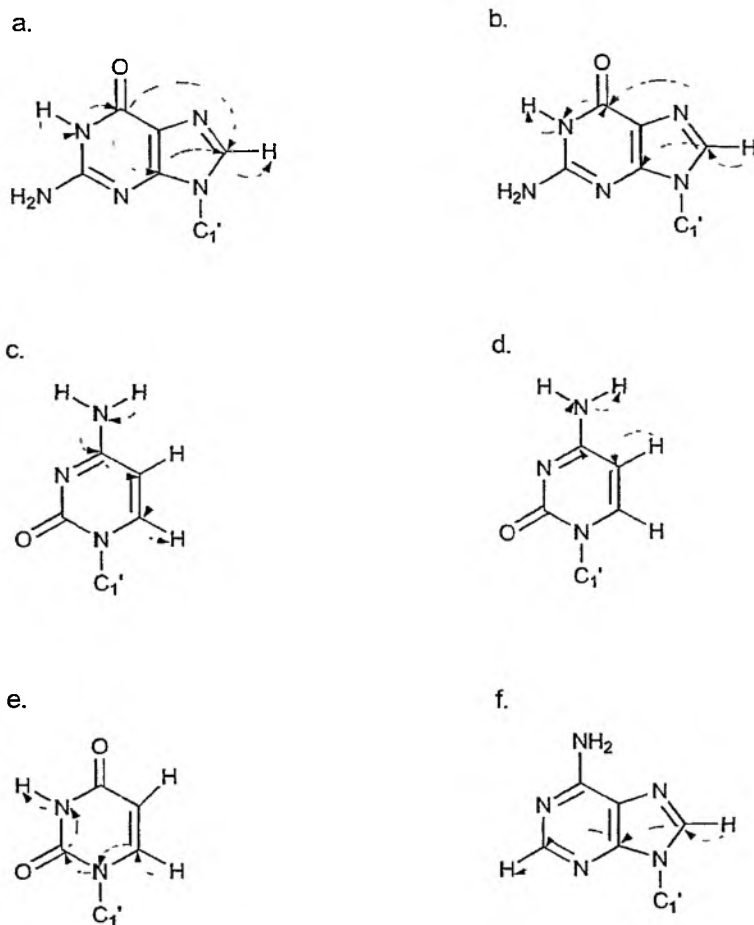
Dostęp do preparatów znakowanych izotopami ^{15}N i ^{13}C dostarczył badaczom nowych narzędzi w przewyżnianiu problemów napotykanym w eksperymentach homojądrowych. W literaturze napotkać można zasadniczo dwie strategie przypisania sygnałów, dla znakowanych izotopowo cząsteczek kwasów nukleinowych. W pierwszej z nich, opierającej się głównie na analizie kontaktów NOE [2, 11], przypisywanie sygnałów dokonywane jest w oparciu o różne techniki $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -edycji widm NOESY i TOCSY. W drugiej, preferowanej ostatnio metodzie [23, 20], dla identyfikacji sygnałów wykorzystuje się korelację poprzez sprzężenia skalarne, gdzie obecność sygnału korelacyjnego w widmie jednoznacznie dowodzi istnienia wiązania chemicznego pomiędzy jądrami zaangażowanymi w oddziaływanie. Zastosowanie tego podejścia rozwiązuje problem niejednoznaczności przypisań napotykanym w metodach opartych na sekwencyjnej analizie sygnałów NOE.

Pierwszym etapem analizy widm cząsteczek znakowanych izotopowo jest identyfikacja sygnałów pochodzących od protonów niewymienialnych (H2, H5, H6, H8) i protonów wymienialnych (iminowych i aminowych) zasad nukleinowych. W następnej kolejności przypisuje się protony należące do reszt cukrowych (H1', H2', H3', H4', H5', H5''). Sygnały pochodzące od poszczególnych reszt zasad koreluje się z odpowiadającymi im resztami cukrowymi w zależności od stosowanej strategii, albo poprzez obserwację kontaktów NOE pomiędzy protonami aromatycznymi i H1', lub też poprzez bezpośrednią korelację sygnału H1' poprzez sprzężenia skalarne z sygnałami atomu azotu wiązania N-glikozydowego. Sekwencyjne połączenie pomiędzy kolejnymi resztami nukleotydydowymi otrzymywane jest albo za pomocą eksperymentów NOE lub też wykorzystując korelacje poprzez wiązania wzdłuż szkieletu fosforocukrowego. W ten sposób możliwe jest często przypisanie prawie wszystkich sygnałów w widmach NMR kwasów nukleinowych.

4.1. PRZYPISANIE PROTONÓW W NUKLEOZASADACH

Rozróżnienie pomiędzy sygnałami protonów iminowych pochodzących od reszt uracylu i reszt gwanozyny stało się dużo łatwiejsze z chwilą wprowadzenia znakowania izotopowego ^{15}N , gdyż przesunięcie chemiczne atomu azotu związanego z protonem iminowym różni się znacznie dla reszt gwanozyny (145–150 ppm) i uracylu (155–165 ppm). Sygnały pochodzące od atomów azotu grup aminowych można również zidentyfikować na podstawie przesunięć chemicznych. Linie rezonansowe atomów azotu pochodzące od grup aminowych reszt cytozyny występują w regionie 95–100 ppm, natomiast sygnały atomów azotu od grup aminowych gwanozyny pojawiają się w regionie 70–75 ppm.

Ważną grupę eksperymentów stanowią metody pozwalające na korelację pomiędzy protonami wymiennymi a protonami H8/H6 [20, 24–27].



Rysunek 4. Przykładowe drogi transferu magnetyzacji wykorzystywane dla korelacji różnych jąder w purynach i pirymidynach: a) HNC-TOCSY-CH, b) i e) HCCNH-TOCSY, c) HNCCCCH, d) H5(C5C4N)H i f) HCCH-TOCSY

I tak na przykład w widmach typu HNCCH-TOCSY otrzymuje się informację o oddziaływaniach pomiędzy protonami iminowymi zaangażowanymi w tworzenie wiązania wodorowego a protonami H8 puryn lub H6 pirymidyn. Możliwość identyfikacji sygnałów H2 i H8 przynależących do danej reszty adeniny jest niezwykle istotna z uwagi na częsty brak jakichkolwiek kontaktów NOE do protonów H2 w regionach jednonicowych struktur RNA. Korelację pomiędzy tymi jądrami uzyskuje się najczęściej za pomocą eksperymentów typu HCCH-TOCSY [28, 29].

Rysunek 4 ilustruje przykładowe drogi transferu magnetyzacji wykorzystywane dla korelacji różnych jąder w purynach i pirymidynach.

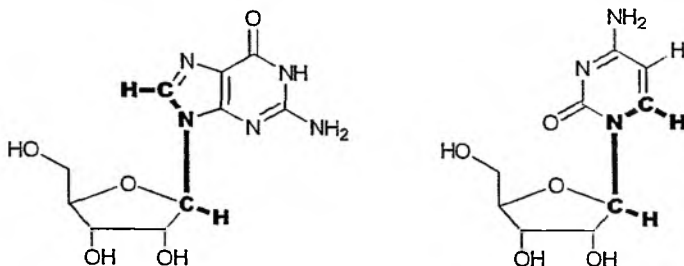
4.2. PRZYPISANIE SYGNAŁÓW POCHODZĄCYCH OD PIERŚCIENIA CUKROWEGO

Zastosowanie znakowania izotopowego ^{13}C niezwykle ułatwia przypisanie sygnałów pochodzących od reszt cukrowych, dzięki możliwości edycji widm w dodatkowym wymiarze ^{13}C . W celu identyfikacji sygnałów pierścieni cukrowych cząsteczek całkowicie znakowanych izotopem ^{13}C stosuje się eksperymenty typu HCCH-TOCSY, HCCH-COSY lub ich hybrydowe formy [22, 28, 30, 31]. W widmach typu HCCH-TOCSY czy HCCH-COSY magnetyzacja przenoszona jest pomiędzy protonami tej samej reszty cukrowej i pośredniczącymi atomami węgla. Oznacza to, że transfer magnetyzacji następuje poprzez duże sprzężenia skalarnie przez jedno wiązanie (155–170 Hz) i sprzężenia ^{13}C - ^{13}C (38–42 Hz), a nie jak w eksperymentach homojądrowych poprzez małe, zależne od konformacji cukru wicynalne stałe sprzężenia $^3J_{\text{HH}}$ (2–8 Hz). Eksperymenty te są stosunkowo czułe, gdyż duże stałe sprzężenia prowadzą do wydajnego transferu magnetyzacji.

4.3. KORELACJA SYGNAŁÓW PIERŚCIENIA CUKROWEGO I ZASADY

W cząsteczkach kwasów nukleinowych zasada heterocykliczna połączona jest z pierścieniem cukrowym wiązaniem N-glikozydowym. Dlatego też optymalnym rozwiązaniem dla korelacji sygnału protonu H1' z odpowiadającym mu sygnałem protonu aromatycznego H8/H6 wydają się być eksperymenty rezonansu potrójnego HCN [22, 28, 32]. W metodach opartych na obserwacji efektu NOE nie zawsze jest możliwe jednoznaczne przypisanie pierścienia cukrowego do właściwej nukleozasady, z tego też względu eksperymenty wykorzystujące korelacje poprzez wiązania są niezwykle ważne w analizie widm kwasów nukleinowych. W eksperymentach typu HCN proton anomeryczny wiąże się z protonami H6/H8 poprzez korelacje do wspólnego atomu azotu N1/N9 (HsCNb – od strony pierścienia cukrowego łączy jądra H1', C1' i N9/N1, a HbCNb koreluje jądra H6/H8, C6/C8 i N1/N9). Z kolei w eksperymentach HCNCH możemy uzyskać bezpośrednie korelacje pomiędzy sygnałem protonu H1' i odpowiadającym mu sygnałem protonu aromatycznego H6/H8 (Rysu-

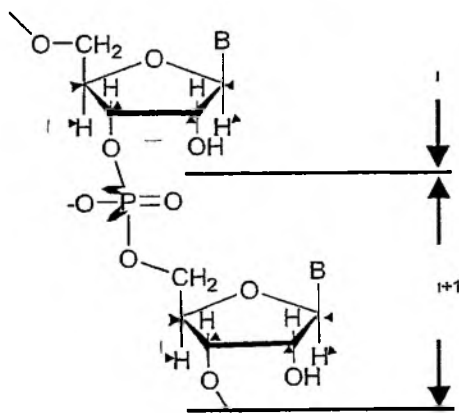
nek 5). W literaturze można spotkać jeszcze inne modyfikacje tych eksperymentów [33–35], a ich głównym celem jest poprawa czułości eksperymentu.



Rysunek 5 Korelacje poprzez wiązania pomiędzy sygnałem H1' i odpowiadającym mu sygnałem protonu aromatycznego H6/H8 otrzymywane w widmach HCN i HCNCH

4.4. SEKWENCYJNE PRZYPISANIE RESZT CUKROWYCH Z WYKORZYSTANIEM KORELACJI HETEROJĄDROWYCH WZDŁUŻ SZKIELETU FOSFOROCUKROWEGO

Sekwencyjne przypisanie sygnałów dla reszt cukrowych można uzyskać za pomocą widm 3D HCP [36, 37], w których transfer magnetyzacji następuje poprzez wiązania wzdłuż szkieletu fosforocukrowego. W eksperymentach tych wykorzystuje się stosunkowo duże wartości sprzężeń $J_{C4'(i)P(i)}$ oraz $J_{C4'(i+1)P(i)}$. W widmach HCP sygnały H4'C4' pochodzące od jednej reszty cukrowej wykazują korelacje do dwóch sygnałów atomów fosforu: $P_{(i)}$ oraz $P_{(i+1)}$, a więc odpowiednio z końca 5' i 3'. Natomiast sygnały H2'C2' i H3'C3' łączą się tylko z atomem fosforu $P_{(i+1)}$, a sygnały C5'H5'/H5'' są skorelowane z atomem fosforu $P_{(i)}$.



Rysunek 6 Transfer magnetyzacji w eksperymentach HCP i PCCH-TOCSY

W widmach cząsteczek RNA zarówno sygnały pochodzące od protonów H4', jak i od jąder ^{31}P bardzo często się nakrywają, co utrudnia analizę widm HCP. Poprawę rozdzielczości w tego typu eksperymentach można uzyskać przenosząc magnetyzację do znacznie lepiej rozdzielonych protonów H1'. Sekwencją, która wykorzystuje ten rodzaj ścieżki jest sekwencja PCCH-TOCSY [38]. W eksperymencie PCCH-TOCSY transfer magnetyzacji następuje od atomu fosforu do atomu węgla C4', potem kolejno magnetyzacja przekazywana jest poprzez C3', C2' do C1' a następnie do protonów anomerycznych, H1' (Rysunek 6).

5. TECHNIKA TROSY

W przypadku większych cząsteczek kwasów nukleinowych, zarówno przypisanie sygnałów rezonansowych jak i wyciągnięcie odpowiednio dużej liczby więzów odległościowych jest często utrudnione głównie z uwagi na szybką relaksację poprzeczną jąder ^1H i ^{13}C prowadzącą do znacznego poszerzenia sygnałów, oraz słabą dyspersję przesunięć chemicznych jąder ^1H i ^{13}C . W technice TROSY (ang. *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*) [39] wykorzystuje się wzajemne znoszenie się dwóch głównych mechanizmów relaksacji spinowo-sieciowej: oddziaływania dipolowego (DD) i anizotropii przesunięcia chemicznego (CSA). Ze względu na dużą wartość tensora anizotropii przesunięć chemicznych $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, dochodzi do znacznej redukcji szerokości linii jednej ze składowych dubletu $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ lub multipletu $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. Poprzez wybór jedynie wąskiej składowej, widma rejestrowane przy użyciu techniki TROSY odznaczają się znacznym wzrostem rozdzielczości, a niejednokrotnie również czułości pomiaru. Efekt ten jest szczególnie wyraźny dla dużych cząsteczek oraz silnych pól magnetycznych (800 Hz–900 Hz).

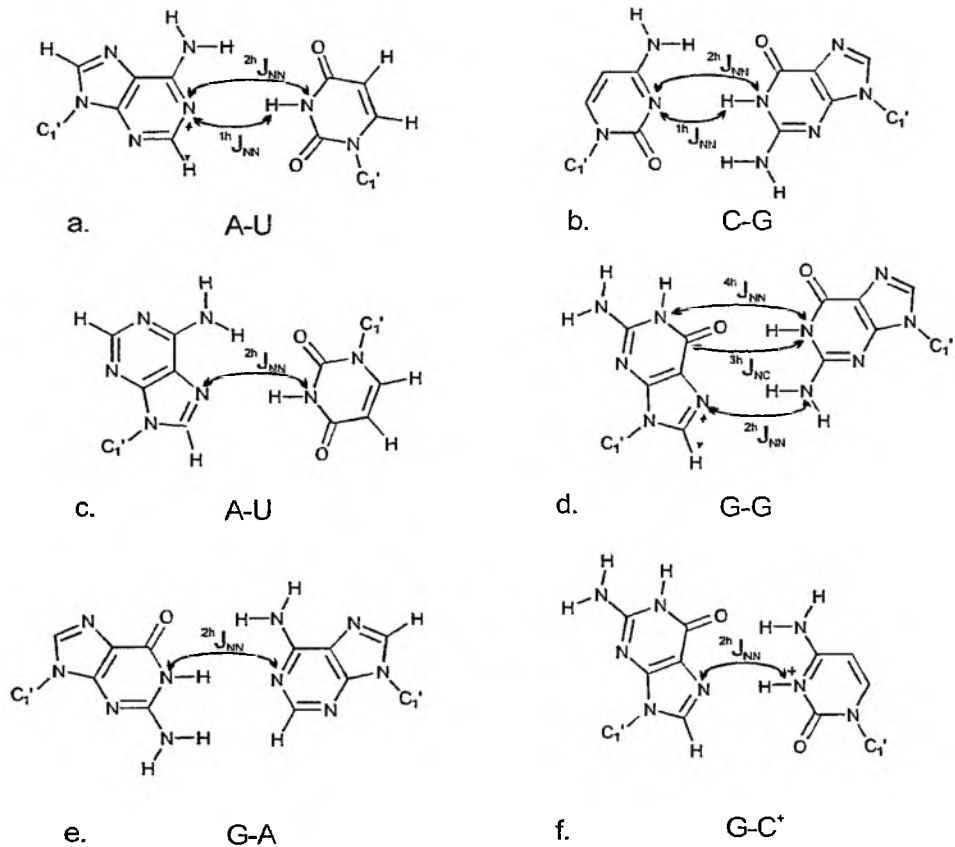
Połączenie techniki TROSY z innymi eksperymentami pozwala nie tylko na badanie cząsteczek o większych masach, ale również znacznie ułatwia pomiar, omówionych poniżej, małych stałych sprzężenia poprzez wiązanie wodorowe czy resztowych sprzężeń dipolowych [35, 40–42].

6. OBSERWACJA SPRZEŻEŃ SKALARNYCH POPRZEZ WIĄZANIA WODOROWE

Wiązania wodorowe są niezwykle istotne dla stabilizacji struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej kwasów nukleinowych. Jeszcze do niedawna większość dowodów na obecność wiązań wodorowych w kwasach nukleinowych otrzymywana była w sposób pośredni, na podstawie przestrzennej bliskości grup donorowych i akceptorowych, lub innych dowodów pośrednich, jak na przykład spowolnienie szybkości wymiany atomu wodoru. Dopiero stosunkowo późno, w roku 1998 zaobserwowano, że w kwasach nukleinowych istnieje zaskakująco duże sprzężenie skalarnie ($^2J_{\text{NN}} \sim 6-7 \text{ Hz}$) pomiędzy iminowym atomem azotu zaangażowanym w two-

rzenie wiązania wodorowego i jego partnerem, atomem azotu ^{15}N w obrębie pary Watsona-Cricka [43, 44]. Mniejszą stałą sprzężenia ($^1J_{\text{HN}}$ ~2–4 Hz) stwierdzono dla oddziaływania pomiędzy protonem iminowym – donorem wiązania wodorowego i akceptorowym atomem azotu. Szybko stało się jasne, że obserwacje te mogą być wykorzystane do identyfikacji wszystkich trzech partnerów biorących udział w tworzeniu wiązania wodorowego: donora, akceptora i samego atomu wodoru.

Początkowo dla rejestracji sprzężeń poprzez wiązanie wodorowe wymagane było, aby protony zaangażowane w tworzenie wiązania wodorowego ulegały powolnej wymianie chemicznej. Uniemożliwiało to obserwację tych oddziaływań w dynamicznych regionach struktur kwasów nukleinowych. Wkrótce jednak zaproponowano takie metody, w których proton uczestniczący w tworzeniu wiązania wodorowego może ulegać szybkiej wymianie chemicznej lub przemianom konformacyjnym [45–48]. Możliwość bezpośredniej detekcji wiązań wodorowych zarówno dla kanonicznych jak i niekanonicznych par zasad stanowi niezwykle cenne narzędzie w wyznaczaniu struktur kwasów nukleinowych w roztworze, gdyż dostarcza bardzo silnych więzów strukturalnych.



Rysunek 7 Przykłady pary zasad, dla których stwierdzono istnienie sprzężenia skalarnego poprzez wiązanie wodorowe

Na Rysunku 7 przedstawione są schematycznie przykłady par zasad, dla których do tej pory zaobserwowano obecność sprzężenia skalarnego poprzez wiązanie wodorowe.

7. RESZTKOWE SPRĘŻENIA DIPOLOWE (RDC) W BADANIACH STRUKTURALNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH

Główną niedoskonałością badań strukturalnych metodami spektroskopii NMR, które opierają się na pomiarach efektu NOE i wielkości sprzężeń skalarnych jest to, że dane te dostarczają więzów jedynie o zasięgu lokalnym. Zastosowanie wzbogacania izotopowego poprawiło znacznie dokładność lokalnych geometrii wyznaczanych struktur, jednakże nie miało znaczącego wpływu na otrzymywaną globalną strukturę cząsteczki. W przypadku kwasów nukleinowych, których dwuniciowe regiony przyjmują często wydłużone kształty, na podstawie samej tylko analizy oddziaływań NOE i sprzężeń skalarnych trudno jest wyciągnąć informację np. o zagięciu helisy. Brak informacji o oddziaływaniach dalekiego zasięgu uniemożliwia także ustalenie wzajemnej orientacji odległych części cząsteczki.

Jednym z większych przełomów, jakie dokonały się w ciągu ostatnich lat w biomolekularnej spektroskopii NMR jest rozwój metod pozwalających na obserwację oddziaływań anizotropowych w roztworze, poprzez umieszczenie biomolekuł w rozcieńczonych mediach ciekłokrystalicznych [49, 50]. W wyniku częściowego uporządkowania cząsteczek, $\sim 10^{-3}$ całej populacji, sprzężenia dipolowe nie uśredniają się do zera co prowadzi do pojawienia się na ogół niewielkiego rozszczepienia sygnałów NMR. Szerokość linii NMR w mediach orientujących pozostaje praktycznie niezmienną, gdyż warunki dobiera się w taki sposób, aby cząsteczka nadal ulegała szybkiej reorientacji w roztworze. Tjandra i Bax pokazali [50], że te resztkowe stałe sprzężenia dipolowego (RDC) stanowią fundamentalnie nowy rodzaj informacji strukturalnej. Efekty wzmocnienia NOE i wartości sprzężeń skalarnych dostarczają danych eksperymentalnych o zasięgu lokalnym, natomiast resztkowe sprzężenia dipolowe mogą być źródłem informacji kierunkowych zarówno lokalnych jak i dalekiego zasięgu. W efekcie, resztkowe sprzężenia dipolowe mogą być pomocne przy wyznaczaniu wzajemnej orientacji tych regionów cząsteczki, które znajdują się daleko od siebie lub, z uwagi na brak sygnałów NOE, są słabo zdefiniowane.

W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił postęp zarówno w otrzymywaniu mediów do częściowego porządkowania biocząsteczek oraz metod obliczeniowych pozwalających na wykorzystanie informacji otrzymywanych ze sprzężeń dipolowych do wyznaczania struktur przestrzennych biomolekuł. Obecnie stosuje się różne typy mediów orientujących takie jak np. dyskoidalne bicele lipidowe [51], włókniste bakteriofagi Pfl i fd [52–54], fragmenty membran z *Halobacterium salinarum* [55, 56], a ostatnio także ściśnięty mechanicznie żel poliakrylamidowy [57, 58]. To, w jaki sposób cząsteczki uporządkowują się w danym ośrodku – poprzez oddziaływania steryczne czy/i elektrostatyczne – zależy od specyficznych oddziaływań pomiędzy daną cząsteczką a porządkującym ją medium. Dla kwasów nukleinowych najlep-

szym, jak dotychczas, medium wydaje się być bakteriofag Pf1, który zachowuje swoje porządkujące właściwości w szerokim zakresie temperatur.

Resztkowe stałe sprzężenia dipolowego można mierzyć dla dowolnej pary jąder aktywnych magnetycznie, które wykazują mierzalne oddziaływania dipolowe. W białkach informację o sprzężeniach dipolowych uzyskuje się na ogół dla wiązań amidowych ^1H - ^{15}N w próbkach znakowanych izotopem ^{15}N . Uwzględnienie resztkowych sprzężeń RDC w obliczeniach strukturalnych białek nie tylko wpływa na znaczną poprawę dokładności badanej struktury, ale w niektórych przypadkach możliwe jest nawet wyznaczenie struktury cząsteczki *de novo* bez znajomości więzów opartych o oddziaływania NOE i sprzężenia skalarnie. Włączanie więzów RDC w proces udoładniania struktury staje się już rutyną w przypadku białek, i być może stanie się wkrótce rutyną dla kwasów nukleinowych.

Dla cząsteczek RNA, znakowanie izotopem ^{15}N dostarcza jedynie ograniczonej liczby sprzężeń dipolowych ^1H - ^{15}N . Czasami jednak znajomość nawet niewielkiej liczby tych sprzężeń może prowadzić do uzyskania cennych informacji. Na przykład znajomość jedynie 25 sprzężeń dipolowych ^1H - ^{15}N dla protonów iminowych była wystarczająca aby pokazać, że kąt pomiędzy ramieniem akceptorowym a trzonem antykodonu w cząsteczce tRNA^{Val} jest podobny do tego, jaki zaobserwowano w strukturze krystalicznej dla tRNA^{Phe} [59]. Na ogół jednak, w celu uzyskania dostatecznej liczby więzów kierunkowych w kwasach nukleinowych, konieczne jest zastosowanie znakowania izotopowego ^{13}C .

W przypadku kanonicznej struktury dupleksu DNA ustalono, uwzględniając wyjątkowo dużą liczbę więzów, a w szczególności więzów kierunkowych uzyskanych z pomiaru resztkowych stałych sprzężenia dipolowego (^{13}C - ^1H , ^{13}C - ^{13}C , ^1H - ^1H), detale strukturalne porównywalne z tymi, jakie można otrzymać na podstawie analizy rentgenowskiej [60]. Zaobserwowane niewielkie różnice pomiędzy strukturą krystaliczną a otrzymaną w roztworze wskazują na to, że siły upakowanie w kryształach mogą indukować zmiany strukturalne.

PODSUMOWANIE

Jeszcze kilka lat temu wydawało się, że został osiągnięty kres możliwości dla wyznaczania struktur kwasów nukleinowych w roztworze metodami spektroskopii NMR. Nawet rozwój technik pozwalających na całkowite i selektywne znakowanie izotopowe (^{15}N , ^{13}C i ^2H) w połączeniu z rozkwitem coraz doskonalszych technik eksperymentalnych wielowymiarowej, heterojądrowej spektroskopii NMR pozwalał na ustalanie struktur kwasów nukleinowych nie większych niż 15 kDa, mimo że dla białek granicę tę przekroczone już dużo wcześniej. Dopiero w roku 2003 pokazano, że jest to możliwe również dla cząsteczek RNA, ustalając strukturę przestrzenną domeny II HCV IRES [61] składającej się z 77 reszt nukleotydowych (25 kDa). Rekord ten nie trwał długo, gdyż już kilka miesięcy później opublikowana została struktura cząsteczki RNA wirusa MLV o długości 101 reszt nukleotydowych [62].

Chociaż ustalanie struktury tak dużych cząsteczek nie jest zadaniem ani łatwym ani tanim, jednak pokazuje, że połączenie metod syntezy enzymatycznej całkowitego, specyficznego i segmentowego znakowania izotopowego $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ i ^2H w połączeniu z zastosowaniem opisanych w tej pracy najnowszych metod NMR wyznacza nowe horyzonty w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych metodami wysoko-rozdzielczej spektroskopii NMR.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E.P. Nikonowicz, P. Sirt, L. Jucker, L.M. Bear, A. Pardi, *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 4507.
- [2] E.P. Nikonowicz, A. Pardi, *J. Mol. Biol.*, 1993, **232**, 1141.
- [3] E.P. Nikonowicz, M. Michnicka, K. Kalurachchi, E. DeJong, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 1390.
- [4] M.H. Werner, V. Gupta, L.J. Lambert, T. Nagata, *Meth. Enzymology*, 2001, **338**, 283.
- [5] Daniel P. Zimmer, Donald M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 3091.
- [6] J.M. Louis, R.G. Martin, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 2374.
- [7] J. Milecki, E. Zamaratski, T.V. Maltseva, A. Foldesi, R.W. Adamiak, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 6603.
- [8] S.L. Beaucage, M.H. Crauthers, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 1859.
- [9] J.F. Milligan, D.R. Groebe, G.W. Witherell, O.C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 8783.
- [10] M.J. Michnicka, J.W. Harper, Z. Xi, *Meth. Enzymology*, 1995, **261**, 395.
- [11] T. Dieckmann, J. Feigon, *J. Biomol. NMR*, 1997, **9**, 259.
- [12] L.G. Scott, T.J. Tolbert, J.R. Williamson, *Meth. Enzymology*, 2000, **317**, 18.
- [13] R.T. Batey, J.L. Battiste, J.R. Williamson, *Meth. Enzymology*, 1995, **261**, 300.
- [14] D.E. Smith, J.Y. Su, F.M. Jucker, *J. Biomol. NMR*, 1997, **10**, 245.
- [15] J.E. Masse, P. Bortmann, T. Dieckmann, J. Feigon, *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, 2618.
- [16] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986.
- [17] G. Varani, I. Jr. Tinoco, *Q. Rev. Biophys.*, 1991, **24**, 479.
- [18] G. Varani, F. Aboulela, F.H.T. Allain, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 1996, **29**, 51.
- [19] J. Cromsig, B. van Buuren, J. Schleucher, S. Wijmenga, *Meth. Enzymology*, 2001, **338**, 371.
- [20] S.S. Wijmenga, B.N.M. van Buuren, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 1998, **32**, 287.
- [21] M. Popena, J. Milecki, R.W. Adamiak, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 4044.
- [22] A. Pardi, *Meth. Enzymology*, 1995, **261**, 350.
- [23] B. Furtig, C. Richter, J. Wohnert, H. Schwalbe, *Chembiochem*, 2003, **4**, 936.
- [24] V. Sklenar, T. Dieckmann, S.E. Butcher, J. Feigon, *J. Biomol. NMR*, 1996, **7**, 83.
- [25] J.P. Simorre, G.R. Zimmermann, A. Pardi, B.T. Farmer, L. Mueller, *J. Biomol. NMR*, 1995, **6**, 427.
- [26] J.P. Simorre, G.R. Zimmermann, L. Mueller, A. Pardi, *J. Biomol. NMR*, 1996, **7**, 153.
- [27] R. Fiala, F. Jiang, D.J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 689.
- [28] B.T. Legaut, L. Farmer II, A. Mueller, A. Pardi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 2203.
- [29] J.P. Marino, J.H. Prestegard, D.M. Crothers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 2205.
- [30] W.D. Hu, L.C. Jiang, *J. Biomol. NMR*, 1999, **15**, 289.
- [31] W.D. Hu, L.T. Kakalis, L.C. Jiang, F. Jiang, X.M. Ye, A. Majumdar, *J. Biomol. NMR*, 1998, **12**, 559.
- [32] V. Sklenar, R.D. Peterson, M.R. Rejante, J. Feigon, *J. Biomol. NMR*, 1993, **3**, 721.
- [33] B.T. Farmer II, L. Mueller, E.P. Nikonowicz, A. Pardi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 11040.
- [34] V. Sklenar, R.D. Peterson, M.R. Rejante, E. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 12181.
- [35] R. Fiala, J. Czernek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR*, 2000, **16**, 291.

- [36] H.A. Heus, S.S. Wijmenga, F.J.M. van de Ven, C.W. Hilbers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4983.
- [37] J.P. Marino, H. Schwalbe, C. Anklin, W. Bermel, D.M. Crothers, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**,
- [38] S.S. Wijmenga, H.A. Heus, H.A. Leeu, W.H. Hoppe, M. van der Graaf, C.W. Hilbers, *J. Biomol. NMR*, 1995, **5**, 82.
- [39] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 12366.
- [40] K. Pervushin, C. Fernandez, R. Riek, A. Ono, M. Kainosho, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, 2000, **16**, 39.
- [41] B. Brutscher, J.P. Simorre, *J. Biomol. NMR*, 2001, **21**, 367.
- [42] F. Cordier, A.J. Dingley, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR*, 1999, **13**, 175.
- [43] K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 14147.
- [44] A. J. Dingley, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8293.
- [45] A. J. Dingley, J. E. Masse, R. D. Peterson, M. Barfield, J. Feigon, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6019.
- [46] S. Grzesiek, F. Cordier, A. J. Dingley, *Meth. Enzymology*, 2001, **338**, 111.
- [47] A. Majumdar, A. Kettani, E. Skripkin, D.J. Patel, *J. Biomol. NMR*, 1999, **15**, 207.
- [48] L. Zidek, R. Stefl, V. Sklenar, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, **11**, 275.
- [49] J.H. Prestegard, *Nature Struct. Biology*, 1998, **5**, 517.
- [50] N. Tjandra, A. Bax, *Science*, 1997, **278**, 1697.
- [51] M. Ottiger, A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 1999, **13**, 187.
- [52] G.M. Clore, M.R. Starich, A.M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10571.
- [53] M.R. Hansen, P. Hanson, A. Pardi, *Meth. Enzymology*, 2000, **317**, 220.
- [54] M.R. Hansen, P. Hanson, A. Pardi, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2000, 365.
- [55] B.W. Koenig, J.S. Hu, M. Ottiger, S. Bose, R.W. Hendler, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1385.
- [56] H.J. Sass, F. Cordier, A. Hoffmann, A. Cousin, J.G. Omichinski, H. Lowen, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2047.
- [57] H.J. Sass, G. Musco, S.J. Stahl, P.T. Wingfield, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR*, 2000, **18**, 303.
- [58] R. Tycko, F.J. Blanco, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9340.
- [59] E.T. Molloy, M.R. Hansen, A. Pardi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 11561.
- [60] N. Tjandra, S. Tate, A. Ono, M. Kainosho, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 6190.
- [61] P.J. Lukavsky, I. Kim, G.A. Otto, J.D. Puglisi, *Nature Struct. Biology*, 2003, **10**, 1033.
- [62] V. D'Souza, A. Dey, D. Habib, M.F. Summers, *J. Mol. Biol.*, 2004, **337**, 427.

ROZRÓŻNIANIE MOLEKUŁ A SPEKTROSKOPIA NMR CIECZY

DIFFERENTIATION OF MOLECULAR STRUCTURES USING NMR SPECTROSCOPY IN LIQUIDS

Adam Gryff-Keller

*Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej,
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

Wstęp

1. Rozróżnialność stereoizomerów i identycznych grup chemicznych
 2. Metoda otrzymywania pochodnych
 3. Metoda kompleksowania
 - 3.1. Wpływ trwałości kompleksu na widmo NMR
 - 3.2. Rozpuszczalniki chiralne
 - 3.3. Kompleksy inkluzyjne
 - 3.4. Kompleksy metali
 - 3.5. Ciekłe kryształy
 4. Określanie konfiguracji absolutnej
- Piśmiennictwo cytowane
-

Prof. dr hab. Adam Gryff-Keller (ur. 1944), ukończywszy Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, podjął pracę w Zakładzie Chemii Organicznej tego Wydziału, gdzie pracuje do chwili obecnej. W roku 1967 utracił wzrok w wyniku wypadku przy pracy. Doktorat – 1975, habilitacja – 1986, tytuł profesorski – 1999. W ramach stypendium Fundacji im. Alexandra von Humboldta przebywał na stazach na Uniwersytecie w Monachium, Instytucie Maxa Plancka w Heidelbergu i Uniwersytecie w Bayreuth.

Zainteresowania naukowe: badanie własności spektroskopowych, struktury i dynamiki molekuł organicznych w fazie ciekłej metodami opartymi na spektroskopii NMR, a także zastosowania tej spektroskopii w diagnostyce chorób metabolicznych.

ABSTRACT

The high resolution NMR spectroscopy in liquids is a convenient tool for differentiating stereoisomers. Diastereomeric structures having different spatial distribution of electron density produce different magnetic environments for their nuclei and in consequence have, in general, different NMR spectra. The same concerns diastereotopic groups in a molecule. On the other hand, enantiomers or enantiotopic groups can be differentiated only when they are placed in a chiral environment. It can be accomplished by transforming enantiomers into their diastereomeric derivatives with the aid of chiral derivatising reagents, or by using chiral complexing or solvating agents. The most popular methods of practical realization of these approaches have been reviewed and illustrated with some examples. The spectroscopic differentiation of enantiomers provides a possibility of determining their absolute configurations.

Keywords: distinguishability of molecules, NMR in liquids, chiral reagents, chiral recognition

Słowa kluczowe: rozróżnialność molekuł, NMR w cieczach, odczynniki chiralne, rozróżnianie enancjomerów

WSTĘP

Różne związki chemiczne mają różne własności fizyczne. Stwierdzenie to dotyczy również widm NMR, ale jeśli ma ono stanowić podstawę do formułowania naukowych wniosków, wymaga uściślenia i dosyć długiego komentarza. Czy widmo NMR może pełnić rolę „odcisku palca”? Można z całą pewnością stwierdzić, że jeżeli widma NMR dużej zdolności rozdzielczej dwóch próbek ciekłych są różne, to badane próbki są chemicznie różne, oczywiście pod warunkiem, że zostały przygotowane w identyczny sposób a ich widma zarejestrowane w identycznych warunkach. Wnioskowanie odwrotne zasadniczo już nie jest ścisłe. Praktycznie jednak niezwykle rzadko zdarza się przypadek, żeby różne związki chemiczne dawały identyczne widma NMR zwłaszcza przy stosowaniu silnych pól magnetycznych i różnych warunków pomiaru. Powyższe sformułowania można byłoby rozciągnąć również na widma NMR dużej zdolności rozdzielczej próbek stałych. Jednak w tym przypadku zachowanie identycznych warunków przygotowania próbki w praktyce jest bardzo trudne ze względu na polimorfizm, wbudowywanie molekuł rozpuszczalnika i ogólnie różnorodność fazy krystalicznej [1, 2].

Odpowiedź na pytanie, czy dwa obiekty chemiczne są identyczne, czy różne, zależy od narzędzia zastosowanego do porównywania struktur. Abstrahując jednak na razie od tego problemu można przyjąć jako rzecz oczywistą, że związki, których cząsteczki mają różne wzory sumaryczne, są różne, a warto jedynie zastanawiać się nad rozróżnianiem struktur izomerycznych. Przypomnijmy, że izomery konstytucyjne różnią się między sobą grafem utworzonym z atomów i wiązań, natomiast stereoizomery opisywane są przez jednakowe grafy, ale różnią się geometrią. Z reguły prawie wszystkie własności fizykochemiczne izomerów konstytucyjnych w tym widma NMR są różne. Zagadnienie nieidentyczności struktur staje się więc nietrywialne dopiero w obrębie klasy stereoizomerów.

1. ROZRÓZNIALNOŚĆ STEREOIZOMERÓW I IDENTYCZNYCH GRUP CHEMICZNYCH

W celu sprawdzenia, czy dwie struktury są identyczne, czy też opisują różne stereoizomery można posłużyć się następującą procedurą: należy wykonać translację jednej ze struktur doprowadzającą do pokrywania się ich środków masy, a następnie wykonać odpowiednią rotację. Tylko wtedy, gdy procedura ta doprowadza do całkowitego nałożenia struktur stwierdzamy, że są one identyczne. Jeśli dla uzyskania nałożenia się konieczne jest dodatkowo wykonanie odbicia w płaszczyźnie (lub innego obrotu niewłaściwego) mówimy, że struktury są względem siebie enancjomeryczne. W pozostałych przypadkach mamy do czynienia z diastereomerami.

Przechodząc obecnie do zagadnienia rozróżnialności atomów lub grup w obrębie jednej molekuly, przypomnijmy, że ze względu na symetrię molekularną wyróżnia się trzy sytuacje [3]:

- I. grupy diastereotopowe – nie wykazujące powinowactwa przez symetrię;
- II. grupy enancjotopowe – związane przez symetrię, lecz przechodzące w siebie dopiero przez obrót wokół osi inwersyjnej (S_1 – inwersja w środku symetrii, S_2 – odbicie w płaszczyźnie, S_4 – obrót niewłaściwy o 90° itd.);
- III. grupy homotopowe – przechodzące w siebie w wyniku obrotu molekuly wokół właściwych osi symetrii.

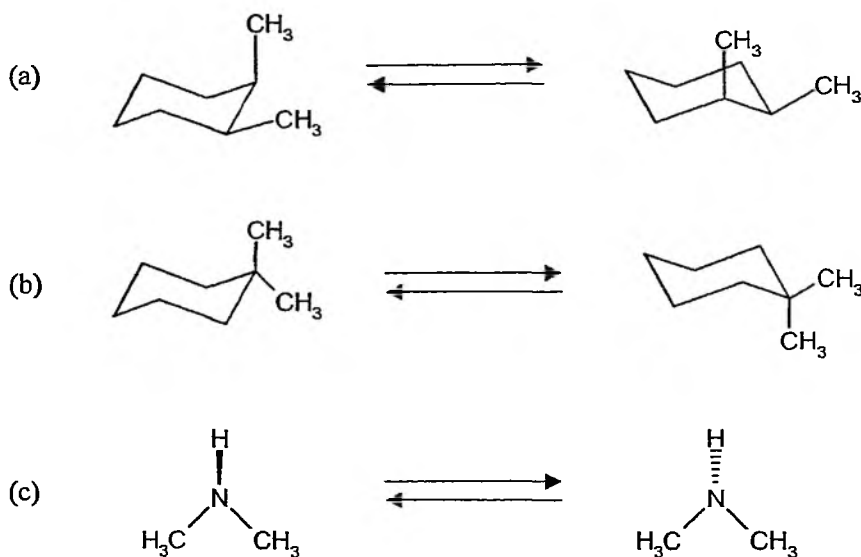
Jeśli podstawą do rozróżniania struktur są widma NMR, to obserwowalne różnice mogą przejawiać się w ekranowaniu poszczególnych jąder, sprzężeniach spinowo-spinowych, w parametrach relaksacyjnych lub przynajmniej w szybkości dyfuzji translacyjnej. Wartości parametrów spektroskopowych zależą wyłącznie, chociaż w bardzo skomplikowany sposób, od struktury elektronowej danej molekuly i od jej oddziaływań z otoczeniem. Parametry opisujące relaksację zależą ponadto w szczególny sposób od dynamiki wewnętrznej, reorientacji i dyfuzji badanej molekuly w roztworze [3]. Nie ma żadnych podstaw, aby przypuszczać, że wszystkie te własności będą identyczne dla dwóch różnych struktur. Dlatego różne molekuly mogą mieć jedynie przypadkowo jednakowe widma NMR. Istnieje wszakże jeden znamienny wyjątek. Są nim struktury enancjomeryczne, które dla spektroskopii NMR są nierozróżnialne. Tymczasem my potrafimy je rozróżniać. Dzieje się tak tylko dzięki temu, że umiemy rozróżniać lewą i prawą stronę i nasze postrzeganie świata zewnętrznego jest chiralne. W środowisku chiralnym również dla spektroskopii NMR enancjomery stają się rozróżnialne. Fakt ten ma duże praktyczne znaczenie, co zostanie szerzej omówione w drugiej części tego artykułu.

Na podstawie podobnego rozumowania można uzasadnić regułę mówiącą, że jeżeli w widmie zmierzonym w środowisku achiralnym rozpatrywane jądra magnetyczne lub analogiczne grupy jąder są anizochronowe, tzn. wykazują różne przesunięcia chemiczne, to są na pewno diastereotopowe. Jeśli grupy stają się anizochronowe dopiero w środowisku chiralnym, to najprawdopodobniej są enancjotopowe. Grupy homotopowe są natomiast zawsze izochronowe, co jednak nie oznacza, że są zawsze magnetycznie równocenne. Ich nierównocенność magnetyczna powstaje, gdy wykazują różne sprzężenia spinowo-spinowe z innymi jądrami. (zagadnienie równocенności magnetycznej i klasyfikacji układów spinowych zostało dokładniej omówione m.in. w monografii [3]).

Kwestia identyczności i rozróżnialności struktur molekularnych jest nierozdzielnie związana z ich trwałością. W tym kontekście mówi się o charakterystycznej skali czasu NMR. Jest ona określana przez wyrażone w jednostkach częstości różnice położenia linii widmowych ulegających uśrednianiu w wyniku zachodzących przemian. Zagadnienie to będzie dokładniej omówione i zilustrowane w innym artykule, znajdującym się w tym zeszycie. W tym miejscu zostaną jedynie przytoczone dwa przybliżone, ale bardzo użyteczne kryteria. Jeśli przez $\Delta\nu$ [Hz] oznaczy się różnicę położenia odpowiadających sobie linii w substracie i produkcie rozpatrywanej przemiany, to wymiana chemiczna przebiegająca z szybkością rzędu $\pi\Delta\nu$ przemian na sekundę powoduje ich uśrednienie (koalescencję). Zaś wymiana przebiegająca

z szybkością większą niż $\Delta\nu^2/\Delta\nu$, gdzie $\Delta\nu$ oznacza zauważalne poszerzenie linii, powoduje zanik poszerzeń dynamicznych w widmie uśrednionym. W przypadku spełniania tego drugiego kryterium, widno obserwowane charakteryzuje się przesunięciami chemicznymi i stałymi sprzężenia spinowo-spinowego, które są średnimi ważonymi przez populacje poszczególnych struktur znajdujących się w stanie równowagi dynamicznej [3–6].

Podczas rozważania zagadnienia rozróżnialności atomów lub grup w obrębie jednej molekuly pojawiają się podobne problemy. W granicy szybkich ruchów molekularnych może pojawić się efektywna symetria, przy czym symetria ta nie może być nigdy niższa niż symetria wyjściowa. Tak więc grupy diastereotopowe mogą stać się enancjotopowymi lub homotopowymi, a grupy enancjotopowe – homotopowymi (Rys. 1).

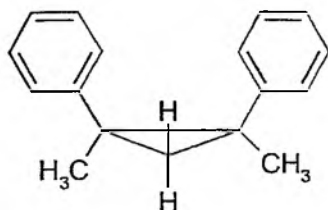


Rysunek 1. Symetria molekuly może ulec zwiększeniu dzięki szybkiej wymianie chemicznej:

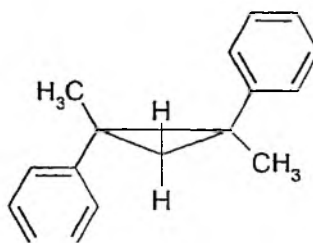
(a) inwersja pierścienia *cis*-1,2-dimetylocykloheksanu powoduje, że diastereotopowe grupy metylowe stają się enancjotopowe; (b) inwersja pierścienia 1,1-dimetylocykloheksanu powoduje, że diastereotopowe grupy metylowe stają się homotopowe; (c) inwersja azotu w dimetyloaminie powoduje, że enancjotopowe grupy metylowe stają się homotopowe

Wbrew pozorom, zjawisko dynamicznego uśredniania widm jest zjawiskiem bardzo częstym. Tak częstym, że przeważnie zupełnie o jego istnieniu zapominamy. Warto sobie, np. uświadomić, że gdyby nie bardzo szybka rotacja, protony grup metylowych często byłyby anizochronowe, a widma molekul niesztynnych, takich jak np. octan etylu, byłyby bardzo skomplikowane, gdyż stanowiłyby nałożenie widm poszczególnych konformerów. Prawidłowe skojarzenie postaci widma NMR z możliwymi symetriami molekul różnych izomerów często dostarcza niepodważalnych dowodów na temat ich budowy. Dla ilustracji tej tezy rozważmy kilka przykładów:

Przykład 1. Rozróżnianie izomerów *cis* i *trans* 1,2-difenylo-1,2-dimetylocyklopropanu (Rys. 2). Jest dosyć oczywiste, że w przypadku izomeru *cis* należy oczekiwać, że diastereotopowe protony pierścienia cyklopropanowego dadzą w widmie $^1\text{H NMR}$ 4 linie układu AB, podczas gdy w izomerze *trans* protony te są homotopowe, a więc izochronowe i dadzą w widmie singlet.



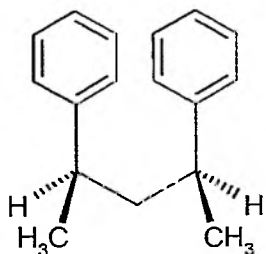
cis-1,2-difenylo-1,2-dimetylocyklopropan



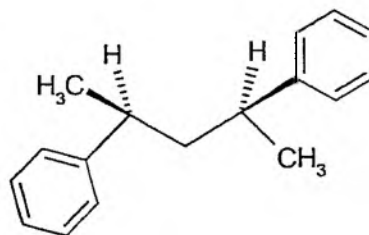
trans-1,2-difenylo-1,2-dimetylocyklopropan

Rysunek 2. W izomerze *cis*-1,2-difenylo-1,2-dimetylocyklopropanu protony przy węglu 3 są diastereotopowe, więc mogą być anizochronowe, a w izomerze *trans* są homotopowe, więc są izochronowe

Przykład 2. Odróżnienie odmian *mezo* i *D,L*-2,4-difenylopentanu (Rys. 3). Rozpatrując efektywną symetrię lub metodą skojarzenia z odpowiednimi cyklopropanami można wydedukować, że w odmianie *mezo* protony geminalne przy węglu 3 są diastereotopowe, a więc prawdopodobnie anizochronowe, a w odmianach (*RR*) i (*SS*) homotopowe, więc izochronowe. Praktyczne wykorzystanie tej różnicy może być jednak trudne, gdyż protony geminalne wchodzą w tym przypadku w skład złożonego układu spinowego i widmo protonowe będzie zależało w obu przypadkach od geminalnej stałej sprzężenia spinowo-spinowego $^2J(\text{H-H})$.



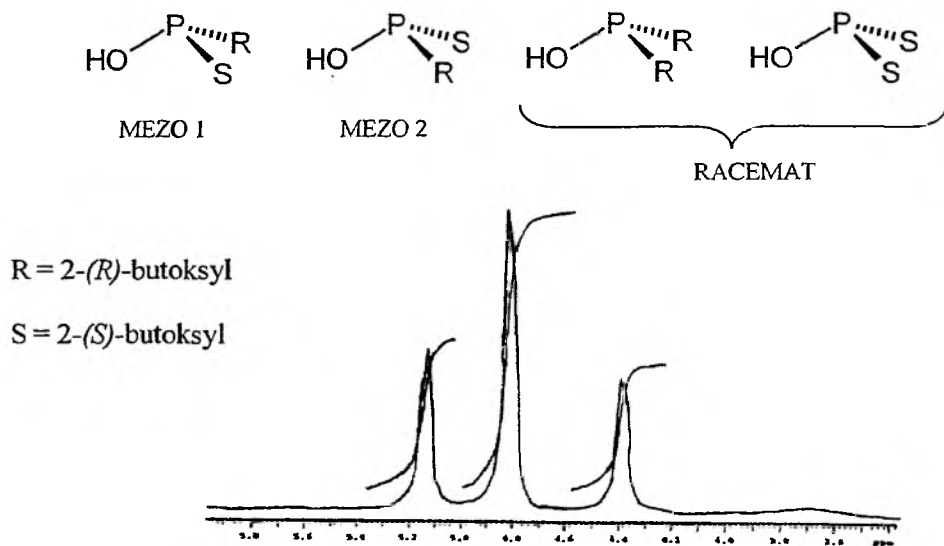
mezo-2,4-difenylopentan



D,L-2,4-difenylopentan

Rysunek 3. W izomerze *mezo*-2,4-difenylopentanu protony przy węglu 3 są diastereotopowe, więc mogą być anizochronowe, a w izomerze *D,L* są homotopowe, więc są izochronowe

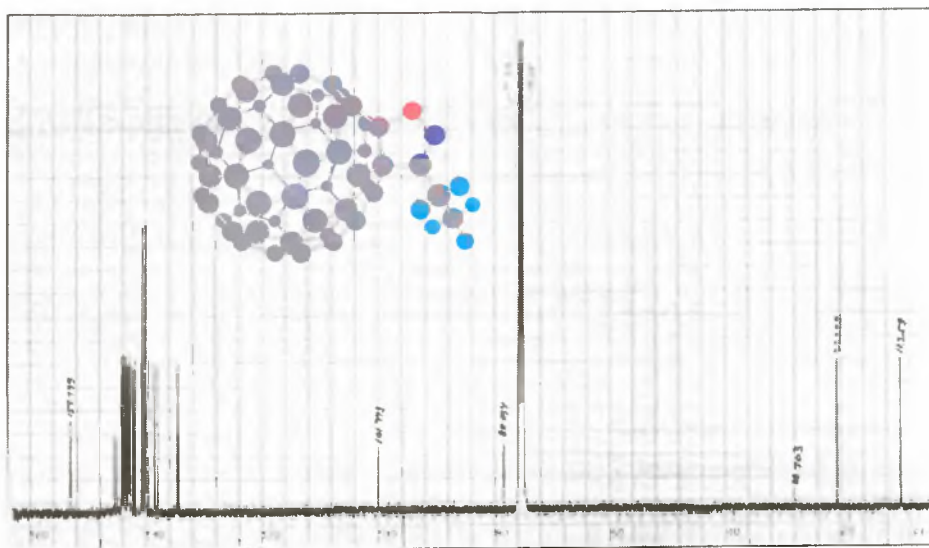
Przykład 3. Widmo $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR di-sec-butylofosfitu (Rys. 4) [7]. W widmie tego związku, otrzymanego z racemicznego 2-butanolu, występują trzy sygnały o względnych intensywnościach 1:2:1. Oznacza to, że w próbce są co najmniej 3 różne związki. Zastanówmy się, jakie. W reakcji mogły powstać 4 struktury *RR*, *RS*, *SR* i *SS* (symbole *R* i *S* odnoszą się tu do reszty 2-butylowej). Powstawały one z jednakowym prawdopodobieństwem, jeśli pominąć indukację asymetryczną, zasadniczo możliwą w tej reakcji. Struktury *RR* i *SS* dają identyczne widma NMR, gdyż są względem siebie enancjomeryczne: odbicie w płaszczyźnie przeprowadza jedną w drugą. Każda z dwóch pozostałych struktur jest inna; obie mają płaszczyzną symetrii a więc są odmianami *mezo*. Traktując problem bardziej formalnie, molekuly *SR* i *RS* są względem siebie diastereomeryczne, gdyż żadna operacja symetrii nie jest w stanie ich nałożyć na siebie. Zauważmy, że inwersja fosforu przeprowadza jedną w drugą. Ale nie jest to operacja symetrii! Fakt obserwacji trzech a nie dwóch różnych sygnałów w widmie jest więc dowodem na powolną (w skali czasu NMR) inwersję wiązań przy fosforze.



Rysunek 4. Stereoizomery di-(2-butylo)-fosfitu i widmo ^{31}P NMR ich mieszaniny powstałej z reakcji, w której substratem był racemiczny alkohol 2-butyloowy

Przykład 4. Cykloaddukt tlenku nitrylu do fullerenu C_{60} [8] (Rys. 5). Fulleren C_{60} z racji wysokiej symetrii daje w widmie ^{13}C NMR pojedynczy singlet. Związek ten ulega reakcji dipolarnej cykloaddycji z tlenkiem propionitrylu ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CNO}$). Można sobie wyobrazić dwa izomeryczne cykloaddukty powstające w zależności od tego, do którego wiązania zachodzi addycja. Przyłączenie tlenku nitrylu do wiązania 5:6 daje produkt pozbawiony jakiegokolwiek symetrii, czyli chiralny. Gdyby

nie było przypadkowych degeneracji w widmie ^{13}C NMR w zakresie aromatycznym powinno dla takiej molekuly pojawić się 58 sygnałów o jednakowej intensywności. Natomiast addycja do wiązania 6·6 daje molekulę posiadającą płaszczyznę symetrii, na której leży pierścień izoksazoliny i dodatkowo dwa inne atomy węgla należące do szkieletu fullereny. Łatwo policzyć, że w widmie ^{13}C NMR powinny w tym przypadku pojawić się w zakresie aromatycznym dwa sygnały o intensywności względnej 1 i 28 sygnałów o intensywności podwojonej. Takie właśnie widmo obserwuje się doświadczalnie, z tym, że zachodzą dwa przypadki akcydentalnej degeneracji, co jest łatwe do stwierdzenia na podstawie intensywności sygnałów.



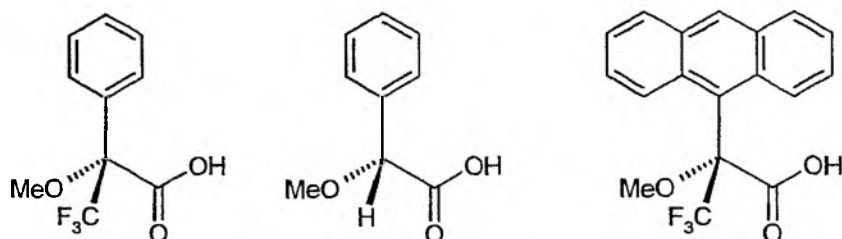
Rysunek 5 Widmo ^{13}C NMR wskazuje, że molekula adduktu tlenku propionitrylu do fullereny C_{60} ma płaszczyznę symetrii

2. METODA OTRZYMYWANIA POCHODNYCH

Nie sposób wymienić wszystkie pomysły odnoszące się do funkcjonalizacji enancjomerów, zastosowane przez różnych autorów dla rozróżnienia izomerów optycznych poszczególnych związków. W rozdziale tym dla ilustracji zagadnienia zostanie omówionych jedynie kilka przykładów, wybranych w sposób arbitralny. Pełniejsze omówienie danych literaturowych można znaleźć w artykułach przeglądowych [2, 9–12].

Popularną metodą funkcjonalizacji chiralnych związków zawierających grupy $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ i $-\text{SH}$ jest wprowadzanie reszty acylowej kwasu 2-fenyl-2-metoksy-3,3,3-trifluorometylopropionowego, tzw. kwasu Moshera [2, 9–12, 15–17] (Rys. 6)

Metoda ta zasługuje na dokładniejsze omówienie ze względu na obszar potencjalnych zastosowań jak i liczbę doniesień o skutecznym jej wykorzystaniu. Odmiany (*S*) i (*R*) chlorków kwasu Moshera o wysokiej czystości optycznej są handlowo dostępne, jakkolwiek dosyć drogie. Opracowano szereg szczegółowych procedur acylowania różnych klas związków za pomocą chlorków lub wytwarzanych *in situ* bezwodników kwasu Moshera [16]. Bardzo oryginalna i wygodna procedura nadająca się do otrzymywania pochodnych amin i alkoholi polega na zastosowaniu, jako odczynnika derywatyzującego, żywicy polistyrenowo-karboksyłanowej, z którą w postaci mieszanego bezwodnika związany jest kwas Moshera, lub jego analog z podstawnikiem 9-antrylowym [12, 17]. Alkohol lub aminę badaną, rozpuszczoną w CDCl_3 , umieszcza się w próbówce NMR-owej, dodaje żywicy, wytrząsa i po odpowiednim czasie (5 min do kilku godz.) rejestruje widmo.

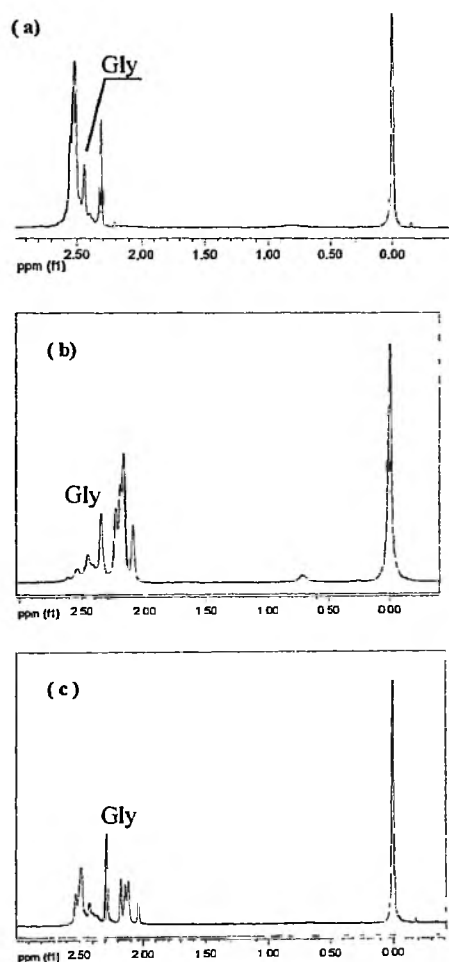


Rysunek 6. Kwas Moshera i jego analogi

Duża skuteczność metody rozróżniania enancjomerów, polegająca na wprowadzaniu do badanej cząsteczki reszty kwasu Moshera, wynika z kilku powodów. Reszta ta ma spore wymagania steryczne i wprowadzenie jej wymusza określone konformacje molekuly diastereomeru, na ogół znacznie różniące się dla enancjomerów cząsteczki badanej. Podobne znaczenie ma fakt, że trzy grupy – fenyłowa, metoksyłowa i trifluorometyłowa mają bardzo różniące się między sobą własności elektryczne. Ponadto wymienione trzy grupy, a zwłaszcza grupa fenyłowa, wnoszą do ekranowania jąder magnetycznych anizotropowe efekty dalekiego zasięgu. Skutkiem tego następuje lepsze różnicowanie się sygnałów w widmach NMR diastereomerów, pochodzących od różnych enancjomerów badanej molekuly. Dla wzmocnienia efektów różnicujących proponowano stosowanie analogów kwasu Moshera z podstawnikami naftyłowymi lub antryłowymi o większej anizotropii ekranowania i większej zawadzie przestrzennej. Można również znaleźć wiele doniesień o stosowaniu pochodnych kwasu migdałowego i szeregu kwasów o podobnej budowie, wykazujących lepsze lub gorsze właściwości różnicowania enancjomerów [2, 9–12] (Rys. 6).

Z perspektywy badań spektroskopowych bardzo korzystne jest że grupy CH_3O – i CF_3 – charakterystyczne dla pochodnych kwasu Moshera dają w widmach odpowiednio ^1H i ^{19}F NMR łatwo rozpoznawalne sygnały. Cenne jest zwłaszcza rozsze-

rzenie możliwości obserwacji na obszar widm fluorowych, które charakteryzują się dużą czułością i bardzo szerokim w porównaniu z protonami zakresem przesunięć chemicznych. Szeroki zakres jest równoznaczny z dużą wrażliwością tego parametru na otoczenie molekularne. W widmach ^{19}F NMR występuje zazwyczaj niewiele innych sygnałów i w związku z tym można pozwolić sobie na badanie mieszanin. Jako przykład niech posłużą widma pochodnych skomplikowanej mieszaniny związków otrzymanej z hydrolizy białka jaja kurzego [18] (Rys. 7). Hydrolizat zawiera głównie mieszaninę L-aminokwasów. Po funkcjonalizacji racemicznym kwasem Moshera, jego odmianą (*R*) i odmianą (*S*) mieszanina ta ma wyraźnie różne widma ^{19}F NMR.

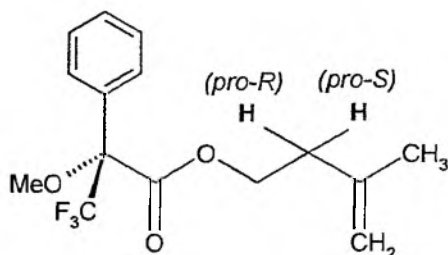


Rysunek 7. Widma ^{19}F NMR pochodnych Moshera aminokwasów hydrolizatu białka jaja kurzego:

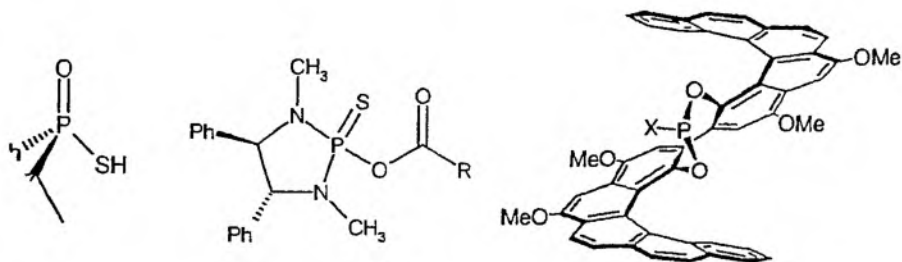
(a) pochodne kwasu (*R*), (b) pochodne kwasu (*S*), (c) pochodne kwasu racemicznego.

W środkowej części wszystkich widm widoczny jest w tym samym miejscu sygnał pochodnej glicyny

Dobrym przykładem pokazującym unikalne możliwości spektroskopii NMR rozróżniania enancjomerów są wyniki badań 2-deutero-3-metylobut-3-en-1-olu [19] (Rys. 8). Różnica strukturalna między enancjomerami tego alkoholu jest bardzo mała i można mieć wątpliwości, czy jakkolwiek metoda będzie w stanie ją wykryć. Spektroskopia NMR nie rejestruje jednak globalnych własności, jest natomiast wrażliwa na otoczenie magnetyczne poszczególnych jąder. Gdy się weźmie to pod uwagę, można zauważyć, że różnica otoczeń magnetycznych pomiędzy diastereotopowymi, geminalnymi miejscami w molekule estru tego alkoholu z chiralnym kwasem może być całkiem znaczna. W cytowanej pracy zastosowano kwas 2-acetoksyfenylooctowy. Nie budzi zdziwienia, że w estrze niedeuterowanego alkoholu geminalne protony przy C-2 są anizochronowe. W związku deuterowanym przy atomie węgla C-2 w jednym z tych miejsc jest proton a w drugim deuteron i widma protonowe diastereomerycznych estrów z konieczności są różne.



Rysunek 8 Protony (*pro-R*) i (*pro-S*) w estrze 3-metylobut-3-en-1-olu z kwasem Moshera są względem siebie diastereotopowe i mają różne przesunięcia chemiczne. Dlatego diastereomeryczne estry 2-deutero-3-metylobut-3-en-1-olu mają różne widma ^1H NMR

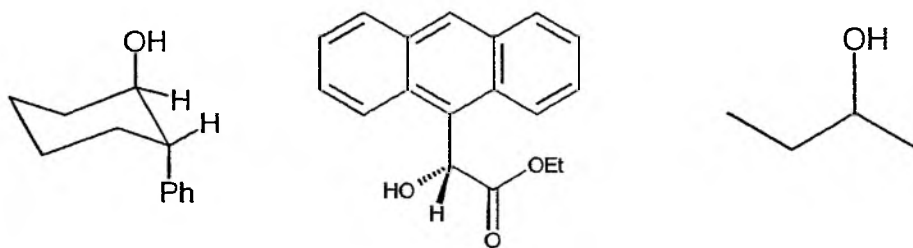


Rysunek 9. Chiralne odczynniki zawierające fosfor

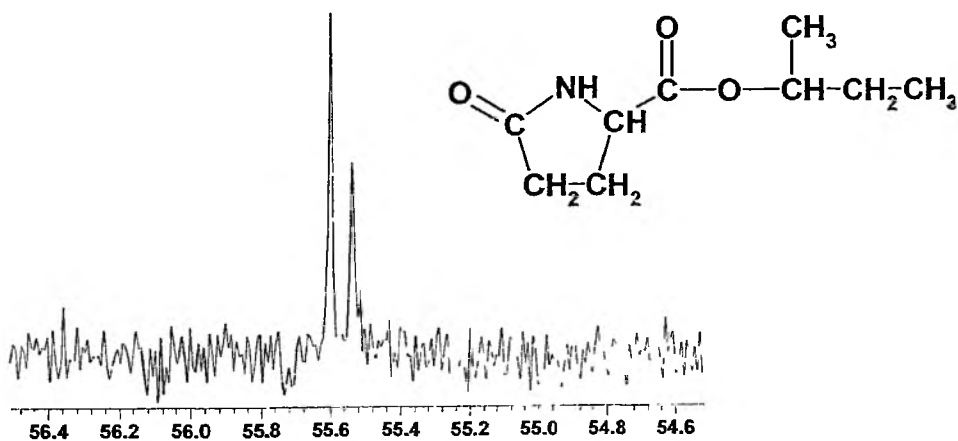
literaturze jest wiele doniesień o stosowaniu chiralnych odczynników fosforowych do rozróżniania enancjomerów [2, 9–12, 20–22], począwszy od bardzo prostej, jak kwas fenylo-*t*-butylo-tiofosfinowy [20], poprzez umiarkowanie złożone pochodne chiralnych diaminy [21], aż po niezwykle skomplikowane struktury przedstawione na Rys. 9, zawierające podstawnik bihelicylowy [22]. Wy się, że przyczyny poszukiwania odczynników umożliwiających wprowadzenie

dotkowego centrum chiralnego do cząsteczki właśnie wśród związków fosforowych leżą podobne zalety spektroskopii ^{31}P NMR, jak spektroskopii na jądrach fluoru. Dodatkową zaletą jest w omawianym przypadku względna łatwość wprowadzenia do molekuł organicznych funkcji fosforowej i potraktowanie jej jako łącznika między cząsteczką badaną a dodatkowym centrum chiralnym.

W przypadku rozróżniania enancjomerów kwasów do otrzymania pochodnych można zastosować reakcję estryfikacji optycznie czynnym alkoholem. Szczególnie polecane są *trans*-2-arylocykloheksanole [10–12, 23]. W estrach takich alkoholi oba podstawniki pierścienia cykloheksanu mają tendencję do przyjmowania pozycji ekwatorialnych, co zbliża w przestrzeni podstawnik arylowy i resztę badanego kwasu. Stosuje się również wiele innych alkoholi, np. estry różnych 2-hydroksykwasów [23, 24] (Rys. 10).



Rysunek 10. Chiralne alkohole stosowane do funkcjonalizacji kwasów



Rysunek 11. Ester 2-butyloxy 5-oksoproliny; sygnał węgla C-2 dla mieszaniny wzbogaconej w jeden z diastereomerów

Również najprostszy chiralny alkohol – 2-butanol może okazać się przydatny w tego rodzaju badaniach. Jego zaletą jest lotność, co umożliwia łatwe usunięcie

jego nadmiaru ze środowiska reakcji. Taką metodę zastosowano np. przy oznaczeniu konfiguracji 5-oksoproliny [25], która czasami pojawia się w moczu ludzkim jako patologiczny metabolit. W próbkach biologicznych ze względu na ich złożony i zmienny skład zauważenie różnic pomiędzy diastereomerami w widmach $^1\text{H NMR}$ może być bardzo trudne. Ale w widmie węglowym różnice takie są już dobrze widoczne (Rys. 11).

Warto zwrócić uwagę na pewne problemy dosyć często ujawniające się przy praktycznych zastosowaniach metody otrzymywania pochodnych. Tak więc gdy w próbce jeden z enancjomerów substancji badanej znajduje się w bardzo dużym nadmiarze a do funkcjonalizacji stosuje się odczynnik optycznie czysty, co skądinąd ma swoje zalety, w widmie końcowym pojawiają się sygnały tylko jednego z diastereomerów. Wtedy rozstrzygnięcie, który to diastereomer, może być trudne, gdyż różnice odpowiednich przesunięć chemicznych są często bardzo małe i zależne od warunków pomiaru. Czasami dla uzyskania wiarygodnej odpowiedzi okazuje się konieczne dodanie do przetworzonej próbki substancji wzorcowej. Najlepszym wzorcem w omawianej sytuacji jest roztwór zawierający sygnały obu diastereomerycznych pochodnych w znanej proporcji.

Jeśli różnicowanie widm diastereomerów umożliwi określenie ich względnych stężeń, to zasadniczo na tej podstawie jest możliwe wyznaczenie nadmiaru enancjomerycznego w próbce badanej. W przypadku, gdy do funkcjonalizacji związku A używa się odczynnika w postaci czystego enancjomeru, np. C_R , w próbce przetworzonej mogą znaleźć się dwa diastereomery, $A_R C_R$ i $A_S C_R$. Przy założeniu pełnego przereagowania badanego związku stosunek ich stężeń będzie równy stosunkowi stężeń enancjomerów A_R i A_S w próbce badanej.

W ogólnym przypadku w oznaczeniach ilościowych trzeba jednak brać pod uwagę zależność składu mieszaniny poreakcyjnej od wielu czynników. Jeżeli do funkcjonalizacji użyty został odczynnik jedynie enancjomerycznie wzbogacony, sytuacja staje się szczególnie skomplikowana, ponieważ wtedy w próbce przetworzonej należy oczekiwać pojawienia się czterech, parami nierozróżnialnych w NMR struktur diastereomerycznych: $A_R C_R + A_S C_S$ i $A_R C_S + A_S C_R$. Podczas interpretacji obserwowanych intensywności sygnałów trzeba brać pod uwagę wpływ enancjoselektywności kinetyki i wydajności reakcji funkcjonalizacji na skład próbki przetworzonej. Nie należy też zapominać o możliwości częściowej racemizacji badanego obiektu, zastosowanego odczynnika lub otrzymywanej pochodnej podczas reakcji. Zresztą, jak to wynika z powyższego skrótowego omówienia, nawet jeżeli można zaniedbać komplikacje wynikające z nietrwałości konfiguracji, to i tak ustalenie enancjomerycznego nadmiaru badanego związku w próbce wyjściowej na podstawie proporcji sygnałów w próbce przetworzonej jest niełatwym zadaniem.

3. METODA KOMPLEKSOWANIA

Drugi sposób rozróżniania enancjomerów polega na wytworzeniu wokół badanego obiektu chiralnego otoczenia dzięki zastosowaniu chiralnego odczynnika kompleksującego lub solwatuującego [9–13]. Metoda ta różni się od omówionej w poprzednim rozdziale tym, że diastereomeryczne struktury stanowiące podstawę rozróżniania są nietrwałe w skali operacji laboratoryjnych. Charakterystyczną cechą takich układów jest to, że stężenia obecnych w roztworze obiektów odpowiadają stanowi równowagi termodynamicznej. Upraszcza to znacznie badania mające na celu rozpoznanie chiralne, gdyż umożliwia wyeliminowanie z rozważań problemu enancjoselektywności kinetyki, zarówno w części dyskusji dotyczącej intensywności sygnałów, jak i w odniesieniu do ich położenia. Intensywności, jak wiadomo, są proporcjonalne do stężeń molowych poszczególnych obiektów w badanej próbce. Stężenia te w układzie znajdującym się w stanie równowagi termodynamicznej wynikają ze stałych równowagi i stężeń wyjściowych reagentów, nie mają natomiast bezpośredniego związku ze stałymi szybkości poszczególnych procesów wymiany.

3.1. WPLYW TRWAŁOŚCI KOMPLEKSU NA WIDMO NMR

Rozpatrzmy najpierw przypadek, gdy diastereomeryczne struktury molekularne, stanowiące podstawę metody rozróżniania enancjomerów są trwałe w skali czasu NMR i równocześnie nietrwałe w skali czasu operacji laboratoryjnych. Przykładami takich układów są kompleksy typu $Cl_2PtAB + C$ ($A = \text{amina}$, $B, C = \text{olefiny}$) [26]. A więc badany roztwór znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej, a zarazem zachodzące przemiany, określane w spektroskopii NMR jako wymiana chemiczna, są na tyle powolne, że widmo roztworu jest prostą superpozycją widm składników. Sytuacja taka jest dosyć podobna do omawianej w poprzednim rozdziale, o ile badano mieszaninę po reakcji derywatywacji, bez obróbki mającej na celu wydzielenie pochodnych.

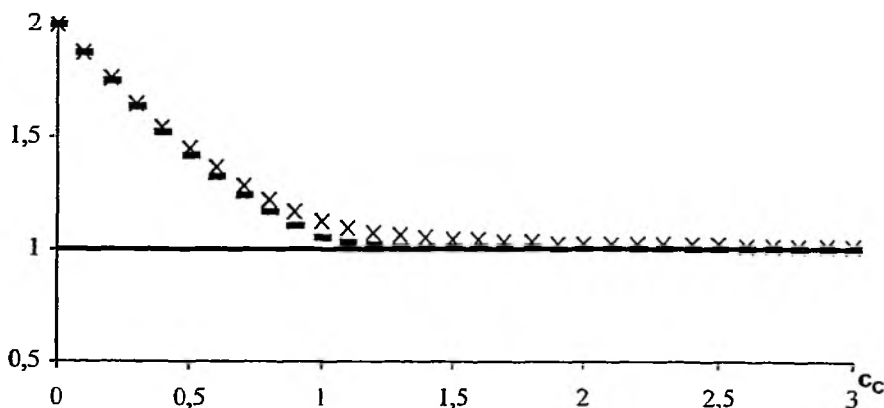
Przypuśćmy, że w celu rozróżnienia enancjomerów związku A do badanego roztworu dodano chiralnego odczynnika kompleksującego C . Załóżmy dla uproszczenia, że odczynnik ten jest w postaci jednego izomeru optycznego (np. enancjomeru (R)). W najprostszym przypadku w badanej próbce mamy doczynienia z dwiema odwracalnymi przemianami, które na ogół charakteryzują się różnymi stałymi równowagi:



Wybrane jądro magnetyczne lub grupa równocennych chemicznie jąder w molekułe A związana jest z trzema różnymi (na ogół) przesunięciami chemicznymi:

$\delta = \delta A_S = \delta A_R, \delta A_R C_R$ i $\delta A_S C_R$. Ponieważ w rozpatrywanym przypadku czasy życia struktur są znacznie dłuższe niż odwrotności różnic przesunięć chemicznych (wyrażonych w skali częstości), to w widmie obserwuje się oddzielne sygnały o intensywnościach proporcjonalnych do frakcji molowych odpowiednich cząsteczek [3–6]. Ale jeżeli w widmie są obecne wszystkie trzy sygnały, stosunek intensywności sygnałów $A_R C_R$ i $A_S C_R$ na ogół nie jest równy stosunkowi stężeń enancjomerów w wyjściowej próbce (Rys. 12). Sytuacja upraszcza się dopiero przy zastosowaniu takiego nadmiaru odczynnika chiralnego, który zapewnia praktycznie pełne skompleksowanie związku A. Wtedy w widmie widoczne są tylko sygnały dwóch kompleksów i ich intensywności rzeczywiście odzwierciedlają skład enancjomeryczny próbki wyjściowej.

$\text{Int}(A_R C_R) / \text{Int}(A_S C_R)$



Rysunek 12. Równowagowy stosunek intensywności sygnałów diastereomerycznych kompleksów dla racemicznej substancji A, tworzącej w sposób odwracalny trwałe w skali czasu NMR kompleksy z optycznie czystym odczynnikiem kompleksującym, C_R , w funkcji stężenia tego odczynnika. W obliczeniach przyjęto całkowite stężenie $c_A = 1$ u oraz stałe równowagi: — $K_R = K_S = 20 \text{ u}^{-1}$; - - - - $K_R = 2(K_S) = 40 \text{ u}^{-1}$; — — — $K_R = 2K_S = 200 \text{ u}^{-1}$, gdzie $K_i = [A_i C_R] / ([A_i][C_R])$, a u oznacza jednostkę stężenia

Najmniej korzystna sytuacja z punktu widzenia możliwości rozpoznawania chiralnego powstaje, gdy czasy życia poszczególnych obiektów znajdujących się w badanej próbce są porównywalne z odwrotnościami różnic przesunięć chemicznych uśrednianych przez wymianę. Wpływ dynamiki przejawia się w rejestrowanych widmach poszerzeniami i charakterystycznymi modyfikacjami kształtu sygnałów, dając skądinąd bardzo interesujące, ale trudne do interpretacji widma [3–6, 13]. Czasami, ze względu na bardzo duże poszerzenia, interesujące sygnały mogą w ogóle zniknąć z pola obserwacji.

Zupełnie inna sytuacja powstaje, gdy czas życia kompleksu jest bardzo krótki w porównaniu z odwrotnościami różnic przesunięć chemicznych. Jest to znacznie częściej spotykany w praktyce przypadek, dotyczący np. kompleksów solwatacyj-

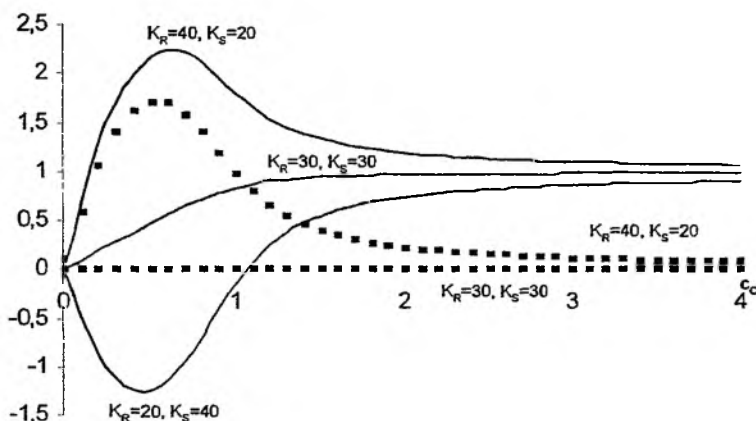
nych. W takich próbkach następuje uśrednienie sygnałów od postaci skompleksowanej i nieskompleksowanej badanej substancji. Niezależnie od nadmiaru, czy niedomiaru odczynnika kompleksującego w widmie obserwuje się co najwyżej dwa zestawy sygnałów dla $(A_R + A_R C_R)$ i $(A_S + A_S C_R)$. Stosunek ich intensywności odpowiada składowi enancjomerycznemu substancji badanej a ich położenia są dosyć skomplikowaną funkcją stężeń reagentów, stałych równowagi i granicznych przesunięć chemicznych (Rys. 13):

$$\delta 1 = \gamma(A_R)\delta A + \gamma(A_R C_R)\delta A_R C_R \quad (3)$$

$$\delta 2 = \gamma(A_S)\delta A + \gamma(A_S C_R)\delta A_S C_R \quad (4)$$

gdzie $\gamma(X)$ oznaczają frakcje molowe odpowiednich obiektów, np.:

$$\gamma(A_R) = [A_R]/([A_R] + [A_R C_R]) \quad (5)$$



Rysunek 13. Obserwowana w widmie Różnica położenia sygnałów związanych z enancjomerami, $\Delta = \delta(A_R + A_R C_R) - \delta(A_S + A_S C_R)$, dla racemicznej substancji A, tworzącej nietrwale kompleksy z optycznie czystym odczynnikiem C_R , w funkcji całkowitego stężenia tego odczynnika.

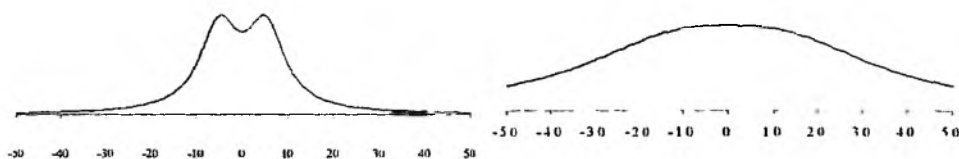
W obliczeniach przyjęto: $c_A = 1$ u1, średni efekt kompleksowania: $[\delta(A_R C_R) + \delta(A_S C_R)]/2 - \delta(A) = 10$ u2 (u1, u2 – arbitralne jednostki) oraz różnice przesunięć chemicznych dla czystych kompleksów odpowiednio.

— $\delta(A_R C_R) - \delta(A_S C_R) = 1,0$ u2, - - - - $\delta(A_R C_R) - \delta(A_S C_R) = 0,0$ u2

Warunkiem zaobserwowania oddzielnych sygnałów dla obu enancjomerów w widmie badanej próbki jest dostatecznie duża wartość różnicy efektywnych przesunięć chemicznych, $|\delta 1 - \delta 2|$, w stosunku do szerokości linii. W ogólnym przypadku różnica $\delta 1 - \delta 2$ może być większa co do wartości bezwzględnej niż $\delta A_R C_R - \delta A_S C_R$ a także może mieć przeciwny znak. Oczywiście wielkość jej zależy od czystości enancjomerycznej odczynnika kompleksującego (solwatuującego) i znika jeśli odczynnik ten jest racemiczny, czyli gdy środowisko staje się achiralne. Jest dosyć interesujące, że nawet jeśli przesunięcia chemiczne dla kompleksów obu enan-

cjomerów są jednakowe ($\delta A_R C_R = \delta A_S C_R$), pod wpływem kompleksowania może nastąpić rozszczepienie sygnałów. Z drugiej strony różnice pomiędzy widmami kompleksów $A_R C_R$ i $A_S C_R$ nie gwarantują, że uda się dobrać skład roztworu umożliwiającą rozróżnienie enancjomerów (Rys. 13). Są to ważne dla praktyki pomiarowej różnice w porównaniu z omawianymi poprzednio przypadkami, gdy położenia sygnałów nie ulegały uśrednianiu.

Na dokładniejsze omówienie zasługuje jeszcze jeden przypadek mający praktyczne znaczenie dla omawianych tutaj eksperymentów, kiedy wymiana chemiczna jest na tyle szybka, że powoduje uśrednianie się widm poszczególnych obiektów, ale przynajmniej niektóre spośród obserwowanych sygnałów są jeszcze poszerzone. Przypomnijmy, że w granicy szybkiej wymiany dynamiczne poszerzenie sygnału jest rzędu $\Delta\delta^2\tau$, gdzie $\Delta\delta$ oznacza różnicę uśrednianych przez wymianę przesunięć chemicznych, a τ — średni czas życia reagujących obiektów [3–6]. Zatem poszerzenie dynamiczne wzrasta z kwadratem indukcji pola magnetycznego, a odległość pomiędzy uśrednianymi sygnałami (wyrażona w Hz) tylko z pierwszą jego potęgą. W konsekwencji rejestrując widma za pomocą spektrometru z silniejszym polem magnetycznym można uzyskać gorsze warunki różnicowania się enancjomerów (Rys. 14). Taka sytuacja powstaje w praktyce często przy stosowaniu paramagnetycznych odczynników przesunięcia, gdzie bardzo często poszerzenia w widmie spowodowane są w większym stopniu efektami dynamicznymi, niż paramagnetycznymi [9, 27].

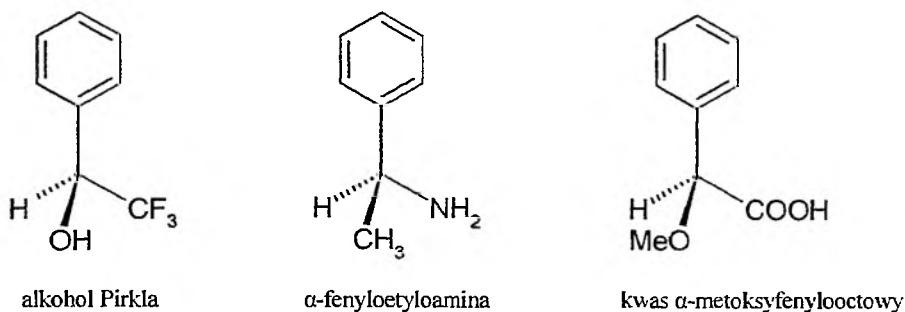


Rysunek 14. Zwiększenie pola magnetycznego, w którym jest rejestrowane widmo, pogarsza separację sygnałów poszerzanych przez wymianę chemiczną, gdyż $\delta\nu - B_0$, $\delta\nu \sim 1,5\Delta\nu^2/k - B_0$ (widmo symulowane)

3.2. ROZPUSZCZALNIKI CHIRALNE

Rozpuszczalniki chiralne i odczynniki solwujące środowisko chiralne można stworzyć przez zastosowanie optycznie czynnego rozpuszczalnika [2, 9, 10, 28]. Ze względu na konieczność eliminacji z widma niepożądanych sygnałów przeważnie oprócz niego stosuje się rozcieńczalnik, którym jest zwykły deuterowany lub chlowany rozpuszczalnik. Odczynnik chiralny powinien mieć dobre właściwości solwujące dzięki tworzeniu wiązań wodorowych, par jonowych lub innych oddziaływań z molekułami substancji badanej (Rys. 15). Do rozpoznania chiralnego stosowano różne alkohole, m.in. tzw. alkohol Pirkle'a, czyli 1-fenyl-2,2,2-trifluoroetanol. Jako bardzo dobry solwant zaproponowano niedawno perdeuterowany 1-(9-

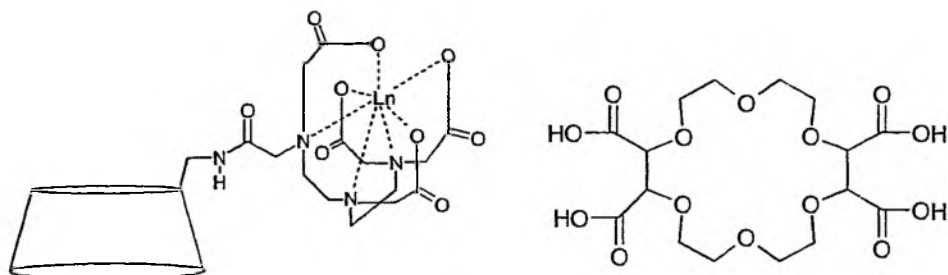
antrylo)-2,2,2-trifluoroetanol [29], który daje duże efekty zarówno w widmach ^1H jak i ^{13}C NMR. Można jednak obawiać się, że nie będzie to odczynnik tani. W podobnych celach stosowano 1-fenyletyloaminę i jej różne analogi, chiralne kwasy organiczne, a także wiele innych związków o mniej lub bardziej wyszukanej budowie (Rys. 15) [2, 9, 10, 28]. Jako ciekawy przykład, a jednocześnie pewne rozwinięcie idei chiralnego rozpuszczalnika można przytoczyć zastosowanie dodecyloal-topiranozydu tworzącego w wodzie liofobowe micelle, do których ekstrahował się z roztworu związek badany [30].



Rysunek 15. Typowe chiralne odczynniki solwujące

3.3. KOMPLEKSY INKLUZYJNE

Do wytworzenia środowiska chiralnego wielokrotnie stosowano tworzenie kompleksów inkluzyjnych [2, 9, 10, 13] (Rys. 16). Trzeba w tym kontekście wspomnieć o układach makrocyklicznych, np. o tetrakarboksylowej pochodnej eteru koronowego 18-korona-6. Kwas ten protonuje aminy, tworząc pary jonowe. Dla powiększenia efektu do układu badanego dodawano kompleksu iterbu(III) [31]. Jednak z pewnością najwięcej badań poświęconych było układom, w którym gospodarzem była cyklodekstryna zwykła lub zmodyfikowana [2, 13]. Przypomnijmy, że łatwo dostępne są trzy cyklodekstryny: α , β i γ , które są cyklicznymi oligosacharydami złożonymi odpowiednio z sześciu, siedmiu lub ośmiu glukozy. Liofilowa wnęka cyklodekstryn przyjmuje chętnie molekuły łatwo rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych a trudno rozpuszczalne w wodzie, takie jak dekalina czy kamfora. Układ jest chiralny, więc może powstać zróżnicowanie widm enancjomerów, zarówno z powodu innych oddziaływań, innych konformacji czy innych stałych równowagi tworzenia kompleksu. Modyfikacje miały na celu silniejsze związanie gościa z gospodarzem i polegały np. na wprowadzaniu grup aminowych amoniowych, karboksylowych lub karboksylanowych. Zaproponowano również modyfikację polegającą na dołączeniu do cyklodekstryny ligandu wielozębatego, który miał za zadanie uchwycenie jonu lantanowca i powiększenie w ten sposób różnic ekranowania molekuły-gościa we wnęce i roztworze [32].



Rysunek 16. Przykłady chiralnych makrocyclicznych odczynników kompleksujących

3.4. KOMPLEKSY METALI

W badaniach nadmiaru enancjomerycznego i innych wykorzystujących rozpoznanie chiralne za pomocą spektroskopii NMR, szerokie zastosowanie znajdują kompleksy metali [2, 9, 10, 14, 32–41]. Wykorzystywane jest przeważnie oddziaływanie typu kwas-zasada Lewisa lub oddziaływanie elektrostatyczne w parach jonowych pomiędzy jonem lub kompleksem metalu i molekułą badaną. Np. stwierdzono, że dodanie jonów barowych do roztworu zawierającego estry typu kwasu Moshera zmienia w dający się przewidzieć sposób ich konformację, dzięki chelatowemu kompleksowaniu [12, 33]. Zwiększa to możliwości rozróżniania enancjomerów niektórych obiektów, a ponadto czasami umożliwia określenie ich konfiguracji absolutnej.

Częściej jednak stosowane są chiralne odczynniki kompleksujące (Rys. 17, 18). Na uwagę zasługują kompleksy platyny, zawierające jako jeden z ligandów cząsteczkę etylenu, która w środowisku może ulec wymianie na inną olefinę, eter allylowy lub podobny związek [26, 34, 35]. Kompleks ten zawiera ponadto chiralną aminę lub związany elektrostatycznie chiralny jon amoniowy. Kompleksy te nadają się do badania molekuł, które są bardzo słabymi zasadami Lewisa. Skuteczne rozróżnianie enancjomerów przeprowadza się wykorzystując widma ^{195}Pt NMR. Jądro to ma bardzo duży zakres przesunięć chemicznych, co oznacza, że jest bardzo wrażliwe na wszelkie zmiany strukturalne. W badaniach mających na celu rozpoznanie chiralne stosowano także fosforowe kompleksy palladu, wykorzystując ^{31}P NMR [10]. Ciekawym odczynnikiem kompleksującym są kompleksy dirodu o składzie Rh_2K_4 , gdzie K jest anionem kwasu Moshera lub kwasu migdałowego. Kompleksy te pozwoliły np. na rozróżnienie enancjomerów siarczków i selenków fosfin [36]. Rekomendowano również stosowanie różnych metaloporfiryn i wielu innych układów [2, 9, 10].

- $\text{Cl}_2\text{PtA}(\text{C}_2\text{H}_4)$ lub $[\text{Cl}_3\text{Pt}(\text{C}_2\text{H}_4)]^-\text{AH}^+$ A – np. α -fenyloetyloamina
- Rh_2X_4 X – anion kw. Moshera lub kw. migdałowego
- chiralne metaloporfiryny

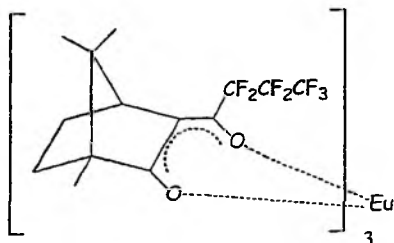
Rysunek 17. Przykłady chiralnych diamagnetycznych kompleksów metali, stosowanych jako pomocnicze reagenty różnicujące enancjomery

Oczywiście najlepiej znane są paramagnetyczne tris- β -diketoniany lantanowców [2, 14]. Są one stosunkowo słabymi a jednocześnie twardymi kwasami Lewisa, mogącymi związać jeden lub dwa ligandy twardych zasad, czyli związków zawierających tlen lub azot. Ze względu na oddziaływanie z centrum paramagnetycznym pod wpływem kompleksowania następuje bardzo duża zmiana przesunięcia chemicznego i relaksacyjne poszerzenie sygnału. W praktyce stosuje się niewielką ilość odczynnika paramagnetycznego w stosunku do substancji badanej. Kompleksy omawianego typu przeważnie są nietrwałe i następuje w nich szybka wymiana ligandów tak, że w widmach z reguły pojawiają się uśrednione sygnały ligandów swobodnych i skompleksowanych. Równocześnie jednak obserwuje się przeważnie poszerzenia dynamiczne sygnałów, co jak wspomniano utrudnia stosowanie silnych pól magnetycznych [9, 27]. Jeżeli kompleks lantanowcowy jest chiralny, można go wykorzystać do rozpoznania chiralnego. Najszerzej znanym i dostępnym handlowo jest odczynnik, w którym jon Eu^{3+} obudowany jest trzema anionami enolu heptafluorobutyryloksamfory.

Znaleziono metodę rozszerzającą zakres stosowania odczynników lantanowcowych również na miękkie zasady Lewisa, takie w których związanie reagentów może odbyć się jedynie za pomocą wolnych par elektronowych siarki, chlorowca (z wyjątkiem fluoru), a nawet za pomocą układu π -elektronów [37]. Stosuje się w tym celu układ złożony z kompleksu lantanowca i β -diketonianu srebra. Jon srebrowy – miękki kwas Lewisa staje się łącznikiem pomiędzy ligandem a anionem tetrakis- β -diketonianu lantanowca.

Wadą tris- β -diketonianów była ich wrażliwość na wodę, która blokowała dostęp do jonu centralnego i mogła spowodować hydrolizę odczynnika. Udało się jednak opracować odczynniki nadające się do roztworów wodnych [14, 38], trzeba jednak powiedzieć, że każdy z nich ma dosyć wąski zakres dopuszczalnych pH i ściśle ograniczone zastosowania. Przykładami takich odczynników są pochodne etylenodiaminy, a także układy azamakrocycliczne, w które wbudowane są chiralne aminy (Rys. 18).

β -diketoniany:



tris[3-(heptafluoropropyl)hydroksymetyleno]-d-kamforato]europium(III)

oraz rozpuszczalne w wodzie:

- $P+4X$ ($P = X_2NCH(CH_3)CH_2NX_2$, $X = -CH_2COOH$ lub $-CH_2-\alpha(-CNCHCHCHCH-)$)
- $LNHCH_2CH_2NHL$ ($L = -CH(COOH)CH_2COOH$)
- Makrocykl otrzymany z kondensacji 2,6-diformylopirydyny i trans-1,2-diaminocykloheksanu
- Makrocykl zbudowany z $Ph-CH(N=)-CH_3$ i $-CH_2CH_2-$

Rysunek 18. Niektóre chiralne ligandy stosowane w odczynnikach lantanowcowych nadających się do badań w roztworach wodnych

Jak już wspomniano, jony lub kompleksy lantanowców czasami stosuje się jako dodatki wzmacniające słabe efekty wywołane przez odczynniki diamagnetyczne [32]. Inne, może nawet ważniejsze zastosowania kompleksów lantanowcowych w badaniach stereochemicznych wynikają z możliwości powiązania tzw. przesunięć pseudokontaktowych z geometrią kompleksu. Mówiąc najogólniej ilościowa analiza obserwowanych zmian położenia sygnałów w widmie i efektów relaksacyjnych umożliwia niekiedy określenie odległości poszczególnych jąder w kompleksie od jonu paramagnetycznego i dostarcza nawet informacji o kątach. Omówienie tego zagadnienia wykracza jednak poza ramy tego artykułu i można je znaleźć np. w artykułach przeglądowych [14, 39] i wielu pracach oryginalnych np. [40–42].

3.5. CIEKŁE KRYSZTAŁY

Jako środowisko chiralne można również zastosować optycznie aktywne rozpuszczalniki ciekłokrystaliczne [2, 10, 13, 42–44]. Taką własność ma cała klasa ciekłych kryształów cholesterolowych a także niektóre układy liotropowe. Na przykład syntetyczny polipeptyd poli- γ -benzyloglutaminian tworzy regularne helisy i rozpuszcza się w rozpuszczalnikach typu chloroformu tworząc w pewnym zakresie stężeń i temperatur strukturę ciekłokrystaliczną, ulegającą uporządkowaniu w polu magnetycznym. Gdy układ taki zastosuje się jako rozpuszczalnik, orientacja

molekuł substancji rozpuszczonej ulega także pewnemu uporządkowaniu dzięki oddziaływaniom międzycząsteczkowym z matrycą ciekłokrystaliczną. Z tego wynikają różnorakie konsekwencje dla widm NMR [3, 42, 43]. Następują zmiany przesunięć chemicznych, ujawniają się bezpośrednie sprzężenia dipolowe, a w przypadku jąder kwadrupolowych następują dodatkowe rozszczepienia sygnałów. Tak więc sygnał każdego deuteru ulega rozszczepieniu na dublet, przy czym wielkość rozszczepienia zależy od jego stałej sprzężenia kwadrupolowego, od orientacji wiązania X–D względem kierunku pola magnetycznego i od stopnia uporządkowania badanego układu. Orientacje odmian enancjomerycznych danej molekuly są zwykle różne. Metodę tę zastosowano między innymi w przypadku hept-3-yn-2-olu [44]. W widmach ^2H NMR na naturalnej zawartości izotopu, zarejestrowanych dla postaci racemicznej tego alkoholu i dla mieszaniny wzbogaconej w jeden z izomerów optycznych zaobserwowano, że sygnał deuteru grupy 1-metylowej pojawił się w postaci dwóch dubletów o różnych stałych rozszczepienia, położonych przy tym samym przesunięciu chemicznym i o intensywnościach proporcjonalnych do stężeń enancjomerów.

Praktyczne stosowanie rozpuszczalników ciekłokrystalicznych nie jest łatwe, ma szereg ograniczeń i nie należy oczekiwać szerszego upowszechnienia tej metody. Jednak w niektórych przypadkach może ona okazać się bardzo przydatna – np. w zastosowaniu do nasyconych węglowodorów lub fluorowęglowodorów, gdy metody funkcjonalizacji, czy kompleksowania na ogół zawodzą.

4. OKREŚLANIE KONFIGURACJI ABSOLUTNEJ

Po doświadczalnym stwierdzeniu różnicowania się widm diastereomerycznych pochodnych związku badanego pozostaje nadal problem określenia jego konfiguracji absolutnej [11, 12]. I tu trzeba od razu powiedzieć, że jedyną w pełni wiarygodną metodą jest porównanie widma próbki badanej z widmem próbki wzorcowej. Jeżeli takowej nie ma, można opierać się na domniemaniu, że w serii podobnych związków utworzonych z tym samym odczynnikiem chiralnym tak zwany „sens nierównocенności” jest zachowany. Przez sens nierównocенności rozumie się znak różnicy przesunięć chemicznych odpowiednich sygnałów dla pary diastereomerów utworzonych przez odmianę (*R*) i (*S*) molekuly badanej z tą samą odmianą odczynnika pomocniczego (lub przez jeden izomer optyczny związku badanego z dwoma enancjomerami odczynnika pomocniczego). Przykładem regularności wspomnianego typu są omawiane już amidy utworzone z α -aminokwasów i kwasu Moshera [18]. Tak więc pochodne L-aminokwasów utworzone z kwasem Moshera o konfiguracji (*R*) dają w widmach ^{19}F NMR sygnał w silniejszym polu niż aminokwasy szeregu D. O ile jednak większość natywnych aminokwasów wykazuje znaczne przesunięcie diastereomeryczne, rzędu 0,4 ppm, o tyle fenyloalanina – tylko 0,02 ppm. Ilustruje to dobrze niepewność wnioskowania „przez analogię”.

W przypadku kilku chiralnych odczynników pomocniczych, jak kwas Moshera, kwas metoksyfenylooctowy, czy 9-antrylo-metoksyoctowy zastosowanych do konkretnych klas związków jak alkohole drugorzędowe czy aminy pierwszorzędowe, wypracowano reguły empiryczno-teoretyczne pozwalające na przewidywanie sensu nierównocенności [11, 12]. Sposób dedukcji polega na wytypowaniu najprawdopodobniejszej konformacji diastereomerycznej pochodnej, a raczej na wskazaniu, która konformacja będzie diagnostyczna. Następnie zakłada się np., że jądra (protony) znajdujące się blisko grupy fenylovej są odsłaniane, a w pobliżu grupy metoksy – przysłaniane. Opisano wiele prawidłowości tego typu, ale i pewną liczbę wyjątków od tych prawidłowości. Wykazano, że niekiedy jest możliwe wydedukowanie konfiguracji badanego związku, dostępnego tylko w postaci jednego enancjomeru [12]. W tym celu rejestruje się serię widm zmieniając temperaturę, dodając do roztworu odczynniki specyficznie solwujące lub jony tworzące ze związkiem badanym kompleksy chelatowe, a następnie interpretuje się zmiany w widmie indukowane przewidywaną zmianą konformacji.

Na zakończenie warto zauważyć, że zasadniczo istnieje możliwość teoretycznego przewidywania sensu nierównocенności na podstawie modelowania molekularnego i teoretycznego obliczania przesunięć chemicznych metodami mechaniki kwantowej. Metoda ta jednak przynajmniej na razie nie ma praktycznego znaczenia i to wbrew pozorom nie z powodu ograniczonej dokładności obliczania przesunięć chemicznych. O ile obliczone teoretycznie wartości stałych ekranowania bywają obciążone pewnymi błędami, o tyle różnice przesunięć chemicznych podobnych chemicznie struktur przewidywane są obecnie zazwyczaj z wystarczającą dokładnością. Znaczne błędy mogą natomiast powstawać z powodu trudności precyzyjnego określenia populacji poszczególnych konformerów występujących w równowadze w badanym roztworze. W przypadku jąder innych niż ^1H i ^{13}C trzeba się ponadto liczyć z możliwością specyficznego wpływu środowiska na ekranowanie poszczególnych jąder w molekuale badanej.

Wspomniane wyżej metody jak i wiele innych zagadnień związanych z zastosowaniami spektroskopii NMR do określania konfiguracji absolutnej zostały szeroko omówione w niedawno opublikowanym artykule przeglądowym [12], który ponadto stanowi bogate źródło odnośników do literatury oryginalnej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M.J. Potrzebowski, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 8, 1367.
- [2] E. Tadeusiak, *Wiad. Chem.*, 2003, 367.
- [3] A. Ejchart, A. Gryff-Keller, *NMR w cieczach. Zarys teorii i metodologii*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
- [4] L.M. Jackman, F.A. Cotton eds, *Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Academic Press, NY, London 1975.
- [5] J. Sandström, *Dynamic NMR Spectroscopy*, Academic Press, London 1982.
- [6] K.G. Orrell, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1999, 37, 1.
- [7] 34th International Chemistry Olympiad, Groningen, the Netherlands.

- [8] S. Meier, M. Poplawska, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4524.
- [9] R. Rothchild, *Enantiomer*, 2000, **5**, 457.
- [10] T.J. Wenzel, J.D. Wilcox, *Chirality*, 2003, **15**, 256.
- [11] J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 2915.
- [12] J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 17.
- [13] H. Dodziuk, W. Koźmiński, A. Ejchart, *Chirality*, 2004, **16**, 90.
- [14] J.A. Peters, J. Huskens, D.J. Raber, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1996, **28**, 283.
- [15] J.A. Dale, H.S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 512.
- [16] A.G. M. Barrett, D. Pilipauskas, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 5170.
- [17] S. Porto, J. Duran, J.M. Seco, E. Quinoa, and R. Riguera, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 2979.
- [18] P. Szczeciński, praca niepublikowana.
- [19] J.L. Giner, D. Kiemle, D.J. Zuniga, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 1175.
- [20] K.G. Gunderson, M.J. Shapiro, R.A. Doti, J.W. Skiles, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 3263.
- [21] A. Alexakis, A.-S. Chauvin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 1411.
- [22] D.J. Weix, S.D. Dreher, T.J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **12**, 10027.
- [23] M.J. Ferreira, S.K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2658.
- [24] M.J. Ferreira, S.K. Latypov, E. Quinoa, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, **8**, 1015.
- [25] D. Bal, A. Gryff-Keller, *XXXVI Ogólnopolskie Seminarium na temat Spektroskopii NMR i jej zastosowań*; Kraków, grudzień 2003.
- [26] G. Uccello-Barretta, R. Bernardini, F. Balzano, P. Salvadori, *Chirality*, 2002, **14**, 484.
- [27] (a) T.J. Wenzel, R.D. Miles, S.E. Weinstein, *Chirality*, 1997, **9**, 1. (b) A. Inamoto, K. Ogasawara, K. Omata, K. Kabuto, Y. Sasaki, *Org. Letters*, 2000, **2**, 3543.
- [28] A. Ejchart, J. Jurczak, *Wiad. Chem.*, 1970, **24**, 857.
- [29] A. Munoz, A. Virgili, *Enantiomer*, 2001, **6**, 235.
- [30] H. Nakagawa, K. Gorni, K.-I. Yamado, *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 49.
- [31] T.J. Wenzel, J.E. Thurston, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 1243.
- [32] T.J. Wenzel, R.D. Miles, K. Zomlefer, D.E. Frederique, M.A. Roan, J.S. Troughton, B.V. Pond, A.L. Cosby, *Chirality*, 2000, **12**, 30.
- [33] R. Garcia, J.M. Seco, S.A. Vasquez, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4579.
- [34] G. Uccello-Barretta, R. Bernardini, F. Balzano, R. Lazzaroni, P. Salvadori, *J. Organomet. Chem.*, 2000, **605**, 68.
- [35] G. Uccello-Barretta, R. Bernardini, F. Balzano, P. Salvadori, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 123.
- [36] S. Malik, H. Duddeck, J. Omelańczuk, and M. Iqbal Choudhary, *Chirality*, 2002, **14**, 407.
- [37] a) W. Offermann, A. Mannschreck, *Org. Magn. Reson.*, 1984, **22**, 355; b) T.J. Wenzel, A.C. Ruggles, D.R. Lalonde, *Magn. Reson. Chem.*, 1985, **23**, 778; c) T.J. Wenzel, D.R. Lalonde, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 1951.
- [38] J. Lisowski, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, **37**, 287; b) M. Takemura, K. Yamato, M. Doe, M. Watanabe, H. Miyake, T. Kikunaga, N. Yanagahira, Y. Kojima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2001, **74**, 707; c) R.S. Dickens, C.S. Love, H. Puschmann, *Chem. Commun.*, 2001, 2308.
- [39] R.J. Abraham, D.J. Chadwick and F. Sancassan, *Tetrahedron*, 1981, **37**, 1081.
- [40] M. Allegrozzi, I. Bertini, M.B.L. Janik M, Y.M. Lee, G.H. Lin, C. Luchinat, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4154.
- [41] R.J. Abraham, R. Konioutou, F. Sancassan, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 2002, 2025.
- [42] A. Ejchart, A. Gryff-Keller, *Wiad. Chem.*, 2000, **54** (11-12), 13.
- [43] J. Courtieu, P. Lesot, A. Meddour, D. Merlet, Ch. Aroulanda, [w:] *Encyclopaedia of Nuclear Magnetic Resonance*, vol. 9, *Advances in NMR*, p. 497, eds. M. Grant, R.K. Harris, 2002.
- [44] J. Parenty, M. Campagne, C. Aroulanda, P. Lesot, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 1663.

BADANIE DYNAMIKI UKŁADÓW ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII NMR

NMR STUDIES OF DYNAMIC SYSTEMS

Stefan Jankowski

*Instytut Chemii Organicznej, Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź*

Abstract

Wprowadzenie

1. Analiza kształtu linii

1.1. Koalescencja sygnałów

1.2. Pełna analiza kształtu linii

1.3. Analiza parametrów aktywacji

2. Wykorzystanie czasów relaksacji

3. Przeniesienie nasycenia spinów

4. Technika dwuwymiarowa – EXSY

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. inż. Stefan Jankowski, profesor nadzwyczajny Politechniki Łódzkiej jest absolwentem Wydziału Chemicznego PŁ. Doktor nauk chemicznych (1988), doktor habilitowany (1998). Początkowo w Instytucie Techniki Radiacyjnej, a od 1996 r. w Instytucie Chemii Organicznej PŁ. Jego główne zainteresowania naukowe to zastosowanie spektroskopii NMR do badań konformacji związków oraz kinetyczne badania mechanizmów reakcji z udziałem trójkoordynacyjnych pochodnych fosforu.

ABSTRACT

The dynamic NMR (DNMR) deals with different techniques for rate constant determination for different chemical processes. The complete band shape analysis is applicable to the study of processes occurring with rate constants between 1 and 10^4 s^{-1} . The measurements of relaxation times are useful for faster processes with rate constants of the order of 10^2 – 10^6 s^{-1} and the spin-saturation technique can be applied for slower processes ($k = 0,1$ – 100 s^{-1}). Kinetic measurements by EXSY experiment are applicable for rate constants between 10^{-2} and 10^2 s^{-1} . The advantages and pitfalls of every method were discussed.

Keywords: nuclear magnetic resonance, DNMR, kinetics

Słowa kluczowe: magnetyczny rezonans jądrowy, kinetyka

WPROWADZENIE

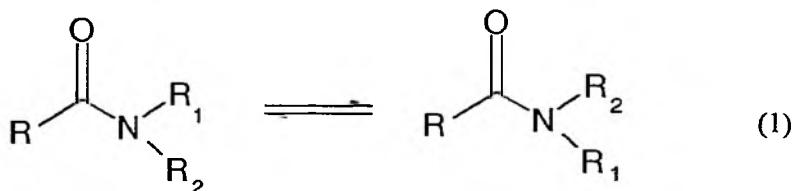
Określenie „dynamiczny” oznacza zmienność w czasie. Termin „dynamiczny NMR” (ang. *dynamic NMR* – DNMR) odnosi się do badań w zakresie wpływu procesów wymiany na obraz widm rejestrowanych metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Wpływ ten zauważono już w początkowym okresie stosowania spektroskopii NMR. Gutowsky i Pake odkryli dla stałego 1,1,1-trichloroetanu zależność kształtu linii rezonansowej protonu od temperatury, którą przypisali wewnątrzcząsteczkowej rotacji wokół wiązania węgiel–węgiel [1]. Wkrótce potem zaproponowano wyjaśnienie obrazu spektralnego etanolu w oparciu o zjawisko wymiany międzycząsteczkowej [2]. Przez wiele lat modelowym związkiem w badaniach wymiany chemicznej był *N,N*-dimetyloformamid, dla którego śledzono zahamowaną rotację niepełnego podwójnego wiązania amidowego C–N. Analiza prac poświęconych wyznaczaniu parametrów aktywacji tego procesu jest ciekawą ilustracją rozwoju metodologii wyznaczania parametrów kinetycznych metodą NMR [3].

Podstawy dotyczące DNMR czytelnik może znaleźć w dostępnych podręcznikach dotyczących spektroskopii NMR [4, 5]. Bardziej zaawansowane opracowania zostały zawarte w monografiach i artykułach przeglądowych [3, 6–9].

Celem niniejszej pracy jest syntetyczne przedstawienie zarówno podstaw teoretycznych jak i opisu różnych metod doświadczalnych, ze szczególnym uwzględnieniem praktycznych aspektów wyznaczania parametrów kinetycznych procesów dynamicznych. Przedstawione zostaną podstawowe techniki oparte na analizie kształtu linii, czasów relaksacji, przeniesienia nasycenia spinów oraz dwuwymiarowa technika EXSY.

1. ANALIZA KSZTAŁTU LINII

W chemii organicznej przyjęto określać atomy lub grupy atomów jako „grupy”. Zamiana miejscami identycznych grup określana jest jako topomeryzacja (ang. *topomerization*) lub wymiana wzajemna (ang. *mutual exchange*) [10]. Wymiana jest zdegenerowana, jeżeli zamieniające się miejscami grupy są identyczne ($R_1 = R_2$), lub nie jest wzajemna, gdy grupy są różne ($R_1 \neq R_2$):



Proces wymiany może być realizowany na drodze różnych przemian chemicznych. Może to być rotacja wokół wiązania, zmiana konformacji czy przeniesienie

atomu lub grupy atomów. Zanim przedstawione zostaną eksperymentalne szczegóły określania parametrów kinetycznych metodą DNMR, opisana zostanie współzależność kinetycznych stałych szybkości wyznaczanych metodą NMR, oraz stałych szybkości reakcji realizujących wymianę [11].

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego rejestruje jedynie te procesy, którym towarzyszy zmiana magnetyzacji. Jeżeli układ, dla którego ułamki molowe pozycji A i B wynoszą odpowiednio p_A oraz p_B , ulega wymianie chemicznej:



to stałe szybkości k_{A-B} oraz k_{B-A} charakteryzują zmianę magnetyzacji wywołaną zmianą położenia. Stała szybkości wymiany definiowana jest jako odwrotność średniego czasu τ dla przejścia pomiędzy położeniami A i B [11]:

$$\frac{1}{k_{\text{wym}}} = \tau = \frac{p_A}{k_{B-A}} = \frac{p_B}{k_{A-B}} \quad (3)$$

Równanie (3) oparte jest na założeniu, że liczby spinów, które przenoszą się z pozycji A w B i odwrotnie, są jednakowe ($p_A k_{A-B} = p_B k_{B-A}$). Stąd:

$$k_{\text{wym}} = k_{A-B} + k_{B-A} \quad (4)$$

i jeżeli $p_A = p_B = 0,5$, to $k_{A-B} = k_{B-A} = 0,5k_{\text{wym}}$.

W pracy [11] przeanalizowano oprócz najprostszego przypadku ($p_A = p_B = 0,5$), również układy obejmujące więcej niż dwa centra wymiany i o różnych proporcjach obsadzeń. Ogólna zależność pomiędzy stałą szybkości wymiany oraz stałą szybkości wyznaczoną metodą NMR jest opisana równaniem:

$$k_{\text{wym}} = \frac{1}{\alpha} k_{A-B} N_A \quad (5)$$

W równaniu (5) pojawiły się dwa nowe wyrażenia. N_A jest liczbą jąder w grupie A i dzięki jej wprowadzeniu stała szybkości wymiany nie zależy od liczby atomów dla danej pozycji. Czynniki α określa współzależność pomiędzy procesem chemicznym i obserwowanym spektroskopowo:

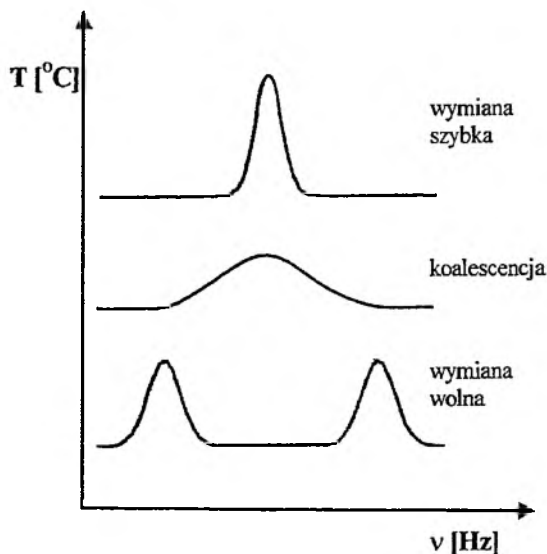
$$\alpha = \frac{P_A P_B}{\Sigma P_i} \quad (6)$$

gdzie P_A i P_B oznaczają odpowiednio liczbę jąder w pozycji A i B, natomiast ΣP_i – ogólną liczbę jąder biorących udział w wymianie.

Entalpię swobodną aktywacji ΔG^\ddagger określa się na podstawie temperaturowej zależności stałej szybkości reakcji k korzystając z równania Eyringa:

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (7)$$

gdzie k_B to stała Boltzmana, h – stała Plancka a R – stała gazowa. Jeżeli $k = k_{\text{wym}}$, to współczynnik przenoszenia κ przyjmuje się za równy 1. Jeżeli k w równaniu (7) jest doświadczalną stałą szybkości $k_{A \rightarrow B}$ lub $k_{B \rightarrow A}$, to zgodnie z równaniem (5) $\kappa = \alpha / N_A$.



Rysunek 1. Wpływ temperatury na kształt linii rezonansowej dla wymiany wzajemnej

Zmianę kształtu linii rezonansowych układu ulegającego wymianie chemicznej ilustruje Rysunek 1. Zanik minimum pomiędzy sygnałami, czyli koalescencję sygnałów, obserwuje się w temperaturze koalescencji (T_c). Wymianę chemiczną określa się jako wolną poniżej T_c , a powyżej tej temperatury mamy do czynienia z wymianą szybką. Wzrost temperatury w przypadku wolnej wymiany powoduje poszerzenie sygnałów, a gdy wymiana jest szybka – zwężenie sygnałów. Zmiana kształtu linii rezonansowej w wyniku zmiany temperatury odzwierciedla przede wszystkim zmianę szybkości procesu odpowiedzialnego za proces wymiany. Kształty sygnałów są wrażliwe na procesy opisane stałymi szybkości k w zakresie $1-10^4 \text{ s}^{-1}$. Mogą ulegać zmianie również inne parametry wpływające na kształt linii rezonansowej: różnica przesunięć chemicznych sygnałów oraz populacje stanów A oraz B.

1.1. KOALESCENCJA SYGNAŁÓW

Jeżeli analizowany jest układ, w którym populacje A i B są jednakowe ($p_A = p_B$), to najprostszy sposób określenia bariery energetycznej procesu polega na znalezieniu temperatury koalescencji. Stała szybkości procesu realizującego wymianę chemiczną w temperaturze koalescencji określona jest wzorem:

$$k_{\text{wym}} = \frac{2\pi(\Delta\nu)}{\sqrt{2}} \quad (8)$$

gdzie $\Delta\nu$ oznacza różnicę przesunięć chemicznych (Hz) sygnałów A oraz B w temperaturze, w której wymiana jest wolna. Wartość energii swobodnej aktywacji ΔG_c^* oblicza się podstawiając k_c oraz T_c do wzoru [7]:

$$\Delta G_c^* = aT[10,319 + \log(T/k_c)], \quad (9)$$

gdzie $a = 1,914 \times 10^{-2}$ (ΔG^* w kJ/mol) lub $a = 4,575 \times 10^{-3}$ (ΔG^* w kcal/mol). Jeżeli stała szybkości k_c została wyznaczona z błędem $\pm 20\%$ oraz temperatura T_c dokładnością $\pm 2^\circ$, to z rachunku błędu wynika, że błąd oznaczenia entalpii swobodnej aktywacji wyniesie zaledwie $\pm 0,5$ kJ/mol. Warto o tym pamiętać i wykazywać znaczną ostrożność w wyciąganiu wniosków mechanistycznych na podstawie porównań wartości ΔG^* uzyskanych na podstawie temperatury koalescencji.

Wyznaczenie stałych szybkości wymiany na podstawie obserwacji koalescencji w różnych temperaturach wymaga zmiany warunków pomiaru: natężenia pola magnetycznego lub rodzaju rejestrowanego jądra (np. oprócz rejestracji widm ^1H można obserwować kształt linii rezonansowych w widmie ^{13}C lub ^{31}P NMR).

Aby upewnić się, czy obserwuje się rzeczywistą koalescencję należy rejestrować widma powyżej i poniżej temperatury T_c aby upewnić się, czy obserwowany proces zaniku minimum pomiędzy sygnałami nie jest spowodowany temperaturową zmianą przesunięć chemicznych, nie związaną bezpośrednio z procesem wymiany chemicznej. Dodatkowym ograniczeniem jest fakt, że dla wyższych pól (współczesne spektrometry wyposażone są w magnesy o natężeniu pola do 21,1 T), temperatura koalescencji może przewyższać temperaturę wrzenia najczęściej stosowanych rozpuszczalników deuterowanych.

1.2. PEŁNA ANALIZA KSZTAŁTU LINII

Metoda analizy kształtu linii wyznaczania stałych szybkości jest bardziej precyzyjna w porównaniu z metodą opartą na obserwacji koalescencji. Jeżeli temperatura pomiaru jest wyznaczona z precyzją co najmniej $\pm 0,5^\circ$, to błąd oznaczenia ΔG^* będzie rzędu $\pm 0,15$ kJ/mol [3].

Dla układu podlegającego wymianie kształt linii rezonansowej opisują zmodyfikowane równania Blocha [12]. Mają one zastosowanie do układów bez sprzężenia

skalarnego ($J = 0$). Widma sprzęgających się układów dynamicznych ($J \neq 0$) opisują równania oparte na metodzie macierzy gęstości. Czytelnicy zainteresowani tym zagadnieniem znajdą jego szczegółowy opis w pracy [13].

Na kształt linii rezonansowej oprócz stałej szybkości k mają wpływ następujące czynniki:

$$\nu = f(\nu, \nu_i, J_{ik}, T_{2i}, p_i, k_y)$$

gdzie ν, ν_i – częstości rezonansowe wymieniających się grup, J_{ik} – stała sprzężenia skalarnego, T_{2i} – czasy relaksacji poprzecznej oraz p_i – ułamki molowe poszczególnych grup.

Jeżeli oprócz stałej szybkości k_y pozostałe wielkości są znane, to metodą iteracyjną można określić jej wartość na podstawie dopasowania widma obliczonego do rzeczywistego. Metodę tę określa się jako metodę pełnej analizy kształtu linii (ang. *the complete band-shape analysis* – CBS) [14]. Natomiast nie jest możliwe osiągnięcie wiarygodnej wartości stałej szybkości na drodze dopasowywania wszystkich parametrów. Należy pamiętać o występowaniu minimów lokalnych, którym odpowiadają stałe szybkości niekiedy znacznie odbiegające od wartości rzeczywistych [15]. Korzystne jest przy korzystaniu z programów iteracyjnych stosowanie jako parametrów wyjściowych wcześniej uzyskanych danych z iteracji dla wymiany w niższej temperaturze.

Przesunięcia chemiczne ν_A oraz ν_B łatwo wyznaczyć na podstawie widm wykonanych w temperaturze, w której badany proces wymiany jest wolny. Należy pamiętać o tym, że przesunięcie chemiczne jest parametrem bardzo często wrażliwym na wpływ temperatury ze względu na oddziaływania międzycząsteczkowe oraz solwatację. Najczęściej obserwuje się prostoliniową zależność przesunięć chemicznych od temperatury. W celu wyznaczenia funkcji opisującej zależność różnicy przesunięć $\Delta\nu = (\nu_A - \nu_B)$ od temperatury należy wykonać pomiary w kilku temperaturach, najwyżej w temperaturze o 5 stopni poniżej temperatury koalescencji, po czym wyznaczyć funkcję opisującą zależność $\Delta\nu$ od temperatury. Na poprawność wyznaczenia tej zależności ma wpływ zarówno precyzja pomiaru różnicy przesunięć, jak i precyzja określenia temperatury. Współczesne spektrometry wyposażone są do pomiaru temperatury w termopary umieszczone bezpośrednio pod próbką. Ryzykowne jest założenie, że wskazania przyrządu odpowiadają rzeczywistej temperaturze w próbce, dlatego należy wykonać kalibrację wskazań przyrządu w oparciu o pomiary dla roztworów wzorcowych. Najczęściej stosowane są roztwory glikolu etylenowego lub metanolu, dla których wyznaczono temperaturowe zależności różnicy przesunięć protonów C–H oraz O–H [16].

Stałą czasową relaksacji poprzecznej T_2 można oszacować na podstawie szerokości połówkowej sygnału. Uzyskana w ten sposób wartość jest mniejsza od rzeczywistej wartości T_2 wyznaczonej metodą echa spinowego, ponieważ zawiera dodatkowo czynnik związany z niejednorodnością pola magnetycznego. W klasycznej metodzie Carra–Purcella–Meibooma–Gilla [17] wyznaczania T_2 stosuje się ciąg

impulsów 180° , które oddzielone są dostatecznie krótkim odstępami czasu (najczęściej rzędu kilku ms) aby wyeliminować wpływ dyfuzji cząsteczek na mierzone wartości T_2 . Ponieważ na wartość T_2 wpływa również szybkość wymiany, to aby uzyskać wartość rzeczywistą T_2 należy zwiększać częstotliwość powtarzania impulsów do momentu uzyskania stałej wartości. Kolejnym etapem jest określenie wpływu temperatury na wartość stałej T_2 . Często przyjmuje się, że taka sama wartość T_2 może być przyjęta dla wszystkich fragmentów cząsteczki. Wyjątki od tej reguły odnoszą się w szczególności do pomiarów niskotemperaturowych. Należy pamiętać, że szybkość relaksacji poprzecznej ma największy wpływ na kształt linii rezonansowej w temperaturach znacznie odbiegających od temperatury koalescencji. Wykonanie pomiarów w jak najszerszym zakresie temperatury jest bardzo istotne z punktu widzenia zmniejszania błędu oznaczenia parametrów aktywacji.

Stosunek populacji p_A oraz p_B dla układu ulegającego wymianie wolnej łatwo jest określić poprzez integrację. Ze wzrostem temperatury stosunek ten ulega zmianie zgodnie z równaniem:

$$p_A/p_B = e^{-\Delta G_0/RT} \quad (10)$$

gdzie ΔG_0 oznacza energię swobodną wymiany. Na podstawie kilku wartości stosunku p_A/p_B w różnych temperaturach można znaleźć wartość tego stosunku w temperaturze wyższej od temperatury koalescencji, korzystając z półlogarytmicznej zależności opartej na równaniu (10).

1.3. ANALIZA PARAMETRÓW AKTYWACJI

Badania zależności stałej szybkości reakcji od temperatury mają na celu wyznaczenie, ważnych z punktu widzenia mechanizmu reakcji, parametrów aktywacji: entalpii swobodnej, entalpii i entropii aktywacji. Wielkości te są ze sobą powiązane:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (11)$$

Z rachunku błędu wynika, że na dokładność oznaczenia entalpii swobodnej składają się błędy entalpii i entropii aktywacji, pomniejszone o wielkość wynikającą z kowariancji entalpii i entropii aktywacji. Tak więc, im większy błąd eksperymentalny, tym lepsza korelacja entalpii i entropii. Potwierdza to analiza wartości parametrów aktywacji wyznaczonych dla wewnętrznej rotacji grupy NMe_2 w N,N-dimetyloformamidzie. Wyznaczone przez wielu autorów wartości energii swobodnej aktywacji są zbliżone, a wartości entalpii i entropii dość znacznie różnią się wykazując wzajemną dobrą korelację liniową [3].

Podsumowując, należy z dużą ostrożnością traktować wartości entalpii i entropii aktywacji wyznaczone metodą DNMR. W szczególności w tych przypadkach, gdy występują czynniki niekorzystne dla precyzji analizy danych: mała różnica prze-

sunięć chemicznych, nieliniowa zależność przesunięć chemicznych od temperatury, duża różnica populacji układu podlegającego wymianie.

Do obliczenia stałych szybkości służą programy iteracyjne [18].

2. WYKORZYSTANIE CZASÓW RELAKSACJI

Wykorzystanie czasów relaksacji w badaniach dynamiki stosunkowo małych cząsteczek organicznych zostało omówione w artykule przeglądowym [19]. Przedstawione tam metody obejmują badanie koalescencji czasów relaksacji T_1 , pomiar zależności czasów relaksacji T_2 w funkcji częstości powtarzania impulsów metodą CPMG oraz zastosowanie czasów relaksacji $T_{1\rho}$.

O wpływie procesów wymiany na wartość eksperymentalnej stałej T_2 wspomniano już wcześniej przy omawianiu metody pełnej analizy kształtu linii. Na podstawie przebiegu zależności $T_{2(\text{eksp})}$ od odstępu czasowego pomiędzy impulsami 180° można wyznaczyć stałe szybkości wymiany, z zakresu dostępnego dla metody analizy kształtu linii oraz szybszych. Podobny zakres szybkości można określać wykorzystując pomiar $T_{1\rho}$, przy czym jest on prostszy w porównaniu z metodą opartą o pomiar T_2 . Obie metody równocześnie zastosowano do wyznaczenia stałej dysocjacji kompleksu inhibitor – enzym [20], a więc układu składającego się z małej cząsteczki (ligand L) oraz makrocząsteczki M:



Ogólne równanie opisujące zależność stałej $T_{1\rho}$ ma postać:

$$\frac{1}{T_{1\rho}^{\text{wym}}} = p_f [\cos^2(\beta_f) / T_1^f + \sin^2(\beta_f) / T_2^f] + p_b [\cos^2(\beta_b) / T_1^b + \sin^2(\beta_b) / T_2^b] + p_f p_b \sin^2(\beta) \Delta\omega^2 [k_{\text{wym}} / (k_{\text{wym}}^2 + \omega_{\text{SL}}^2)] \quad (13)$$

gdzie $\cos(\beta_1) = \Delta\omega / (\Delta\omega_1^2 + \Delta\omega_{\text{SL}}^2)^{1/2}$ oraz $\sin(\beta_1) = \omega_{\text{SL}} / (\Delta\omega_1^2 + \omega_{\text{SL}}^2)^{1/2}$.

Indeksy f oraz b odnoszą się odpowiednio do formy wolnej i związanej. $\Delta\omega = 2\pi | \nu_f - \nu_b |$, natomiast $\Delta\omega_1$ określa różnicę przesunięcia i -tego jądra w stosunku do częstotliwości podstawowej.

Powyższą metodą określono stałą szybkości dysocjacji kompleksu tubercydyny i fosforylasy nukleozydu purynowego *Escherichia coli*. Wartości czasów T_1 oraz T_2 wyznaczono w niezależnych eksperymentach, natomiast czasy $T_{1\rho}$ protonu H-1' ligandu zmierzono dla różnych wartości pola ujarzmiającego spiny ω_{SL} . Metodą najmniejszych kwadratów oszacowano wartości $k_{\text{wym}} = 2400 \pm 200 \text{ s}^{-1}$ i $\Delta\omega = 110 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ (dla $p_f/p_b = 10$) oraz $k_{\text{wym}} = 2050 \pm 200 \text{ s}^{-1}$ i $\Delta\omega = 105 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ (dla $p_f/p_b = 40$).

Dla tej samej próbki zmierzono czasy T_2^{wym} dla różnych wartości czasu powtórzenia t_{cp} . Zależność T_2^{wym} od t_{cp} opisuje równanie:

$$\frac{1}{T_2^{\text{wym}}} = (1/T_2^f + 1/T_2^b + k_1' + k_{-1})/2 - (1/t_{\text{cp}}) \ln \lambda^+ \quad (14)$$

gdzie:

$$\ln \lambda^+ = \ln[(D_+ \cosh^2 \xi - D_- \cos^2 \eta)^{1/2} + (D_+ \sinh^2 \xi - D_- \sin^2 \eta)^{1/2}]$$

$$D_{\pm} = 1/2[\pm 1 + (\psi + 2\Delta\omega^2)/(\psi^2 + \xi^2)^{1/2}]$$

$$\xi = (t_{\text{cp}}/\sqrt{8})[\psi + (\psi^2 + \xi^2)^{1/2}]^{1/2}$$

$$\eta = (t_{\text{cp}}/\sqrt{8})[-\psi + (\psi^2 + \xi^2)^{1/2}]^{1/2}$$

$$\psi = \left(\frac{1}{T_2^f} - \frac{1}{T_2^b} + k_1' - k_{-1}\right)^2 - (\Delta\omega)^2 + 4k_1'k_{-1}$$

$$\xi = 2\Delta\omega\left(\frac{1}{T_2^f} - \frac{1}{T_2^b} + k_1' - k_{-1}\right)$$

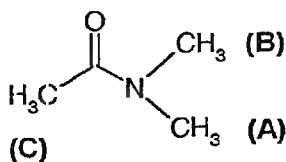
$$k_1' = k_1[M] = k_{\text{wym}}(p^b)^{-1} \text{ oraz } k_{-1} = k_{\text{wym}}(p^f)^{-1}$$

Na podstawie zależności T_2 od czasu t_{cp} uzyskano następujące wartości stałych szybkości $k_{\text{wym}} = 2400 \pm 200 \text{ s}^{-1}$ i $\Delta\omega = 117 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ (dla $p_f/p_b = 10$) oraz $k_{\text{wym}} = 2100 \pm 200 \text{ s}^{-1}$ i $\Delta\omega = 110 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ (dla $p_f/p_b = 40$), a więc bardzo bliskie wartościom wyznaczonym metodą $T_{1\rho}$.

Zaletą metody opartej o pomiary T_2 jest to, że może być stosowana niezależnie od szybkości wymiany, natomiast wadą jest konieczność stosowania szybkiego powtórzenia pulsów i przez co wzrasta wrażliwość na niedoskonałość aparatury. Jeżeli stała szybkości $k_{\text{wym}} > 10^3 \text{ s}^{-1}$, korzystniejsze jest stosowanie pomiaru $T_{1\rho}$.

3. PRZENIESIENIE NASYCENIA SPINÓW

Jeżeli różnica przesunięć chemicznych grup ulegających wymianie jest na tyle duża, aby możliwe było nasylenie sygnału jednej grupy bez zakłócenia sygnału drugiej, to szybkość wymiany można określić metodą przeniesienia nasycenia spinów. Zasadę tej metody opisano dla rotacji grupy amidowej w N,N -dimetyloacetamidzie [21]:



W widmie $^1\text{H-NMR}$ widoczne są trzy sygnały grup metylowych. Nasycenie sygnału jednej z grup metylowych, np. B, powoduje zmniejszenie intensywności sygnału grupy uczestniczącej w wymianie (A), natomiast intensywność sygnału C pozostaje niezakłócona.

Zmianę magnetyzacji protonów A w czasie opisuje równanie:

$$\frac{dM_A}{dt} = -k(M_A - M_B) + \frac{M_{0A} - M_A}{T_{1A}} \quad (15)$$

gdzie k – stała szybkości wymiany, a T_{1A} – czas relaksacji podłużnej protonów A.

Jeżeli nasycenie protonów B ($M_B = 0$) będzie dostatecznie długie, aby ustalił się stan stacjonarny dla protonów A ($dM_A/dt = 0$), to równanie (15) przyjmie postać:

$$k = \frac{1}{T_{1A}} \left(\frac{M_{0A}}{M_A} - 1 \right) \quad (16)$$

Do obliczenia stałej szybkości wymiany wystarczy wyznaczyć stosunek intensywności sygnałów przed i po nasyceniu oraz w niezależnym eksperymencie czas relaksacji T_{1A} . Metoda jest bardzo prosta, jednakowoż jest ograniczona jedynie do układów, dla których sygnały ulegające wymianie są dostatecznie od siebie oddalone.

4. TECHNIKA DWUWYMIAROWA – EXSY [9]

Podobnie jak metoda przeniesienia nasycenia spinów technika EXSY (ang. *EXchange Spectroscopy*) ma zastosowanie dla wymiany wolnej, kiedy poszerzenie sygnałów nie jest jeszcze obserwowalne. Zaletą EXSY jest to, że jak każda z technik dwuwymiarowych eksperyment, pozwala równocześnie obserwować wszystkie procesy wymiany zachodzące w cząsteczce. Ograniczeniem metody jest długi czas rejestracji widm, a więc koszt metody. Widma EXSY rejestruje się stosując sekwencję składającą się z trzech pulsów 90° . Pierwsze dwa pulsy oddalone są o zmienny czas ewolucji t_1 , a pulsy drugi i trzeci są przedzielone stałym czasem mieszania – t_m . Sygnały korelacyjne obserwowane są pomiędzy wymieniającymi się grupami, a intensywność sygnału zależy od szybkości wymiany. Jeżeli równowagowa magnetyzacja w pozycji j wynosi M_j^0 , to dla małych wartości czasów mieszania t_m intensywność

ność sygnału korelacyjnego odpowiadającego wymianie pomiędzy pozycjami i oraz j jest proporcjonalna do stałej szybkości wymiany:

$$I_{ij} \approx k_{wy\text{m}}^j t_m M_i^0 \quad (i \neq j) \quad (17)$$

Stałą szybkości wymiany można wyznaczyć na podstawie nachylenia prostej w układzie współrzędnych: intensywność sygnału korelacyjnego – czas mieszania. Dla układu dwóch ulegających wymianie układów A i B o jednakowej populacji (przy założeniu, że w obu pozycjach czasy T_1 są jednakowe), stała szybkości wymiany $k_{wy\text{m}} = k_{A-B} + k_{B-A}$ określa wzór:

$$k = \frac{1}{t_m} \ln \frac{r+1}{r-1} \quad (18)$$

gdzie $r = (I_{AA} + I_{BB}) / (I_{AB} + I_{BA})$ a I_{ij} jest intensywnością sygnału diagonalnego ($i = j$) lub korelacyjnego ($i \neq j$). Jeżeli populacje A i B są różne ($p_A \neq p_B$), to $r = 4p_A p_B (I_{AA} + I_{BB}) / (I_{AB} + I_{BA}) - (p_A - p_B)^2$.

Górny limit szybkości, jaki można śledzić metodą EXSY ogranicza nierówność $k_{wy\text{m}} \ll \omega_A - \omega_B$. Gdy wymiana jest zbyt szybka, poszerzenie sygnałów i koalescencja utrudniają wyznaczenie stałej szybkości. Najmniejsza wartość stałej szybkości wymiany, dostępną metodą EXSY, jest w przybliżeniu równa odwrotności czasu T_1 .

Jeżeli nie jest możliwe wykonanie serii eksperymentów z różnymi czasami t_m ze względu na ograniczony czas dostępu do spektrometru, konieczne jest oszacowanie optymalnej wartości t_m . Jeżeli czasy relaksacji w obu pozycjach są jednakowe, to optymalny czas t_m można oszacować na podstawie zależności:

$$t_{m,\text{opt}} \approx \frac{1}{T_1^{-1} + k_{A-B} + k_{B-A}} \quad (19)$$

Stosując technikę EXSY należy być świadomym komplikacji wynikających z obecności w widmie obok sygnałów spowodowanych wymianą, również sygnałów wywołanych sprzężeniami skalarnymi oraz bliskością przestrzenną grup (efekt Overhausera). Można określić udział efektu bliskości przestrzennej wykorzystując wrażliwość wymiany chemicznej na temperaturę i obecność katalizatorów. Obniżając temperaturę eksperymentu lub nie dodając katalizatora wyznacza się intensywność sygnałów wywołanych efektem Overhausera.

Dwuwymiarowe eksperymenty EXSY szeroko wykorzystywano do badania kinetyki wymiany chemicznej w związkach organicznych, nieorganicznych, metaloorganicznych oraz biochemicznych [9].

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie zmian obrazu widm NMR do badań kinetyki procesów chemicznych (dynamiczny NMR) obejmuje kilka różnych technik, takich jak analiza kształtu linii rezonansowej, pomiary czasów relaksacji, zastosowanie nasycenia spinów czy dwuwymiarowa technika EXSY. Ta różnorodność jest wynikiem poszukiwań jak najlepszej metody pomiaru szybkości procesów z udziałem cząsteczek organicznych, nieorganicznych, metaloorganicznych i biomolekuł. Metodę analizy kształtu linii warto zastosować, gdy stała szybkości wymiany zawarta jest w przedziale od 1 do 10^4 s^{-1} , technikę przeniesienia nasycenia spinów gdy $k = 0, 1-100 \text{ s}^{-1}$, natomiast techniki oparte na wykorzystaniu czasów T_2 oraz $T_{1\rho}$ dla stałych z przedziału 10^2-10^6 s^{-1} . Pomiary kinetyczne dwuwymiarową techniką EXSY najlepiej służą do wyznaczania stałych szybkości z przedziału $10^{-2}-10^2 \text{ s}^{-1}$.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H.S. Gutowsky, G.E. Pake, *J. Chem. Phys.*, 1950, **18**, 162.
- [2] U. Liddel, N.F. Ramsey, *J. Chem. Phys.*, 1951, **19**, 1608.
- [3] J. Sandström, *Dynamic NMR Spectroscopy*, Academic Press, London 1982, rozdz. 7.
- [4] H. Günther, *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego*, PWN, Warszawa 1983, rozdz. 8.
- [5] W. Zieliński, A. Rajca (red.), *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, WN-T, Warszawa 2000, s. 89-98, 212-218.
- [6] J.I. Kaplan, G. Fraenkel, *NMR of chemically exchanging systems*, Academic Press, New York 1980.
- [7] M. Oki, *Application of dynamic NMR spectroscopy to organic chemistry*, VCH Publishers, Inc., Deerfield Beach 1980.
- [8] G. Binsch, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1980, **19**, 411.
- [9] C.L. Perrin, T.J. Dwyer, *Chem. Rev.*, 1990, **90**, 935.
- [10] *Odkrycia* 3, rozdz. 2.
- [11] M.L.H. Green, L.-L. Wong, *Organometallics*, 1992, **11**, 2660.
- [12] H.M. McConnell, *J. Chem. Phys.*, 1958, **28**, 430.
- [13] a) C. S. Johnson, Jr., C. G. Moreland, *J. Chem. Educ.*, 1973, **50**, 477; b) *Odkrycia* 3, rozdz. 3.
- [14] *Odkrycia* 3, s. 86-92.
- [15] S. Szymański, A. Gryff-Keller, *J. Magn. Resonance*, 1976, **22**, 1.
- [16] D.S. Ralford, C.L. Fisk, E.D. Becker, *Anal. Chem.* 1979, **51**, 2050.
- [17] a) S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.*, 1958, **29**, 688; b) J.T. Gerig, A. D. Stock, *Org. Magn. Reson.*, 1975, **7**, 249; c) J.T. Gerig, B.A. Halley, D.T. Loehr, J.A. Reimer, *Org. Magn. Reson.*, 1979, **12**, 352.
- [18] a) G. Jeschke, H. Thiele, A. Germanus, *WinKubo and WinDynamics* (Bruker Biospin, www.bruker.de); b) P.H.M. Budzelaar, *gNMR*, v. 5 (Adept Scientific, www.adeptsience.com).
- [19] A. Ejchart, *Wiad. Chem.* 1989, **43**, 819.
- [20] D.G. Davies, M.E. Perlman, R.E. London, *J. Magn. Reson.*, 1994, **B 104**, 266.
- [21] J.R. Russel, R.J. Flesher, S.K. Shin, *J. Chem. Educ.*, 1997, **74**, 978.

**PODSTAWOWE TECHNIKI EKSPERYMENTALNE
SPEKTROSKOPII NMR W FAZIE CIEKLEJ**

**BASIC EXPERIMENTAL TECHNIQUES
OF NMR SPECTROSCOPY IN LIQUIDS**

Wiktor Koźmiński

*Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego,
ul. Pasteura 1,
02-093 Warszawa*

Abstract

Wstęp

Czułość pomiaru

Detekcja kwadraturowa

Wybór dróg koherencji

Najważniejsze eksperymenty homojądrowe

Najważniejsze eksperymenty heterojądrowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Wiktor Koźmiński ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 1987 roku. Praca magisterska pt.: „Struktura roztworów soli miedzi w rozpuszczalnikach organicznych badana metodą EPR” – wykonana pod kierunkiem profesora Zbigniewa Kęckiego. 1988–1994 Instytut Chemii Organicznej PAN w Warszawie, doktorat pt.: „Związki mezojonowe – struktura i zależności spektralne”, promotor profesor Lech Stefaniak. 1994–1996 staz naukowy w Uniwersytecie Zuryskim w grupie profesora Wolfganga von Philipsborna. Od 1996 r. pracuje na Wydziale Chemii UW. W 2001 r. habi-

litacja pt.: „Wybrane metody eksperymentalne nowoczesnej spektroskopii NMR” wyróżniona nagrodą Prezesa Rady Ministrów w 2003 r.

Tematyka naukowa: Nowe techniki eksperymentalne spektroskopii NMR i ich zastosowania w chemii i biochemii.

ABSTRACT

General overview of most important NMR techniques and applications for organic and bioorganic molecules in liquids is given. The sensitivity of NMR experiments is discussed with regard to nuclear properties, B_0 field, applied method of excitation and detection, and finally concentration. In the next chapter the principles and consequences of quadrature detection are discussed. The most important techniques of quadrature detection in directly and indirectly detected domains are exemplified. In the next point the principles, advantages and disadvantages of coherence selection techniques via phase cycling and Pulsed Field Gradients are indicated and compared with respect to various applications.

In the last part of present article the most important homo- (COSY, TOCSY, NOESY, and ROESY) and heteronuclear (HSQC, HMQC/HMBC) techniques used in NMR investigations in liquids are briefly reviewed. The characteristic features and experimental problems of these methods are discussed with respect to usual applications in chemistry and biochemistry.

Keywords: NMR spectroscopy, sensitivity, PFG, multidimensional acquisition

Słowa kluczowe: spektroskopia NMR, czułość metody, impulsowy gradient pola B_0 (PFG), widma wielowymiarowe

WSTĘP

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR – ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) wykorzystuje przejścia pomiędzy poziomami spinowymi jąder atomów w stałym polu magnetycznym i jest techniką wciąż doskonałą i systematycznie rozwijaną. Stale bowiem znajdowane są nowe jej zastosowania w badaniach struktury i dynamiki cząsteczek w chemii i biochemii. Parametry spektralne NMR (jak ekranowanie, pośrednie i bezpośrednie sprzężenia spinowo-spinowe czy mechanizmy i przebieg procesów relaksacji) umożliwiają szczegółowy wgląd w strukturę, dynamikę a także wzajemne oddziaływania molekuł.

Można wyróżnić dwa odrębne nurty ewolucji metod spektroskopii NMR. Pierwszy, technologiczny, związany jest z techniką budowy coraz silniejszych magnesów, konstruowania coraz doskonalszych sond pomiarowych, przedwzmacniaczy i stabilnych źródeł promieniowania radiowego, wiąże się także z postępowaniem technik komputerowych. Kolejne generacje spektrometrów NMR zapewniają coraz większą relatywną czułość pomiaru i pozwalają na użycie nowych rodzajów metod eksperymentalnych w rutynowych badaniach. Drugi kierunek, dzięki wynalazkowi impulsowej spektroskopii NMR z transformacją Fouriera w latach 60. [1, 2] – a w konsekwencji spektroskopii wielowymiarowej w latach 70. [3–7] – wiąże się z rozwojem technik pomiarowych, powstających dla współcześnie funkcjonujących generacji sprzętu. Nowe metody eksperymentalne pozwalają na pomiar niedostępnych dotąd parametrów spektralnych z maksymalną możliwą czułością i dokładnością. Właśnie w tej dziedzinie, daje się obecnie zauważyć największy i najszybszy postęp. Jego siłą napędową, ze względu na szczególne trudności eksperymentalne i komplikację widm, stały się w znacznej mierze zastosowania spektroskopii NMR do badania dużych cząsteczek o znaczeniu biologicznym i w medycynie. O znaczeniu i uznaniu tej dziedziny świadczy relatywnie duża liczba nagród Nobla przyznanych w ostatnich latach za rozwój metodologii NMR (W dziedzinie chemii Richard R. Ernst w 1991 roku, za wkład w rozwój metodologii spektroskopii NMR wysokiej rozdzielczości, i Kurt Wüthrich, za opracowanie metod spektroskopii NMR pozwalających na wyznaczanie trójwymiarowej struktury biomolekuł w roztworach, w 2002 roku; oraz w dziedzinie medycyny, Paul C. Lauterbur i Sir Peter Mansfield, za wynalazek obrazowania magnetyczno-rezonansowego MRI – ang. *Magnetic Resonance Imaging*, w 2003 roku). Większość nowych technik daje się jednak z powodzeniem zastosować również do małych i średnich molekuł, leżących w domenie zainteresowań chemii organicznej.

Obszerna literatura źródłowa oraz liczne prace przeglądowe i monograficzne – wśród których należy wymienić chociaż najważniejsze [8–14] – ukazują jak zmieniają się poglądy na najlepsze lub najskuteczniejsze metody pomiaru. Równolegle upowszechnia się wykorzystanie nowych możliwości aparaturowych, na przykład: impulsowych gradientów indukcji magnetycznej B_0 [15, 16] i B_1 [17, 18] oraz modulowanych amplitudowo i fazowo impulsów promieniowania radiowego [19, 20]. Większość tych osiągnięć jest już rutynowo wykorzystywana w praktyce eksperymentalnej.

Istotny wpływ na ilość i jakość nowo publikowanych sekwencji impulsów wywarło upowszechnienie się zaproponowanego przez Sorensena formalizmu *Product Operator Formalism* (POF) [21]. Pozwala on na stosunkowo łatwe, choć w przybliżeniu tylko dla układów ze słabymi sprzężeniami ($J \ll \Delta\delta$), przewidywanie efektów swobodnej precesji magnetyzacji w funkcji czasu oraz działania impulsów liniowo spolaryzowanego promieniowania radiowego o składowej magnetycznej B_1 i gradientów pola B_0 . Zastosowanie POF w praktyce umożliwia tworzenie i analizę złożonych wielowymiarowych sekwencji impulsowych, zawierających często kilkadziesiąt impulsów promieniowania radiowego na kilku kanałach częstotliwości.

Choć najbardziej zaawansowane metody badań strukturalnych wykorzystywane są przede wszystkim w zastosowaniu do molekuł o znaczeniu biologicznym, to w podobny sposób badać można również małe i średnie cząsteczki organiczne. Należy wówczas uwzględnić różnice wynikające z odmiennych czasów korelacji, a także dynamiki konformacyjnej, na przykład szybkiej rotacji wokół wiązań pojedynczych w niewielkich cząsteczkach acyklicznych.

CZUŁOŚĆ POMIARU

Jednym z podstawowych problemów eksperymentalnych spektroskopii NMR jest relatywnie niska czułość pomiaru. Wynika ona z małej różnicy energii pomiędzy jądrowymi stanami spinowymi, a co za tym idzie, wyrównanych obsadzeń poziomów spinowych w stanie równowagi termicznej. Dlatego też wielkie znaczenie mają sposoby poprawy czułości eksperymentów NMR, zarówno przez konstrukcje nowych generacji sprzętu jak i wykorzystanie nowych sekwencji impulsów.

Z technicznego punktu widzenia, wielki postęp został ostatnio osiągnięty w konstrukcji sond pomiarowych nowej generacji. Czułość nowych sond z nadprzewodzącymi cewkami i przedwzmacniaczami jest nawet kilkakrotnie wyższa od tradycyjnych. Jednak sondy te mają zwykle obniżoną tolerancję na wodne roztwory jonowe, a ich dostępność jest limitowana bardzo wysoką ceną.

¹ B_0 – stała indukcja magnetyczna, B_1 – składowa magnetyczna promieniowania radiowego

Istnieją jednak możliwości poprawienia czułości pomiaru poprzez dobór odpowiedniej techniki eksperymentalnej do konkretnego układu. W ogólnym przypadku, pomijając ściśle związaną z szerokością sygnału prędkość relaksacji poprzecznej, czułość eksperymentu NMR, a w praktyce stosunek sygnału do szumu (S/N), jest określona wzorem:

$$\frac{S}{N} = N_0 (NA)^2 \gamma_{\text{wzb}} \gamma_{\text{obs}}^2 B_0^2 T^{-1},$$

gdzie N_0 jest liczbą molekuł w aktywnej przestrzeni próbki, γ_{wzb} i γ_{obs} są odpowiednio czynnikami magnetogirycznymi jąder wzbudzanych i tych, których sygnał jest obserwowany, natomiast N_A jest liczbą akumulacji, B_0 – wielkością stałej indukcji magnetycznej, a T – temperaturą bezwzględną.

Zależność czułości od N_0 jest oczywista. Liczba aktywnych cząsteczek jest bowiem wprost proporcjonalna do stężenia i objętości czynnej części próbki. Przy czym należy również uwzględnić relatywne zawartości związanych z eksperymentem izotopów. Wzrost N_0 można więc osiągnąć trzema sposobami :

- przez zwiększenie stężenia (w przypadku badań roztworów), w granicach rozpuszczalności danej substancji i tak, by uniknąć znaczącego wzrostu lepkości, a w konsekwencji, przyspieszenia relaksacji poprzecznej;

- przez zwiększenie objętości próbki, pamiętając jednak, że im jest ona większa, tym trudniej uzyskać zadowalającą jednorodność stałego pola B_0 i jednocześnie B_1 ;

- przez, często niezbędne w badaniach większych cząsteczek o znaczeniu biologicznym, wzbogacenie próbki w rzadkie izotopy. Wiąże się to jednak z kosztowną procedurą i nie zawsze jest możliwe w praktyce.

Liczba akumulacji (N_A) jest wprost proporcjonalna do czasu trwania eksperymentu, jednak w idealnym przypadku stosunek sygnału do szumu rośnie proporcjonalnie do \sqrt{NA} . Tak więc, na dziesięciokrotną poprawę stosunku sygnału do szumu potrzeba stukrotnie dłużej trwającego eksperymentu. Nie zawsze to jest możliwe, nie tylko z przyczyn ekonomicznych, ale też ze względu na długofalową stabilność spektrometru i jego otoczenia. Czas pojedynczej akumulacji można natomiast zmniejszać do minimum wyznaczonego przez straty sygnału, wynikające z częściowego nasycenia, spowodowanego zbyt wolną relaksacją podłużną wzbudzanych jąder.

Dla danej próbki w określonym polu B_0 najefektywniej można uzyskać zwiększenie czułości przez wzbudzenie i pomiar sygnału swobodnego zaniku indukcji (FID)² jąder o jak najwyższym współczynniku γ . I tu właśnie największe znaczenie ma właściwy dobór eksperymentu z wykorzystaniem co najmniej jednego przeniesienia populacji poziomów spinowych pomiędzy jądrami różnych rodzajów. Warunkiem powodzenia w transferze polaryzacji jądrowej jest istnienie niezerowych sprzężeń spinowo-spinowych, skalarnych lub dipolowych.

² ang. *Free Induction Decay*

Możliwe jest przeniesienie polaryzacji zarówno od jąder czułych (I) o wysokim γ do jąder mniej czułych (S), jak i w odwrotnym kierunku, a następnie detekcji sygnału FID. W tym drugim przypadku mówi się czasem o tak zwanej „detekcji odwrotnej”³ [22–24]. Najsilniejsze teoretycznie wzmocnienie można uzyskać dzięki dwukrotnemu przeniesieniu polaryzacji z jąder czułych do niskoczujących i z powrotem. W takim przypadku jednak niemożliwe jest bezpośrednie uzyskanie parametrów spektralnych jąder S w widmie jednowymiarowym i konieczny staje się pomiar pośredni – przez wprowadzenie dodatkowego wymiaru czasu – a w konsekwencji, po dwuwymiarowej transformacji Fouriera, częstości.

Najczęściej do przeniesienia polaryzacji stosuje się techniki INEPT⁴ [25] lub DEPT⁵ [26], choć często wykorzystuje się także krzyżowe przeniesienie polaryzacji w heterojądrowym eksperymencie Hartmanna-Hahna [27]. Ta ostatnia technika stosowana jest rutynowo w badaniach stałych próbek polikrystalicznych, poddanych jednocześnie wirowaniu pod tzw. kątem magicznym w celu uśrednienia anizotropii ekranowania (MAS)⁶.

Względne czułości różnych typów eksperymentów dla jąder o różnych γ zestawione są dla przykładu w Tabeli 1. Relatywne czasy pomiaru do osiągnięcia równego stosunku sygnału do szumu, z pominięciem innych aspektów eksperymentalnych, jak np. szybkości relaksacji, są kwadratami odwrotności liczb umieszczonych w tej tabeli. Z wielkości tych wynika niezbicie, że nawet w przypadku pomiarów widm ¹³C w prostych związkach organicznych, przy stężeniach rzędu 10⁻² mol×dm⁻³, stosowanie wzbudzenia i detekcji protonów daje duże korzyści. Znacznie szybciej można uzyskać widmo dwuwymiarowe tego rodzaju, niż konwencjonalne widmo jednowymiarowe, nawet przy wykorzystaniu maksymalnego wzmocnienia przez jądrowy efekt Overhausera. Natomiast w przypadku spektroskopii NMR jąder o niższym współczynniku γ czy pomiarach dużych cząsteczek bioorganicznych, metody oparte na wielokrotnym przeniesieniu polaryzacji stają się koniecznością, nawet przy wzbogaceniu w rzadkie izotopy.

Omawiając czułość eksperymentów NMR, należy wspomnieć również, o szeroko obecnie wykorzystywanych zastosowaniach impulsowych gradientów B_0 (PFG⁸) [28, 29]. Choć wybór dróg koherencji za pomocą PFG wiąże się zazwyczaj ze stratą czułości (czasem nawet dwukrotną), ich użycie wydatnie wspomaga tłumienie niepożądanych sygnałów np. pochodzących od rozpuszczalnika czy izotopomerów zawierających ¹²C lub ¹⁴N. Pozwala to na poprawę dynamiki rejestrowanego sygnału FID, a w przypadku próbek związków organicznych o relatywnie wysokich stęże-

³ ang. *Inverse detection*. Historycznie, standardowa konfiguracja spektrometrów oparta była na założeniu detekcji jąder o niskim γ z ewentualnym odprzęgnięciem jąder o wysokim czynniku γ , najczęściej ¹H. Stąd przeciwna konfiguracja dostosowana do obserwacji np. ¹H z użyciem kanału odprzęgania dostrojonego do częstości nuklidów o małym γ nazywana jest czasem myląco odwrotną.

⁴ ang. *Inversive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*.

⁵ ang. *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*.

⁶ ang. *Cross Polarization*.

⁷ ang. *Magic Angle Spinning*.

⁸ ang. *Pulsed Field Gradients*.

niach, zastosowanie PFG w technikach korelacyjnych – dzięki skróceniu niezbędnych cykli fazowych – pozwala na przyspieszenie ich rejestracji.

Tabela I. Porównanie względnych czułości eksperymentów NMR ze wzbudzeniem i obserwacją różnych jąder. Względne zawartości izotopowe nie zostały uwzględnione, jednak ich wpływ nie zależy od sposobu pomiaru

I	S	$\gamma(I)/\gamma(S)$	wzb S obs S NOE = 0 $ \gamma(S) ^{3/2}$	wzb I obs S $ \gamma(I)\gamma(S) ^{3/2}$	wzb I obs I $ \gamma(I) ^{3/2}$
^1H	^{13}C	4	1/32	1/8	1
^1H	^{15}N	-10	1/316	1/32	1
^1H	^{57}Fe	31	1/5350	1/173	1

Zależność czułości eksperymentu NMR od stałej indukcji magnetycznej B_0 wydawała się dotąd oczywista, a budowa coraz silniejszych magnesów nadprzewodzących limitowana była wyłącznie postępem technicznym i ich ceną. Jednak zastosowanie jeszcze mocniejszych magnesów do spektroskopii NMR wysokiej zdolności rozdzielczej, prawdopodobnie już w niedalekiej przyszłości ograniczone będzie istotnym udziałem efektów anizotropowych. Przykładem może być zwiększający szerokość sygnałów mechanizm relaksacyjny, związany z anizotropią przesunięcia chemicznego (CSA⁹). Prędkość relaksacji wywoływanej przez efekty CSA jest proporcjonalna do kwadratu B_0 . Podobnie możliwe w bardzo wysokich polach częściowe porządkowanie się molekuł w fazie ciekłej może powodować poszerzenie się sygnałów ze względu na pojawianie się resztkowych sprzężeń bezpośrednich dipol-dipol.

DETEKCJA KWADRATUROWA

W nowoczesnych spektrometrach podstawowym sposobem detekcji sygnału FID jest jednoczesny pomiar części rzeczywistej (o modulacji $\cos[\Omega t]$) i części urojonej (o modulacji odpowiednio $\sin[\Omega t]$), gdzie $\Omega = \omega - \omega_0$. Dokonuje się tego przez modulację mierzonego sygnału swobodnego zaniku indukcji odpowiednio $\cos[\omega_0 t]$ i $\sin[\omega_0 t]$, gdzie ω_0 jest częstością referencyjną odpowiadającą środkowi wybranego zakresu spektralnego, a następnie odfiltrowując składowe niskiej częstotliwości. Zespółona transformacja Fouriera łącząc odpowiednio symetryczne i antysymetryczne sygnały $\cos[\Omega t]$ i $\sin[\Omega t]$ pozwala wyznaczyć znak Ω .

⁹ ang. *Chemical Shift Anisotropy*.

W pośrednio mierzonych wymiarach widm wielowymiarowych postępowanie jest podobne. Najprościej, można za pomocą cyklu fazowego lub echa gradientowego uzyskać sygnał o modulacji fazowej ($\cos[\Omega t_1] - i\sin[\Omega t_1]$). W takim przypadku znak Ω jest określony, jednak nie będzie możliwe uzyskanie czysto absorbcyjnego kształtu linii spektralnych. W konsekwencji konieczne będzie posługiwanie się widmem wartości absolutnej, w którym większość szczegółów zazwyczaj ulega zatarciu.

Innym rozwiązaniem jest pomiar dwóch zbiorów danych o modulacjach amplitudowych przesuniętych w fazie o 90° . Takie postępowanie nazywane jest metodą Statesa [30]. Zespolona transformacja Fouriera względem t_1 pozwala uzyskać absorpcyjny kształt sygnałów (również tak zwanych „sygnałów zawiniętych” czyli odpowiadających częstościom wykraczającym poza wybrany zakres spektralny). Wadą tej metody jest częste pojawianie się fałszywych sygnałów dla $\Omega = 0$, tzw. sygnałów osiowych.

Stosowana dawniej zwłaszcza na spektrometrach firmy Bruker technika TPPI [31, 32] (ang. *Time Proportional Phase Incrementation*), polegała na utworzeniu jednego tylko zbioru danych, mierzonego z dwukrotnie mniejszym krokiem czasu ewolucji t_1 i dodawaniem 90° do fazy pierwszego impulsu (przed czasem ewolucji). W tym wypadku można osiągnąć takie same rezultaty jak dla techniki Statesa, jednak „sygnały osiowe” znajdują się na skraju zakresu spektralnego, a „sygnały zawinięte” pojawiają się przesunięte w fazie o 90° . Znaczenie metody TPPI zmalało znacznie ponieważ bardzo trudne bądź niemożliwe jest łączenie jej z innymi sposobami detekcji kwadraturowej w widmach wielowymiarowych.

Połączeniem zalet metod Statesa i TPPI jest technika zwana najczęściej „States-TPPI” [33], która różni się od techniki Statesa jedynie jednoczesnym odwróceniem fazy impulsu wzbudzającego interesujące koherencje przed t_1 i odbiornika w parzystych krokach t_1 . Dzięki temu „sygnały osiowe” przesuwają się na skraj widma.

W przypadku gdy do wyboru koherencji w czasie ewolucji stosowane są gradientowe impulsy B_0 otrzymujemy widma o modulacji fazowej. Dla uzyskania użytecznego widma konieczna jest wtedy, dla każdego kroku t_1 , rejestracja dwóch zbiorów danych echa ($\cos[\Omega t_1] - i\sin[\Omega t_1]$) i antyecha ($\cos[\Omega t_1] + i\sin[\Omega t_1]$). Jak łatwo zauważyć suma obu zbiorów danych pozwoli odtworzyć modulację amplitudową $\cos[\Omega t_1]$, natomiast ich różnica $\sin[\Omega t_1]$.

WYBÓR DRÓG KOHERENCJI

Najprostszym sposobem wyboru dróg koherencji jest użycie cykli fazowych. Polegają one na wielokrotnym powtarzaniu rejestracji danych z różnymi fazami impulsów promieniowania radiowego i odbiornika. Jest to metoda łatwa do zastosowania i nie powodująca strat interesującego sygnału. Jej wadami są: podatność na

wszelkiego rodzaju niestabilności w pracy spektrometru, konieczność dopasowania wzmocnienia odbiornika do najsilniejszego sygnału, nawet jeśli interesujemy się sygnałem słabym i wreszcie przedłużanie czasu trwania eksperymentu gdy czułość detekcji nie stanowi problemu.

Alternatywną metodą jest zastosowanie do wyboru dróg koherencji impulsowych gradientów B_0 (PFG). W tym przypadku wybór dokonywany jest w trakcie pojedynczego przebiegu, a wzmocnienie odbiornika może być dostosowane do najsłabszych sygnałów (gdy to one są obiektem zainteresowania), wydatnie poprawiając digitalizację intensywności. Wadą zastosowań PFG do wyboru dróg koherencji jest (w większości przypadków)¹⁰, strata części użytecznego sygnału. Wynika ona stąd, że inny jest warunek ogniskowania dla koherencji o różnych znakach, na przykład dla heterojądrowego echa i antyecha. Najczęściej gdy jeden z impulsów gradientowych umieszczony jest w ograniczonym impulsami czasie stałym to strata sygnału wynosi 1/2, gdy impuls PFG znajduje się wewnątrz czasu ewolucji np. t_1 , wówczas czynnik ten wynosi jedynie $1/\sqrt{2}$. Użycie impulsów gradientowych, w szczególności formie echa spinowego, w próbkach o wysokich współczynnikach autodyfuzji, na przykład w gazach, niesie ze sobą ryzyko istotnego osłabienia sygnału na skutek przemieszczenia się badanych cząsteczek w trakcie trwania echa.

W praktyce obie metody wyboru dróg koherencji są najczęściej łączone. Dokładny opis ich działania czy metod projektowania wykracza jednak poza ramy tego opracowania.

NAJWAŻNIEJSZE EKSPERYMENTY HOMOJĄDROWE

COSY (ANG. *CORRELATED SPECTROSCOPY*)

Technika COSY [7, 34] jest jedną z najprostszych technik korelacyjnych. Stanowi ona podstawowe narzędzie badania małych i średnich cząsteczek organicznych. Pozwala powiązać ze sobą pary jąder (najczęściej ^1H) związanych wzajemnym skalarnym sprzężeniem spinowo-spinowym. Sprzężenie, którego efektem jest przeniesienie polaryzacji i w konsekwencji pojawienie się sygnału korelacyjnego nazywa się sprzężeniem aktywnym, natomiast wszystkie inne sprzężenia pasywnymi. Sprzężenia aktywne powodują rozszczepienia sygnałów w antyfazie¹¹, a pasywne w fazie. Sygnały korelacyjne powinny zawsze mieć formę sygnałów absorbcyjnych w obu wymiarach widma. Natomiast sygnały leżące na przekątnej są dyspersyjne i w fazie. Widma takie wymagają tzw. fazowania w obu wymiarach. Możliwa jest też uproszczona rejestracja i obróbka widm COSY jako widm wartości absolut-

¹⁰ Wyjątek stanowią niektóre echa gradientowe homojądrowe, odfiltrowywanie magnetyzacji podłużnej i tak zwane techniki z poprawą czułości gdzie obie możliwe drogi koherencji są, kosztem komplikacji sekwencji, selektywnie odzyskiwane.

nej, które nie wymagają fazowania. Jednak istotne zmniejszenie zdolności rozdzielczej w takim przypadku powoduje ograniczenie stosowania takich pomiarów do najprostszych przypadków. Technika COSY ma wiele wariantów wśród których należy wymienić:

- technikę z filtrowaniem dwukwantowym [35], pozwala ona na redukcję sygnałów diagonalnych, jednak czułość zmniejsza się dwukrotnie.
- technikę z użyciem gradientowej selekcji koherencji, która pozwala szybko uzyskać widmo dla relatywnie dużych ilości substancji, jednak w najprostszej implementacji jest to najczęściej widmo wartości absolutnej.
- technikę E.COSY [36], której podstawowym zastosowaniem są pomiary pasywnych stałych sprzężenia.

TOCSY (ANG. *TOTAL CORRELATED SPECTROSCOPY*)

Technika TOCSY [37, 38], zwana również niegdyś HOHAHA¹², pozwala wzajemnie skorelować jądra należące do jednego systemu sprzężeń. Jest ona szczególnie przydatna w przypadkach występowania dobrze zdefiniowanych układów spinowych jak pierścienie cukrowe czy reszty boczne aminokwasów. Ponieważ w widmach TOCSY multiplety są zawsze w fazie można tę technikę stosować do większych cząsteczek gdzie w przypadku COSY przyspieszenie relaksacji powoduje często zanik sygnałów w antyfazie. TOCSY stosowane jest też często jako dodatkowe przeniesienie polaryzacji w dwu- i trójwymiarowych technikach heterojądrowych pozwalających korelować całe układy spinowe, np. HSQC-TOCSY czy HMQC-TOCSY. W podobny sposób przydaje się też mieszanie typu TOCSY w technikach pomiaru heterojądrowych stałych sprzężenia jak HETLOC [39] czy HECADÉ [40, 41].

NOESY (ANG. *NUCLEAR OVERHAUSER ENHANCEMENT SPECTROSCOPY*)

Metoda NOESY [39] jest jedną z najważniejszych metod spektroskopii NMR w chemii organicznej i biochemii. Pozwala ona korelować ze sobą jądra związane wzajemnym sprzężeniem dipolowym, a więc znajdujące się blisko w przestrzeni. Dla małych cząsteczek ($\omega\tau_c < 1$, gdzie ω – częstość rezonansowa a τ_c czas korelacji) jądrowy efekt Overhausera (NOE) jest dodatni, a sygnały korelacyjne mają przeciwny znak do diagonalnych. Dla dużych natomiast znak efektu zmienia się. Dlatego też gdy $\omega\tau_c \approx 1$ efekt Overhausera może być nieobserwowalny. W takich przypadkach znajduje zastosowanie technika ROESY [42, 43] (ang. *Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), gdzie efekt jest zawsze dodatni (sygnały korelacyjne mają przeciwny znak do sygnałów diagonalnych). W obu przy-

¹¹ Składowe multipletów mają przeciwny znaki.

¹² ang. *Homonuclear Hartmann Hahn Experiment*.

padkach można obserwować także sygnały wynikające z wymiany chemicznej. Podobnie, dla prostych układów często jest korzystnie wykonywać selektywne pomiary jednowymiarowe. Obecnie, w miejsce popularnych kiedyś technik różnicowych, stosuje się najczęściej selektywne echo gradientowe (DPFGSE – ang. *Double Pulsed Field Gradient Selective Echo*) [44].

Efekt Overhausera stosować można w jakościowych badaniach relatywnie małych cząsteczek organicznych, do rozwiązywania na przykład problemów stereochemicznych. Jednak zawsze należy brać pod uwagę ewentualne uśrednianie się efektów wskutek dynamiki konformacyjnej. W przypadku dużych cząsteczek jak białka (lub małych ale o ograniczonej swobodzie konformacyjnej np. cyklicznych) możliwe jest wykorzystanie ilościowych pomiarów efektów NOE do badań strukturalnych.

NAJWAŻNIEJSZE EKSPERYMENTY HETEROJĄDROWE

Najważniejszym problemem w eksperymentach heterojądrowych jest czułość, dlatego też współcześnie największe znaczenie zyskują te techniki, które wykorzystują wzbudzenie i detekcję jąder o wysokim czynnikiem γ , czyli przede wszystkim jądra ^1H .

Metoda HSQC (ang. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) [45], wykorzystywana jest przede wszystkim do pomiaru widm korelacyjnych z przeniesieniem polaryzacji przez jedno wiązanie. Cechą charakterystyczną widm HSQC jest czysto absorbcyjny kształt linii spektralnych. Możliwe jest także użycie jej do pomiaru widm z udziałem korelacji dalekiego zasięgu, jednak gdy sprzężenia homojądrowe stają się porównywalne czułość eksperymentu dramatycznie spada. Gdy konieczne jest jednak zastosowanie techniki HSQC do korelacji dalekiego zasięgu (z wykorzystaniem małych stałych sprzężenia), na przykład ze względu na czysto absorbcyjny kształt sygnałów, można tego dokonać w wersji selektywnej (od strony jąder ^1H). W przypadkach, gdy nie obserwuje się sprzężeń homojądrowych jak na przykład najczęściej dla grup metylowych, użycie HSQC jest preferowane zarówno dla małych jak i dużych sprzężeń.

Czułość techniki HMQC [46, 47] (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*), nie zależy od obecności i wielkości sprzężeń homojądrowych, dlatego też może być ona z łatwością wykorzystana do pomiarów zarówno z wykorzystaniem sprzężeń przez jedno wiązanie jak i dalekiego zasięgu. W przypadku wszystkich wariantów HMQC ograniczeniem jest obecność zniekształceń fazowych wynikających ze sprzężeń heterojądrowych. Natomiast ich czułość może być często większa ze względu na brak wkładu dipolowego w relaksację koherencji wielokwantowych, a co za tym idzie dłuższe możliwe czasy ewolucji. Szczególnym wariantem HMQC jest HMBC [48] (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Różni się ona jedynie obecnością tak zwanego filtra dolnoprzepustowego, którego zadaniem jest eliminacja z widma korelacji przez jedno wiązanie.

Działanie wszystkich technik heterojądrowych, zwłaszcza stosowanych do próbek o naturalnej zawartości izotopowej można z korzyścią poprawić stosując selekcję dróg koherencji za pomocą gradientowych impulsów B_0 . Należy jednak pamiętać o przedstawionych wcześniej zaletach i ograniczeniach tej metody.

PODSUMOWANIE

Metody spektroskopii NMR stały się nieodłącznym narzędziem w pracy współczesnego chemika i biochemika. W chemii małych i średnich cząsteczek stosuje się już rutynowo techniki dwuwymiarowe. Umożliwiają one jednoznaczne przypisania sygnałów, szybką rejestrację widm ^{13}C i ^{15}N , a także dostarczają licznych informacji o strukturze i dynamice cząsteczek w roztworach. Natomiast w badaniach metodami spektroskopii NMR molekuł o znaczeniu biologicznym niezbędna jest rejestracja widm trój- i czterowymiarowych. Pozwalają one na wzajemną korelację odpowiednich przesunięć chemicznych i przypisania sygnałów, poprawiają separację pików, a także umożliwiają precyzyjne wyznaczanie parametrów istotnych strukturalnie.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.R. Ernst, W.A. Anderson, 1966, *Rev. Sci. Instrum.*, **37**, 93.
- [2] R.R. Ernst, 1966, *Adv. Magn. Reson.*, **2**, 1.
- [3] J. Jeener, *Ampere International Summer School II, Basko-Polje*, Yugoslavia 1971.
- [4] R.R. Ernst, 1975, *Chimia*, **29**, 179.
- [5] A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst, 1975, *J. Magn. Reson.*, **18**, 69.
- [6] A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst, 1975, *Naturwissenschaften*, **62**, 34.
- [7] W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, 1976, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229.
- [8] A. Bax, *Two-Dimensional NMR in Liquids*, Delft University Press, Delft 1982.
- [9] R.R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford 1987.
- [10] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986.
- [11] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, 1988, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 490.
- [12] C. Griesinger, H. Schwalbe, J. Schleucher, M. Sattler, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemist and Biochemists*, 2nd ed., WR. Croasmun, RMK. Carlson, (eds.), VCH New York 1994, p. 457.
- [13] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D.E. Mierke, H. Kessler, 1995, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1671.
- [14] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, 1999, *Prog. NMR Spectrosc.*, **34**, 93.
- [15] R.E. Hurd, 1990, *J. Magn. Reson.*, **87**, 422.
- [16] J. Keeler, R.T. Cloves, A.L. Davis, E.D. Laue, 1994, *Methods in Enzymology*, **239**, 145.
- [17] C.J.R. Counsell, M.H. Levitt, R.R. Ernst, 1985, *J. Magn. Reson.*, **64**, 470.
- [18] D. Canet, 1997, *Prog. NMR Spectrosc.*, **30**, 101.
- [19] R. Freeman, 1991, *Chem. Rev.*, **91**, 1397.
- [20] R. Freeman, 1998, *Prog. NMR Spectrosc.*, **32**, 59.

- [21] M.D. Sorensen, S.M. Kristensen, J.J. Led, O.W. Sorensen, 1993, *J. Magn. Reson.*, **A 103**, 364.
- [22] A.A. Maudsley, R.R. Ernst, 1977, *Chem. Phys. Lett.*, **50**, 368.
- [23] A.A. Maudsley, L. Müller, R.R. Ernst, 1977, *J. Magn. Reson.*, **28**, 463.
- [24] P.J. Keller, K.E. Vogele, 1986, *J. Magn. Reson.*, **68**, 389.
- [25] G.A. Morris, R. Freeman, 1979, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 760.
- [26] M.R. Bendall, D.M. Doddrell, D.T. Pegg, 1981, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4603.
- [27] S.R. Hartman, E.L. Hahn, 1962, *Phys. Rev.*, **128**, 2042.
- [28] R.E. Hurd, 1990, *J. Magn. Reson.*, **87**, 422.
- [29] J. Keeler, R.T. Cloves, A.L. Davis, E.D. Laue, 1994, *Methods in Enzymology*, **239**, 145.
- [30] D.J. States, R.A. Heberkorn, D.J. Ruben., 1982, *J. Magn. Reson.*, **48**, 286.
- [31] G. Drobny, A. Pines, S. Sinton, D.P. Weitekamp, D. Wemmer, 1979, *Faraday Div. Chem. Soc. Symp.*, **13**, 49.
- [32] D. Marion, K. Wüthrich, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **113**, 967.
- [33] D. Marion, M. Ikura, R. Tchudin, A. Bax, 1989, *J. Magn. Reson.*, **85**, 393.
- [34] A. Bax, R. Freeman, 1981, *J. Magn. Reson.*, **44**, 542.
- [35] U. Piantini, O.W. Sorensen, R.R. Ernst, 1982, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6800.
- [36] C. Griesinger, O.W. Sorensen, R.R. Ernst, 1986, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6817.
- [37] L. Braunschweiler, R.R. Ernst, 1983, *J. Magn. Reson.*, **53**, 521.
- [38] D.G. Davis, A. Bax, 1985, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2821.
- [39] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, 1991, *Angew. Chem.*, **103**, 1341.
- [40] W. Koźmiński, D. Nanz, 1997, *J. Magn. Reson.*, **124**, 383.
- [41] W. Koźmiński, D. Nanz, 2000, *J. Magn. Reson.*, **142**, 294.
- [42] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, 1979, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546.
- [43] A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J. Lee, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811.
- [44] A. Bax, D.G. Davis, 1985, *J. Magn. Reson.*, **63**, 207.
- [45] K. Stott, J. Keeler, Q.N. Van, A.J. Shaka, 1997, *J. Magn. Reson.*, **125**, 302.
- [46] G. Bodenhausen, D.J. Ruben, 1982, *Chem. Phys. Lett.*, **93**, 504.
- [47] M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell, 1983, *J. Magn. Reson.*, **52**, 81.
- [48] A. Bax, R. H. Griffey, B.L. Hawkins, 1983, *J. Magn. Reson.*, **55**, 301.
- [49] A. Bax, M.F. Summers, 1986, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093.

**NMR CIAŁA STAŁEGO – ZASTOSOWANIA
W FARMACJI I DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ**
PHARMACEUTICAL AND MEDICAL APPLICATIONS
OF SOLID STATE MAS NMR

Iwona Wawer, Maciej Pisklak, Katarzyna Paradowska

*Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa*

Abstract

Technika NMR w fazie stałej

Interpretacja widm MAS NMR

Badania substancji leczniczych, polimorfizm

Lek w postaci tabletki

Zastosowania w diagnostyce medycznej

Piśmiennictwo cytowane



Iwona Wawer – studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. w 1976 r. obroniła pracę doktorską. w 1994 r. otrzymała tytuł doktora habilitowanego. Od 1995 r. jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie.

Zajmuje się magnetycznym rezonansem jądrowym (NMR) i elektronowym (EPR) od ponad 30 lat. Obecnie głównie NMR w fazie stałej i jego zastosowaniami w badaniach związków biologicznie czynnych oraz badaniami antyoksydantów przy użyciu EPR.



Maciej Pisklak – studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie; bezpośrednio po dyplomie został uczestnikiem Studium Doktoranckiego. Pracę doktorską obronił w 2003 r. Obecnie jest adiunktem w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego AM

Specjalizuje się w dziedzinie zastosowań ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{27}Al , ^{29}Si MAS NMR oraz mikrotomografii MR w badaniach farmaceutycznych i medycznych.



Katarzyna Paradowska – ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, od 1999 r. pracuje na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego AM.

Zajmuje się głównie metodą badawczą MAS NMR różnych jąder, szczególnie interesuje się cukrami i ich pochodnymi (glikozydami, polisacharydami) oraz ich aktywnością biologiczną.

ABSTRACT

Some characteristic features, distinguishing NMR in solution and solid phase, are briefly described. The techniques of magic angle spinning, cross-polarization, as well as the experiments with variable cross-polarization time and dipolar-dephasing pulse sequences are illustrated. The spectra measured for solutions are frequently used as an aid in the assignment of solid-state ones. The differences $\Delta = \delta_{\text{solution}} - \delta_{\text{solid state}}$ are explained in terms of conformational effects (resulting from frozen intramolecular reorientation in the solids) and intra- and intermolecular interactions (hydrogen bonds and also short intermolecular contacts in the crystals).

Solid-state NMR spectroscopy has become an important technique in the field of pharmaceutical sciences. Solid-state techniques are used for the characterization of pharmaceutical solids: drug substances and dosage forms (tablets) and their mutual interactions. Structural information on solid antibiotics (penicillin salts, erythromycin A, chloramphenicol and its derivatives), anticoagulants (warfarin, sintrom), antimalaria (artemizinin) or anxiolytic drugs (buspirone and its analogues) was obtained by the analysis of ^{13}C CP MAS spectra. Frequently exploited area is polymorphism because pharmaceutical polymorphs can display different solubilities, dissolution rates and bioavailability. Polymorphic forms of steroids (testosterone, prednisolone, cortisone) and 4-azasteroids (finasteride) and of numerous other drugs (e.g. AZT, paracetamol, phenobarbital) have been detected. Solid-state NMR has thus an ability to differentiate polymorphs, determine asymmetry in the crystal unit cell and investigate molecular motions within the solids.

MAS NMR spectra can be recorded for powdered tablets, enabling fast identification of the active substance. Few examples of forensic applications include „Exstasy” and Viagra tablets. The technique ideally lends itself to the studies on drug-excipients interaction, possible conversions of the drug during processing and storage can be followed.

Multinuclear solid state NMR is also useful in characterization of materials and tissues removed during surgery (bones, brain tumors, urinary stones).

Keywords: ^{13}C CP MAS NMR, ^1H MAS NMR, solid-state, polymorphism

Słowa kluczowe: ^{13}C CP MAS NMR, ^1H MAS NMR, ciało stałe, polimorfizm

TECHNIKA NMR W FAZIE STAŁEJ

Podstawy zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego oraz rejestracji i interpretacji widm w fazie ciekłej i stałej zostały opisane w kilku podręcznikach i monografiach, warto polecić zwłaszcza te wydane w ostatnich latach [1, 2, 3]. Podajemy więc tylko krótką charakterystykę techniki umożliwiającej rejestrację widm NMR w fazie stałej, podkreślając jej odmiennność od standardowego NMR w roztworze.

Najczęściej mierzone są widma ^1H NMR, prawie 100% abundancja i duży moment magnetyczny jąder powodują dużą czułość metody, a więc dobrej jakości widma rejestruje się bardzo szybko. Niestety, konsekwencją dużego momentu magnetycznego są silne oddziaływania dipolowe jąder ^1H – ^1H (rzędu 20–50 kHz). W cieczy są one uśredniane przez ruchy molekularne, w fazie stałej natomiast powodują silne poszerzenie linii rezonansowych. Oddziaływania momentów magnetycznych jąder opisuje Hamiltonian, który jest sumą wkładów od poszczególnych rodzajów oddziaływań:

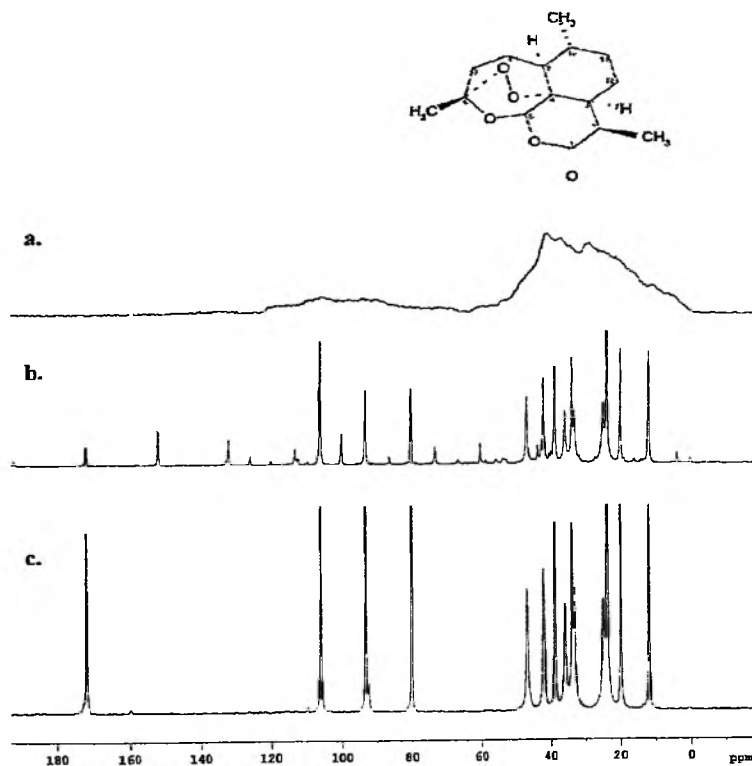
$$H = H_{\text{Zeeman}} + H_{\text{przes.chem.}} + H_{\text{sprzęż.spin.}} + H_{\text{dipolowe}} + (\text{ew. } H_{\text{kwadrupol.}})$$

W Hamiltonianie oddziaływań dipolowych występuje czynnik: $1/2(3\cos^2\theta - 1)$, staje się on równy zero jeśli $\theta = 54^\circ 44'$. Aby uśrednić oddziaływania dipolowe trzeba próbkę ustawić pod tym kątem (w stosunku do kierunku pola magnesu) i wirować z szybkością większą niż wielkość oddziaływania. Precyzyjne ustawienie kąta, nazywanego „kątem magicznym” nie jest problemem ale technicznie trudno wykonalne jest osiągnięcie obrotów z szybkością np. 40–50 kHz. Próbką (proszek) jest umieszczona w małym ceramicznym rotorze z tlenku cyrkonu (ZrO_2). Jeden strumień powietrza unosi rotor tworząc poduszkę powietrzną a drugi dmuchając na wysokości korka z nacięciami (którym zamknięty jest rotor) powoduje jego szybki obrót. W najczęściej używanych sondach szybkość wirowania to 8–15 kHz, w specjalnie dostosowanych sondach osiąga się 30–40 kHz. Niestety, nie wystarcza to do otrzymania widm o rozdzielczości porównywalnej z roztworem. Widma rejestrowane w ten sposób określa się jako ^1H MAS (ang. *Magic Angle Spinning*) NMR.

Łatwiej osiągnąć dobrą rozdzielczość w widmach ^{13}C NMR. Jądra ^{13}C mają mniejszy moment magnetyczny niż protony, a do tego szansa, że dwa jądra będą obok siebie jest bardzo mała bowiem ich abundancja to tylko 1,1%. Nie ma konieczności wirowania tak szybko i widma o dobrej rozdzielczości otrzymuje się przy szybkości wirowania 6–10 kHz. Problemem jest natomiast stosunek sygnału do szumu, dlatego widma są rejestrowane przy pomocy specjalnej sekwencji impulsów co zaproponowali w 1973 r. Pines, Gibby i Waugh [4]. Wykorzystuje ona zjawisko polaryzacji skrośnej CP (ang. *Cross-Polarization*) czyli przeniesienia polaryzacji od jąder ^1H do ^{13}C . Warunkiem transferu jest: $\gamma_{\text{H}} \cdot B_{1\text{H}} = \gamma_{\text{C}} \cdot B_{1\text{C}}$, znany jako warunek Hartmanna-Hahna, (gdzie: γ_{H} i γ_{C} to stosunki magnetogiryczne obu jąder). Transfer

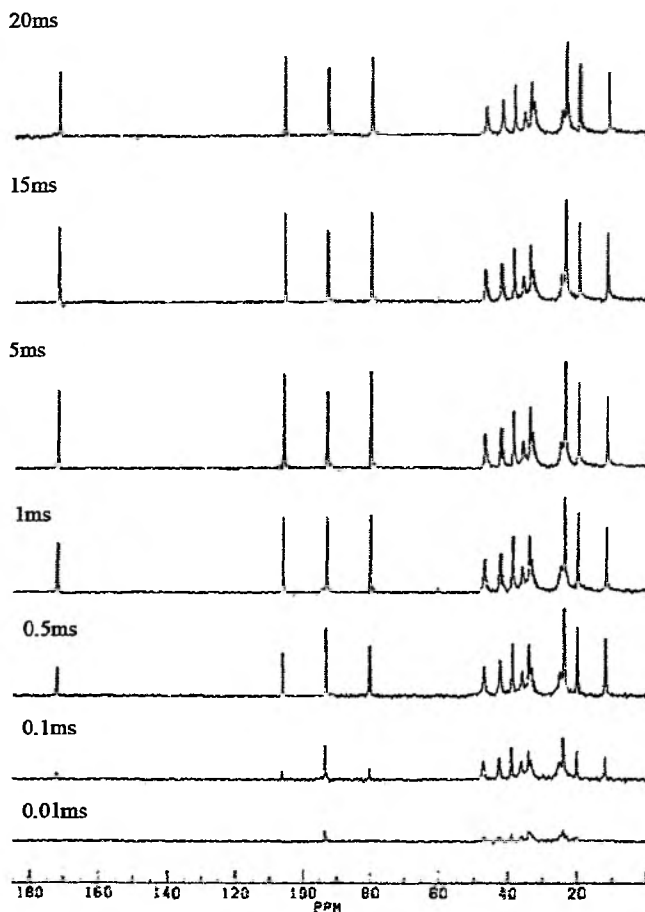
polaryzacji od protonów następuje w czasie t_{cp} (czas kontaktu) – rośnie wtedy polaryzacja jąder ^{13}C . Wzrost intensywności sygnału jest nawet 4-krotny bo $\gamma_H/\gamma_C \approx 4$. Sekwencja impulsowa CP może być dość szybko powtarzana bo intensywność sygnałów zależy głównie od czasów relaksacji protonowej T_{1H} (i $T_{1\rho}$). Dynamika procesów polaryzacji skróśnej zależy od liczby protonów związanych z danym atomem węgla i maleje w szeregu: CH_3 (nie rotujące) $>$ CH_2 $>$ CH $>$ CH_3 (rotujące) $>$ C (czwartorzędowy). Widma rezonansu ^{13}C w fazie stałej są to najczęściej widma CP MAS.

Widmo statyczne, czyli bez wirowania, to szeroki kontur często zajmujący cały zakres spektralny (Rys. 1a) i dopiero włączenie obrotów powoduje pojawienie się wąskich linii. Cechą charakterystyczną widma MAS rejestrowanego przy powolnych obrotach jest obecność dodatkowych sygnałów (Rys. 1 b). Są one po obu stronach widma, w odległości równej szybkości rotacji (w Hz) i określa się je jako pasma boczne (ang. *spinning side bands*, ssb). W miarę przyspieszania obrotów „odsuwają się” od głównego widma a ich intensywność maleje. Widmo leku przeciwalarycznego artemizyny, zarejestrowane przy szybkości rotacji 10 kHz jest czytelne i nie ma trudności w interpretacji sygnałów rezonansowych (Rys. 1c).



Rysunek 1. Widma ^{13}C NMR artemizyny w fazie stałej zarejestrowane bez wirowania (a), przy szybkości rotacji 2 kHz (b) i 10 kHz (c)

Ciekawym, ale rzadko rozważanym problemem jest wpływ wirowania z tak dużą szybkością na strukturę próbki. Siły odśrodkowe powodują, że proszek koncentruje się na ścianach rotora, czasem następuje odwodnienie (utrata wody krystalizacyjnej). Temperatura w próbce jest o kilka stopni niższa przy obrotach do 5 kHz ale przy 10 kHz rośnie o 5–10°. Jeszcze wyższe obroty powodują jej wzrost eksponentyjny; trzeba się z tym liczyć rejestrując widma związków o niskiej temperaturze topnienia lub preparatów tkankowych, które mogą ulec destrukcji.



Rysunek 2. Widma ^{13}C CPMAS artemizyny rejestrowane ze zmiennym czasem polaryzacji skrośnej t_{cp}

Dla jakości widma ^{13}C CP MAS największe znaczenie ma dynamika polaryzacji skrośnej. Wpływ czasu kontaktu ilustruje Rys. 2: przy krótkim czasie t_{cp} widać sygnały protonowanych węgli artemizyny, sygnał węgla karbonylowego pojawia się w widmie rejestrowanym z $t_{cp} = 0,1$ ms, ale przedłużanie czasu kontaktu ponad 15 ms powoduje zmniejszenie intensywności wskutek procesów relaksacji ($T_{1\rho}^H$).

Ustalenie czasu kontaktu przy którym osiągane jest maksimum intensywności jest konieczne gdy widma w fazie stałej mają służyć do pomiarów ilościowych.

INTERPRETACJA WIDM MAS NMR

Pierwszym etapem przypisania sygnałów rezonansowych w widmie ^{13}C CP MAS jest porównanie z widmem w roztworze, wiele sygnałów ma przesunięcia chemiczne różniące się o mniej niż 1 ppm. Taka sytuacja jest charakterystyczna dla sztywnych molekuł, które nie tworzą wiązań wodorowych. Identyczne przesunięcia w widmach obu faz obserwowano dla większości węgla np. w molekułach steroidów [5, 6]. Większe różnice $\Delta = \delta_{\text{roztwór}} - \delta_{\text{c stałe}}$ rzędu kilku ppm, są wynikiem innej konformacji oraz oddziaływań między- i wewnątrz-molekularnych. Często spotyka się je np. dla węgla karbonylowych gdy w kryształach tworzona jest z udziałem grup C=O sieć wiązań wodorowych.

W odróżnieniu węgla protonowanych od czwartorzędowych pomagają specjalne sekwencje impulsowe:

- zarejestrowanie widm ze zmiennym czasem kontaktu, np. bardzo krótkim (ang. *short contact*) – w widmie widoczne są tylko sygnały węgla związanych z protonami, które mają krótki czas polaryzacji skośnej,
- wprowadzenie krótkiej przerwy w sekwencji impulsowej, tuż przed rejestracją sygnału (ang. *dipolar dephased*) – w widmie z opóźnioną akwizycją są dobrze widoczne sygnały węgla czwartorzędowych, ponieważ inne mają krótki czas relaksacji.

Bardzo dobrą charakterystykę kinetyki polaryzacji skośnej i możliwości jakie daje jej stosowanie można znaleźć w pracy Kołodziejkiego i Klinowskiego [7].

W interpretacji widm fazy stałej bardzo przydatne są dane krystalograficzne. Obie metody można uznać za komplementarne, przy czym NMR jest bardziej czuły na lokalne efekty, jak nieuporządkowanie łańcucha alifatycznego czy oddziaływania międzymolekularne jakiejś grupy funkcyjnej. Z pomocą NMR można rozstrzygnąć, czy nieporządek strukturalny jest statyczny, czy też wynika z procesów dynamicznych (transfer protonu, rotacje wewnątrz-molekularne). Znajomość upakowania kryształu pozwala lepiej zinterpretować przesunięcia chemiczne i ich różnice w porównaniu z roztworem, szczególnie potrzebne są dane o sieci wiązań wodorowych.

Do ustalenia sekwencji sygnałów w widmie bardzo przydaje się znajomość stałych ekranowania, dlatego cennym narzędziem w interpretacji np. struktur polimorficznych stają się metody teoretyczne [8].

Widma ^{13}C CP MAS były wykorzystywane do charakterystyki wielu związków organicznych w fazie stałej [9], są szczególnie przydatne gdy mamy do czynienia ze związkami trudno rozpuszczalnymi lub łatwo rozkładającymi się w roztworze.

Techniką tą rejestrowano pierwsze widma cukrów już 20 lat temu: α - i β -D-glukozy w 1984 r. [10], laktozy w 1983 r. [11], przegląd badań NMR mono-, disa-

charydów i ich pochodnych w fazie stałej opublikował w 1998 r. M. Potrzebowski [12]. Analizowano dane MAS NMR dla innych ważnych biomolekuł: aminokwasów (w tym metioniny [13], selenometioniny [14]), peptydów [15], homopolipeptydów [16] oraz bioaktywnych związków izolowanych z roślin: flawonoidów [17, 18, 19], sapogenin steroidowych [5], kumaryn [2-] czy β -karotenu [21].

BADANIA SUBSTANCJI LECZNICZYCH, POLIMORFIZM

Mimo, że od pierwszych zastosowań minęło ćwierć wieku, NMR w fazie stałej nie stał się popularną metodą badania leków i preparatów farmaceutycznych. Zwracał na to uwagę Bugay w 1995 r. [22] oraz Wawer w 1999 r. [23] ale sytuacja nie zmieniła się radykalnie w ciągu ostatnich lat. Jest to trochę zaskakujące, zważywszy, że prawie 90% preparatów farmaceutycznych jest sprzedawanych w fazie stałej. Istotnym powodem jest wysoki koszt spektrometru NMR z sondami do MAS, drugą prawdopodobną przyczyną jest niedostateczna znajomość tej techniki przez tradycyjnie wykształconych farmaceutów. Wartościowe aplikacje farmaceutyczne powstają na ogół w tych laboratoriach, gdzie istnieje interdyscyplinarna współpraca lekarzy czy farmaceutów z fizykami i fizykochemikami.

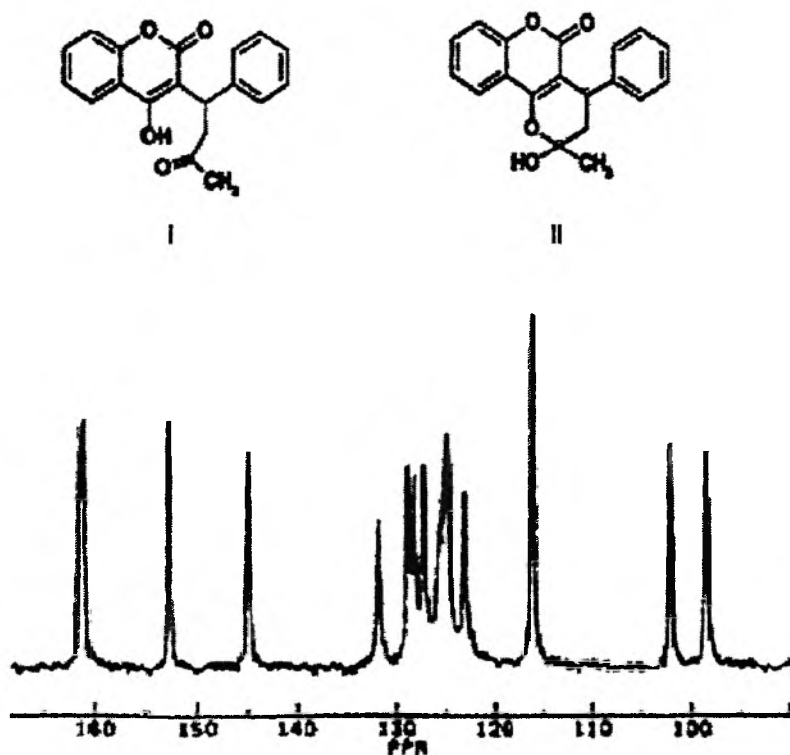
Farmaceutyczne zastosowania NMR w fazie stałej omówiono w pracach przeglądowych [24, 25] oraz w monografii poświęconej projektowaniu i analizie leków [23]. Krystaliczna forma substancji czynnej jest ważna nie tylko ze względu na biodostępność ale musi być brana pod uwagę w projektowaniu leku, w procedurze jego rejestracji, a często też podlega ochronie patentowej [26].

Badania metodą ^{13}C CP MAS NMR dostarczyły ważnych informacji strukturalnych o antybiotykach penicylinowych [27, 28]. W sieci krystalicznej kwasu penicylinowego i jego soli jest wystarczająco dużo miejsca na rotację pierścienia aromatycznego, ale szybkość rotacji nie jest zależna od rozmiarów kationu. Poprzez analizę kształtu sygnałów w widmach rejestrowanych w różnych temperaturach można uzyskać parametry kinetyczne charakteryzujące dynamikę tego procesu.

Antybiotykiem używanym od wielu lat jest chloramfenikol, ale jego toksyczność spowodowała ograniczenie zastosowań, jednocześnie trwają intensywne poszukiwania analogów o korzystniejszych właściwościach. Takim związkiem jest tiamfenikol oraz nowa pochodna z pierścieniem pirolowym, dla której nie udało się wyhodować monokryształu. Informacje o jej strukturze w cieple stałym uzyskano z widm ^1H i ^{13}C MAS NMR a w przypisaniu sygnałów rezonansowych pomocne były obliczenia stałych ekranowania [29]. Analiza stałych ekranowania i przesunięć chemicznych dla geometrii *treo* i *erytro* sugeruje, że pochodna pirolowa ma w części alifatycznej konfigurację *treo*, podobnie jak chloramfenikol. Interesujące były widma ^1H MAS – zaskakująco dobrą rozdzielczość miało widmo chloramfenikolu, w którym można było odróżnić protony aromatyczne *orto* i *meta*, różniące się o 0,5 ppm. Świadczy to o istnieniu ruchów molekularnych (rotacja grupy CHCl_2 oraz pierścienia feny-

lowego), wskazywały na to wcześniejsze badania metodą rezonansu kwadrupolowego (NQR) jąder ^{35}Cl .

Struktura erytromycyny w ciele stałym była przedmiotem badań NMR, również z użyciem związku wzbogaconego w ^{13}C [30, 31]. W widmie ^{13}C CP MAS krystalicznego dihydratu erytromycyny A obserwowano 35 wąskich sygnałów (od 37 węgli), które przypisano wspomagając się obliczeniami stałych ekranowania (DFT B3LYP/D95**). Podczas ogrzewania próbki zanika uporządkowanie kryształu, a w związku z tym sygnały poszerzają się. Ogrzewanie powyżej 75°C lub odwodnienie powoduje duże zmiany w widmie. Pojawienie się sygnałów przy δ 110,8, 86,2, 82,4 i 43,8 ppm (z których najbardziej charakterystyczny jest ten przy 110,8 ppm) świadczy o utworzeniu cyklicznego hemiketalu – następuje więc istotna zmiana strukturalna [32].



Rysunek 3. Warfaryna w formie otwartej I i cyklicznej (hemiketal); strukturę II potwierdza widmo ^{13}C CP MAS NMR

Podobny problem istnieje dla leków o działaniu antykoagulacyjnym, pochodnych kumaryny. Warfaryna, 4-hydroksy-3-(1-fenyl)-3-oksobutylideno kumaryna i sintrom (pochodna *p*-nitrofenylowa) (Rys. 3) są przedstawiane i nazywane jako otwarte

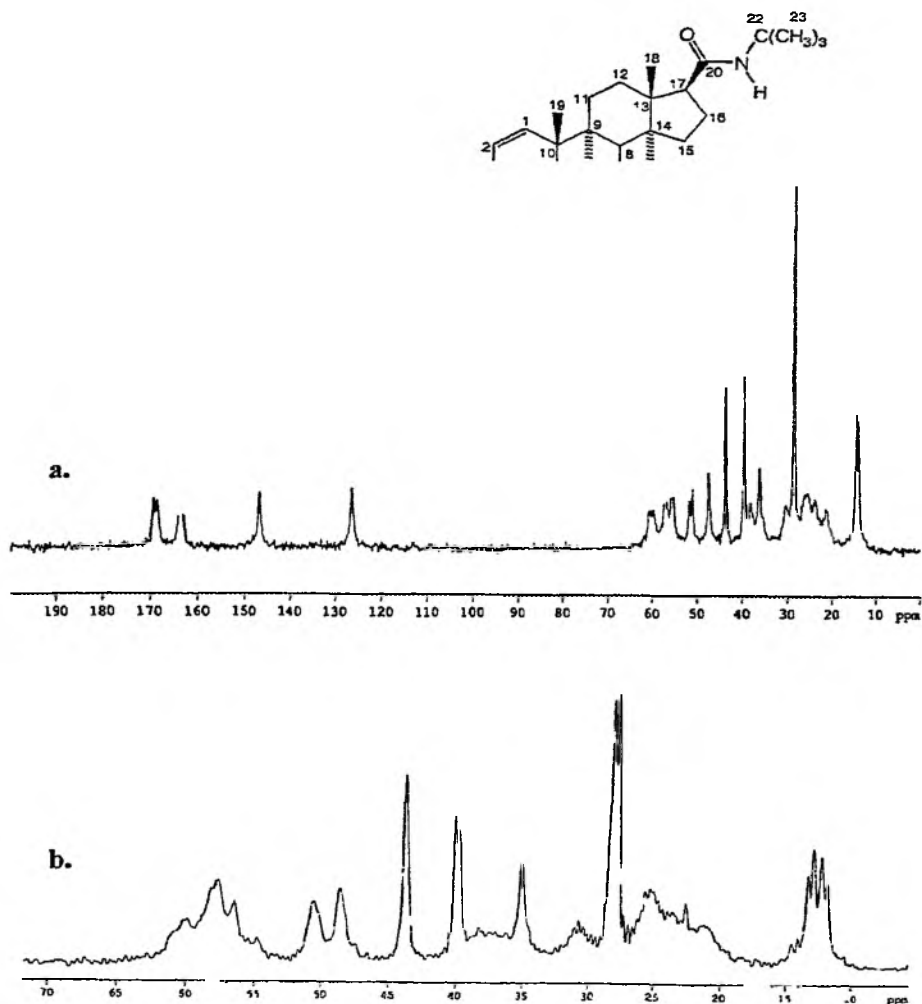
tautomery I chociaż w fazie stałej mają postać cyklicznego hemiketalu II (o nazwie: 2-hydrokso-2-metylo-4-fenyl-3,4-dihydro-2H-pirano{3,2-c}chromen-5-on). Można oczekiwać, że grupa karbonylowa w łańcuchu $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-}$ powinna mieć przesunięcie chemiczne bliskie 200 ppm, tymczasem w widmie ^{13}C CP MAS nie ma sygnałów $\delta > 165\text{ppm}$. Jest natomiast charakterystyczny sygnał węgla $\delta 102,2\text{ ppm}$ z cyklicznego hemiketalu. Widma NMR fazy stałej są w tym przypadku jedynym źródłem informacji strukturalnej, bowiem dla leku w postaci soli sodowej nie udaje się otrzymać monokryształów. Bardzo skomplikowane są widma w roztworze, istnieje tam mieszanina dwóch konformerów formy cyklicznej (70:30 w DMSO), w innych rozpuszczalnikach obserwuje się kilka procent formy otwartej [33] (Rys. 3).

Informacje strukturalne, dotyczące ew. występowania substancji czynnej w kilku formach (polimorfizmu) czy też obecności wody krystalizacyjnej (pseudopolimorfizm) są ważne przy stosowaniu leku i wymagane przy jego rejestracji. Polimorfizm wpływa na rozpuszczalność, stabilność leku jak i na jego biodostępność. Różne formy polimorficzne mogą się uwalniać z postaci leku z różną szybkością *in vivo* dlatego zjawisko to jest intensywnie badane metodami krystalograficznymi, kalorymetrycznymi i spektroskopowymi. Polimorfizmu dotyczy większość farmaceutycznych zastosowań NMR w fazie stałej, były one omówione w kilku pracach przeglądowych [23, 34, 35].

Znany lek przeciwko wirusowi HIV, 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT) w fazie stałej tworzy dimery z dwoma wiązaniami wodorowymi N-H...O, w których ma miejsce szybka wymiana protonów. Molekuły w dimerze różnią się ułożeniem przestrzennym i konformacją pierścieni furanozowych, ich nierównocенność przejawia się rozszczępieniem sygnałów w widmie ^{13}C CP MAS NMR [36].

Obecność dubletów w widmie ^{13}C CP MAS zamiast pojedynczych sygnałów może mieć różne przyczyny strukturalne. W przypadku jednej z pochodnych buspironu (potencjalne leki anksjolityczne) dwie molekuły w kryształach różniły się przestrzenną orientacją fragmentu chinolinowego, w innym kryształach polimorfizm wynikał z pseudo-aksjalnego lub pseudo-ekwatorialnego podstawienia tego pierścienia do azotu piperazyny [37]. Intensywnie badany był polimorfizm steroidów: testosteronu [38], androstanolonu [39] czy octanu kortyzonu [40].

Zarejestrowano widma ^{13}C CP MAS NMR dla kilku 4-aza-steroidów, w tym dla finasterydu, stosowanego w leczeniu prostaty [6]. Struktura finasterydu w fazie stałej bardzo zależy od rodzaju rozpuszczalnika i warunków krystalizacji, znanych jest aż 9 form polimorficznych. Analiza przesunięć chemicznych pokazuje, że dwie z form, dla których rejestrowano widma CP MAS, odpowiadają formom wcześniej znanym, choć krystalizowanym z innego rozpuszczalnika. Stosując octan etylu lub wodne roztwory kwasu octowego można otrzymać kryształy z jedną molekułą w komórce elementarnej lub z dwiema, (Rys. 4 a, b). Znalezione też nową formę, która krystalizuje z molekułą dioksanu – o czym przekonuje jego sygnał przy $\delta 67,0\text{ ppm}$ [6] (Rys. 4).



Rysunek 4. Widma ^{13}C CP MAS NMR dla dwóch form polimorficznych finasterydu, z jedną (a) i dwiema molekułami w komórce elementarnej kryształu (b)

W kilku polimorficznych formach występują znane leki, luminal [23, 41] czy paracetamol. Do sporządzania handlowych preparatów paracetamolu używana jest jego forma jednoskośna, ale przez jej stopienie można otrzymać metastabilną postać ortorombową. W widmach ^{13}C CP MAS preparatu poddawanego stopieniu, widać mieszaninę obu form. Różnice przesunięć chemicznych odpowiadających sobie węgli świadczą o tym, że molekuły paracetamolu w obu formach są w zupełnie innym otoczeniu chemicznym [42].

Wiadomo było, że sulfanilamid w fazie stałej istnieje w trzech formach, ich dokładniejszą charakterystykę umożliwiły techniki MAS NMR: różnice w mobil-

ności molekuł ujawniły się w wyniku pomiarów czasów relaksacji, natomiast rejestracja widm molekuł wzbogaconych w ^{15}N pozwoliła na wykazanie innej anizotropii ekranowania dla atomów azotu, co potwierdzono obliczeniami teoretycznymi stałych ekranowania [43].

LEK W POSTACI TABLETKI

NMR w fazie stałej był często stosowany do badania leków w tabletkach (sproszkowanych) [44–46]. Jedne z pierwszych prac dotyczyły różnych rodzajów aspiryny [44, 45]. Diaz i inni zarejestrowali widma kilku rodzajów tabletek: aspiryny Bayera, reklamowanej jako super-mocnej (Bufferin) i o maksimum mocy (Anacin), ale różnice w intensywności sygnałów widać było tylko w zakresie 60–100 ppm, czyli typowym dla węglowodanów (dodawanych jako wypełniacze, np. skrobia).

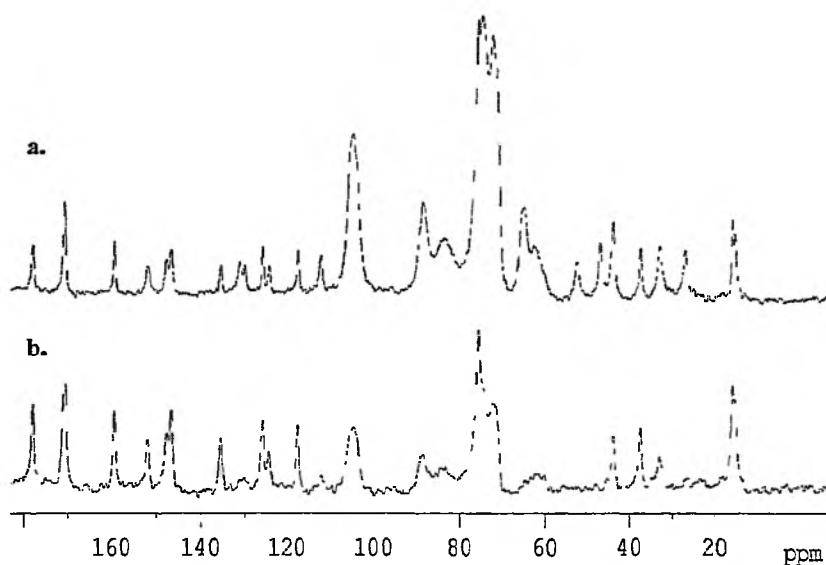
W widmie ^{13}C CP MAS tabletki paracetamolu [23] szerokie sygnały w zakresie 60–100 ppm pochodzą od skrobi, a te w zakresie 30–40 ppm od glikolu polietylenowego (są to często używane materiały pomocnicze). Interesujące są sygnały w zakresie aromatycznym – węgle *ortho* i *meta* dają oddzielne pary sygnałów ponieważ w kryształach nie ma rotacji podstawników: $\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$ ani grupy OH.

Wobec wysokich cen niektórych leków, atrakcyjna finansowo staje się ich nielegalna produkcja. Problem ten jest jeszcze poważniejszy gdy dotyczy substancji o działaniu narkotycznym. MAS NMR jest tu przydatnym narzędziem do szybkiej identyfikacji zarówno substancji czynnej jak i składników masy tabletkowej.

Różnice przesunięć chemicznych między roztworem a ciałem stałym można powiązać ze strukturą krystaliczną. Obserwowano je dla pochodnych amfetaminy: chlorowodoru 3,4-metylenodioksy amfetaminy (*R,S*)-MDA, pochodnej metylowej (MDMA) i etylowej (MDEA) oraz chlorowodorów efedryny i pseudoefedryny. Okazało się, że przesunięcia chemiczne (*R,S*)-MDMA zmieniają się po wymieszaniu z laktozą. [46]. Można to przypisać tworzeniu sieci wiązań wodorowych, ale obecność cukru ma też wpływ na upakowanie molekuł – zwiększa ich mobilność w fazie stałej w porównaniu z czystym związkiem. Mieszanie z laktozą jest stosowane przez producentów nielegalnie produkowanych tabletek „Ekstazy”, dlatego istotne jest poznanie charakterystycznych zmian w widmie, a również możliwość wykorzystania tej techniki do ustalenia składników tabletki.

Interesującym obiektem jest też sildenafil, lek stosowany w chorobach układu krążenia ale obecnie powszechnie znany pod nazwą viagra i stosowany jako stymulator funkcji seksualnych. Analiza widm ^{15}N i ^{13}C MAS NMR w fazie stałej pozwoliła na przypisanie sygnałów, ustalenie miejsca protonowania i oddziaływań wewnątrz- i międzymolekularnych (nie ma danych krystalograficznych dla soli) [48]. Dane te zostały zastosowane do badania viagry w tabletkach. W postaci leku jest sól, cytrynian sildenafilu; jest on łatwy do identyfikacji bo tylko dwa węgle dają sygnały w zakresie typowym dla węglowodanów. Widmo ^{13}C CPMAS viagry

w tabletkę przedstawia Rysunek 5. Korzystne jest zastosowanie sekwencji impulsowej z opóźnioną akwizycją (ang. *dipolar dephase*). Wprowadzenie przerwy przed rejestracją FID powoduje znaczące zmniejszenie intensywności protonowanych węgli węglowodanów, (jako wypełnienie tabletki często używana jest heksametyloceluloza) (Rys. 5).



Rysunek 5. Widma ^{13}C CPMAS viagry w 100 mg tabletkę, widmo standartowe (a), oraz z zastosowaniem sekwencji impulsowej z opóźnioną akwizycją (b) Szybkość wirowania 8 kHz

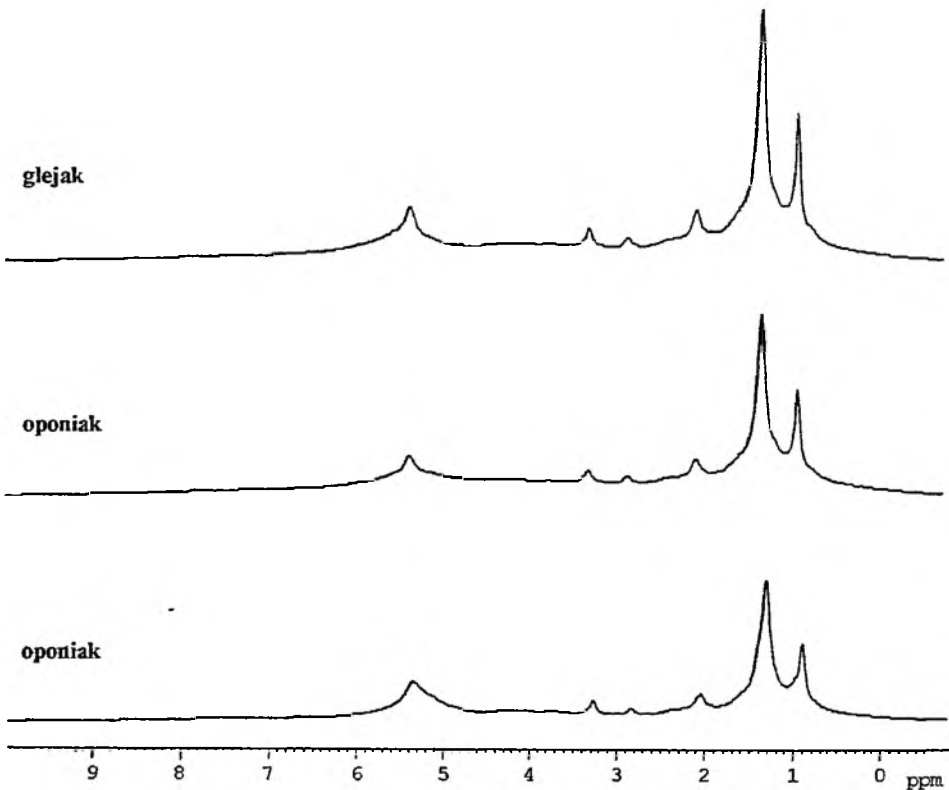
^{13}C CP MAS NMR jest metodą nieniszczącą, a czytelne widmo otrzymuje się po ok. 1/2 godziny – może więc być dobrą alternatywą do identyfikacji nielegalnie wytwarzanych tabletek lub innych pochodnych sildenafilu (jak homosildenafil produkowany w Korei, różniący się jedną grupą metylenową od oryginału).

Istotną pomocą dla przemysłu farmaceutycznego może być możliwość śledzenia zmian następujących w procesie wytwórczym, w trakcie np. liofilizacji, suszenia rozpyłowego, stapiania, mieszania z wypełniaczami czy powlekania tabletek. NMR w fazie stałej można zastosować do kontroli stabilności leku w trakcie jego przechowywania. Aktualnie, wiele prac poświęcono też opracowywaniu nowych nośników leków, takich jak preparaty krzemionkowe, matryce polimerowe [49] czy cyklodekstryny [23].

ZASTOSOWANIA W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Szybki rozwój tomografii magnetyczno-rezonansowej (MRI) i popularność tej techniki w diagnostyce klinicznej spowodowały zainteresowanie fizykochemicznymi badaniami tkanek. Interpretacja zmian w organach widzianych w obrazach MRI wymaga wiedzy o czasach relaksacji, zawartości poszczególnych metabolitów i biopolimerów. Najciekawsze jest powiązanie tych danych z molekularną, biochemiczną charakterystyką choroby. Wykonanie widma ^1H NMR *in vivo* umożliwia spektroskopia magnetyczno-rezonansowa (MRI), ale otrzymywane widma na ogół nie mają wystarczająco dobrego stosunku sygnału do szumów. Dobrze widoczne są jedynie metabolity obecne w fazie wodnej, w stężeniach rzędu mmoli.

W tej sytuacji cenne są informacje, które można uzyskać analizując tkanki i inne materiały (np. kamienie) usunięte np. podczas operacji.



Rysunek 6 Widma ^1H MAS NMR liofilizowanych tkanek nowotworu mózgu rejestrowanych z superszybkim wirowaniem (33 kHz)

Interesującym polem zastosowań MAS NMR w fazie stałej jest analiza nowotworów mózgu. Fragment usuniętego guza jest kierowany do badań histopatologicznych, resztę materiału zamraża się w ciekłym azocie a następnie poddaje liofilizacji. Zarejestrowano widma ^1H MAS NMR dla kilku preparatów tkankowych, wśród których były: złośliwe glejaki, oponiaki i czaszko gardlaki [50]. W widmach liofilizatów dominują sygnały lipidów: intensywne sygnały grup CH_3 , CH_2 i CH pochodzą od protonów reszt kwasów tłuszczowych, które są wystarczająco mobilne, aby były „widziane” w widmie NMR. Widmo ^1H MAS liofilizowanej tkanki guza mózgu (glejak) rejestrowane przy pomocy sondy wysokoobrotowej (szybkość wirowania 33 kHz) przedstawia Rysunek 6.

Największy wkład w intensywność sygnałów wnoszą prawdopodobnie triglicerydy i reszty kwasów tłuszczowych w fosfolipidach. Interesujące jest to, że profil sygnałów jest charakterystyczny dla danego typu nowotworu. Metody MAS NMR stwarzają, więc możliwość biochemicznej charakterystyki tkanek mózgu.

Stosunkowo łatwo osiągalnym materiałem badawczym są kości, np. stawu biodrowego, które wymieniane są na protezy. Widma ^1H , ^{13}C i ^{31}P MAS umożliwiają strukturalną charakterystykę tkanki kostnej i jej składników. Są to złożone fosforany wapniowe, wśród których dominuje hydroksyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$), natomiast głównym polimerem organicznym jest kolagen.

Żaden z syntetycznych związków, w których jony fosforanowe zostały częściowo zastąpione przez HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} czy OH^- , takich jak węglanohydroksyapatyt, monetyt czy bruszyt, nie odpowiada jednak strukturze i właściwościom materiału kostnego. Interesujących informacji dostarcza ^{31}P CP MAS NMR, mimo, że w widmie sproszkowanej kości obserwuje się tylko jeden sygnał o przesunięciu chemicznym 3,1 ppm. Kinetykę polaryzacji skrośnej $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ opisano trzema procesami o różnej dynamice, świadczy to o istnieniu domen bogatych (hydroksyapatyt) i ubogich (fosforan) w protony [51]. Drogą do zrozumienia budowy materiału kostnego są na pewno badania jego składników, takich jak bruszyt [52, 53].

Interesujące wydaje się też inne zastosowanie NMR w fazie stałej, analiza kamieni moczowych czy nerkowych. W badaniach kamieni moczowych z użyciem ^{13}C i ^{31}P MAS NMR [54] pierwszym celem była identyfikacja składników. Udało się oznaczyć ilościowo 60–85% wagowych składu, w tym takie związki jak: szczawian wapnia, fosforany wapnia i kwas moczowy. Ich spektroskopowa charakterystyka jest podobna do bruszytu i hydroksyapatytu wapnia. Techniki CP MAS pozwoliły na odróżnienie rezonansów pochodzących z krystalicznych/amorficznych oraz protonowanych/nieprotonowanych fragmentów.

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

CP, ang. *cross-polarization* – polaryzacja skrośna

MAS, ang. *magic angle spinning* – wirowanie pod kątem magicznym

MRI, ang. *magnetic resonance imaging* – obrazowanie magnetyczno-rezonansowe, tomografia

MRS, ang. *magnetic resonance spectroscopy* – spektroskopia magnetyczno-rezonansowa

SSB, ang. *spinning side bands* – pasma boczne, dodatkowe sygnały pojawiające się wskutek rotacji

T_{CP} , ang. *contact time* – czas kontaktu (czas, w którym następuje transfer polaryzacji)

T_1 , ang. *spin-lattice relaxation time* – czas relaksacji spin-sieć

$T_{1\rho}$, ang. *rotating-frame relaxation time* – czas relaksacji w wirującym układzie współrzędnych

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.W. Hennel, J.Klinowski, *Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2000.
- [2] M.L. Duer, *Solid State NMR Spectroscopy: Principles and Applications*, Blackwell Publishing, Cambridge 2002.
- [3] N. Müller, *Current Developments In Solid State NMR Spectroscopy*, Springer-Verlag Wien New York, 2002.
- [4] A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, 1973, **59**, 569.
- [5] I. Wawer, J. Nartowska and A. Cichowlas, *Solid State NMR*, 2001 **20**, 35.
- [6] J. Morzycki, I. Wawer, A. Gryszkiewicz, J. Maj, L. Siergiejczyk, A. Zaworska, *Steroids*, 2002, **67**, 621.
- [7] W. Kołodziejski, J. Klinowski, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 613.
- [8] C.J. Jameson, A.C. De Dios, *Nuclear Magnetic Resonance vol. 28*, (ed) The Royal Soc. Chem., 1999, 43.
- [9] I. Wawer, S. Witkowski, *Curr. Org. Chem.*, 2001, **5**, 987.
- [10] P. Pfeffer, K. Hicks, *J. Carbohydr. Chem.*, 1984, **3**, 197.
- [11] W.L. Earl, A.F.W. Parish, *Carbohydr. Res.*, 1983, **115**, 23.
- [12] M.J. Potrzebowski, *Recent Advances in Analytical Chemistry*, ed. Atta-Ur Rahman, Gordon and Breach Publishers, Amsterdam 1998, 359.
- [13] L.E. Diaz, F. Morin, Ch.L. Mayne, D.M. Grant, Ch. Chang, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 167.
- [14] M.J. Potrzebowski, R. Katarzyński, W. Ciesielski, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, **37**, 314.
- [15] A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando, G.A. Webb, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, ed. G.A. Webb, Academic Press, 1993, **28**, 55.
- [16] K.A. Henzler Wildman, E.E. Wilson, D.K. Lee, A. Ramamoorthy, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 2003, **24**, 94.
- [17] I. Wawer, A. Zielinska, *Magn. Reson. Chem.*, 2001, **39**, 374
- [18] S. Olejniczak, M. J. Potrzebowski, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1.
- [19] S. Olejniczak, K. Ganicz, M. Tomczykowa, J. Gudej, M. Potrzebowski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2, 2002, **6**, 1059.
- [20] T. Zołek, K. Paradowska, I. Wawer, *Solid State NMR*, 2002, **23**, 77.
- [21] W. Kołodziejski, T. Kasprzycka-Gutman, *Solid State NMR*, 1998, **11**, 177.
- [22] D. Bugay, *Magnetic Resonance Spectrometry, Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*, H.G. Brittain Ed., M. Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong, 1995, rozdz. 4.

- [23] U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto 1999, rozdz. 8.
- [24] U. Holzgrabe, B. Diehl, I. Wawer, *J. Pharmaceut. Biomed. An.*, 1998, **17**, 557.
- [25] P.A. Tishmack, D.E. Bugay, S.R. Byrn, *J Pharm. Sci.*, 2003, **92**, 441.
- [26] A.W. Newman, S.R. Byrn, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 898.
- [27] J. Fattah, J.M. Twyman, S.J. Heyes, D.J. Watkin, A.J. Edwards, K. Proust, Ch.M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 5636.
- [28] M. Wendeler, J. Fattah, J.M. Twyman, A.J. Edwards, Ch.M. Dodson, S.J. Heyes, K. Prout, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9793.
- [29] T. Zołek, K. Paradowska, D. Krajewska, A. Różański, I. Wawer, *J. Mol. Struct.*, 2003, **646**, 141.
- [30] G.A. Stephenson, J.G. Stowell, P.H. Toma, R.R. Pfeiffer, S.R. Byrn, *J. Pharm. Sci.*, 1997, **86**, 1239.
- [31] E. Mary, R. Mueller, B. Sun, S.W. Fesik, R.G. Gryffin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10602.
- [32] R.J. Iuliucci, J. Clawson, J.Z. Hu, M.S. Solum, D. Barich, D.M. Grant, C.M. Taylor, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 2003, **24**, 23.
- [33] M. Pisklak, D. Maciejewska, F. Herold, I. Wawer, *J. Mol. Struct.*, 2003, **649**, 169.
- [34] H.G. Brittain, S.J. Bogdanowich, D.E. Bugay, J. DeVincentis, G. Lewen, A.W. Newman, *Pharm. Res.*, 1991, **8**, 963.
- [35] D.E. Bugay, *Pharm. Res.*, 1993, **10**, 317.
- [36] W. Kołodziejski, J. Klinowski, *Chem. Phys. Lett.*, 1999, **303**, 183.
- [37] A. Szelejewska-Wozniakowska, Z. Chilmonczyk, A. Les, I. Wawer, *Solid State NMR*, 1998, **13**, 63; *ibid.* 1999, **14**, 59.
- [38] R.A. Fletton, R.K. Harris, A.M. Kenwright, R.W. Lancaster, K.J. Packer, N. Sheppard, *Spectrochim. Acta*, **43A**, 1987, 1111.
- [39] R.K. Harris, B.J. Say, R.R. Yeung, R.A. Fletton, R.W. Lancaster, *Spectrochim. Acta*, **45A**, 1989, 465.
- [40] R.K. Harris, A.M. Kenwright, B.J. Say, R.R. Yeung, R.A. Fletton, R.W. Lancaster, G.L. Hardgrove, *Spectrochim. Acta*, **46A**, 1990, 927.
- [41] Y. Kato, F. Watanabe, *J. Pharm. Soc. Jap.*, 1978, **98**, 639.
- [42] H.A. Moynihan, I.P. O'Hare, *Int. J. Pharm.*, 2002, **247**, 179.
- [43] A. Portieri, R.K. Harris, R.A. Fletton, R.W. Lancaster, T.L. Threlfall, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, **42**, 313.
- [44] C. Chang, L.E. Diaz, F. Morin, D.M. Grant, *Magn. Res. Chem.*, 1989, **24**, 768.
- [45] L.E. Diaz, L. Frydman, A.C. Olivieri, B. Frydman, *Anal. Lett.*, 1987, **20**, 1657.
- [46] J.W. Lubach, B.E. Padden, S.L. Winslow, J.S. Salsbury, D.B. Masters, E.M. Topp, E.J. Munson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 1504.
- [47] G.S. Lee, R.C. Taylor, M. Dawson, G.S. Kannangara, M.A. Wilson, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 2000, **16**, 225.
- [48] I. Wawer, M. Pisklak, Z. Chilmonczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (w druku).
- [49] D. Horsztyński, I. Wawer, P. Grieb, *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2003, **37**, 123.
- [50] A. Kaflak, D. Chmielewski, A. Górecki, W. Kołodziejski, *Solid State NMR*, 1998, **10**, 191.
- [51] A. Kaflak-Hachulska, A. Ślósarczyk, W. Kołodziejski, *Solid State NMR*, 2000, **15**, 237.
- [52] A. Kaflak-Hachulska, A. Samoson, W. Kołodziejski, *Calcif. Tissue Int.*, 2003, **73**, 476.
- [53] M. Bak, J.K. Thomsen, H.J. Jakobsen, S.E. Petersen, T.E. Petersen, N.C. Nielsen, *J. Urol.* 2000, **64**, 856.

**CZASOPISMA CHEMICZNE W POLSCE –
STAN W 2004 r. – PRÓBA OCENY**

**CHEMICAL PERIODICALS IN POLAND –
SITUATION IN 2004 – TENTATIVE VALUATION**

Janusz Jurczak¹, Jacek Kijeński², Józef J. Ziółkowski³

¹ *Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski,
ul. L. Pasteura 1, 02-093 Warszawa*

² *Instytut Chemii Przemysłowej im. I. Mościckiego w Warszawie
ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa*

³ *Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

Abstract

Wstęp

Część I. Czasopisma chemiczne o charakterze naukowym oraz związane tematycznie z chemią

Część II. Czasopisma naukowo-techniczne w zakresie chemii przemysłowej

1. Charakterystyka czasopism
2. Ocena merytoryczna czasopism
3. Podsumowanie – wnioski

Część III. Miejsce polskich czasopism chemicznych w Europie

ABSTRACT

The analysis of chemical periodicals in Poland in 2004 have been ordered by Polish Academy of Science, the Committe for Chemistry and presented in three parts.

In Part I (Józef J. Ziółkowski) are presented:

- journals of scientifics character, printed in english, english and polish and german (Group A)
- journals printed in polish (Group B)
- journals printed as scientifics bulletins edited by the univeristes or research institutes (Group C)
- popularized scientific or commercial journals (Group D) and
- the books publication, special issues usually for didactic purposes (Group E)

In Part II (Jacek Kijeński) are disscussed chemical periodicals addressed to science, technology and industrial chemistry mainly related to environmental chemistry, polymers, fuels, energy problems, and raw materials.

In Part III (Janusz Jurczak) is presented opinion about location of polish chemical periodicals in Europe.

Presented above analysis is probably the first complex valuation and although not complete may stimulate further discussion on strategy of development of chemical periodicals in Poland.

Keywords: chemical periodicals, polish journals

Słowa kluczowe: czasopisma chemiczne, polskie czasopisma chemiczne

WSTĘP

Z inicjatywy Komitetu Chemii Polskiej Akademii Nauk zespół w składzie: Janusz Jurczak, Jacek Kijęński i Józef J. Ziółkowski dokonał przeglądu stanu czasopiśmiennictwa chemicznego w Polsce, w roku 2004 i przedstawił niezależne oceny (część I, II, III).

W części I (J.J. Ziółkowski) omówiono czasopisma o charakterze naukowym:

- wydawane w języku angielskim, angielskim i polskim lub w języku niemieckim (grupa A)
- wydawane tylko w języku polskim, często ze streszczeniami w języku obcym (grupa B)
- wydawane jako Zeszyty Naukowe przez Uczelnie lub Instytuty Badawcze (grupa C)
- czasopisma o charakterze popularno-naukowym i reklamowym (Grupa D) oraz przykład książkowych wydawnictw periodycznych (grupa E).

W części II (Jacek Kijęński) dokonano analizy czasopiśmiennictwa naukowo-technicznego w zakresie chemii przemysłowej, głównie o tematyce:

- ochrona środowiska,
- tworzywa sztuczne,
- paliwa, energia, surowce mineralne.

W części III Janusz Jurczak przedstawił zwięzłą ocenę miejsca polskich czasopism chemicznych w Europie, która może stanowić zachętę do kompetentnej dyskusji.

Przedstawione opracowania są prawdopodobnie pierwszymi próbami kompleksowej oceny, które choć niekompletne to mogą zachęcić również czytelników „Wiadomości Chemicznych” do zastanowienia się nad przyszłością polskich czasopism chemicznych.

CZĘŚĆ I. CZASOPISMA CHEMICZNE O CHARAKTERZE NAUKOWYM ORAZ ZWIĄZANE TEMATYCZNIE Z CHEMIĄ

Chemia w Polsce jest tą dyscypliną naukową, która od wielu lat zajmuje w rankingach światowych relatywnie wysoką pozycję. Z tej racji od wielu lat chemicy polscy mają stosunkowo łatwą drogę do publikowania w czasopismach zagranicznych. Wskazuje na to stale rosnąca liczba prac publikowanych przez polskich uczonych nawet w najlepszych czasopismach zagranicznych. Pomimo to liczba czasopism chemicznych i o tematyce zbliżonej do chemii stale w Polsce rośnie i chociaż poprawia się z roku na rok ich poziom, to dystans nawet do średnich czasopism zagranicznych wydłuża się.

Najwyższą rangę wśród krajowych czasopism mają te które są wydawane w językach obcych, przeważnie angielskim oraz te które są recenzowane. Najczęściej czasopisma z tej grupy (A i B, Tabela 1,2) są rozpoznawane na rynku międzyna-

rodowym, rzadko jednak są prenumerowane przez biblioteki zagraniczne. Niektóre z wielkim trudem osiągają miejsca na t.zw. Liście Filandelfijskiej, posiadają Impact Factor i są dość wysoko punktowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (KBN), co jest ważne dla oceny placówek naukowo-badawczych w Polsce.

W grupie A, czasopism wydawanych w języku obcym (przeważnie angielskim) wymienić można 16 tytułów (Tabela 1), wydawanych z różną częstotliwością, jako miesięczniki, dwumiesięczniki, kwartalniki, półroczniki i roczniki. W ostatnich latach zaczęły się ukazywać „Annals of the Polish Chemical Society” (vol. 3, 2004), w których drukowane są referaty, komunikaty i postery wygłaszane na Zjazdach PTCh. (w języku angielskim).

Tabela 1. (Grupa A), Czasopisma wydawane w języku angielskim, lub angielskim i polskim, lub niemieckim

Lp	Tytuł czasopisma	Forma wydawnicza *	Nakład	IF **	Uwagi dot. dystrybucji
1.	Polish Journal of Chemistry	M	245	0.515	W bibliotekach 150 egz.
2.	Chemia Analityczna – Chemical Analysis	D	230	0.415	134/biblioteki
3.	Polimery	M	500	0.474	450/prenumerata
4.	Polish Journal of Environmental Studies	D	300	0.461	144/biblioteki
5.	Inżynieria Chemiczna i Procesowa – Chemical and Process Engineering	K	180	0.110	76/biblioteki
6.	Nukleonika (International Journal of Nuclear Research)	K	300	0.231	65/biblioteki/ wymiana
7.	Polish Journal of Applied Chemistry (poprzednio Chemia Stosowana)	K	150	–	44/biblioteki
8.	Polish Journal of Chemical Technology	K	400	–	25/biblioteki/ wymiana
9.	Acta Chromatographica	R	350	–	50/biblioteki
10.	Chemia i Inżynieria Ekologiczna	M	350	–	98/biblioteki 205/prenumerata
11.	Polish Journal of Pharmacology	D	250	–	81/biblioteki 23/wymiana
12.	Archives of Thermodynamics	K	220	–	30/biblioteki 120/prenumerata 30/wymiana
13.	Oceanological and Hydrobiological Studies	K	320	–	153/wymiana
14.	Annual Report 2002 Institute of Atomic Energy	R	200	–	–
15.	Annual Report 2002 Institute of Nuclear Chemistry and Technology	R	250	–	–
16.	Annals of the Polish Chemical Society	R	400	–	–

* M – miesięcznik; D – dwumiesięcznik; K – kwartalnik; R – rocznik

** IF – impact factor, współczynnik wpływu w 2004 roku

Z tej grupy czasopism w czołówce krajowej lokują się te, które osiągnęły, choćby niewielki współczynnik wpływu (ang. *impact factor*, IF) są recenzowane i zadbały o obecność na półkach bibliotecznych. Wśród tych czasopism polskich od wielu lat w czołówce lokuje się „Polish Journal of Chemistry” (dawniej „Roczniki Chemii”), miesięcznik wydawany w języku angielskim w nakładzie około 250 egzemplarzy (ponad 150 egz. w bibliotekach). Zbliżoną pozycję zajmuje „Chemia Analityczna – Chemical Analysis” (dwumiesięcznik, nakład około 230 egz., ponad 130 egz. w bibliotekach). Obydwa czasopisma wychodzą pod szyldem Polskiego Towarzystwa Chemicznego chociaż Polish Journal of Chemistry od lat nie korzysta z pomocy finansowej PTChem.

Kolejne czasopismo „Polimery” (miesięcznik, nakład ok. 500 egz.) tematycznie związane do problematyki naukowej i technologicznej związanej z polimerami, przoduje w konkurencji z innymi czasopismami o orientacji naukowo-technicznej i przemysłowej, wśród których wyróżniają się dwa inne czasopisma: „Polish Journal of Chemical Technology” (kwartalnik, nakład około 400 egz.) i „Polish Journal of Applied Chemistry” (kwartalnik, nakład około 150 egz.) jednak obydwa bez tzw. współczynnika wpływu.

Z innych czasopism, które zostały dostrzeżone na tzw. Liście Filadelfijskiej są: „Polish Journal of Environmental Studies”, „Inżynieria Chemiczna i Procesowa”, „Chemical and Process Engineering” i „Nukleonika”.

Wśród czasopism o charakterze przemysłowym należy wymienić „Przemysł Chemiczny”, miesięcznik wydawany w nakładzie około 750 egz. dość powszechnie obecny w bibliotekach zagranicznych mimo że wydawany jest w języku polskim. Pozostałe czasopisma zarówno te z grupy A jak i B (Tabela 1 i 2) istnieją na rynku ze zmiennym szczęściem walcząc zarówno o środki finansowe jak i o autorów i czytelników.

Wydaje się, że odrębną i dość wysoką pozycję wśród polskojęzycznych czasopism chemicznych zajmują „Wiadomości Chemiczne” (dwumiesięcznik, wydawany w nakładzie około 500 egz. z czego ponad 300 egz. w bibliotekach i u indywidualnych prenumeratorów) oraz czasopismo „Chemicz – Nauka, Technika, Rynek”, bardzo starannie wydawane jako miesięcznik w nakładzie około 600 egz. Pierwsze z tych czasopism jest monopolistą na polskim rynku, jako chemiczne czasopismo przeglądowe – drugie, doskonale upowszechnia i popularyzuje ogólne problemy chemii, zarówno od strony techniki jak i rynku.

Osobną, bardzo ważną rolę, chociaż adresowaną do określonych odbiorców mają czasopisma o charakterze edukacyjnym (np. „Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia” i „Chemia w Szkole”) lub związanych z szeroko pojętą ekologią i ochroną środowiska jak „Ochrona Środowiska” (nakład około 1500 egz.), „Ochrona Powietrza i Problemy Odpadów” (nakład około 600 egz.), „AURA”, miesięcznik wydawany w nakładzie około 15000 egz.

Tabela 2. (Grupa B), Czasopisma wydawane w języku polskim

Lp	Tytuł czasopisma	Forma Wydawnicza *	Nakład	IF **	Uwagi dot. dystrybucji
1.	Przemysł Chemiczny	M	750	0,515	365/biblioteki 150/wymiana
2	Wiadomości Chemiczne	D	500	–	320/biblioteki/ prenumerata
3	Chemik. Nauka, Technika, Rynek	M	600	–	50/biblioteki/wymiana reszta prenumerata przez firmy
4	Biotechnologia	K	650	–	Biblioteki/ prenumerata
5	Ochrona Środowiska	K	1500	–	1380/prenumerata 120/biblioteki/ wymiana
6	Postępy Biochemii	K	800	–	580/prenumerata 120/biblioteki
7	Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia	R/2	315	–	230/prenumerata 40/biblioteki/wymiana
8	Chemia w Szkole	D	4850	–	Prenumeraty Biblioteki
9	Nafta – Gaz	M	500	–	250/biblioteki 20/prenumerata 30/wymiana
10	Ochrona powietrza i problemy odpadów	D	600	–	–
11	AURA – ochrona środowiska	M	15000	–	1300/biblioteki/ prenumerata

* M. – miesięcznik; D – dwumiesięcznik; K – kwartalnik; R – rocznik

** IF – impact factor, współczynnik wpływu w 2004 roku

Czasopisma zebrane w grupie C (Tabela 3) to przeważnie wydawnictwa o charakterze lokalnym (zeszyty naukowe poszczególnych uczelni lub instytutów badawczych) ukazujące się najczęściej jako roczniki i dość nieregularnie. Obserwując dynamikę wydawniczą tych czasopism można sądzić o malejącej aktywności wydawców i nie wykluczone, że te czasopisma mogą zniknąć z rynku w najbliższej przyszłości.

Przykłady czasopism o charakterze popularno-naukowym i reklamowym przedstawiono w Tabeli 4 (Grupa D).

Osobną grupę wydawnictw zajmują serie wydawnicze książek, i monografii o charakterze naukowym i dydaktycznym ale nie typu podręczników (Grupa E, Tabela 5).

Tabela 3. (Grupa C), Zeszyty naukowe (wydawane przez Uczelnie lub Instytuty Badawcze)

Lp	Tytuł czasopisma	Forma Wydawnicza *	Nakład	Uwagi dotyczące dystrybucji
1.	Chemia – Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej	R	140	78/prenumeraty 27/biblioteki 35/wymiana
2	Inżynieria Chemiczna i Procesowa – Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej	R**	140	40/biblioteki 20/wymiana
3	Chemia Spożywcza i Biotechnologia – Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej	R	100	40/prenumerata 31/biblioteki 29/wymiana
4	Chemia i Ochrona Środowiska – Prace Naukowe WSP w Częstochowie	R	200	18/biblioteki
5	Technologia Żywności (seria) Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie	R	100	–
6	Barwniki. Środki Pomocnicze	K	100	26/prenumerata 20/biblioteki
7	EKOPLAST – Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Szczecińskiej	R/2	300	12/biblioteki 25/wymiana

* K – kwartalnik; R/2 – półrocznik; R – rocznik; R** – edycja nieregularna

Tabela 4. (Grupa D), Czasopisma o charakterze popularno-naukowym, komercyjnym, reklamowym, technicznym, problematyce laboratoryjnej itp.

Lp	Tytuł czasopisma	Forma Wydawnicza *	Nakład	Uwagi dotyczące dystrybucji
1.	LAB – Laboratoria, Aparatura, Badania	D	3500	842/firmy/uczelnie 86/biblioteki 53/prenumeraty
2	Analityka – nauka i praktyka	K	3000	–

* K – kwartalnik; R – rocznik

Tabela 5. Wydawnictwo: Education in Advanced Chemistry (Grupa E)

Lp.	Tytuł woluminu	Nakład	Wydawca/Edytor
1	Vol. 1. Principles and Advances in Molecular Catalysis	650	Poznań-Wrocław / B. Marciniak, J.J. Ziółkowski
2	Vol. 2. Organometallics and Molecular Catalysis	500	Poznań-Wrocław / B. Marciniak
3	Vol. 3. Environmental Chemistry and Protection	500	Poznań-Wrocław / J.J. Ziółkowski
4	Vol. 4. Pollution Abatement Through Cleaner Technologies	350	Kraków / Z. Stasicka
5	Vol. 5. Biological and Chemical Waste Treatment Technologies	300	Poznań-Wrocław / B. Marciniak
6	Vol. 6. Mechanistic Aspects of Molecular Catalysis	400	Poznań-Wrocław / B/ Marciniak
7	Vol. 7. Perspectives in Coordination Chemistry	500	Poznań-Wrocław / A.M. Trzeciak, P. Sobota, J.J. Ziółkowski
8	Vol. 8. Organotransition Metal Chemistry and Catalysis	450	Poznań-Wrocław / B. Marciniak

Według wiedzy autora może być w Polsce takich wydawnictw sporo chociaż trudne są do zidentyfikowania ze względu na sposób dystrybucji i bardzo często lokalny zasięg ich wykorzystania (często do celów szkoleniowych, dydaktycznych).

Przykładem tego typu wydawnictwa jest seria pt. „Education in Advanced Chemistry” wydawana przez Uniwersytety w Poznaniu i we Wrocławiu. Dotychczas ukazało się 8 voluminów z tej serii w latach 1993–2002 w nakładach 300–600 egz., kolejne tomy ukażą się w 2005 i 2006 roku.

Spora liczba czasopism wymienionych w grupie E to czasopisma fachowe, związane z chemią, analityką, chemią przemysłową i rynkiem chemicznym. Są one omówione w Części II.

CZĘŚĆ II. CZASOPISMA NAUKOWO-TECHNICZNE W ZAKRESIE CHEMII PRZEMYSŁOWEJ

Ostatnie 15-lecie charakteryzowało się znacznym ożywieniem rynku wydawniczego w obszarze periodyków dotyczących chemii stosowanej i przemysłowej, co przeczy powszechnie głoszonej tezie o znaczącym spadku czytelnictwa w Polsce. Wśród przyczyn tego ożywienia można wymienić nie tylko zmianę ogólnych uwarunkowań życia społecznego i gospodarczego (brak ograniczeń w zaopatrzeniu w papier, zniesieniu cenzury), ale również ożywienie gospodarcze, przejawiające się w tworzeniu nowych firm, głównie małych i średnich przedsiębiorstw, zainteresowanych dostępem do informacji naukowo-technicznej związanej zwłaszcza z pracami prowadzonymi w krajowych instytutach naukowo-badawczych i uczelniach. Rozwój rynku periodyków w zakresie chemii stosowanej i przemysłowej odbywał się w sposób żywiołowy i był w dużym stopniu wynikiem decyzji podejmowanych przez przedsiębiorstwa, stowarzyszenia, a nawet osoby fizyczne, które spodziewały się odniesienia sukcesu wydawniczego i utrzymania się na rynku. Niniejsza analiza stanu polskiego czasopiśmiennictwa naukowo-technicznego w zakresie chemii przemysłowej i działów pokrewnych obejmuje 65 tytułów. W związku z dużym zróżnicowaniem czasopism ich charakterystykę sporządzono uwzględniając następujące kryteria:

- dziedzina chemii przemysłowej,
- charakter (prace oryginalne naukowo-badawcze, prace naukowo-techniczne, prace popularno-naukowe i techniczno-ekonomiczne),
- częstotliwość wydawania (miesięczniki, dwumiesięczniki, kwartalniki, roczniki),
- typ wydawcy (instytuty, uczelnie, stowarzyszenia, formy prywatne).

1. CHARAKTERYSTYKA CZASOPISM

W związku z szerokim zakresem pojęcia „chemia przemysłowa” czasopisma zgromadzone zostały w 10 grupach tematycznych (Tabela 6).

Tabela 6. Grupy tematyczne czasopism z zakresu chemii przemysłowej

Lp.	Zakres tematyczny	Liczba czasopism
1.	Ochrona środowiska	13
2.	Tworzywa sztuczne	11
3.	Paliwa, energia, surowce mineralne	9
4.	Informacje dla branży chemicznej (tematyka ogólno-chemiczna)	6
5.	Włókiennictwo	5
6.	Chemia rolna (nawozy i ochrona roślin)	5
7.	Technologie, aparatura i inżynieria chemiczna	4
8.	Ochrona przed korozją	4
9.	Materiały i technologie budowlane	4
10.	Kosmetologia, medycyna, farmacja, tłuszcze	4

Ad. 1. Największą grupę stanowią czasopisma podejmujące problematykę **ochrony środowiska** (13), co pokrywa się z dużym zainteresowaniem tym tematem nie tylko w Polsce, ale również na świecie. W połowie są to czasopisma naukowo-techniczne wydawane przez stowarzyszenia branżowe i uczelnie, zawierające artykuły naukowo-badawcze, przeglądowe, opracowania techniczne i materiały z konferencji naukowych. Reszta to czasopisma popularnonaukowe, wydawane przez wydawnictwa prywatne. Oprócz artykułów naukowych zawierają one informacje praktyczne, przedstawiają firmy i ludzi tworzących branżę, prezentują fachowe informacje o zmieniających się uwarunkowaniach prawnych w dziedzinie ochrony środowiska i gospodarki odpadami. Dużo miejsca poświęcane jest dostosowaniu polskich przepisów prawnych do wymogów Unii Europejskiej. Wśród tej grupy czasopism znajdują się: jeden rocznik, dwa półroczniki, trzy kwartalniki, cztery dwumiesięczniki i trzy miesięczniki.

Ad. 2. Następną grupę stanowią czasopisma, prezentujące tematykę **tworzyw sztucznych** i zastosowania w praktyce (11). Są to w połowie czasopisma naukowo-techniczne wydawane przez instytuty i wydawnictwa uczelniane, zawierające prace badawcze, artykuły przeglądowe, a także informacje o konferencjach branżowych. W tej grupie znajduje się wydawane przez Instytut Chemii Przemysłowej czasopismo „Polimery”, wpisane na Listę Filadelfijską i posiadające Impact Factor. Czasopismo

jest również wysoko punktowane przez KBN (Tabela 7). Reszta to magazyny poświęcone tematyce tworzyw sztucznych i opakowań w aspekcie techniczno-ekonomicznym i marketingowym, wydawane przez wydawnictwa prywatne. Zdecydowana większość to miesięczniki i dwumiesięczniki. Poza nimi jedno czasopismo to kwartalnik, wydawany przez Akademię Medyczną we Wrocławiu i jedno to półrocznik, wydawany przez Politechnikę Szczecińska.

Ad. 3. **Paliwa, energia i surowce mineralne** to zagadnienia podejmowane przez następną grupę czasopism (9). Ponad połowa z nich (5) to czasopisma naukowo-techniczne, prezentujące artykuły naukowe o współczesnym stanie wiedzy w tej dziedzinie. Pozostałe to magazyny techniczno-ekonomiczne, poświęcone zagadnieniom związanym z produkcją i przetwórstwem ropy naftowej i gazu, elektroenergetyką, ciepłownictwem, bezpieczeństwem chemicznym, bieżącymi informacjami z branży w kraju i na świecie. Większość czasopism wydawana jest przez instytuty naukowe i stowarzyszenia branżowe. Zaledwie dwa magazyny wydawane są przez wydawców prywatnych. Ponad połowa (5) to miesięczniki, resztę stanowi jeden rocznik („Annual Report”, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej) i trzy kwartalniki.

Ad. 4. Kolejną grupę stanowią czasopisma prezentujące **ogólne informacje dla branży chemii przemysłowej** (6). Zaledwie dwa z nich to czasopisma naukowo-techniczne, zawierające część naukową, w której zamieszczane są artykuły naukowo-badawcze i przeglądowe oraz część informacyjną. Wśród nich jest miesięcznik „Przemysł Chemiczny” wpisany na Listę Filandelfijską i posiadający Impact Factor. Czasopismo to jest również wysoko punktowane przez KBN (Tabela 7). Drugie czasopismo to miesięcznik „Chemik”. Oba tytuły wydawane są przez Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Pozostałe to magazyny techniczno-ekonomiczne, prezentujące najważniejsze wydarzenia branżowe w kraju i na świecie, opisujące firmy działające na rynku, analizujące sytuację i perspektywy poszczególnych segmentów branży. Wydawane są przez wydawnictwa prywatne. Wszystkie tytuły z tego segmentu to miesięczniki.

Ad. 5. Temat **włókiennictwa** (5) podejmowany jest w większości przez czasopisma instytutów włókienniczych w Łodzi i Poznaniu. Prezentują one zagadnienia przemysłu włókienniczego w artykułach naukowo-badawczych i przeglądowych, a także informacje o branżowych konferencjach i targach. Jedno z tej grupy czasopism, wydawane przez Instytut Włókien Naturalnych, kwartalnik „Fibres&Textiles in Eastern Europe”, znajduje się na Liście Filandelfijskiej i posiada Impact Factor (Tabela 7). Jest ono również wysoko punktowane przez KBN. Tylko jeden magazyn wydawany jest przez Wydawnictwo SIGMA-NOT i ma charakter techniczno-ekonomiczny. Oprócz informacji z zakresu technologii włókienniczych zawiera także wiadomości o działalności zakładów produkcyjnych, Polskiej Izby Przemysłu Teksylnego, rozmowy i opinie z przedstawicielami przemysłu i gospodarki. Jest to również jedyny miesięcznik w tej grupie. Przeważają kwartalniki.

Ad. 6. **Chemia rolna** to następna grupa czasopism (5) z zakresu chemii przemysłowej. W większości są to czasopisma naukowe, wydawane przez instytuty naukowo-badawcze. Prezentują artykuły naukowe związane z nawożeniem i ochroną roślin, publikują prace i referaty z konferencji, a jedno z nich, miesięcznik „Przemysł nawozowy”, wydawany przez Instytut Nawozów Sztucznych, ma charakter bieżącego informatora biblioteczno-dokumentacyjnego. Jedno z czasopism, kwartalnik „Pestycydy”, wydawane przez Instytut Przemysłu Organicznego, znalazło się w rankingu KBN i czyni starania do wpisania na Listę Filandelfijską. Tylko jedno czasopismo wydawane jest przez wydawcę prywatnego. Ma ono formę poradnika dla producentów rolnych ze szczególnym uwzględnieniem bezpiecznego stosowania środków ochrony roślin i nowych rozwiązań technologicznych.

Ad. 7. Następną grupą tematyczną prezentowaną w czasopismach są **technologie, aparatura i inżynieria chemiczna** (4). Dwa z nich to ściśle naukowe, zawierające artykuły naukowo-badawcze z zakresu technologii chemicznej i technologii pokrewnych, inżynierii i aparatury chemicznej. Jedno wydawane jest przez Politechnikę Szczecińską (anglojęzyczny kwartalnik „Polish Journal of Chemical Technology”), a drugie przez Oficynę Wydawniczą SIMPRESS z Gliwic (dwumiesięcznik „Inżynieria i Aparatura Chemiczna”). Dwa kolejne to czasopisma popularno-naukowe, łączące naukę z praktyką. Oprócz opublikowanych prac naukowych zawierają one artykuły o charakterze poradnikowym, informacje o firmach zaopartujących laboratoria w aparaturę, odczynniki, prezentują sylwetki osób z branży, podają terminy seminariów, zjazdów i konferencji. Wydawane są przez wydawnictwa prywatne.

Ad. 8. Kolejną dziedziną chemii przemysłowej podejmowaną na łamach czasopism jest **ochrona przed korozją** (4), obejmująca tematykę technik i technologii przygotowania powierzchni, produkcji farb i lakierów oraz technologii zabezpieczeń przeciwkorozyjnych. Tylko jedno czasopismo ma charakter ściśle naukowy. Jest to wydawana przez Instytut Mechaniki Precyzyjnej „Inżynieria Powierzchni”. Pozostałe to magazyny popularno-naukowe, prezentujące oprócz kilku artykułów naukowych i opisów bibliograficznych, informacje o nowych surowcach i technologiach, bieżących wydarzeniach w branży w kraju i na świecie, terminach konferencji i sympozjów.

Ad. 9. Materiały i technologie budowlane to jeszcze jedna dziedzina **chemii przemysłowej** (4). Czasopisma o tej tematyce to w większości miesięczniki naukowo-techniczne wydawane przez Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Materiałów Budowlanych i Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych. Jedyne kwartalnikami w tym segmencie są „Prace Instytutu Techniki Budowlanej”, prezentujące dorobek naukowy i techniczny pracowników tego instytutu.

Ad. 10. Ostatnią analizowaną grupę stanowią czasopisma o tematyce pokrewnej chemii przemysłowej (4), obejmującej **kosmetologię, farmację, medycynę i prze-**

mysł tłuszczowy. Dwa tytuły („Inżynieria Biomateriałów” i „Tłuszcze jadalne”) to czasopisma ściśle naukowe, publikujące prace naukowe i przeglądowe naukowców polskich, a w przypadku: Inżynierii Biomateriałów” również zagranicznych. Pierwsze wydawane jest przez Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów, drugie przez Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego. Dwa kolejne („Kosmetyka i Kosmetologia” i „Pharmaceutika”) to czasopisma popularno-naukowe, skierowane do lekarzy, farmaceutów, kosmetyczek prezentujące najświeższe informacje z branży w kraju i na świecie, publikujące artykuły poświęcone zagadnieniom technicznym i prawnym tej dziedziny przemysłu, a także wypowiedzi specjalistów.

W niektórych czasopismach, niezależnie od podejmowanej przez nie tematyki, zamieszczane są artykuły o sytuacji w przemyśle chemicznym w aspekcie ekonomicznym. Poruszają one m.in. tematykę prywatyzacji lub restrukturyzacji polskich przedsiębiorstw branży chemicznej, ich funkcjonowania w zintegrowanej Europie, a także prezentują perspektywy i prognozy dla branży. Mogą to być artykuły przekrojowe, dotyczące całej branży chemicznej lub też poszczególnych jej segmentów. Do czasopism tych należą: „Przemysł Chemiczny”, „Chemik”, „Chemical Review”, „Reporter Chemiczny”, „Rynek Chemiczny”, a także „Plastic Review”, „Nafta&Gaz Biznes”, „Przegląd Włókienniczy” i „Materiały Budowlane”.

Źródłem utrzymania wielu rozpatrywanych czasopism są reklamy i artykuły sponsorowane. Czasopismom bez wpływów z reklam, mimo prezentowania wysokiego poziomu merytorycznego coraz trudniej utrzymać się na rynku. Faktem jest, że w czasopismach naukowych i naukowo-technicznych, wydawanych przez wyższe uczelnie lub stowarzyszenia naukowo-techniczne, bardzo często w małym nakładzie, reklam nie ma lub pojawiają się sporadycznie. W zasadzie wszystkie czasopisma podejmujące tematykę włókiennictwa, chemii rolnej i ochrony przed korozją oraz przeważająca część czasopism z pozostałych opisywanych grup tematycznych, nie korzysta z dofinansowania komercyjnego. Z finansowania takiego korzystają natomiast wysokonakładowe czasopisma, wydawane przeważnie przez wydawców prywatnych. Są to wydawane przez wydawnictwo Business Image w nakładzie 5500 egz. czasopisma: „Chemical Review”, „Plastic Review” i „Recycling Review”. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku miesięcznika „Nafta&Gaz Biznes” wydawanego przez USI Poland Sp. zo.o. w nakładzie 7000 egz. i miesięcznika „Packaging Polska” wydawanego przez European Media Group w nakładzie 5000 egz. W tej grupie plasują się również: miesięcznik „Rynek Chemiczny” (4500 egz., Instalator Polski Sp. o.o.), kwartalnik „Analityka” (300 egz., Wydawnictwo Malamut), dwumiesięcznik „LAB Laboratoria (3500 egz. Wydawnictwo Eureka), i dwumiesięcznik „Kosmetyka i Kosmetologia”, wydawany przez Polskie Stowarzyszenie Kosmetyczne.

Należy tu jednak wspomnieć, że z rynku wydawniczego docierają sygnały o bardzo bezwzględnym sposobie pozyskiwania reklam między innymi poprzez stosowanie systemu podwójnych prowizji.

2. OCENA MERYTORYCZNA CZASOPISM

Podstawą oceny merytorycznej jest pozycja czasopisma w rankingu międzynarodowym (Lista Filandelfijska) i krajowym (punktacja KBN). Ze względu na dużą zbieżnością obu tych rankingów została sporządzona jedna lista czasopism, przedstawiona w Tabeli 7.

Tabela 7. Ranking czasopism naukowo technicznych z zakresu chemii przemysłowej i działów pokrewnych

Lp.	Tytuł czasopisma	Wydawca	Lista Filandelfijska ISSN	Impact Factor 2002	Impact Factor 2003	Punktacja KBN
1.	Polimery	Instytut Chemii Przemysłowej	0032-2725	0,703	0,474	8
2.	Przemysł Chemiczny	SITPChem	0033-2496	0,180	0,296	7
3.	Fibres&Textiles in Eastern Europe	Instytut Włókien Chemicznych	1230-3666	0,148	0,160	7
4.	Polish Journal of Ecology	Centrum Badań Ekologicznych PAN				4
5.	Polimery w Medycynie	Akademia Medyczna we Wrocławiu				3
6.	Inżynieria Biomateriałów	Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów				2
7.	Karbo	Wydawnictwo Górnicze Sp.zo.o.				2
8.	Natural Fibres	Instytut Włókien Naturalnych				2
9.	Ochrona Powietrza i Problemy Odpadów	Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Hutniczego				2
10.	Chemia i Inżynieria Ekologiczna	Towarzystwo Chemii i Inżynierii Ekologicznej				0,5
11.	Inżynieria i Ochrona Środowiska	Wydawnictwa Politechniki Częstochowskiej				0,5
12.	Ochrona Środowiska	Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych				0,5
13.	Pestycydy	Instytut Przemysłu Organicznego				0,5
14.	Przegląd Włókienniczy: Włókno, Odzież, Skóra	Wydawnictwo SIGMA-NOT				0,5

Pozostałe czasopisma, nie ujęte w Tabeli 7, nie zostały zakwalifikowane do rankingu KBN. Spośród nich na uwagę zasługują: „Inżynieria Powierzchni”, „Ochrona przed Korozją”, „Elastomery” i „Polimery w Medycynie”. Być może celowe byłoby objęcie tych czasopism rankingiem KBN.

Innym źródłem oceny wartości merytorycznej analizowanych czasopism jest ich dostępność w międzynarodowych bazach danych. W Tabeli 8 zestawione zostały czasopisma ujęte w czterech bazach danych: CA Chemical Abstracts (Columbus, Ohio, USA), RAPRA (Londyn, W. Brytania), CEABA (Dechema, Frankfurt/Main, Niemcy) oraz TEMA (DOMA, TOGA, WEMA – Frankfurt/Main, Niemcy). W przypadku bazy CA ujęty został tylko „Przemysł Chemiczny”, który znajduje się na liście *1500 key scientific journals* oraz na liście 1300 czasopism opracowywanych *cover-to-cover*. Baza RAPRA dotyczy głównie czasopism z zakresu polimerów i tworzyw sztucznych, baza CEABA czasopism z zakresu aparatury, inżynierii i technologii chemicznej oraz biotechnologii, a baza TEMA dotyczy problematyki ogólnotechnicznej (materiały konstrukcyjne, tekstylia, budowa maszyn). We wszystkich przypadkach kwalifikacja poszczególnych czasopism do ujęcia w bazach oparta była na merytorycznej ocenie ich wartości.

Tabela 8. Polskie czasopisma z zakresu chemii przemysłowej w zagranicznych bazach danych

Tytuł czasopisma	Baza danych			
	Chemical Abstracts (CA) (Ohio, USA)	CAEBA (Dechema, Frankfurt/Main, Niemcy)	TEMA (Frankfurt/Main, Niemcy)	RAPRA (Londyn, W. Brytania)
Polimery		x	x	x
Przemysł Chemiczny	x	x		
Inżynieria i Aparatura Chemiczna		x		
Karbo		x		
Techniczne Wroby Włókiennicze			x	
Przegląd Włókienniczy			x	
Elastomery				x
Fibres&Textiles in Eastern Europe				x

3. PODSUMOWANIE – WNIOSKI

Połowa czasopism z zakresu chemii przemysłowej i działów pokrewnych, będących przedmiotem oceny, w części II ma charakter naukowy lub naukowo-techniczny. Wydawane są one przez instytuty, stowarzyszenia naukowo-techniczne i uczelnie. Jedenaście z nich wydawanych jest przynajmniej częściowo w języku angielskim, z czego cztery („Nafta-Gaz”, „Journal of Natural Fibers”, „Polimery” i „Inżynieria Biomateriałów”) rozprowadzane są również za granicą. Trzy tytuły: „Fibres & Textiles in Eeastern Europe”, „Polimery” i „Przemysł Chemiczny”, znajdują się na

Liście Filandelfijskiej i posiadają Impact Factor, a także są wysoko punktowane przez KBN. Ponad połowę wszystkich analizowanych czasopism (38) stanowią miesięczniki lub dwumiesięczniki, dwadzieścia tytułów to kwartalniki, reszta (7) to wydawane przez instytuty lub wydawnictwa uczelniane półroczniki i roczniki.

Szeroki wybór czasopism naukowo-technicznych z zakresu chemii stosowanej i przemysłowej stwarza Czytelnikom możliwość wyboru i zmusza, w pewnym sensie, poszczególne czasopisma do dodatkowych wysiłków w celu sprostania konkurencji na rynku. Jednakże stan taki jest, w dużej części, wynikiem rozdrobnienia zaplecza badawczego w przemyśle chemicznym i braku ścisłych więzi między poszczególnymi ośrodkami naukowo-badawczymi i uczelnianymi. Uporządkowanie rynku wydawniczego będzie zapewne możliwe dopiero wówczas, gdy nastąpi restrukturyzacja i konsolidacja tego zaplecza (J. Kijeński, *Przemysł Chemiczny*, 2004, **83**, 463–468). Informacje publikowane w poszczególnych czasopismach często dublują się, a przeznaczane na ich wydawanie środki publiczne (pochodzące nie tylko z KBN, ale również z budżetów poszczególnych instytutów naukowo-badawczych i wyższych uczelni) są niepotrzebnie tracone. Również poziom merytoryczny wielu czasopism tej grupy (biuletynowo-informacyjnych) pozostawia wiele do życzenia. W czasopismach wydawanych przez instytucje prywatne poziom prac jest też często niski, ale wobec niskiego poziomu wiedzy chemicznej w społeczeństwie mogą one pełnić funkcję popularyzatorską, tyle, że finansowaną z własnych środków i na własne ryzyko.

CZĘŚĆ III. MIEJSCE POLSKICH CZASOPISM CHEMICZNYCH W EUROPIE

Komitet Polskiej Akademii Nauk zainicjował ostatnio debatę nad perspektywami polskiego czasopiśmiennictwa chemicznego po wejściu do Unii Europejskiej.

Chciałbym podzielić się garścią refleksji na kanwie toczącej się dyskusji.

Na wstępie należy uzmysłwić sobie jak przedstawia się sytuacja w interesującej nas dziedzinie w Europie, a właściwie na świecie, na przełomie wieków.

Pierwsza refleksja dotyczy procesu zmniejszania się znaczenia czasopism narodowych, poza Stanami Zjednoczonymi, zapoczątkowanego już na początku lat 90. ubiegłego wieku. W chemii skutkowało to powstaniem konsorcjów ponadnarodowych, głównie europejskich (choć nie tylko) z jednoczesnym likwidowaniem tradycyjnych tytułów znanych chemikom od wielu dziesiątków lat. Tak powstały – a „European Journal” czy „European Journal of Organic Chemistry” i „European Journal of Inorganic Chemistry”, czemu towarzyszyło zniknięcie z rynku części narodowych czasopism niemieckich, francuskich, włoskich, belgijskich, holenderskich, itd. Podobnie przedstawia się konsolidacja brytyjsko-skandynawska. Wspomniana wyżej wyjątkowa sytuacja czasopism amerykańskich też nie uniknęła wpływu zmian zainicjowanych w Europie, „Journal of the American Chemistry Society” czy „Journal of Organic Chemistry” bardziej otworzyły się za granicę, nie tylko liberalizując zasa-

dy dostępu do publikowania, ale także wprowadzając do swych rad redakcyjnych uczonych spoza Ameryki.

Druga ważna do dostrzeżenia na rynku wydawniczym tendencja, to przesunięcie akcentów z czasopism ogólnochemicznych na specjalistyczne periodyki poświęcone ważnym i dynamicznie rozwijającym się gałęziom chemii.

Trzecim wyznacznikiem analizowanych zmian jest proces „elektronizacji” już istniejących czasopism oraz powstawanie nowych, w pełni elektronicznych tytułów takich jak europejskie „Molecules”, amerykańskie „Arkivoc” czy środkowoeuropejskie (regionalne lecz ponadnarodowe) „Central European Journal of Chemistry”. Problem pierwszy, związany z czasopismami ukazującymi się w formie tradycyjnej (papierowej), polega na pełnej elektronizacji procesu przesyłania materiału do publikacji, opracowania redakcyjnego i korespondencji z autorami. Natomiast problem drugi dotyczy nowych, w pełni elektronicznych czasopism, które czy nam się to podoba czy nie, będą rezultatem zachodzącej transformacji.

Zastanówmy się więc jak w zaistniałej, i co ważniejsze wysoce dynamicznej, sytuacji powinno działać polskie środowisko chemiczne, będące zresztą od niedawna pełnoprawnym uczestnikiem europejskiej rodziny naukowej. Pogłębiona diagnoza możliwa będzie po bardziej wszechstronnej analizie i wnikliwszej dyskusji środowiskowej. Z dzisiejszej perspektywy wydają się ważne cztery zagadnienia, które chemicy polscy powinni dostrzec i podjąć próby ich rozwiązania.

Pierwsze to rozważenie wejścia do istniejących już europejskich struktur chemicznego czasopiśmiennictwa podstawowego, związanych z ruchem towarzystw naukowych. Decyzja w tej sprawie powinna być wypracowana przez Polskie Towarzystwo Chemiczne.

Problem drugi wiąże się z koniecznością podjęcia polskich (być może regionalnych) inicjatyw dotyczących powstania specjalistycznych czasopism o zasięgu przynajmniej europejskim. Inicjatywy takie mogą mieć szanse powodzenia jedynie w przypadkach, gdy wpływają one od chemików reprezentujących gałęzie wiedzy uprawiane w Polsce na bardzo wysokim, światowym poziomie.

Trzecie zagadnienie jest ściśle związane z poprzednim i dotyczy „ściągnięcia” kapitału międzynarodowego (środków unijnych) umożliwiającego realizację uzasadnionych merytorycznie inicjatyw. W zakres ten wchodzi również promowanie na rynku polskim inicjatyw komercyjnych, pod jednym wszelako warunkiem, że dotyczą one zagadnień o wysokim poziomie merytorycznym, zweryfikowanym przez środowisko naukowe.

I wreszcie problem będący warunkiem *sine qua non*: powodzenie każdego z przedstawionych wyżej możliwych przedsięwzięć, a mianowicie wprowadzenie, po konsultacji ze środowiskiem, czytelnych zasad finansowania wydawnictw centralnych (Ministerstwo Nauki i Informatyzacji) oraz lokalnych (Samorządy!?).

Po tej krótkiej i nie pretendującej do ogólności analizie, wydaje się, że sprawa polskiego czasopiśmiennictwa wymaga szybkiego i kompetentnego potraktowania zarówno przez środowisko naukowe jak i przez władze odpowiedzialne za rozwój nauki w Polsce. Byłoby to wprawdzie drobną lecz ważną cegiełką w procesie po-

rządkowania, badzo ostatnio zaniedbanych spraw nauki w Polsce, szczególnie w świetle bardzo ważnej roli jaką nauce motorowi rozwoju przyznaje Unia Europejska.

W przygotowaniu tego opracowania, szczególnie Części I udział brała p. mgr Jadwiga Kędzierska.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 lutego 2005

FELIETON NAUKOWY



NOTATKI CHAOTYCZNE
LV. PROFESOR ZAMOJSKI I „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

Ignacy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 22 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 7 książek, 270 prac oryginalnych i ponad 100 artykułów przeglądowych oraz dotyczących

historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”.

Już cały rok minął od chwili śmierci profesora Aleksandra Zamojskiego. Zmarł 23 lutego 2004 roku. W rocznicę Jego śmierci ukazał się specjalny zeszyt „Polish Journal of Chemistry”, który wypełniły prace kolegów i przyjaciół Zmarłego. Trzeba, aby i „Wiadomości Chemiczne” przyłączyły się do tych głosów. Nie będę tutaj pisał o naukowych zasługach Olka. Zrobili to już bardziej kompetentni w tej sprawie Koledzy. Powiem tylko, że przecież najdobitniej o tych zasługach świadczy pozostawiona przez Zmarłego szkoła naukowa. Fakt, że aż dwóch Jego uczniów znalazło się w gronie członków Polskiej Akademii Nauk, najlepiej świadczy o jej walorach. Chcę natomiast opowiedzieć tutaj o bardzo ważnej roli, jaką Zmarły odegrał w trudnych chwilach, jakie przeżywało w swoim czasie nasze wydawnictwo. Były to chwile, które decydowały o naszym być lub nie być. O roli Zmarłego w tym trudnym momencie niewiele innym wiadomo. Myślę, że właściwie jestem jedyną osobą, która może i powinna o tym opowiedzieć.

Wieloletnia zażyłość, jaka łączyła mnie z Olkiem, ugruntowała się na gruncie spraw „Wiadomości Chemicznych” właśnie. Przez szereg lat był On przewodniczącym Rady Redakcyjnej naszego miesięcznika. Potem interesował się jego losami jako wiceprezes i prezes Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Mnie zaś przyszło jesienią 1983 roku objąć redakcję „Wiadomości”. Rocznik 1984 był pierwszym rocznikiem, jaki podpisałem jako redaktor naczelny. A Olek był wtedy właśnie przewodniczącym Rady Redakcyjnej. Zaczęliśmy się zresztą częściej spotykać już wcześniej, bo mój poprzednik, profesor Bobrański, lubił zabierać mnie ze sobą do Warszawy, na spotkania, jakie tam się w sprawach „Wiadomości” odbywały, a to w gronie Rady Redakcyjnej, a to prezydium Zarządu Głównego PTCh. – Dobrze by było – mówił profesor Bobrański – aby pan ze mną pojechał. A ja, rzecz jasna, nie mogłem przecież odmówić.

Profesor Bobrański redagował nasz miesięcznik przez okres trzydziestu kilku lat. Nie sposób zaprzeczyć, że to właśnie on ostatecznie ukształtował profil czasopisma, nadając mu cechy akademickiego czasopisma przeglądowego, o walorach organu naukowego. Szczerze zresztą powiedzmy, profil ten i dzisiaj nie uległ znacznijszym zmianom. Ale fakt, że profesor Bobrański tak długo czasopismo prowadził, nie budził w Warszawie entuzjazmu. W dodatku zdarzył się przypadek dwukrotnego wydrukowania tego samego artykułu. – Co zrobić – mówił Profesor Bobrański – teść nie dopatrywał. Bo teść profesora, kilkanaście lat jeszcze od niego starszy, był sekretarzem redakcji. Można sobie wyobrazić jakaż to była woda na młyn naszych krytyków. Nie ukrywajmy bowiem, że na wspomnianych spotkaniach „Wiadomości” mocno krytykowano. Do naszych krytyków należał również Olek Zamojski. Miał on własną wizję czasopisma. Chciał, by je przekształcić w coś w rodzaju angielskiego „Chemistry in Britain”, gdzie obok krótkich doniesień o najnowszych odkryciach i osiągnięciach naukowych zamieszczane by były wiadomości z życia środowisk chemicznych, informacje o uczonych i ich działaniach, o ich biografiiach wreszcie. Tyle, że my dość szybko zrozumieliśmy, że takie czasopismo może wydawać grupa zawodowych dziennikarzy-chemików a nie zespół oparty na pracy,

w gruncie rzeczy, społecznej, pracujący przecież bezinteresownie. A na zespół zawodowy nigdy nie było (i nie będzie) środków. Więc zbieraliśmy kolejny raz ciężki krytyki i wracaliśmy ze świadomością, że tak na prawdę to niczego nie da się zmienić.

Olek zgłaszał też pod naszym adresem różne propozycje, które mogły by służyć udoskonaleniu tego co już jest, bez jakiegś gruntownej rewolucji. Żeby artykuły były krótkie i łatwe tym samym do przeczytania. Żeby treści zeszytów ożywić wywiadami z wybitnymi uczonymi. Żeby ich skłonić do pisania dla „Wiadomości” osobistych wspomnień. Żeby „Wiadomości” stały się organem „do czytania” a nie tylko „do studiów”.

Dobrze rozumiałem te postulaty. Mój własny ojciec przez całe swoje życie zbierał książki. Miał ich w swojej nauczycielskiej bibliotece coś pod dwa tysiące, co było już niemało, jak na wiejskiego nauczyciela. W Chicago, dokąd rzuciła go przed pierwszą wojną światową przymusowa emigracja polityczna, zostawił, wracając do kraju, koło czterystu, jak twierdziła matka, książek. Kiedy ojca już w roku 40. nie stało, gospodarowaliśmy jak tylko się nam zachciało, w tej górze książek. Była to, jak powiedziałem, biblioteka nauczycielska. Było tam sporo literatury pięknej, sporo dzieł historycznych i broszur politycznych przeróżnych orientacji, ale większość półek zajmowały oprawione roczniki a to „Przyjaciela szkoły”, a to zeszyty „Pracy w klasach łączonych”, i podobne wydawnictwa. Książki w ojcowej bibliotece dzieliliśmy więc na dwie kategorie: na „książki do czytania” i „książki nie do czytania”. Te ostatnie zaś przeważały. Więc dobrze rozumiałem Olka i Jego nalegania, by uczynić „Wiadomości” bardziej „do czytania”.

Ale trzeba też powiedzieć, że wśród naszych krytyków byli i tacy, którzy uważali, że czasopismo nasze nie jest potrzebne polskiemu środowisku chemicznemu i najlepiej by było, gdyby wydawania zaniechać. No, chyba, gdyby ukazywało się w języku angielskim. Dopiero po pewnym czasie zrozumiałem, że takie głosy rodziły się z naturalnej różnicy kondycji, jaka musiała zaistnieć pomiędzy chemikami pracującymi w szkołach wyższych a pracującymi w instytucjach panowskich. Ci ostatni nastawieni byli, zresztą słusznie, na zdobycie międzynarodowego uznania. Wyczyn naukowy był dla nich rodzajem wyczynu sportowego w ostrej konkurencji międzynarodowej. Nie mieli codziennego styku z młodzieżą studencką, ani z potrzebami pracy dydaktycznej. – Dobrze – odpowiadałem więc takim krytykom – będziemy wydawać „Wiadomości” po angielsku, ale dopiero wtedy, kiedy będziemy po angielsku prowadzić wykłady i inne zajęcia, przewidziane programem studiów. Póki co natomiast potrzebne nam jest jakieś forum, choćby dla kształtowania polskiego języka w naukach chemicznych. Większość zresztą publikowanych przez nas materiałów nadsyłali pracownicy szkół wyższych. Ich opracowania wynikały z reprezentowanej tam tematyki badawczej, tematyki, w której rozwijaniu uczestniczyli studenci, a zwłaszcza magistranci. Publikowane przez nas materiały nabierały tym samym waloru pomocy dydaktycznej dla prowadzonych tam prac. Dyskusje, o których opowiadam, były właśnie dlatego pomocne, że zdaliśmy sobie sprawę

z rzeczy podstawowej, z tego, dla kogo czasopismo wydajemy. Że jest ono czasopismem akademickim, nastawionym na potrzeby młodzieży studenckiej i młodej kadry naukowej.

Olek Zamojski nigdy nie reprezentował takich likwidatorskich poglądów. Był krytykiem czasopismu życzliwym i chciał tylko, by je ulepszyć, tak by było chętniej i szerzej czytane. Był też zapewne trochę rozczarowany naszym (moim?) konserwatyżmem. I wreszcie sam w jakiejś mierze swoje wydawnicze idee zrealizował, uruchamiając „Orbital”, którego był przecież twórcą i głównym autorem.

Dziś, gdy te dyskusje dawno już przebrzmiały, był „Wiadomości”. Jeśli byłby zagrożony, to tylko z przyczyn ekonomicznej natury. Ja natomiast chcę tu wrócić do początków mojej pracy redaktorskiej. To co mnie na prawdę wtedy zdumiało, to fakt, że tak mało zależało od naszych własnych decyzji. Bo na codzienną pracę redakcji wpływały niezależne od nas decyzje aż dziewięciu bodaj instytucji. Nadzór nad wydawnictwem sprawował Zarząd Główny PTCh i jego Prezydium. No i także powołana do tego celu Rada Redakcyjna. Ale o naszych finansach decydował Wydział Wydawnictw PAN, cała więc sprawa finansów wydawnictwa pozostawała poza nami. Potrzebny nam papier przydziałała odpowiednia Centrala na wniosek wspomnianego już Wydziału. A redakcję techniczną sprawował wrocławski oddział PWN i tam była nasza redakcja techniczna. Tyle, że oddział nie miał własnej drukarni i zlecał tę robotę Wrocławskiej Drukarni Dziełowej. Wcześniej jednak musiał wystąpić do Urzędu Cenzury o zezwolenie na druk. Inna rzecz, że tamtejsi urzędnicy nie zadawali sobie trudu studiowania niezrozumiałych dla nich tekstów i dość mechanicznie stawiali swoją pieczęć. A dalej był jeszcze kolportaż. Ten załatwiała przedsiębiorstwo Ruch, ale tylko w zakresie krajowym. Kolportażem zagranicznym bowiem zawiadywała Ars Polona. W rezultacie nikt nie był w stanie powiedzieć, jaki jest i jaki powinien być nakład wydawnictwa, ile zeszytów realnie się rozchodzi, ilu mamy czytelników za granicą, ile dostaniemy papieru i jakie będą niezbędne nakłady finansowe. Poza tym, jak wiemy, każdy dodatkowy decydent to potencjalny zator, przeszkadzający regularnej pracy. Kiedy ta sytuacja uległa radykalnej zmianie nie mogliśmy przez długi czas odtworzyć ani listy prenumeratorów, ani oszacować realnie wielkości potrzebnego nakładu.

Cała ta skomplikowana budowa runęła w 1989 roku. Z dnia na dzień Akademia zaniechała finansowania czasopism towarzystw naukowych. To wydarzenie miało miejsce gdzieś na przełomie lat 1989 i 1990. Pamiętam, że niedługo potem w Warszawie i Łodzi odbywało się polsko-amerykańskie spotkanie naukowców pracujących nad chemią biopolimerów. Spotkałem tam Olka, wtedy już chyba prezesa Zarządu Głównego PTCh. Wiedział o zgotowanej nam klęsce i razem poszliśmy do sekretarza naukowego odpowiedniego wydziału PAN, aby nam jakoś pomógł. Sekretarzem był wtedy profesor Zielenkiewicz. Ale wszystko, co od niego uzyskałem to była tylko taka rada: teraz są takie czasy, że redaktor czasopisma musi być nie tylko redaktorem merytorycznym, ale i musi się nauczyć być biznesmenem i same-mu zdobyć potrzebne mu środki. Wróciłem do Wrocławia bardzo zgnębiony. I wte-

dy po jakimś czasie zatelefonował do mnie Olek. – Ty wiesz – powiedział – dowiedziałem się, że fundusze wydawnicze Akademia podzieliła pomiędzy swoimi instytucjami, z zaleceniem, aby je wykorzystano do celów wydawniczych. A wasz wrocławski Instytut Badań Strukturalnych dostał tyle i tyle milionów. Spróbuj uzyskać z tego coś dla „Wiadomości”. Suma była niemała, bo i był to czas wielkiej inflacji.

I to był telefon, który uratował nasze wydawnictwo. Dyrektorem Instytutu Badań Strukturalnych był wtedy profesor Jan Klamut, z którym dobrze się znałem. Wybrałem się zaraz do niego. – Jakie tam pieniądze, jakie pieniądze? – próbował się dziwić. Ale przecież Olek uzbroił mnie w bardzo konkretne dane. Wtedy Jan powiedział – no to i co z tego, że mam te pieniądze. Ale mogę je przeznaczyć na inne ważne cele. To moja sprawa i moja decyzja. Musiałem użyć argumentów ostatecznych. – Jak chcesz – powiedziałem Janowi – ale wtedy wydawnictwo przejmie Warszawa. Wiedziałem, że mogę liczyć na jego wrocławski patriotyzm. Szybko więc ustaliliśmy o jaką sumę chodzi i jak ją naszemu wydawnictwu przekazać. Aby zaś wszystko było w porządku od strony formalnej, zgodziłem się aby na okładce, zgodnie ze stanem faktycznym, widniał wrocławski instytut jako współwydawca czasopisma. Olek zżymał się na to ostatnie postanowienie. – Nie mogłeś – mówił mi – jakoś inaczej tego załatwić? – Przecież – oponowałem – profesor Klamut musi być w porządku od tej formalnej nawet strony. Przecież nie może nam tej, dużej zresztą sumy, po prostu podarować. Ta sprawa wywołała też niechętnie głosy na posiedzeniu Zarządu Głównego PTCh. Ale o tym wiem już tylko ze słyszenia.

Tak więc dwóch ludzi, Olek Zamojski i Janek Klamut, uratowało istnienie „Wiadomości Chemicznych”, których upadek był w zaistniałych warunkach nieunikniony. Janowi kilka lat temu za to publicznie dziękowałem. Do roli Olka mogę teraz odnieść się tylko wspomnieniem. A był to przecież czas, kiedy skończyły swój żywot liczne, niekiedy bardzo zasłużone wydawnictwa. Sam osobiście zetknąłem się z dwoma takimi wydarzeniami. W roku 1989 zostałem członkiem Rady Redakcyjnej miesięcznika „Człowiek i Światopogląd”. Nie powiem by mi to nie sprawiło sporej satysfakcji. Radę tę stanowił kwiat polskiej humanistyki. Przewodniczył jej profesor Z. Cackowski, filozof, mój przyjaciel z lat młodzieńczych. A członkami byli m.in. J. Baszkiewicz, M. Fritzhand, J. Kmita, J. Ładosz, Wł. Markiewicz, J. Tazbir, J. Topolski, W. Tyloch. Nauki przyrodnicze reprezentował A. Urbanek, a ja byłem bodaj jedynym reprezentantem nauk ścisłych. Po pewnym czasie redaktor naczelny, Z. Słowik, zaproponował mi, żebym napisał do tego czasopisma coś ze swojej dziedziny. Napisałem spory tekst z chemii białek. Dziś nie pamiętam już nawet jego tytułu. Ale nim doszło do druku, czasopismo upadło, przestało się ukazywać. Cóż – żał mi było tego tekstu. Minęło ze dwa lata i przetworzyłem ten tekst na artykuł do „Problemów”. „Problemy” – ktoś z kolejnych pokoleń polskiej młodzieży nie miał w rękę tego tak zasłużonego dla kultury narodowej czasopisma? Czytywałem je jako licealista w latach jeszcze 40., gdy wychodziło pod redakcją Tadeusza Unkiewicza. Do dziś pamiętam niektóre artykuły, jak ten profesora Łubnickiego, o człowieku zawieszonym pomiędzy makro- i mikroświatem, albo ten o czwar-

tym wymiarze, autorstwa bodaj profesora Piekary. „Problemy” chętnie wzięły mój materiał, ale cóż, na piątym zeszycie rocznika 1993 zakończyły swój żywot i mój tekst znów się nie mógł ukazać.

Na tym tle szczególnie wyraźnie widać, że „Wiadomościom” się jeszcze powiodło i tym jaskrawiej uwidacznia się rola, jaką w naszych kłopotach odegrali profesorowie Zamojski i Klamut. Jan okazał się też niezwykle cennym sprzymierzeńcem w kolejnym naszym kłopotcie. Nasz wydawca, oddział wrocławski PWN, prządlł coraz cienie i bardzo chciał się nas pozbyć. No i w końcu całkiem odmówił nam dalszych usług. Ratunek widziałem w wydawnictwie Ossolineum. Dyrektorem był tam inny dobry kolega, Eugeniusz Adamczak. Wybraliśmy się do niego na rozmowę, z profesorem Klamutem właśnie. U Adamczaka też było krucho, ale bardzo potrzebował pieniędzy. – Jak mi – powiedział – zapłacicie za pół roku z góry, to was wezmę. I zaczął się prawdziwy targ o to, jaka suma wydawnictwo Ossolineum zadowolili. Wszyscy trzej byliśmy dobrymi kolegami, to też z pewnym zdumieniem przysłuchiwałem się dalszej rozmowie. Właściwie tylko Jan ją prowadził. Miał potem o to do mnie pretensję. – Siedziałeś – mówił – jak niemowa. Przecież to była twoja a nie moja sprawa. Cóż – kompletnie nie byłem przygotowany do rozstrzygnięcia jakichkolwiek finansowych kwestii.

Ale nasza dalsza egzystencja zyskała w ten sposób mocne podstawy. Przekazaną nam przez Instytut Badań Strukturalnych kwotę umieściliśmy na własnym koncie redakcji w Banku Handlowo-Kredytowym SA. Ten nowopowstały bank dawał niebotyczne oprocentowanie wkładów. Nie ukrywam, poszliśmy na pewną spekulację. Było to ryzykowne, bo wkłady w tym banku nie były gwarantowane. Ale z tego nie zdawaliśmy sobie sprawy; cóż ja wtedy wiedziałem o funkcjonowaniu banków? I otóż, po pewnym czasie wyczytałem w miejscowej prasie, że bank jest bliski krachu. Zatelefonowałem do Olka. Aż jęknął. – A mówiłem ci – krzyknął prawie – żebyś tego nie robił! Tej ryzykownej operacji finansowej mianowicie. Nie pamiętam, pewnie mi i mówił. Musieliśmy szybko działać. Udałem się do dyrektora oddziału krakowskiego Banku Przemysłowo-Handlowego. Był uprzedzony i przyjął mnie bardzo życzliwie. W ciągu doby dokonaliśmy transferu wszystkich naszych środków na nowe konto w tym właśnie banku. I tam jesteśmy i dziś. Wprawdzie oprocentowanie było tam niższe, ale warto było zapłacić za spokój i gwarancję wkładu.

Miałem wtedy i tę satysfakcję, że zatelefonował do mnie profesor Jedliński, podówczas redaktor naczelny „Chemii Stosowanej”. – Bo, widzi pan – powiedział – chodzą słuchy, że potrafiłiście wzorcowo rozwiązać kwestie finansowania wydawnictwa. Niech mi pan opowie, jak to zrobiliście. Konto w Banku Handlowo-Kredytowym otwarliśmy w końcu roku 1990. Przenosiny zaś do Banku Przemysłowo-Handlowego odbyły się na początku roku 1992. Własne konto, które zresztą pozwoliło nam nieco nawet zarabiać, całkowicie zmieniło naszą rolę. Bo teraz sami musieliśmy decydować o nakładzie, płacić wszelkie rachunki, organizować kolportaż, no i w ogóle, być panem we własnym domu.

Tymczasem w Warszawie zebrały się nad nami ciemne chmury. Olek nie był już wtedy prezesem Towarzystwa, i nowe władze zorganizowały dobrze zresztą przygotowaną naradę nad naszymi losami. Uczestniczyło w tej naradzie całe prezydium ZG i cała Rada Redakcyjna. Zaproszono ekspertów i młodszych kolegów z Uniwersytetu Warszawskiego, redaktorów ukazującego się tam popularno-naukowego czasopisma chemicznego, które, nie ukrywajmy, przeżywało ostre trudności finansowe. Znow padły dobrze mi znajome argumenty o konieczności zmiany profilu „Wiadomości”. Ale wszystkich zaskoczyło oświadczenie eksperta, który powiedział, że z obowiązku (bo całość naszych materiałów recenzował dla odpowiedniej naukowo-informacyjnej instytucji niemieckiej) czyta „Wiadomości” od deski do deski i znajduje tam bardzo wiele bardzo ciekawych pozycji. Bardzo mi pomógł ten nieoczekiwany sprzymierzeniec. Ja zaś zirytowałem się trochę. – Macie – powiedziałem – jako tako grający akordeon. Dlaczego chcecie go koniecznie przerobić na trąbkę? Intencje młodych naszych krytyków były natomiast zbyt wyraźne. Myśleli, wiedząc o naszej niezłej sytuacji finansowej, że coś z tego da się uszczknąć. Zapytałem ich zresztą wprost, czy w ich intencjach leży przejęcie funduszy po zlikwidowanych „Wiadomościach”. Nie zaprzeczyli. – Nie oddam – powiedziałem wtedy – z konta „Wiadomości” – nawet jednego grosza. Bo mi tego zrobić po prostu nie wolno. I właściwie na tym się wyczerpał program tej narady.

Olek był obecny na tej naradzie. Krótko rozmawiałem z nim potem w kuliarach. – Ty nie mogłeś – gderał – wymyślić jakiegoś innego muzycznego instrumentu, tylko tę trąbkę!

Nie będę też ukrywał, że rady i propozycje Olka w jednej przynajmniej sprawie odbiły się na moim własnym udziale w pracach nad „Wiadomościami”. Nie da się oowiem zaprzeczyć, że z ducha tych rad właśnie poczęły się moje „Notatki chaotyczne”. Jeśli więc moim Czytelnikom się one podobają, to niechże zdadzą sobie sprawę z tego, że powstały one z inspiracji Olka Zamojskiego. Napisałem ich już sporo, ale gdzieś w okolicach kolejnej, już piętnastej, powziąłem zamiar zaprzestania dalszej roboty. Wtedy ówczesny prezes ZG, prof. Konarski, spowodował przyznanie mi za tę twórczość Medalu Skłodowskiej-Curie. Z sugestią, żebym pisał dalej. To zobowiązywało i oto jesteśmy już przy notatce o numerze LV. Medal odbierałem na Zjeździe PTCh, w auli Politechniki Wrocławskiej. Siedzieliśmy tam z Olkiem obok siebie. Potem odszedłem na chwilę, aby odznaczenie odebrać. Wracam, a tu Olek palcem łzę spod oka wyciera. Wzruszył się. Jeśli dalej kontynuuję tą moją przygodę z „Notatkami”, to może z racji i tego ulotnego wspomnienia?

Przy tej okazji chciałbym choć w ten sposób naprawić pewne zaniedbanie. Olek opowiadał mi kiedyś o swoim ojcu, lekarzu w Poznaniu. Wertując materiały XIII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, jaki się odbył w 1929 roku w Wilnie, napotkałem wzmiankę o udziale w zjeździe S. Zamojskiego z Poznania. Wspomniałem o tym Olkowi. – To mógłby być rzeczywiście – powiedział – mój tata. Przyslij mi, jeśli możesz, ksero tego dokumentu. Nie udało mi się tego zrobić, bo gdzieś ze szczętem „zadziałem” tą informację. Odnalazłem ją dopiero niedawno. Zamieszczam więc ją tutaj, w postaci kserokopii.

10. Sekcja

Fizjologii, Patologii doświadczalnej, Farmakologii i Chemii fizjologicznej.

Gospodarze: *M. Eiger, M. Seńkowski i S. Stengalewicz*; sekretarz: *E. Czarnacki*.

Sala posiedzeń — Sala wykładowa Zakładu Fizjologii U. S. B. Zakretowa 23, Telefon 67.

Posiedzenie I.

Czwartek, dnia 26.IX. godz. 16—19.

Uroczyste uczczenie pamięci s. p. prof. Napoleona Cybulskiego w dziesiątą rocznicę jego śmierci.

1. *Czubański Fr.* (Warszawa) — Zmiany właściwości krwi (składniki morfotyczne, PH, krzepliwość) pod wpływem czynników nerwowych.
2. *Gutowski B. i J. Wałowski* (Warszawa) — O zmianach PH krwi żyłnej i tętnicznej w okresie wydzielania soku żołądkowego.
3. *Gutowski B. i Zawadzki Br.* (Warszawa) — Wpływ długotrwałej czynności wydzielniczej żołądka na zagęszczenie jonów wodorowych (H⁺).
4. *Modrakowski J. i Lentz R.* (Warszawa) — Wpływ sztucznej kwasicy i alkalozy na szybkość opadania czerwonych ciałek i zawartość białka w osoczu i surowicy oraz przepuszczalność naczyń włosowatych
5. *Dąbrowski S. i Deryng B.* (Poznań) — Dopuszczalne błędy w oznaczeniu stężenia ciał we krwi, moczu oraz wydajności nerki dla określenia stałej Ambarde.
6. *Mozołowski W.* (Lwów) — Zasady purynowe mięśni i krwi.
7. *Moraczewski W.* (Lwów) — Pęcznienie żelatyny w roztworach soli i kwasach.
8. *Łapa W. i Zamojski S.* (Poznań) — Oznaczenie rezerwy alkalicznej we krwi metodą miareczkową i gazometryczną.

Stronica z programu obrad XIII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich w Wilnie, 26–29 IX 1929

Śmierć przyjaciół to sprawa bolesna. Ale cóż, należymy do roczników, które właśnie są powoływane. Kiedyś, w czasie asystenckiej młodości miałem kolegę, który studia odbył w Krakowie. Opowiadał nam, jak lubili śledzić poranne spacery profesora Skarżyńskiego. Był to — to informacja dla młodzieży — nasz wybitny biochemik, złotousty wykładowca. Słuchałem go tylko raz, na inauguracyjnym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, i było to niezapomniane przeżycie. — Więc — mówił nasz kolega, ten z Krakowa — szedł profesor Skarżyński ulicami Krakowa i przystawał pod każdym murem kościelnym. Stał tam chwilę i szedł dalej. A kościołów w Krakowie wiadomo ile. Więc pytam kolegę, który był tam ze mną. Po co on tak przystaje? Wiadomo, mówi kolega, patrzy czy to jego rocznik już powołują.

Wspomnijmy więc kolegę i przyjaciela, którego powołano przed rokiem.

Z HISTORII CHEMII

**PROFESOR EDWARD SUCHARDA
I JEGO SZKOŁA**

**PROFESSOR EDWARD SUCHARDA
AND HIS SCHOOL**

Anna Sucharda-Sobczyk

*ul. Smoluchowskiego 52/5
50-372 Wrocław*

Dr Anna Sucharda-Sobczyk chemik-organik (spektroskopia molekularna) wieloletni kierownik Centralnego Laboratorium Chemicznej Analizy Instrumentalnej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Prof. Edward Sucharda (1891–1947) po ukończeniu w r. 1912 studiów chemicznych w Szkole Politechnicznej we Lwowie (późniejsza Politechnika Lwowska) rozpoczął pracę jako asystent u prof. Stefana Niementowskiego w Katedrze Chemii Organicznej. W 1914 r. doktoryzuje się na podstawie pracy pt. „Kwasy 8-oksychinoliny i ich przetwory. Dwuoksyantrachinon- 3.7-dwuoksychinolina”, a sześć lat później, mając lat 29 – habilituje (rozprawa pt. „5.6.8-trójoksybenzofityrydyna i jej utlenianie do pochodnych 1.8-naftyrydyny”), po czym obejmuje Katedrę Chemii Ogólnej na Wydziale Rolniczo-Lasowym Politechniki Lwowskiej. Po roku uzyskuje tytuł profesora nadzwyczajnego, a po dwóch latach, w wieku 32 lat zostaje profesorem zwyczajnym. W 1925 r. obejmuje kierownictwo Katedry Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki, którą kieruje do roku 1945 (podczas okupacji sowieckiej – Lwowski Instytut Politechniczny, podczas okupacji niemieckiej – Technische Fachkurse).

W czasie pierwszej wojny światowej był dwukrotnie wcielany do armii austriackiej; jeden rok pracował wówczas jako chemik w fabryce amunicji w Blumau pod Wiedniem. W 1918 r. powrócił do Lwowa, wstąpił do Wojska Polskiego i uczestniczył aktywnie w Obronie Lwowa (m.in. jako kierownik warsztatów saperskich). Kilka miesięcy spędził w Warszawie pracując w Głównym Urzędzie Zaopatrzenia Armii. W 1944 r. zaarrestowany przez NKWD przebywał w więzieniu przez 4 miesiące, następnie poprzez Kraków (kierownictwo Laboratorium Badawczego Lasów Państwowych, organizująca się Politechnika Śląska z siedzibą w Krakowie) przyjechał do Wrocławia.



Prof. dr hab. Edward Sucharda

We Wrocławiu od 1 września 1945 r. podjął prace organizacyjne na Uniwersytecie i Politechnice, pełniąc funkcję prorektora. Był kierownikiem Katedry Chemii Organicznej, dojeżdżając równocześnie na Politechnikę Śląską w Gliwicach (kierownictwo Katedry Chemii Organicznej).

W działalności naukowej prof. **Suchardy** dają się wyróżnić cztery główne kierunki jego zainteresowań. Pierwszy był związany z chemią azotowych związków heterocyklicznych, który przejął od swego nauczyciela prof. **Niementowskiego**. Obejmował on opracowywanie syntez wielopierścieniowych związków aza-aromatycznych: pochodnych naftyrydyny, fenantroliny. Kolejne ważne prace, to syntezы indygooidów na drodze *orto*-kondensacji. Otrzymał pirydynową pochodną niebieskiego indyga i później, wspólnie z Edwinem **Płażkiem** (1926–27) jego siarkowy analog (δ -tiopyrindigo).

Z Bogusławem **Bobrańskim** (1927) opracował syntezę niepodstawionej naftyrydyny, a z L. Klisieckim serię jej 1.5-pochodnych. W kolejnej pracy z **Bobrańskim** otrzymał 1.3-dioksy-benzo-2.5-naftyrydynę. Z A. Konopnickim (1927) opracował prostą metodę otrzymywania kwasu akrydynowego, zaś z **Płażkiem** w 1928 r. opublikował pracę o bromowaniu pochodnych pirydyny, a także syntezę analogów pirydynowych barwników trifenylometanowych. Z C. **Troszkiewiczem** (1932) opisał pirydynowe połączenia siarki, a z W. Jaroszewiczem (1935) opublikował nową syntezę sym-tri-5-pirydylo-benzenu.

W roku 1934 wspólnie z H. **Kuczyńskim**, J. Surmińskim, T. **Mazońskim** i T. Mieleckim opisał reakcje (wysokociśnieniowe, w zatopionych rurach) otrzymywania pochodnych fenantrolin i chlorofenantrolin z odpowiednich nitrozwiązków.



Pracownicy Katedry Chemii Organicznej Politechniki Lwowskiej, Lwów ok 1930 r
Siedzą od lewej Czesława Troszkiewicz, prof Edward Sucharda
Stoją od lewej drugi – Bogusław Bobrański i kolejno Tadeusz Mazoński i Edwin Płazek

Kontynuatorem badań nad chemią pirydyny i jej pochodnych był pierwszy doktorant **Suchardy** – Edwin **Plażek**, późniejszy profesor chemii Wydziału Rolniczo-Lasowego Politechniki Lwowskiej i Politechniki Wrocławskiej (dziekan), z którym wspólnie w latach 1927–28 opublikowali cztery znaczące prace.

Prof. Edwin **Plażek** działalność naukową całego swojego życia związał z chemią azotowych związków heterocyklicznych, głównie pirydyny. Znacząca jest jego spuścizna pod postacią 73 oryginalnych prac naukowych, 11-tu opracowań i trzech książek. Pozostawił po sobie szkołę naukową – licznych współpracowników – uczniów, z których siedmiu uzyskało stopnie profesorskie. W większości kontynuowali oni, a także ich następcy, tematykę związaną z chemią organiczną heterocyklicznych związków azotowych.

Jeszcze we Lwowie, na Wydziale Rolniczo-Lasowym Politechniki, **Plażek** opublikował wspólnie z Z. Rodewaldem serię prac o tej tematyce. Już we Wrocławiu wspólnie z J. Richterem badał benzosulfonamidowe pochodne pirydyny, a różnorakiej jej pochodne były przedmiotem jego publikacji z T. Batkowskim, A. Inasińskim, H. Kozdrój, J. Baryckim i K. Lewicką.

We współpracy z Romanem **Tyką**, późniejszym profesorem chemii Politechniki Wrocławskiej zajmował się **Plażek** syntezami pochodnych fosforowych pirydyny, którą to tematykę rozpoczął jeszcze w roku 1934 we Lwowie.

Najbliższymi, wieloletnimi współpracownikami Edwina **Plażka** byli Tadeusz i Zofia **Talikowie**, późniejsi profesorowie chemii Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Zofia **Talikowa** opublikowała 123 oryginalne prace, w tym 9 wspólnie z **Plażkiem**. Wypromowała pięciu doktorów, z których jeden habilitował się. Tadeusz **Talik** jest autorem 101 opublikowanych prac w tym pięciu wspólnych z **Plażkiem** (wypromował czterech doktorów). Tematyka wszystkich prac związana była ściśle z chemią pochodnych pirydyny.

W 1958 r. wspólnie z W. **Czuba**, E. **Plażek** zajmował się chemią nitrowych pochodnych pirydyny, usiłując otrzymać 2,6-dwunitropirydynę w syntezie analogicznej dla 3,5-dwunitropochodnej. Przeprowadzili pełną analizę nieoczekiwanego przebiegu reakcji. Władysław **Czuba** habilitował się na Politechnice Wrocławskiej, pracował na Wydziale Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu, a następnie objął Katedrę Chemii na Politechnice Krakowskiej i w końcu powrócił do Wrocławia. Wypromował dziewięciu doktorów, a po jego śmierci, wyhabilitowany dr. M. **Woźniak** przejął po nim krakowską Katedrę Chemii. **Czuba** kontynuował w swoich pracach tematykę związaną z azotowymi związkami heterocyklowymi.

Tematem wspólnych prac **Plażka** i J.S. **Wieczorka**, późniejszego docenta Politechniki Wrocławskiej, były syntezy i przemiany *N*-tlenków 2-dimetyloaminopirydyny. Przeprowadzili reakcje nitrowania i nitroazowania tych połączeń. O ile sam **Wieczorek** zajmował się chemią *N*-heterocykli, jego dwaj doktorzy przejęli tematykę chemii związków fosforowych.

Wspólnie z P. **Tomasikiem**, późniejszym profesorem chemii Akademii Rolniczej w Krakowie, Edwin **Plażek** poddawał redukcji pochodne 3,5-dinitropirydyny,

a także badał ruchliwość atomu chloru w jej 2-chloropochodnej. Piotr **Tomasik** doktoryzował się u prof. **Skrowaczewskiej**, habilitował się we Wrocławiu, a następnie pracował na Politechnice Częstochowskiej; potem objął w Krakowie Katedrę Chemii na Akademii Rolniczej. Chemia związków *N*-heterocyklicznych stanowi ok. 1/3 jego zainteresowań. W miarę upływu czasu pracy badawczej zainteresowania swoje skierował bardziej na aspekty fizyczne chemii organicznej i chemię skrobi. P. **Tomasik** ma obszerny dorobek i wypromował kilkunastu doktorów.

W publikacjach z W. **Śliwą** (późniejszym profesorem chemii Politechniki Częstochowskiej) zostały opisane syntezy sulfonamidów pochodnych diaminopirydyn; poszukiwano tu czynnych farmakologicznie analogów sulfametazyny i sulfamerazyny. Wanda **Śliwa** kontynuowała tematykę aromatycznych związków *N*-heterocyklowych. Wypromowała kilku doktorów.

Z L. **Kuczyńskim** opublikował **Płażek** prace na temat ruchliwości atomu bromu w 3-bromo- i 3-bromo-5-nitropirydynach.

Współpracownikiem E. **Suchardy** jeszcze we Lwowie, w latach 1931–38 była Zofia **Skrowaczewska**, późniejszy profesor chemii organicznej Politechniki Wrocławskiej. Ogłosili wspólnie prace opisujące syntezę s-tripirydylobenzenu (1936) i nową metodę sulfonowania amin aromatycznych (1946). Z. **Skrowaczewska** doktoryzowała się w roku 1949 u prof. **Płażka** i przez wiele lat już jako samodzielny pracownik naukowy kontynuowała „lwowską” tematykę związaną z azotowymi heterocyklami. W okresie późniejszym swojej działalności naukowej włączyła się w syntezę związków fosforoorganicznych, a także badania nad melaminą. Od 1964 r. do przejścia na emeryturę kierowała Zakładem Chemii Organicznej Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej. Wypromowała wielu doktorów (wszyscy z dziedziny *N*-heterocykli), z których sześciu uzyskało już tytuły profesorów. Spośród nich: Jacek **Młochowski**, Lucjan **Achremowicz**, Piotr **Tomasik**, Wanda **Śliwa** i Jacek **Skarżewski**, podjęli w swych pracach, w pełni lub po części tematykę **Suchardy**, tzn. chemii azotowych związków heterocyklicznych. Dochowali się oni już i swoich następców, którzy również częściowo przejęli zapoczątkowaną jeszcze we Lwowie tematykę.

W latach 1950–65 prof. **Skrowaczewska** opublikowała metody otrzymywania pirydynowych pochodnych aldehydowych (z L. **Achremowiczem**), badała też reakcje redukcji nitropochodnych pirydyny (z H. Ban-Oganowską), przeprowadziła i zbadała reakcje nitrowania 2.4-lutydyn (z T. Batkowskim), a także pewne przegrupowania jej *N*-tlenków (z L. **Syperem**). Z L. **Achremowiczem** opracowała nowy sposób rozdzielania zasad pirydynowych. Z P. **Tomasikiem** serię pochodnych pirydynowych poddała badaniom spektroskopowym (UV) i polarograficznym.

Jacek **Młochowski**, późniejszy profesor chemii organicznej w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej w znaczącym stopniu był kontynuatorem lwowskiej tematyki; prowadził prace nad pochodnymi chinoliny, fenantroliny, 1.3.5-triazyny. W miarę upływu czasu tematykę rozszerzył na heterocykliczne związki selenowe. Okazały się one bardzo interesujące

i ważne z punktu widzenia zarówno chemicznego jak i biochemicznego. Ma bogaty dorobek naukowy, a spośród siedmiu doktorów, których wypromował, dwóch już się habilitowało.

Współpracownikiem **Suchardy** we Lwowie (i we Wrocławiu) był Leonard **Kuczyński**, późniejszy profesor Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej (dziekan, rektor). Współpracę rozpoczęli od pracy na temat sulfokwasów sulfonów aromatycznych, a kontynuowali we Wrocławiu w badaniach nad działaniem kwasu azotowego na pinen (terpeny) oraz nad ulepszeniem metody spalań związków organicznych (analiza ilościowa). W pracach L. **Kuczyńskiego** wielokrotnie przewija się tematyka pirydynowa. Zarówno jeszcze w okresie pracy na Politechnice Wrocławskiej dotyczącej ruchliwości chlorowców w pochodnych pirydyny, wspólnej z **Plaźkiem**, jak i później dotyczącej np. syntezy uroselektanu B z 2.6-lutydyny, a także metod rozdziału frakcji pikolinowej zasad pirydynowych, czy wreszcie syntezy nowych pochodnych pirydynowych o spodziewanym działaniu leczniczym.

Leonard **Kuczyński** wypromował kilkunastu doktorów (wielu spośród pracowników przemysłu farmaceutycznego), trzech z nich uzyskało stopnie profesorskie. Profesorowie: Adam **Nawojski**, Tadeusz **Zawisza** i Zdzisław **Machoń** (promotorzy odpowiednio: dwóch, jednego i trzech doktorów) prowadzili syntezy związków heterocyklicznych aktywnych biologicznie. Posiadają znaczący dorobek we wdrażaniu nowych leków w przemyśle farmaceutycznym.

U T. **Zawiszy** habilitował się Edwin **Wagner** – doktorant B. **Bobrańskiego**. Większość prac **Wagnera** związana jest z pochodnymi kwasu barbiturowego i diazynami. Prof. **Wagner** kieruje obecnie Zakładem Technologii Leków A.M. we Wrocławiu.

Druga całkowicie odrębna dziedzina zainteresowań prof. **Suchardy**, to analiza ilościowa związków organicznych. Wspólnie z B. **Bobrańskim** opracowali w roku 1927 modyfikację ebulioskopu W.Świętosławskiego pozwalającą na wykonywanie oznaczeń dla centygramowych ilości próbek. W 1928 r. zaprezentowali kompletną metodę oznaczania zawartości węgla i wodoru w związkach organicznych dla próbek 0,02–0,03 g. Równocześnie zaadoptowali metodę Pregla (oznaczanie azotu) również dla skali centygramowej. Prace te wywołały ogromne zainteresowanie na całym świecie, czego dowodem jest wydanie wyników w formie książkowej w kilku językach.

Do tematyki tej powrócił **Sucharda** po dziesięciu latach i wspólnie z C. **Troszkiewicz** (1938) opublikował metodę oznaczeń (węgla i wodoru) opartą na spalaniu w tlenie w obecności katalizatorów. A po wojnie, we Wrocławiu (1946), wobec ogromnych trudności aparaturowych opracował wspólnie z L. **Kuczyńskim** modyfikację metody spalań Liebiga.

Tematyka „analityczna” **Suchardy** jest wyraźnie kontynuowana w pracach samodzielnych B. **Bobrańskiego** zarówno jeszcze we Lwowie (1937), jak i już we Wrocławiu (1955–64). B. **Bobrański** opublikował na ten temat 5 prac, a także opracowanie monograficzne (tłumaczone na język rosyjski).

Bogusław **Bobrański** doktoryzował się u **Suchardy** w 1929 r. i tamże wykonał pracę habilitacyjną. Był profesorem na Oddziale Farmacji Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, a następnie po wojnie na Wydziale Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu (był dziekanem i rektorem uczelni, członkiem PAN). Obok prac „analitycznych” **B. Bobrański**, publikował prace na temat azotowych związków heterocyklicznych (pochodne pirydyny i chinoliny). Po wojnie centrum swoich zainteresowań skupił na kwasie barbiturowym i jego pochodnych.

Prof. **Bobrański** pozostawił po sobie 114 oryginalnych prac naukowych, 15 patentów, 3 podręczniki. Wypromował 16 doktorów, z których pięciu uzyskało tytuł profesora.

Danuta **Prelicz** była profesorem chemii na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wrocławiu, a także w Wyższej Szkole Wojsk Inżynieryjnych: wypromowała dwóch doktorów. I ona i prof. Tadeusz **Jakóbiec** oraz prof. Helena **Śladowska** (profesorowie chemii na Wydziale Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu) kontynuowali w znacznej mierze tematykę związaną z chemią pochodnych kwasu barbiturowego i pokrewnych związków heterocyklowych. M. **Konieczny** był profesorem w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. J. **Pomorski** – profesorem Wrocławskiej Akademii Medycznej. Ludwik **Syper**, doktorant **Bobrańskiego**, jest obecnie profesorem chemii w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.

Trzecią grupę zainteresowań stanowią zagadnienia o charakterze technologicznym. Ta problematyka chemii stosowanej pojawia się w zainteresowaniach E. **Suchardy** bardzo wyraźnie. W latach 1928–33 utrzymywał on bliskie kontakty z przemysłem naftowym (inż. B. Manasterski, Polmin, Drohobycz) i opracował techniczne udoskonalenia metod chlorowania gazu ziemnego, otrzymywania czterochloru węgla i chloroformu, chlorowania metanu, rafinacji olejów mineralnych, które to wyniki zaowocowały patentami.

Współpracował również z fabryką barwników „Boruta” w Zgierzu (prace dotyczące zastosowania difenylsulfonu w reakcji sulfonowania amin aromatycznych, także syntezy indygooidów). Interesował się otrzymywaniem w skali technicznej kwasu benzenosulfonowego (wspólnie z T. **Mazońskim**). Z W. Jaroszewiczem (1934) opracowywał syntezy środków silnie pieniących, z H. i L. **Kuczyńskimi** syntezy związków sulfonowych wyraźnie obniżających napięcie powierzchniowe. Z T. **Mazońskim** w roku 1936 opublikował cykl prac nad mechanizmem reakcji Skraupa – otrzymywania chloro- i oksy-pochodnych chinoliny z nitrobenzenu, które to prace miały aspekt praktyczny. Syntezy laboratoryjne były często opracowywane również w skali półtechnicznej.

Pracował osobiście nad ulepszeniami aparaturowymi, m.in. nad przyrządem do ekstrakcji ciecz przez ciecz, piecem termostatowym do ogrzewania rur zatopionych z automatyczną regulacją temperatury.

Prace o znaczeniu technologicznym kontynuowali jego współpracownicy i uczniowie: Tadeusz **Mazoński** i w pewnym stopniu Czesław **Troszkiewicz** – pro-

fesorowie Politechniki Śląskiej w Gliwicach, a także wspomniani już Zofia Skrowaczewska i Leonard Kuczyński.

Czesława Troszkiewicz, późniejszy profesor Katedry Chemii Organicznej Politechniki Śląskiej w Gliwicach współpracowała z E. Suchardą we Lwowie w latach 1931–39. Opublikowała z nim prace o tio- i sulfo-karbonowych kwasach pirydynowych i sulfonowaniu aminochinolin. Uczestniczyła również w pracach o charakterze analitycznym. Po wojnie, w 1946 r. jest współautorem pracy z Suchardą na temat otrzymywania pochodnych *p*-aminofenolu. Pracę doktorską obroniła we Wrocławiu u prof. Płażka. W Gliwicach kontynuowała badania nad syntezą i reaktywnością azotowych układów heterocyklicznych (J. Glinka, S. Goszczyński, B. Prajsnar, J. Suwiński, W. Zieliński). Opracowała nowe metody otrzymywania podstawionych chinolin i fenantrydyn z nienasyconych oksymów i ich estrów, a także połączeń z grupy akrydyn, pirazolopirydyn, indazoli, oksazoli. Prowadziła syntezę związków heterocyklicznych w oparciu o kwasy imidowe. C. Troszkiewicz zajmowała się również tlenowymi związkami heterocyklicznymi, głównie z grupy węglowodanów. W zakładzie przez nią kierowanym przeprowadzono około 20 przewodów doktorskich i kilka habilitacyjnych.

Tadeusz Mazoński współpracował z Suchardą we Lwowie w latach 1929–31 i 1934–37. Oprócz badań nad reakcją Skraupa opracowywali wspólnie techniczną metodę otrzymywania kwasu benzenosulfonowego, a także opisali metodę uzyskania z benzyny krakowej octanów amylu i heksylu. Mazoński był współautorem konstrukcji pieca do termostatycznego prowadzenia reakcji w rurach zatopionych. Jako późniejszy profesor organicznej technologii chemicznej Politechniki Śląskiej zawsze przejawiał zainteresowania chemią przemysłową. Już w czasie pracy na Politechnice Lwowskiej, daje się zauważyć jego wyraźne powiązanie z technologią (współpraca z prof. Leśniańskim w latach 1931–34 i 1937–40). Również w Gliwicach związał się naukowo z prof. Wacławem Leśniańskim i ściśle współpracował aż do jego śmierci.

Jego prace na Politechnice Śląskiej dotyczyły zagadnień przeróbki ropy naftowej (prof. M. Taniewski, doktorowie: A. Lachowicz, M. Otremba, K. Skutil, J. Krajewski), głównie poszukiwań wysoko aktywnych i wysoko selektywnych katalizatorów do procesów odwodarniania. Prowadził również prace nad pirolizą olefin oraz badania kinetyki i mechanizmu termicznego rozkładu alkanów, a także alkenów. W Zakładzie Przemysłowej Syntezy Organicznej zajmował się utlenianiem związków organicznych w fazie ciekłej (prof. Z. Kulicki, A. Burghardt, J. Zawadiak, doktorowie: S. Bal, Z. Stec). Kolejnym przedmiotem zainteresowań Mazońskiego było utlenianie kumenu i ogólnie badanie nadtlenców.

I w jednej i drugiej dziedzinie dokonał wiele. Świadczą o tym liczne publikacje, patenty i wypromowani pracownicy naukowcy. Był wysokiej klasy specjalistą.

Ostatni temat „stosowany” pojawił się około 1936 r. i wywołany został bliskimi osobistymi kontaktami z inż. Waligórą, właścicielem terpentyniarni w Szczec-

brzeszynie. Tu pierwotny problem otrzymywania kamfory z polskich surowców przerodził się w wieloletnie, wielopokoleniowe zainteresowanie chemią terpenów.

Analizowano we Lwowie możliwości przeprowadzania reakcji chlorowodorowania na terpentynach i ten fragment przekazano do zastosowania przemysłowego. Kolejne badania to katalityczna izomeryzacja pinenu do kamfenu; gdy ukończono prace w skali laboratoryjnej i przechodzono do półtechnicznej – wybuchła druga wojna światowa.

Sucharda zajmował się działaniem kwasów na pinen. W przeciwieństwie do produktów addycji kwasu siarkowego i kwasów sulfonowych, które okazały się nieciekawe, przyłączenie do pinenu kwasu azotowego dające mieszaninę azotanów terpineolu, borneolu i fenchołu, otwierały drogę (redukcja) do wolnych alkoholi (w dobrej wydajności). Analogiczne reakcje przebadano na kamfenie, wreszcie na dipentenie, co pozwoliło na uzyskiwanie z małocennych frakcji terpentyny – cennego terpineolu.

Chemię terpenów rozwijał przez wiele lat we Wrocławiu, najbliższy współpracownik **Suchardy** – **Henryk Kuczyński**. Ukończył on Politechnikę Lwowską i doktoryzował się w 1938 r. Po wojnie habilitował się w Krakowie na Politechnice Śląskiej w roku 1945. We Wrocławiu związał się z Politechniką Wrocławską, gdzie uzyskał stopnie profesorskie (był dziekanem, prorektorem uczelni, członkiem PAN) i kierował katedrami chemii Politechniki I także Uniwersytetu Wrocławskiego.

Prof. **H. Kuczyński** choć współpracował z **Suchardą** w dziedzinach zróżnicowanych tematycznie, takich jak: syntezy mezytylenu (1935), reakcje nitronaftalenów (1936), nitrochinolin (1936), sulfokwasy sulfonów aromatycznych (1938), czy otrzymywanie pochodnych *p*-aminofenoli (1946) po wojnie kontynuował i rozwijał już wyłącznie tematykę terpenową. Zainteresowanie tą dziedziną chemii organicznej, zapoczątkowane około 1937 r. trwało u niego do końca życia. Oczywiście uległo ono znacznemu rozszerzeniu, a dawne, bezpośrednie powiązanie z przemysłem, zastąpiły w znacznej mierze, badania strukturalne, konformacyjne.

Profesor **Henryk Kuczyński** stworzył własną szkołę chemii terpenów. Wypromował kilkunastu doktorów, z których sześciu uzyskało tytuły profesorskie. Rozwiniął on chemię i stereochemię układu karanu. Interesowały go szczególnie epoksydacja wiązania podwójnego i stereoselektywne metody otwierania pierścieni epoksydowych. Ma poważne osiągnięcia w dziedzinie syntez alilowych alkoholi terpenowych, karwomentoli i ich dihydro- pochodnych. Opracował nową, oryginalną metodę dehydratacji alkoholi trzeciorzędowych. Był uznanym w świecie chemikiem organikiem – specjalistą w dziedzinie chemii związków terpenowych.

Nowoczesny kierunek tych badań koncentruje się obecnie na określaniu konformacji izoprenoidów, możliwości ich biodegradacji, badaniu znaczenia biochemicznego, a także w pewnym stopniu na potencjalnym wykorzystywaniu jako środków farmaceutycznych.

W kierunku tym znaczące wyniki uzyskał prof. **Andrzej Zabza**. Był on doktorem **H. Kuczyńskiego** i u niego się habilitował. Głównym tematem jego zainteresowań były początkowo stereochemiczne przekształcenia monoterenów, szcze-

gólnie syntezy przestrzennie jednorodnych alkoholi allilowych. Swoje zainteresowania badawcze rozszerzył o zagadnienia związane z biochemią owadów. Współpracuje w zagadnieniach biotransformacji połączeń terpenowych, a jego osobistą zasługą jest wprowadzenie do badań wrocławskich nowoczesnych technik spektroskopowych (NMR). Wypromował 5 doktorów, dwoje z nich jest już samodzielnymi pracownikami naukowymi.

Awansowali już uczniowie uczniów **Kuczyńskiego**. I tak np. Czesław **Wawrzeńczyk** – profesor Chemii Akademii Rolniczej we Wrocławiu, uczeń prof. A. **Zabży** i „prawnuke” **Suchardy** wypromował już 7 swoich doktorów.

Bardzo silnie z tematyką izoprenoidową związany jest prof. Antoni **Siewiński** z Akademii Rolniczej we Wrocławiu, (sam doktoryzował się u prof. M. Kocóra, współpracownika H. **Kuczyńskiego**). Jego doktorantki Jadwiga **Dmochowska-Gładysz** i Wanda **Peczyńska-Czoch** są już profesorami, pierwsza na Akademii Rolniczej (Wrocław), druga na Politechnice Wrocławskiej. Oprócz nich, wypromował 3 doktorów, a także przeprowadził przewody habilitacyjne dla dwóch doktorantek prof. I. **Małunowicz** (doktorat u H. **Kuczyńskiego**): dr Agnieszki **Mironowicz** i Teresy **Kolek**. Obie są profesorami Wrocławskiej Akademii Rolniczej. **Siewiński** wydaje się być, bezspornym kontynuatorem wywodzącej się od **Suchardy** „szkoły terpenów”. Ma znaczące osiągnięcia szczególnie w dziedzinie biotransformacji izoprenoidów.

Nieżyjący już Zenon **Chabudziński**, późniejszy profesor chemii Wydziału Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu (także jej dziekan) był jednym z najbliższych współpracowników prof. H. **Kuczyńskiego**. Również on rozwijał w swoich badaniach chemię terpenów, wypromował sześciu doktorów, z których – już z tytułem profesora, Zbigniew **Rykowski**, kontynuuje tematykę swoich poprzedników. **Chabudziński** pozostawił znaczący dorobek w dziedzinie chemii pochodnych pinanu i karanu, dokonując pierwszych syntez ich izomerycznych epoksydów, ketonów i alkoholi. W ostatnich latach swego życia zwrócił uwagę na możliwość wykorzystania związków monoterpenu do syntezy laktonów, pochodnych pinanu o spodziewanych właściwościach przeciwnowotworowych. Również jego uczeń Z. **Rykowski** interesuje się syntezą związków terpenowych, jako potencjalnych środków leczniczych, zwłaszcza, że z tej właśnie grupy połączeń w 2003 r. w Polsce, dwa związki uzyskały rejestrację jako leki, a na całym świecie ogromne zainteresowanie skupił np. nowy lek przeciwcukrzycowy (glitryn), właśnie z grupy izoprenoidów.

Główną tematyką badań Krzysztofa **Piątkowskiego** (doktorat i habilitacja u H. **Kuczyńskiego**) – profesora Politechniki Wrocławskiej była chemia i stereochemia dihydropinolu. Szczególnie interesowały go możliwości wzajemnej przemiany enancjomerów tego układu terpenowego. Przeprowadził u siebie 8 przewodów doktorskich.

Tematyce terpenowej pozostał wierny przez całe swoje życie – dr hab. Mirosław **Walkowicz**. Przeprowadzał on wszechstronne badania stereochemiczne otrzymywanego z karenu-3 układu bicykloheksanowego. Wypromował dwóch doktorów.

Jedynym ze współpracowników-uczniów Henryka Kuczyńskiego który zainteresował się problemami technicznymi chemii terpenów był Mieczysław **Bukała**. Interesował go zarówno rozdział surowców, gdzie opracował wysokiej klasy metody rektyfikacji, a następnie identyfikacji poszczególnych frakcji (chromatografia), jak i wykorzystanie pochodnych terpenowych w produkcji środków pianotwórczych jako flotantów przy wzbogacaniu rud miedzi (współpraca z Kombinatem Górniczo-Hutniczym Miedzi w Lubinie), badał fuzle terpentynowe (terpentyna siarczynowa) uzyskiwane przy produkcji papieru (współpraca z Zakładami Papierniczymi w Bardzie Śl.) a także jako surowców przy otrzymywaniu środków ochrony roślin (wielochloroterpeny), czy substancji owadobójczych.

W zespole **Bukały** prowadzono również pomocnicze prace chemiczne dla różnych gałęzi przemysłu. Badano reakcje katalizowanej izomeryzacji alfa- i beta-pineny, addycję metanolu do alfa-pineny i jego hydratację, możliwości otrzymywania szeregu alkoholi terpenowych z estrów. Opracowano nową metodę syntezy eterów alkiloterpenowych.

Z **Bukałą** współpracowali ściśle Bogdan **Burczyk**, Stanisław **Witek**, Jan **Chlebicki** i Stanisław **Kucharski** – późniejsi znani technologowie, profesorowie Politechniki Wrocławskiej. Dochowali się oni już i swoich następców (prof.: Piasecki, Sokołowski, Wilk).

Wydaje się, że wpływ jaki wywarł E. **Sucharda** na swoich współpracowników był duży. Zdecydowana większość z nich kontynuowała przez całe swoje życie naukowe „jego” tematykę. Jak wspomina prof. **Plażek**: „największą zaletą **Suchardy** była łatwość i oryginalność koncepcji rozwiązywania opracowywanego zagadnienia obok bardzo wybitnego talentu eksperymentatorskiego”. Był niewątpliwie człowiekiem obdarzonym pewną charyzmą, posiadał zdolność skupiania wokół siebie ludzi wartościowych, nawiązywania z nimi silnych więzi i w jakimś stopniu przekazywaniu im swoich sugestii.

Cechowały Go ogromne siły witalne. Na Politechnice spędzał dziennie około 10 godzin, cały czas będąc w ścisłym kontakcie z współpracownikami. Sam eksperymentował, ulepszał aparaty, projektował i równocześnie samodzielnie wykonywał wiele złożonych szklanych aparatów chemicznych.

Natężenia prac naukowych zdawały się nie zakłócać liczne funkcje, które pełnił na uczelni. W latach 1924/25, 30/31 i 36/37 był prodziekanem (Wydz. Rolniczo-Lasowy i Chemiczny), w latach 1923/24 i 35/36 – dziekanem, prorektorem w latach akademickich 1933/34 i 34/35 i wreszcie rektorem przez półtorej kadencji: 1937–39. Obok kierownictwa Katedry Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym prowadził zajęcia z chemii analitycznej ilościowej, a także przez wiele lat wykładał chemię ogólną na Wydziale Mechanicznym Politechniki.

Prof. **Sucharda** nie był jednak „pracoholikiem”. Po godzinie 18-tej rozpoczynał swoją prywatną część życia, równie intensywną. Był bardzo rodzinny, uczestniczył w bogatym życiu towarzyskim, znakomicie grał w brydża, tańczył, grał na fortepianie, jeździł na nartach, rowerze, grał dobrze w tenisa; był znakomitym hipnotyzerem i różdżkarzem.

Był członkiem Polskiej Akademii Umiejętności w Krakowie, członkiem Akademii Nauk Technicznych w Warszawie, członkiem Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego (prezesem jego Oddziału Lwowskiego i prezesem Zarządu Głównego). Był członkiem-założycielem Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego. Odznaczony był dwukrotnie Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski; pierwszy raz w 1938 roku, drugi – pośmiertnie w roku 1947.

Pozostawił po sobie 44 publikacje, 6 patentów, dwa podręczniki szkolne. Jego współpracownicy i ogromna rzesza przyjaciół z którymi był bardzo silnie związany – już nie żyją. Żyją i działają kontynuatorzy tematyki – wnuki i prawnuki naukowe, którzy zawsze chętnie przynależność do „szkoły Suchardy” podkreślają.

Na Politechnice Wrocławskiej wmurowane są dwie tablice z płaskorzeźbą głowy, jedna z największych sal wykładowych w gmachu głównym nosi jego imię. Także jedna z ulic Wrocławia nosi imię Suchardy. Jest też patronem Zespołu Szkół Chemicznych we Wrocławiu i ma tablicę sobie poświęconą na gmachu chemii Politechniki Śląskiej.

BIBLIOGRAFIA PRAC PROF. EDWARDA SUCHARDY

- [1] S. Niementowski, E. Sucharda, *Kwasy 8-oksychinolinowe i ich przetwory*, Rozpr. Wydz. Mat.-Przyr. Akad. Um., **55**, 15A, 31 (1916).
- [2] S. Niementowski, E. Sucharda, *Über 8-Chinolinkarbonsäure und ihre Derivate Dioxyantrachinon-3.7-dichinolin*, Ber., **49**, 15 (1916).
- [3] S. Niementowski, E. Sucharda, *Synteza pewnej pochodnej benzo-2.5-naftyrydyny i jej przeprowadzenie w kwas kynurenowy*, Rozpr. Wydz. Mat.-Przyr. Akad. Um., **56**, 16A, 337 (1917).
- [4] S. Niementowski, E. Sucharda, *Synthese des 1.3.10-Trioxybenzo-2.5-Naphtyridins und dessen Überführung in Kynuren-säure*, J. prakt. Chem., **94**, 193 (1916).
- [5] S. Niementowski, E. Sucharda, *Synthesen des 1.3-Dioxybenzo-Naphtyridins und eines angularen Ring systems des Dichinopyridins*, Ber., **52**, 484 (1916).
- [6] S. Niementowski, E. Sucharda, *Syntezy 1.3-dwuoksy-benzo-2.5-naftyrydyny i nowego angularnego pięciordzeniowego układu dwuchinopirydonu*, Rozpr. Wydz. Mat.-Przyr. Akad. Um., **58**, 18A, 299 (1919).
- [7] E. Sucharda, *5.6.8-trójoksybenzo-1.10-naftyrydyna i jej utlenienie do pochodnych 1.8-naftyrydyny*, Kosmos, **45**, 123 (1920).
- [8] E. Sucharda, *O utlenieniu 8-sulfochinoliny*, Kosmos, **46**, 1 (1921).
- [9] E. Sucharda, *Kondensacja kwasu 2-amino-nikotynowego z kwasem chlorooctowym na pochodne (pyrolo-4'.5')-2.3-pirydyny*, Roczniki Chem., **3**, 236 (1923).
- [10] L. Klisiewicz, E. Sucharda, *Syntezy pewnych pochodnych (pirydyno-5'.6')-pirydyny i otrzymywanie kwasu 2-amino-nikotynowego*, Roczniki Chem., **3**, 251 (1923).
- [11] E. Sucharda, *Über eine neue Darstellungsmethode der Chinolinsäure und einiger Derivate derselben*, Ber., **58**, 1727 (1925).
- [12] E. Sucharda, *O nowej metodzie otrzymywania kwasu chinolinowego i pewnych jego pochodnych*, Roczniki Chem., **5**, 449 (1925).
- [13] E. Sucharda, *Über die δ-Pyrindigo-Synthese*, Ber., **58**, 1724 (1925).
- [14] E. Sucharda, *O syntezie δ-pyrindyga*, Roczniki Chem., **5**, 453 (1925).

- [15] E. Płażek, E. Sucharda, *Über eine Synthese des δ -Thio-Pyridigos*, Ber., 59, 2282 (1926).
- [16] E. Płażek, E. Sucharda, *O syntezie δ -tio-pyryndyga*, Roczniki Chem., 7, 187 (1927).
- [17] B. Bobrański, E. Sucharda, *Über eine Synthese des 1.5-Naphthyridins*, Ber., 69, 1081 (1927).
- [18] B. Bobrański, E. Sucharda, *Synteza 1.5-naftyrydyny*, Roczniki Chem., 7, 421 (1927).
- [19] B. Bobrański, E. Sucharda, *O syntezie kwasu (karboksy-metylo)-2-chinolinokarboksylowego-3 oraz pewnych jego pochodnych*, Roczniki Chem., 7, 192 (1927).
- [20] L. Klisiecki, E. Sucharda, *1.5-Naftyrydyna i pewne jej pochodne*, Roczniki Chem., 7, 205 (1927).
- [21] A. Konopnicki, E. Sucharda, *O nowej metodzie otrzymywania kwasu akrydynowego i pewnych jego połączeń*, Roczniki Chem., 7, 183 (1927).
- [22] E. Sucharda, B. Bobrański, *O nowym ebullioskopie do oznaczania ciężaru cząsteczkowego przy użyciu małych ilości substancji*, Przemysł Chem., 11, 371 (1927).
- [23] E. Sucharda, B. Bobrański, Chem. Ztg., 51, 368 (1927).
- [24] B. Bobrański, E. Sucharda, *Centigramowa analiza elementarna. I. Oznaczenie węgla i wodoru z automatyczną regulacją spalania. I. Oznaczenie azotu*, Roczniki Chem., 8, 290 (1928).
- [25] E. Sucharda, B. Bobrański, *Halbmikromethoden zur automatischen Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischer Substanzen und ebullioskopischen Molekulargewichtsbestimmung*, Sammlung Vieweg, Heft 94, Fr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1929.
- [26] E. Płażek, E. Sucharda, *Über einen Diphenyl-pyridyl-mathanfarbstoff*, Ber., 61, 1811 (1928).
- [27] E. Płażek, E. Sucharda, *Untersuchungen über 2-Acetyl-amino-pyridin*, Ber., 61, 1813 (1928).
- [28] E. Sucharda, Polmin (Państwowa Fabryka Olejów Mineralnych), *O chlorowaniu gazu ziemnego*, Patent pol., 10468 (4.04.1928).
- [29] Polmin (Państwowa Fabryka Olejów Mineralnych), E. Sucharda, *Otrzymywanie czterochlorku węgla i chloroformu z niższych chloropochodnych metanu*, Patent pol., 11910 (1.10.1928).
- [30] Polmin (Państwowa Fabryka Olejów Mineralnych), E. Sucharda, *O chlorowaniu metanu i gazów zawierających metan*, Patent pol., 11909 (1.10.1928).
- [31] E. Sucharda, *Otrzymywanie wyższych węglowodorów z metanu*, Patent pol., 14323 (11.01.1929).
- [32] E. Sucharda, *O chlorowaniu metanu mieszaniną HCl i powietrza*, Patent pol., 10462 (1929).
- [33] B. Bobrański, E. Sucharda, *Ein neuer Apparat zur Kohlensäureabsorbition bei der Elementaranalyse*, Chem. Ztg., 54, 412 (1930).
- [34] E. Sucharda, C. Trozskiewicz, *O otrzymywaniu o-tio- i o-sulfo-karbonowych kwasów pirydynowych*, Roczniki Chem., 12, 193 (1932).
- [35] E. Sucharda, T. Mazoński, *O otrzymywaniu estrów kwasu mrówkowego z olefin zawartych w lekkich frakcjach benzyny krakowej*, Przemysł Chem., 17, 164 (1933).
- [36] E. Sucharda, T. Mazoński, J. Mokrzycki, *O konstrukcji pieca rurowego do termostatycznego prowadzenia reakcji w rurach zatopionych*, Roczniki Chem., 14, 1066 (1934).
- [37] K. Cybulski, E. Sucharda, C. Trozskiewicz, W. Turska, *O sulfonowaniu aminochinolin*, Roczniki Chem., 14, 1172 (1934).
- [38] E. Sucharda, H. Kuczyński, *O otrzymywaniu mezytylenu*, Roczniki Chem., 14, 1182 (1934).
- [39] W. Jaroszewicz, E. Sucharda, *O produktach reakcji kwasu dwuazo-mezytyleno-sulfonowego z gliceryną*, Roczniki Chem., 14, 1188 (1934).
- [40] W. Jaroszewicz, E. Sucharda, *O syntezie 1.3.5-trójpirydylo-benzenu*, Roczniki Chem., 14, 1195 (1934).
- [41] E. Sucharda, Polmin (Państwowa Fabryka Olejów Mineralnych), *O rafinacji surowej ropy, wosków, tuszczów i olejów*, Patent pol., 20674 (9.02.1933).
- [42] T. Mazoński, E. Sucharda, *O otrzymywaniu kwasu benzeno-sulfonowego*, Przemysł Chem., 18, 478 (1934).
- [43] E. Sucharda, B. Bobrański, *Semimicromethods for the Elementary Analysis of Organic Compounds*, Gallenkamp & Co Ltd. Translated by G.W.Ferguson, London, 1936.

- [44] T. Mazoński, E. Sucharda, *O bezpośrednim otrzymywaniu chloro- i oksychinolin z nitrobenzenu*, Roczniki Chem., **16**, 146 (1936).
- [45] Z. Skrowaczewska, E. Sucharda, *O syntezie s-trój-dwufenylobenzenu i s-trójdwufenyłometanobenzenu*, Roczniki Chem., **16**, 151 (1936).
- [46] H. Kuczyński, E. Sucharda, A. Surmiński, *O reakcji 1- i 2-nitronaftalenu oraz 1 5-dwunitronaftalenu z gliceryną i kwasem solnym*, Roczniki Chem., **16**, 509 (1936).
- [47] H. Kuczyński, E. Sucharda, *O reakcji 5-, 6-, 7-, 8-nitrochinolin z gliceryną i kwasem solnym*, Roczniki Chem., **16**, 519 (1936).
- [48] T. Mazoński, T. Mielecki, E. Sucharda, *O reakcji o- i p-nitrotoluenu i o-nitrofenolu z gliceryną i kwasem solnym*, Roczniki Chem., **16**, 519 (1936).
- [49] E. Sucharda, T. Mazoński, *Über die Nebenprodukte der Skraupschen Chinolinsynthese*, Ber., **69**, 2719 (1937).
- [50] E. Sucharda, T. Mazoński, *O otrzymywaniu mrowczanu amylu i heksylu z benzyny krakowej*, Roczniki Chem., **17**, 41 (1937).
- [51] H. Kuczyński, L. Kuczyński, E. Sucharda, *O sulfokwasach sulfonów aromatycznych*, Roczniki Chem., **18**, 624 (1938).
- [52] E. Sucharda, C. Troszkiewiczówna, *O nowej centigramowej metodzie oznaczaniu węgla i azotu w związkach organicznych*, Roczniki Chem., **18**, 784 (1938).
- [53] E. Sucharda, *Otrzymywanie krystalicznego kamfenu z pinenu drogą izomerizacji*, Zgłoszenie patentowe 1938/39.
- [54] E. Sucharda, *Uproszczony sposób technicznego otrzymywania syntetycznej kamfory z pinenu*, prace nieopublikowane.
- [55] Z. Skrowaczewska, E. Sucharda, *On a new method of sulphonating aromatic amines*, Ann. Acad. Pol. Sci. Techn., **7**, 133 (1939-45).
- [56] H. Kuczyński, E. Sucharda, C. Troszkiewiczówna, *On direct producing p-amino-phenol-compounds from aromatic nitro-compounds*, Ann. Acad. Pol. Sci. Techn., **7**, 129 (1946).
- [57] E. Sucharda, *O działaniu stężonego kwasu azotowego na pinen*, Rozpr. PAU, Wydz. Mat-Przyr., **72A**, 13 (1946).
- E. Sucharda, Z. Pleśniewicz, *Chemia organiczna*, Podręcznik dla II klasy liceów humanistycznych i przyrodniczych, Książnica Atlas, Wyd. I. Lwów 1937, Wyd. II. Wrocław 1946, Wyd. III, Wrocław 1947.
- Z. Szeller, E. Sucharda, *Chemia*, Podręcznik dla II klasy liceum humanistycznego, Książnica Atlas, Wrocław 1948.

Praca wpłynęła 4 marca 2005

KRONIKA



BOGDAN NOWAKOWSKI LAUREATEM NAGRODY IM. JANA POPIELAWSKIEGO I PIOTRA MODRAKA

Z inicjatywy grona przyjaciół przedwcześnie zmarłych wybitnych fizykochemików **Jana Marii Popielawskiego i Piotra Modraka**, utworzona została nagroda ich imienia. Nagrodę ufundowała Fundacja BRE-Banku w Warszawie. Celem tej nagrody jest upamiętnienie osiągnięć naukowych, organizacyjnych i dydaktycznych Zmarłych Uczonych oraz promocja w Instytucie Chemii Fizycznej PAN badań teoretycznych przez nich uprawianych. Szczegółowe informacje o dorobku naukowym, dydaktycznym i organizacyjnym Zmarłych J. Popielawskiego i P. Modraka można znaleźć w literaturze [1–6]. Na posiedzeniu w dniu 6.12.2004, Kapituła Nagrody przyznała nagrodę za rok 2004 Bogdanowi Nowakowskiemu, w uznaniu wybitnych osiągnięć naukowych w badaniach wpływu fluktuacji na nieliniowe układy chemiczne. Poprzednio, nagrodę otrzymali: Jerzy Górecki za 2000 r. i Andrzej Lech Kawczyński za 2002 r. o czym informowaliśmy w „Wiadomościach Chemicznych” (Wiad. Chem., 2001, **55**, 216; 2003, **57**, 147).



Doc. dr hab. Bogdan Nowakowski

Docent dr hab. Bogdan Nowakowski rozpoczął pracę w IChF PAN w 1978 roku, po ukończeniu studiów na Wydziale Fizyki UW. Stopień doktora uzyskał w 1986 roku, na podstawie rozprawy dotyczącej dynamiki kondensacji i koagulacji aerozoli, której promotorem był Profesor Popielawski. Również we współpracy z nim zajmował się teorią szybkości reakcji i procesów transportowych w nierównowagowych układach chemicznych [7]. Kontynuując te badania po przedwczesnej śmierci Profesora Popielawskiego, wykazał istotne znaczenie efektów nierównowagowych dla stałych szybkości reakcji i współczynników dyfuzji w dynamice chemicznych struktur dyssypatywnych [8]. Przewidywania tej teorii zostały potwierdzone przez mikroskopowe symulacje numeryczne dla modeli fal chemicznych [9]. Warto nadmienić, że Zakład Dynamiki Chemicznej IChF PAN, w którym pracuje Bogdan Nowakowski, wywodzi się z pracowni utworzonej i przez szereg lat kierowanej przez Profesora Popielawskiego. Obecne badania prowadzone przez Bogdana Nowakowskiego również dotyczą dziedziny w której aktywny był Profesor Popielawski – fluktuacji w nierównowagowych układach chemicznych. W ramach tej tematyki Bogdan Nowakowski opracował metodę teoretycznego opisu fluktuacji w układach termochemicznych na poziomie mezoskopowym, opartą o równanie master [10]. Podejście to zostało wykorzystane jako podstawa bardzo efektywnych symulacji numerycznych (o rzędy wielkości szybszych od symulacji mikroskopowych), które pozwoliły na szczegółowe badania efektów stochastycznych w układach termochemicznych o złożonej, nieliniowej dynamice [11]. Bogdan Nowakowski jest autorem 48 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Prof. dr hab. A. Jabłoński

*Przewodniczący Kapituły Nagrody,
Dyrektor IChF PAN, Warszawa*

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] P. Modrak, M. Janik-Czachor, *Wiad. Chem.*, 1992, 46, 601.
- [2] S. Olszewski, *ibid.*, 1999, 53, 7.
- [3] *Acta Phys. Pol. B*, 1992, 23, 175.
- [4] G. Nicolis, S.A. Rice. *Physics Today*, 1992, 45, 108.
- [5] S. Olszewski. *Orbital*, 1999, 3/99, 188.
- [6] A.S. Cukrowski, J. Górecki, A.L. Kawczyński. B. Nowakowski, [w:] *Far-From-Equilibrium Dynamics of Chemical Systems*, Eds: J. Górecki *et al.*, World Scientific, Singapore, 1994, s. 1.
- [7] B. Nowakowski and J. Popielawski, *The Kinetic Theory of the Effect of Chemical Reaction on Diffusion of a Trace Gas*, *Journal of Chemical Physics*, 1994, 100, 7602.

-
- [8] B. Nowakowski, *Nonequilibrium Molecular Velocity Distribution in Binary Reactive Gaseous Mixture*, Journal of Chemical Physics, 1998, 109, 3443.
 - [9] A. Lemarchand and B. Nowakowski, *Perturbation of Local Equilibrium by a Chemical Wave Front*, Journal of Chemical Physics, 1998, 109, 7028.
 - [10] B. Nowakowski and A. Lemarchand, *Stochastic effects in thermochemical system with Newtonian heat exchange*, Physical Review E 64, 2001, 061108.
 - [11] A.L. Kawczyński and B. Nowakowski, *Master equation simulations of a model of thermochemical system*, Physical Review E 68, 2003, 036218.
-

NOWE WYDAWNICTWA



A. Kołodziejczyk, *Naturalne Związki Organiczne*, PWN, Warszawa 2003. ISBN 83-01-14032-1.

W liczącym 601 stron podręczniku *Naturalne Związki Organiczne*, omówiono nazewnictwo, budowę, otrzymywanie, właściwości chemiczne, fizyczne i farmakologiczne oraz znaczenie biologiczne ważnych naturalnych związków organicznych, takich jak: aminokwasy, peptydy, białka, cukry, lipidy, alkaloidy, steroidy, tereny, terpenoidy i feromony. Prawdopodobnie, wielu czytelników uzna podręcznik za niekompletny, gdyż brakuje w nim niektórych bardzo ważnych naturalnych związków organicznych, w tym kwasów nukleinowych. Nie ma też wstępu, w którym Autor uzasadniłby rezygnację z opisu tych związków naturalnych.

Pomimo powyższej uwagi książka jest nowoczesnym i bardzo dobrze napisanym podręcznikiem, w którym przedstawiono nie tylko podstawowe wiadomości o wyżej wymienionych grupach związków organicznych, ale i związane z nimi najnowsze osiągnięcia naukowe. Przedstawiono też współczesne metody badawcze związków naturalnych i omówiono problemy związane z produkcją niektórych z nich.

Tym co wyróżnia podręcznik Kołodziejczyka jest duża dawka informacji o zabarwieniu humanistycznym. Autor omówił wpływ związków naturalnych na rozwój cywilizacyjny i przedstawił własne przemyślenia dotyczące aktualnych problemów ekologicznych, ekonomicznych i etycznych związanych z wykorzystaniem produktów naturalnych przez człowieka. W podręczniku, humanistyczne akcenty zostały potraktowane marginalnie, o czym świadczy użycie mniejszej czcionki do ich wydrukowania. Myślę jednak że wielu czytelników przeczyta te fragmenty podręcznika z należnym im zainteresowaniem i rozważą. Obecnie coraz trudniej znaleźć wyraźne granice pomiędzy naukami ścisłymi, przyrodniczymi i humanistycznymi. Ale czy warto szukać takich granic? Przecież wiele ważnych problemów chemicznych i biologicznych jest nierozdzielnie związanych z problemami etycznymi, prawnymi, ekonomicznymi i uwarunkowaniami geohistorycznymi. Nie powinno się tego przemilczać w podręcznikach akademickich.

Książka jest napisana językiem przystępnym i zrozumiałym dla niefachowców. Jej mocną stroną jest też duża ilość dobrze dobranych ciekawostek. Czynią one podręcznik atrakcyjnym dziełem popularno-naukowym, który się łatwo czyta. Myślę, że niejeden czytelnik znajdzie w podręczniku nieznaną mu, a nawet zaskakującą informację. Znajdujące się w podręczniku ciekawostki i humanistyczne przemyślenia Autora pozwolą uwierzyć uczniom i studentom, że chemia nie tylko jest jedną z nauk ścisłych, ale jest integralną częścią wiedzy, której znajomość jest niezbędna dla zrozumienia otaczającej nas rzeczywistości.

Książkę Prof. Aleksandra Kołodziejczyka *Naturalne Związki Organiczne* gorąco polecam studentom kierunków chemicznych, przyrodniczych i medycznych a także uczniom szkół średnich zaintereso-

wanych tematyką z pogranicza chemii i biologii. Podręcznik będzie też pomocny nauczycielom i wykładowcom, gdyż zawarte w nim informacje są bardzo aktualne i mogą wzbogacić treść wykładów z chemii organicznej i biochemii.

Zbigniew Szewczuk

J. Gawroński, K. Gawrońska, K. Kacprzak i M. Kwit, *Współczesna Synteza Organiczna. Wybór Eksperymentów*, PWN, Warszawa 2004. ISBN 83-01-14138-7.

Szybki rozwój chemii organicznej wymusza w prowadzenie regularnych zmian programów nauczania z tego przedmiotu. Ponadto, ciągły wzrost liczby studentów chemii na uczelniach polskich przy ograniczonej ilości miejsc w laboratoriach wymaga od organizatorów zajęć dydaktycznych ograniczenia limitu czasu przeznaczanego na ćwiczenia. Sytuacja ta doprowadza do konieczności bardzo starannego wyboru ćwiczeń: z jednej strony krótkich i niedrogich, a z drugiej nowoczesnych i pozwalających osiągnąć wszystkie cele dydaktyczne. Nauczyciele akademicy naszych uczelni są więc zmuszeni do nieustannych reorganizacji programów zajęć. Dlatego pojawienie się nowego dobrego podręcznika z preparatyki organicznej, uwzględniającego polskie realia kształcenia, spotkać się musi z należnym mu zainteresowaniem i aprobatą.

Licząca 439 stron książka *Współczesna Synteza Organiczna. Wybór Eksperymentów* jest bardzo udanym polskim podręcznikiem do ćwiczeń z zaawansowanej chemii organicznej. Zawiera on opis ponad 150 eksperymentów ujętych w ośmiu działach:

1. Selektywne tworzenie wiązań węgiel–węgiel.
2. Selektywne tworzenie wiązań węgiel–heteroatom.
3. Selektywne reakcje redukcji i uwodnienia.
4. Kataliza asymetryczna aminokwasami i ich pochodnymi.
5. Biokataliza w syntezie asymetrycznej.
6. Syntezy użytecznych związków chiralnych z substratów pochodzenia naturalnego.
7. Różne techniki i metody syntezy.
8. Stereochemia w syntezie organicznej.

Kompilując swój podręcznik, Autorzy wykorzystali opisy eksperymentalne oryginalnych prac publikowanych w czasopiśmie naukowych i zaadoptowali je do potrzeb i możliwości przeprowadzenia w warunkach ćwiczeń laboratoryjnych. Należy podkreślić, że wiele z przedstawionych typów reakcji jeszcze nie znalazło się ani w polskich ani zagranicznych podręcznikach z syntezy organicznej. Dlatego książka *Współczesna Synteza Organiczna* stanowi cenne uzupełnienie klasycznych podręczników z preparatyki organicznej.

Podobnie jak w innych podręcznikach tego typu, każdy rozdział rozpoczyna przedstawienie teoretycznych podstaw omawianego typu reakcji oraz czynności stosowanych w preparatyce. Wiele miejsca poświęcono omówieniu techniki pracy. W książce znajduje się też rozdział poświęcony otrzymywaniu wybranych nowoczesnych reagentów organicznych stosowanych w syntezie organicznej. Uważam go za bardzo przydatny, gdyż stosunkowo niewielki koszt otrzymywania drogich odczynników organicznych umożliwi ich zastosowanie w zazwyczaj niedoinwestowanych laboratoriach chemii organicznej naszych uczelni.

Autorzy świadomie zrezygnowali z opisu doświadczeń przeznaczonych dla początkującego studenta, adresując podręcznik *Współczesna Synteza Organiczna* do studentów zaawansowanych. Uważam jednak, że zapoznanie się z opisem otrzymywania wybranych preparatów przez początkujących studentów

może im ułatwić zrozumienie niektórych treści teoretycznych przerabianych na wykładach kursu podstawowego. Skala trudności opisanych syntez zmienia się w szerokich granicach. Prowadzący ćwiczenia będą więc mogli niektóre z ćwiczeń łatwo przystosować do podstawowego kursu preparatyki organicznej lub pracowni chemii bioorganicznej. Moim zdaniem, podręcznik ten jest odpowiedni dla wszystkich studentów chemii i kierunków pokrewnych, takich jak biotechnologia i farmacja. Będzie on też pomocny dla akademickich nauczycieli chemii organicznej.

Wybór eksperymentów jest oryginalny i ciekawy, choć może sprawiać wrażenie niedosytu. Niestety, żaden podręcznik z preparatyki nie może być kompletny i z konieczności musi zawierać tylko niektóre, wybrane przez autorów przepisy. Sądzę jednak, że w opiniowanym podręczniku brakuje propozycji syntez wieloetapowych. Wprowadzie syntez takie mogą sprawiać niedoświadczonemu syntetykowi sporo kłopotów lecz pozwalają na znaczne obniżenie kosztów kształcenia. Student sam może syntezować sobie substrat do następnej syntezy, której produkty będzie dalej wykorzystywał. Opracowanie długiego i sensownego ciągu reakcji jest niewątpliwie zadaniem ambitnym i trudnym. Ale jeśli zależy nam na nauczaniu studenta kilku różnych umiejętności w jednym ciągu reakcji, byłoby to bardzo entuzjastycznie przyjęte przez nauczycieli akademickich. Ponadto uważam, że we *Współczesnej Syntezie Organicznej* wskazane byłoby podanie opisu syntez na nośniku stałym oraz syntez kombinatorycznych.

Pewnym zaskoczeniem dla czytelnika może być w podręczniku opis modelowania molekularnego. Wprawdzie zgadzam się z Autorami, że przedstawiony materiał będzie przydatny studentom chemii, lecz uważam, że współczesna praca w laboratorium organicznym jest uzależniona w większym stopniu od analizy chromatograficznej i spektroskopii. Niestety, poza nielicznymi przypadkami, autorzy nie proponują czytelnikowi zastosowania nowoczesnych metod instrumentalnych do potwierdzenia jednorodności i tożsamości (włącznie ze strukturą i stereochemią) otrzymanych produktów. Uważam za celowe rozwiązywanie na pracowni preparatyki organicznej praktycznych problemów spektroskopowych, gdyż pozwalała to na zrozumienie przez studentów nierozłączności tych kierunków działania. Z moich obserwacji wynika, że o wiele korzystniejsze i interesujące dla studenta jest badanie związków powstałych w reakcji, którą samodzielnie przeprowadził, niż praca z anonimowym związkiem wydanym przez asystenta w ramach ćwiczeń ze spektroskopowej analizy jakościowej związków organicznych. Chęć udowodnienia przez studenta, że otrzymał właściwą i jednorodną substancję zmusza go do wyjątkowo dokładnej analizy widm (NMR, IR, UV i MS) uzyskanych dla zsyntezowanych przez siebie związków. Pracownia organiczna stanowi więc dla studentów wyjątkową okazję do nauczania się tych metod, chociaż wymaga udostępnienia im kosztownej aparatury spektroskopowej.

Dobry podręcznik z preparatyki organicznej powinien zawierać bezbłędny opis sprawdzonych procedur przydatnych do praktycznego nauczania chemii organicznej. Z reguły, z większym zaufaniem podchodzi się do następnych, poprawionych wydań takich podręczników, wychodząc z założenia, że pierwsze wydania mogą jeszcze zawierać błędy. Przedstawione w podręczniku przepisy są obecnie testowane z licznymi grupami studentów na polskich uczelniach. Myślę, że po upływie pewnego czasu nauczyciele akademicy będą mogli wskazać ewentualne niedociągnięcia w przepisach, co umożliwi ich poprawienie i uzupełnienie w następnym wydaniu. Moim zdaniem podręcznik *Współczesna Synteza Organiczna. Wybór Eksperymentów* autorstwa Gawrońskiego i wsp. jest bardzo udany i jestem przekonany, że zarówno opiniowane, jak i następne jego wydania będą się cieszyły coraz większym zainteresowaniem wśród studentów i ich nauczycieli.

Zbigniew Szewczuk

Danuta Sobczyńska, Paweł Zeidler, Ewa Zielonacka-Lis, *Chemistry in the Philosophical Melting Pot*. Eds T. Buksiński, P.W. Juchacz, Peter Lang Europäischer Verlag der Wissenschaften, Frankfurt am Main 2004, 443 pp., 68,50 E

Redakcja zwraca uwagę Czytelników na ciekawą pozycję wydawniczą polskich autorów w jęz. angielskim, drukowaną za granicą. Jest to praca zbiorowa pt. *Chemistry in the Philosophical Melting Pot* pod redakcją pracowników Instytutu Filozofii UAM, prof. D. Sobczyńskiej, prof. P. Zeidlera i Dr E. Zielonackiej-Lis. Wszyscy trzej ukończyli studia chemiczne, lecz od wielu lat zajmują się filozofią – filozoficznymi kontekstami badań chemicznych i od 10 lat uczestniczą aktywnie w tworzeniu nowej dyscypliny – filozofii chemii, jako członkowie International Society for the Philosophy of Chemistry.

Książka stanowi podsumowanie zorganizowanego „IV Summer Symposium in the Philosophy of Chemistry and Biochemistry”, które odbyło się w 2000 r. na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

Dla zainteresowanych załączamy ulotkę wydawnictwa P. Langa z informacją o książce.

Redakcja

Now available Philosophy

Danuta Sobczyńska / Paweł Zeidler / Ewa Zielonacka-Lis (eds.)
Chemistry in the Philosophical Melting Pot

Frankfurt am Main, Berlin, Bern, Bruxelles, New York, Oxford, Wien, 2004 443 pp., num. fig.
Dia-Logos Studies in Philosophy and Social Sciences
Edited by Tadeusz Buksiński and Piotr W. Juchacz Vol. 5
ISBN 3-631-52474-9 · pb. € 68.50* / US-\$ 76.95 / £ 45.--
US-ISBN 0-8204-6594-1

Chemistry is a natural science which has immensely influenced both the development of technology and of civilization, transforming the world of our everyday life. It is therefore something of a paradox of modern philosophy that it took so long for it to perceive chemistry as an incredibly complex and interesting subject suitable for philosophical discourse. However, from the beginning of the 1990s this discourse has been developing in a most dynamic way creating a veritable melting pot in which various chemical concepts and actions are being blended with philosophical and cultural ideas. The authors of the 22 articles included in the presented volume have taken the opportunity to analyze various components of what may be termed the resulting alloy – the philosophy of chemistry. They discuss in detail the fundamental philosophical, methodological and semiotic aspects characteristic of the theory and laboratory practice of chemistry. They also reveal the alchemical roots of chemistry and its emergence as a modern theoretical and experimental scientific discipline. These issues are examined both from the point of view of professional chemists and from that of the philosophers of science.

Contents: Some philosophical ideas about chemistry · Chemical thinking in the tweezers of logic
Grasping the chemical phenomena · From alchemy to modern experimental chemistry

PETER LANG GMBH
Europäischer Verlag der Wissenschaften
Eschborner Landstr. 42-50

Phone ++49/69/78 07 05-0
Fax ++49/69/78 07 05-50
e-mail zentrale.frankfurt@peterlang.com
www.peterlang.de

D - 60489 Frankfurt am Main

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

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 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 indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

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

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

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

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997, cena 3 zł

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

Do nabycia jest również książka Z. Ruziewicz *Ludzie i dzieła. Studia nad historią chemii na ziemiach polskich*, wyd. Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej, cena 10 zł.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisanania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej strony**; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszerne streszczenie w języku angielskim (do 1.5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o użytym edytorze. Pożądanym edytorem Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych**, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. Niezależnie od tego **do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji**.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

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

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane**. Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

**DO CZYTELNIKÓW
„WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”**

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2004 r. wynosi 96 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 48 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

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

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2004 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 60 zł (składka – 50 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci, doktoranci oraz studenci płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 30 zł (składka – 20 zł, prenumerata – 10 zł).

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

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 5711602202-0000000027202458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



SPIS TREŚCI

Szkoła Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego	1
Wojciech BOCIAN, Lech KOZERSKI: Zastosowanie spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych ligandów organicznych i biocząsteczek	3
Andrzej EJCHART: Strategie NMR wyznaczania struktur białek w roztworze	23
Zofia GDANIEC: Spektroskopia NMR w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Część I	47
Adam GRYF-KELLER: Rozróżnianie molekuł a spektroskopia NMR w cieczy	67
Stefan JANKOWSKI: Badanie dynamiki układów za pomocą spektroskopii NMR	93
Wiktor KOŹMIŃSKI: Podstawowe techniki eksperymentalne spektroskopii NMR w fazie ciekłej	107
Iwona WAWER, Maciej PISKLAK, Katarzyna PARADOWSKA: NMR ciała stałego – zastosowania w farmacji i diagnostyce medycznej	121
Janusz JURCZAK, Jacek KIBEŃSKI, Józef J. ZIÓLKOWSKI: Czasopisma chemiczne w Polsce – stan w 2004 r. – próba oceny	139
Felieton naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. LV. Profesor Zamojski i „Wiadomości Chemiczne”	157
Z historii chemii	
Anna SUCHARDA-SOBCZYK: Profesor Edward Sucharda i jego szkoła.	167
Kronika	183
Nowe wydawnictwa	187

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Piotr M. WOJCIECHOWSKI: Naturalne orbitale wiązań – metoda NBO
Agnieszka OLEJNICZAK: Karborany i metalokarborany. Część II. Metalokarborany
Andrzej ORZESZKO: Estroimidowe materiały ciekłokrystaliczne
Roman MAZURKIEWICZ, Beata FRYCZKOWSKA, Rafał GABAŃSKI: Sole winylofosfoniowe w syntezie organicznej
Henryk MYSZKA, Dorota BEDNARCZYK: Saponiny steroidowe
Jerzy CHOMA, Mieczysław JARONIEC, Marcin KŁOSKE: Uporządkowane nanoporowate materiały węglowe
Elżbieta KOCIOLEK-BALAWĘJDER, Daniel OCIŃSKI: Arsen w technice i środowisku

Felieton naukowy

Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. LVI. Dwie dusze Ludwika Brunera
