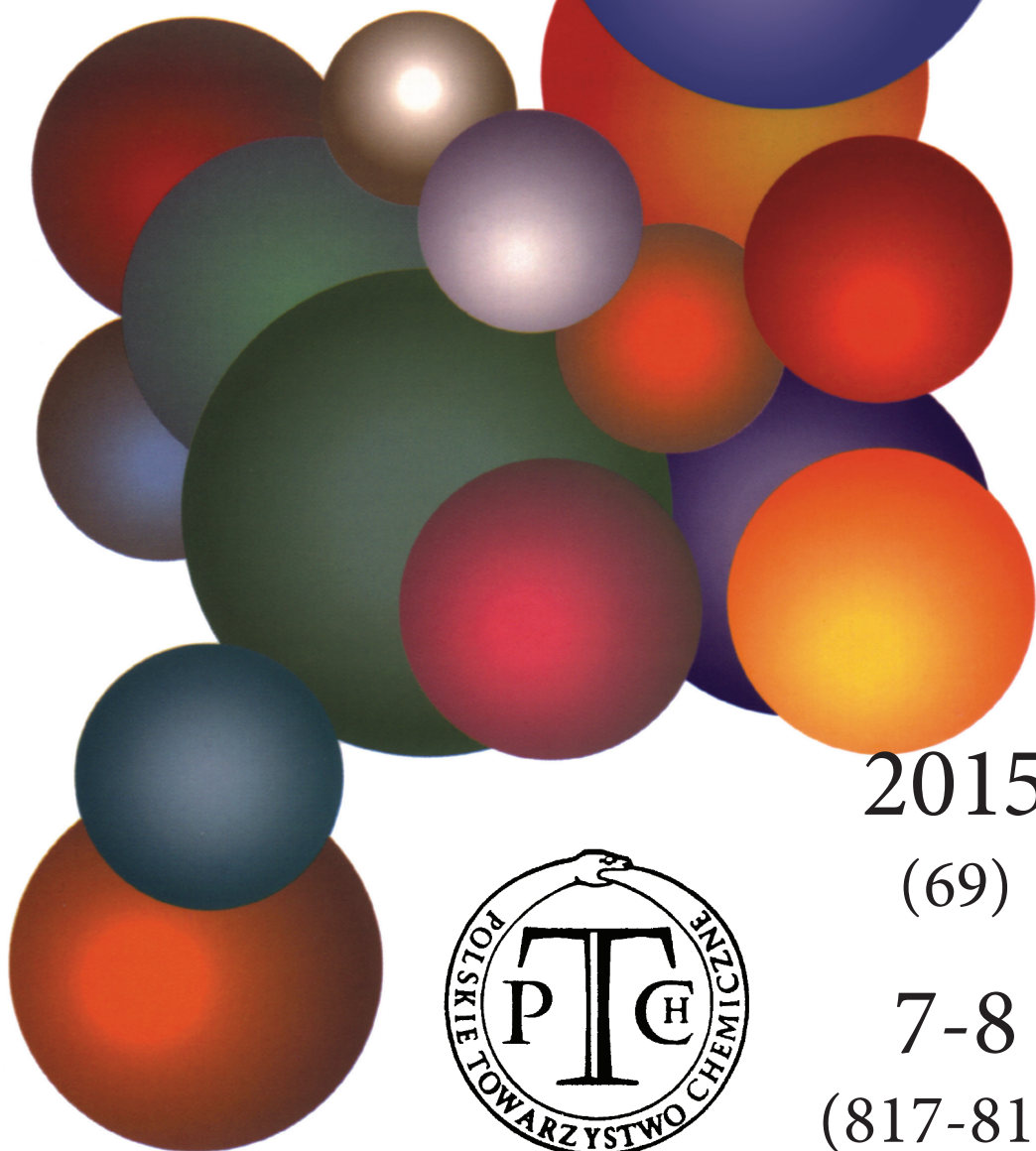


WIADOMOŚCI *chemiczne*

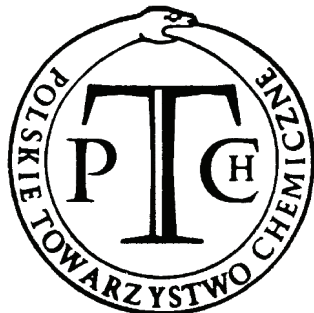


2015

(69)

7-8

(817-818)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

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

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROŚLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06

e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)

<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2015

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lipiec-wrzesień 2015

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

**BADANIE ODDZIAŁYWANIA WANKOMYCYNY
Z FRAGMENTEM PEPTYDOGLIKANU
ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII**

STUDY ON INTERACTION OF VANCOMYCIN WITH
BACTERIAL CELL WALL PEPTIDOGLYCAN

Justyna Samaszko-Fiertek*, Rafał Ślusarz, Janusz Madaj

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Cukrów
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: j.samaszko-fiertek@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Badanie sił oddziaływania fragmentów peptydowych ściany komórkowej bakterii z wankomycyną
 - 1.1. Metody badania oddziaływania peptydoglikanu z wankomycyną

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Rafał Ślusarz ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim. Także na Wydziale Chemii UG, w 2004 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, po obronie rozprawy pt. „Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G”. Obecnie zajmuje się badaniem zmian konformacyjnych układów cukrowych i glikoproteinowych podczas swoistego oddziaływania z fragmentami konstrukcyjnymi komórek bakteryjnych oraz enzymami organizmów wyższych metodami modelowania molekularnego. Jego warsztat pracy obejmuje dynamikę molekularną, analizę statystyczną, optymalizację, dokowania oraz badanie oddziaływań międzycząsteczkowych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

ABSTRACT

Unfortunately, despite of work involved in understanding of the mechanism of bacterial virulence, especially *Staphylococcus aureus*, it has not been developed effective therapy against this bacteria. The first antibiotic used against this bacteria was penicillin, which was discovered by Alexander Fleming in 1928.

A new generation of drugs introduced into therapy against *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria are glycopeptide antibiotics. The most widespread and most commonly used are vancomycin and teicoplanin, discovered respectively in 1956 and 1978.

As a result of frequent use of vancomycin VISA (ang. *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) and VRSA (ang. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) strains were discovered. The mechanism of action of this antibiotic based on the inhibition of the biosynthesis of bacterial cell wall peptidoglycan fragment. Forming stabilized by hydrogen bonds complex with terminal fragment of peptidoglycan (dipeptide D-Ala-D-Ala) vancomycin prevents its further crosslinking [2] (Fig. 1).

However, in recent years other theories of the mechanism of action of glycopeptide antibiotics against Gram-positive bacteria were presented it seems to be crucial to find methods of selection of new antibiotics and for this purpose standard techniques of the analysis, including isothermal titration calorimetry (ITC) [3], nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) [8–15], high performance liquid chromatography (HPLC) [16], capillary electrophoresis [17] or self-assembled monolayers (SAMs) [22] are used.

Discovering new methods for studying of interaction between vancomycin and Gram-positive bacterial cell wall allows use it as a new technique for rapid selection of potential new antibiotics, including glycopeptide derivatives.

Keywords: vancomycin, HPLC, capillary electrophoresis, NMR, SAMs

Słowa kluczowe: wankomycyna, HPLC, elektroforeza kapilarna, NMR, SAMs

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

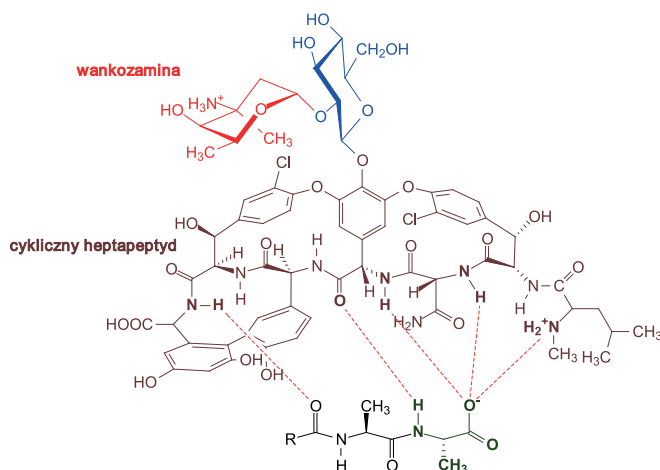
Używane w tekście symbole aminokwasów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature zawartymi w *Eur. J. Biochem.*, **1985**, 138, 9-37 oraz *A Short Guide to Abbreviations and Their Use In Peptide Science*, *J. Peptide Sci.*, **1999**, 5, 465-471. W wypadkach nie objętych postanowieniami stosowano oznaczenia powszechnie przyjęte w chemii peptydów.

| | |
|------------|---|
| AFM | – ang. <i>Atomic Force Microscopy</i> |
| Białko Map | – ang. <i>MHC class II analogous protein</i> |
| DCC | – ang. <i>dicyclohexylcarbodiimide</i> |
| Gal | – D-galaktoza |
| GalNAc | – N-acetylo-D-galaktozamina |
| GlcNAc | – N-acetylo-D-glukozamina |
| HATU | – ang. <i>2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate</i> |
| HBTU | – ang. <i>O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate</i> |
| HOAt | – ang. <i>1-hydroxy-7-azabenzotriazole</i> |
| HOBt | – ang. <i>N-hydroxybenzotriazole</i> |
| HPLC | – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| LLO | – ang. <i>lipid-linked oligosacchrides</i> |
| LSP | – ang. <i>lipopolysacchride</i> |
| LTA | – ang. <i>lipoteichoicacid</i> |
| NCCLS | – ang. <i>National Committee on Clinical Laboratory Standards</i> |
| MIC | – ang. <i>minimum inhibitor concentration</i> |
| MurNAc | – kwas N-acetylo-D-muraminowy |
| NMR | – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| OT | – transferaza oligosacharydowa |
| PRSA | – ang. <i>penicilineresistant strain S. aureus</i> |
| PBP | – ang. <i>peniciline binding protein</i> |
| PIERS | – ang. <i>Polarized Infrared External Reflectance Spectroscopy</i> |
| PTE | – ang. <i>peniciline tetracycline erythromycine resistant strain S. aureus</i> |
| SAM | – ang. <i>Self-Assembled Monolayers</i> |
| SPPS | – ang. <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> |
| SPR | – ang. <i>Surface Plasmon Resonance Spectroscopy</i> |
| TEM | – transmisyjny mikroskop elektronowy |

| | |
|------|---|
| VISA | - ang. <i>vancomycin-intermediate</i> S. aureus |
| VRE | - ang. <i>vancomycin-resistant</i> Enterococcus |
| VRSA | - ang. <i>vancomycin-resistant strain</i> S. aureus |

WPROWADZENIE

Niestety pomimo ogromu włożonej pracy w poznanie mechanizmu zjadliwości bakteryjnej, przede wszystkim gronkowca złocistego, nie opracowano jak dotąd skutecznej terapii przeciwko tej bakterii. Początkowo stosowano przeciwko niemu pierwszy odkryty przez Aleksandra Fleminga w 1928 antybiotyk – penicylinę. Bakteria ta wykształciła przeciwko niemu swoisty system odporności. Stosunkowo szybko pojawiły się pierwsze szczepy PRSA (ang. *penicilineresistant S. aureus*), odporne na stosowanie tego antybiotyku, o czym przestrzegali sam twórca: „Jeśli kuracja nie zniszczy wystarczającej liczby bakterii, ocalałe wydadzą uodpornione potomstwo, które szybko się namnoży. W efekcie choroba przypuści ponowny atak i nie będzie jej już można wyleczyć penicyliną” [1]. Niestety rzeczywistość okazała się okrutniejsza i podobne błędy popełniono względem najbardziej popularnego oraz najczęściej stosowanego antybiotyku przeciwko *S. aureus* wankomycynie. W konsekwencji czego bakteria wykształciła szczepy wankomycyno wrażliwe VISA (ang. *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) i odporne VRSA (ang. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) na skuteczność terapii przy zastosowaniu tych antybiotyków. Mechanizm działania tych antybiotyków w głównej mierze opiera się zahamowaniu biosyntezy fragmentów peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii. Zatrzymanie tego procesu związane jest z bezpośrednim oddziaływaniem antybiotyku z końcowym fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej gronkowca złocistego (dipeptydem D-Ala-D-Ala) (Rys. 1) [1, 2].



Rysunek 1. Wankomycyna i oddziaływanie z fragmentem peptydowym peptydoglikanu *S. aureus* [2]

Figure 1. Vancomycin and their interaction with peptidoglycan fragment of *S. aureus* [2]

Jednakże w ostatnich latach pojawiają się inne teorie opisujące mechanizm działania nowych potencjalnych antybiotyków przeciwko bakterii Gram-dodatniej.

Dlatego tak ważne jest położenie nacisku na dalszy rozwój i opracowanie technik syntetycznych określonych fragmentów ściany komórkowej wchodzących w interakcje z potencjalnymi antybiotykami przeciwko *S. aureus*.

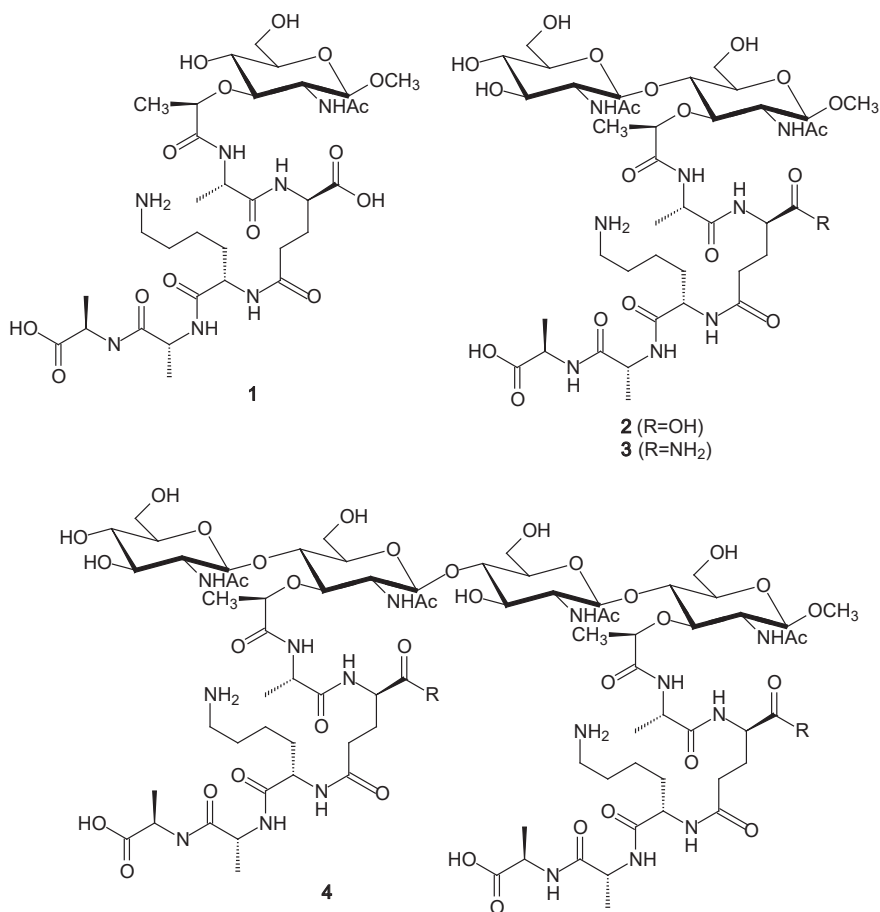
Kolejnym ważnym aspektem jest znalezienie metod selekcji nowych antybiotyków. W tym celu próbuje się wykorzystać standardowe techniki wykorzystywane w analizie, m.in. spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) czy elektroforezę kapilarną, mające na celu skrócenie czasu przeprowadzania wstępnych badań przed klinicznych.

1. BADANIE SIŁ ODDZIAŁYWANIA FRAGMENTÓW PEPTYDOWYCH ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII Z WANKOMYCYNĄ

Do badań nad siłą wzajemnego oddziaływania wankomycyny z fragmentem peptydoglikanu w kompleksie i wyznaczenia stałej asocjacji (K_a) stosowano różnego typu techniki analityczne, m.in. izotermiczną kalorymetrię miareczkową (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC). Metoda ta pozwoliła wyznaczyć nie tylko stałą K_a , lecz również parametry termodynamiczne (m.in. entalpię i entropię).

Otrzymane wyniki potwierdziły stawianą od lat hipotezę, że im dłuższy fragment peptydoglikanu tym oddziaływania są silniejsze. Jednakże z porównania stałej K_a dla fragmentu tripeptydowego z wartościami dla fragmentu mono-, di- i tetrasacharydowego (podstawionymi fragmentami pentapeptydowymi) wynika, że obecność fragmentu cukrowego nie wpływa na tworzenie się kompleksu. Niewielka zmiana wartości dla związku **2** i **3** związana jest z ładunkiem ujemnym na grupie karboksylowej z łańcucha bocznego γ -iGlu. W przypadku pochodnej **3** grupa ta podstawiona jest grupą aminową, zmieniając tym samym zdolność solwatacji tego związku (Rys. 2) [3].

Ciekawe rezultaty otrzymano dla związku **4**, dla którego wyznaczono dwie stałe asocjacji. Pierwsza odnosi się do powstającego kompleksu w stosunku 1:1, druga zaś związana jest z przyłączeniem kolejnej wankomycyny do istniejącego już kompleksu. Sugeruje to, że w obrębie struktury przy tworzeniu się kompleksu pomiędzy jedną cząsteczką wankomycyny a cząsteczką związku **4** powstają dodatkowe słabe oddziaływania elektrostatyczne, które ją stabilizują (Tab. 1) [3].



Rysunek 2. Fragmenty pochodnej peptydoglikanu wykorzystane do badań oddziaływań z wankomycyną [3]
Figure 2. Peptidoglycan derivatives used for studies of interactions with vancomycin [3]

Tabela 1. Parametry termodynamiczne tworzenia kompleksu pomiędzy wankomycyną a fragmentem ściany komórkowej w buforze octanu sodu, pH = 4,7 (T = 298 K) [3]

Table 1. Thermodynamic parameters of complex between vancomycin and a fragment of the cell wall in sodium acetate buffer, pH = 4.7 (T = 298 K) [3]

| Ligand | K _a [M ⁻¹] | ΔG° [kJmol ⁻¹] | ΔH° [kJmol ⁻¹] | TΔS [kJmol ⁻¹] |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| (Ac) ₂ KAA | (4,8 ± 0,7) · 10 ⁵ | -32,4 ± 0,4 | -40,1 ± 1,0 | -7,7 ± 1,0 |
| 1 | (6,6 ± 1,0) · 10 ⁵ | -33,2 ± 0,4 | -40,2 ± 1,0 | -7,0 ± 1,0 |
| 2 | (5,4 ± 0,8) · 10 ⁵ | -32,7 ± 0,4 | -39,2 ± 1,0 | -6,5 ± 1,0 |
| 3 | (2,5 ± 0,3) · 10 ⁵ | -30,8 ± 0,3 | -40,2 ± 1,0 | -9,4 ± 1,0 |
| 4 (I-stała) | (1,1 ± 0,2) · 10 ⁶ | -34,5 ± 0,5 | -41,2 ± 1,0 | -6,7 ± 1,0 |
| 4 (II-stała) | (4,0 ± 0,7) · 10 ⁵ | -32,0 ± 0,5 | -45,4 ± 1,0 | -13,4 ± 1,0 |

1.1. METODY BADANIA ODDZIAŁYWANIA PEPTYDOGLIKANU Z WANKOMYCYNĄ

Wraz z pojawieniem się szczepów gronkowca złocistego opornych na działanie stosowanych dotąd leków bardzo ważne stało się opracowanie/zaprojektowanie nie tylko nowych antybiotyków lecz również metod ich selekcji. Stanowi to duże wyzwanie dla naukowców ponieważ powierzchnia bakterii wykazuje się słabymi właściwościami antygenowymi [4–7]. Badania nad nowymi lekami trwają od kilku do kilkunastu lat, niestety najwięcej czasu pochłaniają testy kliniczne. Dlatego też projektowanie nowych leków i metod ich badania opiera się na wykorzystaniu wiedzy o mechanizmie działania istniejących już antybiotyków, co pozwala na skrócenie czasu przeprowadzanych analiz.

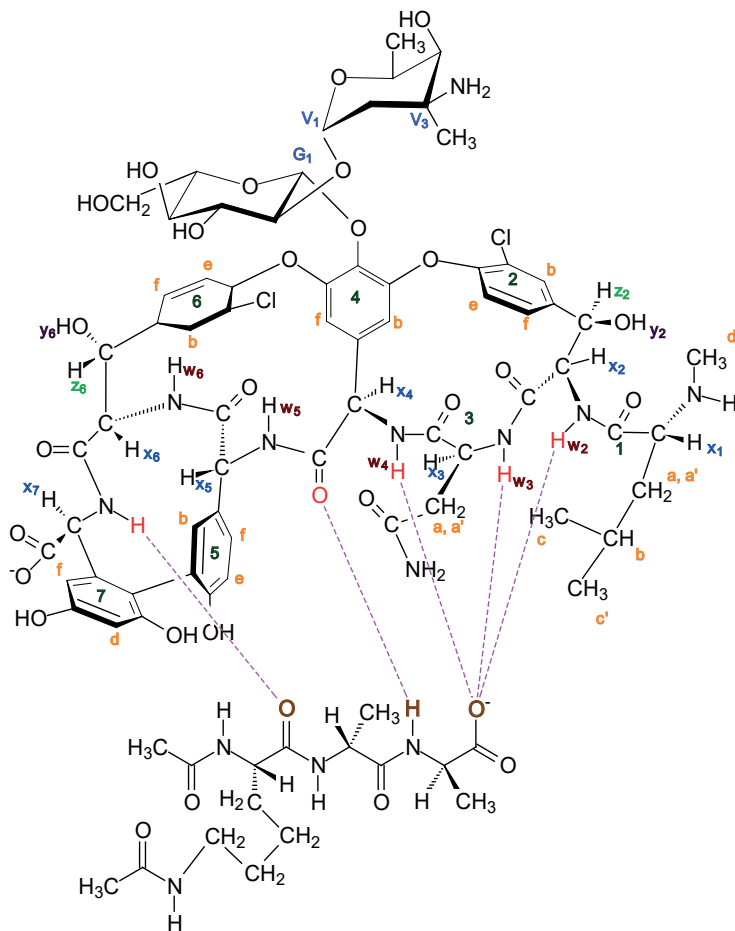
W przypadku gronkowca złocistego wykorzystuje się podstawową wiedzę o jego zdolności tworzenia się kompleksu C-terminalnego fragmentu dipeptydowego (D-Ala-D-Ala), wchodzącego w skład peptydoglikanu z wankomycyną. Na tej podstawie opracowano kilka metod badania oddziaływania pomiędzy antybiotykiem, a powierzchnią ściany komórkowej bakterii. Opierały się one na wykorzystaniu już istniejących technik analitycznych, m.in. spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) czy spektrometria mas z jonizacją typu electrospray (ang. *Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry*, ESI-MS).

Wraz z rozwojem techniki NMR i odkryciem efektu NOE nastąpił gwałtowny postęp w określaniu struktur różnego typu związków, w tym wankomycyny. Po poznaniu dokładnej budowy antybiotyku ostatniej szansy w terapii przeciwko zakażeniom wywołanym szczepami MRSA, dużo czasu poświęcono na badania tworzenia się kompleksu z fragmentem peptydoglikanu. Pionierami tego typu badań był Williams wraz ze współpracownikami [8]. W pierwszej fazie badań zastosowali oni model wykorzystujący głównie fragmenty di- i tripeptydowe (Ac-D-Ala-D-Ala, Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala) oraz wankomycynę. Badanie struktury kompleksu okazało się skomplikowane ze względu na niejednoznaczne przypisanie m.in. protonów amidowych (–CONH–) wankomycyny biorących udział w tworzeniu wiązań wodorowych w kompleksie, w odniesieniu do protonów pochodzących z cząsteczki wankomycyny niebiorącej udziału w tworzeniu kompleksu [8].

Początkowo analizy przeprowadzano w temperaturze 25°C i DMSO-d₆ nie otrzymując jednoznacznych wyników. W celu zahamowania wymiany protonów zastosowano ponownie jako rozpuszczalnik DMSO-d₆, ale z domieszką CCl₄ (3:1), obniżono temperaturę z 25 do 0°C, CCl₄ zastosowany został jako antyzamrażacz (ang. *antifreeze*). Warunki te obniżały stałą dysocjacji kompleksu i chroniły przed zbyt szybką wymianą protonów, powodujących zrywanie wiązań wodorowych. Do analizy zastosowano mieszaninę ~20 mM każdego komponentu, uzyskując kompleks w stosunku 1 : 1 [9].

Z analizy widm ¹H NMR wynikało, że nastąpiła zmiana wartości przesunięć protonów grup metylowych dipeptydu Ac-D-Ala-D-Ala z 1,28 oraz 1,18 (w przy-

padku samego dipeptydu) na 0,5 i 0,92 dla fragmentu peptydowego „związanego” w kompleks z wankomycyną. Wpływa na to ulokowanie tych grup naprzeciwko pierścieni aromatycznych wankomycyny (głównie pierścienia 5 i 7 – Rys. 3, Tab. 2). Kolejnym dowodem tworzącego się kompleksu były zmiany wartości przesunięć chemicznych w kierunku wyższych wartości dla grup amidowych NH z antybiotyku (Tab. 3). Stwierdzono, że pierścienie aromatyczne bifenylu oddziałują z grupą metylową *N*-terminalnej reszty *D*-alaniny z fragmentu peptydowego [9, 10]. Interakcje te potwierdzone zostały z analizy X-ray CDPI [11].



Rysunek 3. Kompleks wankomycyna – fragment peptydowy peptydoglikanu wykorzystany do badań oddziaływań przy wykorzystaniu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego [10]

Figure 3. Complex between vancomycin and a peptide fragment of peptidoglycan used for studies of interactions using NMR spectroscopy [10]

Table 2. Zmiana przesunięć chemicznych we fragmencie peptydowym peptydoglikanu związanego w kompleks z wankomycyną (A1) [10]

Table 2. Changing of the chemical shifts in a peptide fragment of peptidoglycan bound in a complex with vancomycin (A1) [10]

| Proton peptydowy | A1 + dipeptyd | | Proton peptydowy | A1 + tripeptyd | |
|--------------------|---------------|----------|-------------------|----------------|----------|
| | Wolny | Związany | | Wolny | Związany |
| A _C Me | 1,28 | 0,50 | A _C Me | 1,28 | 0,50 |
| A _C CH | 4,14 | 3,90 | A _C CH | 4,16 | 3,90 |
| A _C NH | 8,16 | 7,84 | A _C NH | 8,10 | 7,84 |
| A _N Me | 1,18 | 0,92 | A _N Me | 1,20 | 0,92 |
| A _N CH | 4,30 | 4,70 | A _N CH | 4,30 | 4,52 |
| A _N NH | 8,06 | 8,06 | A _N NH | 8,24 | 8,02 |
| CH ₃ CO | 1,82 | 1,82 | KαCH | 4,18 | 4,18 |
| | | | KεCH ₂ | 3,00 | 3,06 |
| | | | KαNH | 8,10 | 7,48 |
| | | | KεNH | 7,84 | 7,94 |

Table 3. Zmiana przesunięć chemicznych wybranych protonów wankomycyny (A1) w kompleksie z fragmentem peptydowym mureiny [10]

Table 3. Change of chemical shifts selected protons of vancomycin (A1) in complex with a peptide fragment of murein [10]

| Wankomycyna (A1) | A1 | A1 + dipeptyd | A1 + tripeptyd |
|------------------|------|---------------|----------------|
| w5 | 8,64 | 8,76 | 8,90 |
| w7 | 8,46 | 8,74 | 9,15 |
| w4 | 8,22 | 9,00 | 9,00 |
| w2 | 7,80 | 11,70 | 11,80 |
| 6b | 7,89 | 7,26 | 7,16 |
| 2f | 7,50 | 7,62 | 7,60 |
| 2b | 7,46 | 7,17 | 7,16 |
| 2e | 7,20 | 6,90 | 6,88 |
| 5b | 7,20 | 7,77 | 7,82 |
| w3 | 6,78 | 8,30 | 8,34 |
| x4 | 5,74 | 5,88 | 5,90 |
| x2 | 4,86 | 5,18 | 5,17 |
| 4b | 5,52 | 5,40 | 5,40 |
| x5 | 4,38 | 4,64 | 4,64 |
| x3 | 4,38 | 4,70 | 4,70 |
| x7 | 4,38 | 4,40 | 4,50 |
| x1 | 3,20 | 4,14 | 4,16 |
| x6 | 4,20 | 4,50 | 4,40 |

| Wankomycyna (A1) | A1 | A1 + dipeptyd | A1 + tripeptyd |
|------------------|------------|---------------|----------------|
| N-Me | 2,40 | 2,64 | 2,60 |
| 3a, 3a' | 2,38; 2,12 | 2,16 | 2,10 |
| 1b | 1,70 | 1,65 | 1,38 |
| 1a, a' | 1,50; 1,30 | ~1,38 | 1,40 |
| V6 | 1,06 | 1,02 | 1,00 |
| 1c | 0,90 | 0,70 | 0,68 |
| 1c' | 0,86 | 0,70 | 0,68 |

W tworzenie wiązań wodorowych w kompleksie zaangażowane są w sumie 3 grupy amidowe NH, jedna grupa karbonylowa C=O oraz jedna grupa aminowa (NH₂+CH₃) pochodzące z wankomycyny. Analiza widm NMR potwierdziła powstawanie tych oddziaływań. Wskazywała na to m.in. zasadnicza zmiana przesunięcia protonu w2 (Rys. 3). W kompleksie wartość jego wynosi 11,7 ppm, podczas gdy w wolnej wankomycynie jest przesunięta o około 3,9 ppm w kierunku niższych wartości. Taka różnica tłumaczona jest tworzącym się wiązaniem pomiędzy protonem a atomem tlenu z anionu karboksylanowego C-teminalnej reszty D-alaniny (Tab. 3) [10].

Wraz ze zmianą wartości przesunięcia chemicznego grup NH zmienia się siła powstającego wiązania. Porównując siłę tworzącego się wiązania wodorowego pomiędzy ligandem a grupą NH drugiej reszty aminokwasowej wankomycyny zauważalna jest pewna prawidłowość. Im dłuższy jest fragment peptydowy tym większa jest siła wiązania w tworzącym się kompleksie. (brak ligandu < Ac-D-Ala < Ac-D-Ala-D-Ala < Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala) [2]. Wpływ na tę zależność mają tworzące się dodatkowo oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe. Wykorzystanie fragmentu tripeptydowego pozwoliło ustalić, że w roztworze wodnym ma miejsce rotacja łańcucha bocznego L-lizyny dzięki czemu skierowany on jest stroną pierścienia aromatycznego w pozycji 7 antybiotyku (Rys. 3) [12, 13].

Przy wykorzystaniu technik NOE zaobserwowano, że protony ligandu i antybiotyku są ułożone względem siebie stosunkowo blisko. Wpływa na to zmiana konfiguracji w obrębie wankomycyny i tworzenia przez nią tzw. karboksylowej kieszeni wiążącej (ang. carboxylate binding pocket). Utworzona jest ona głównie przez reszty aminokwasowe antybiotyku znajdujące się w pozycji 2, 3 oraz 4. Rotacja wiązań w obrębie reszty L-izoasparaginy, N-metylo-L-leucyny i p-hydroksyfenyloglicyna, ułatwia jej powstanie. Obrót o 180° wiązania αCHCO w N-metylo-L-leucynie pozwala na zmianę ułożenia terminalnego kationu grupy N-metylowej (NH₂+CH₃) i wytworzenie oddziaływań elektrostatycznych z anionem karboksylanowym (COO⁻) D-alaniny.[13]

Tworzenie się wiązania wodorowego pomiędzy anionem karboksylanowym z ligandu a grupami NH antybiotyku potwierdzone zostały przy użyciu techniki krystalografii. Jak dotąd do analiz wykorzystywano głównie krótkie fragmenty peptydowe, takie jak di- i tripeptydowe, a badania nad tworzeniem się kompleksu wan-

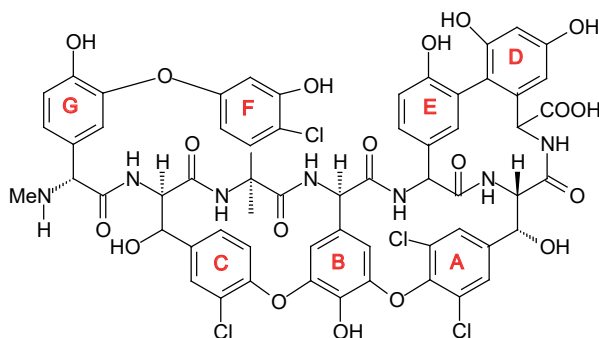
komocyny z dłuższymi fragmentami peptydoglikanu przez długi okres czasu były słabiej udokumentowane.

Pierwsze analizy z zastosowaniem fragmentu pentapeptydowego L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala przeprowadził Mueller [14]. Do badań wykorzystany został aglikon aridicyny A (Rys. 4), identyczny z fragmentem heptapeptydowym wankomocyny. Tworzenie się kompleksu potwierdziła m.in. zmiana przesunięć chemicznych dla atomów azotu z grup amidowych heptapeptydu (Tab. 4) [14].

Table 4. Zmiana przesunięć chemicznych atomów azotu (^{15}N) z grup amidowych pochodzących z łańcuchów peptydowego aglikonu aridicyny A [14]

Table 4. Changing of chemical shifts nitrogen atom (^{15}N) amide groups coming from the peptide chain of the aglycone aridicine A [14]

| Label (etykieta) | Tripeptyd | | | Pentapeptyd | | |
|------------------|-----------|----------|---------|-------------|----------|---------|
| | Wolny | Związany | Różnica | Wolny | Związany | Różnica |
| CNH | 108,0 | 111,7 | +3,7 | 108,0 | 111,7 | +3,7 |
| FNH | 118,1 | 122,5 | + 4,4 | 118,4 | 122,6 | +4,2 |
| BNH | 118,3 | 116,0 | -2,3 | 118,1 | 115,9 | -2,2 |
| ENH | 122,1 | 123,9 | +1,6 | 122,1 | 123,8 | +1,7 |
| ANH | 105,6 | 105,6 | 0,0 | 105,6 | 105,0 | -0,6 |
| DNH | 128,3 | 128,3 | 0,0 | 126,5 | 126,8 | +0,3 |



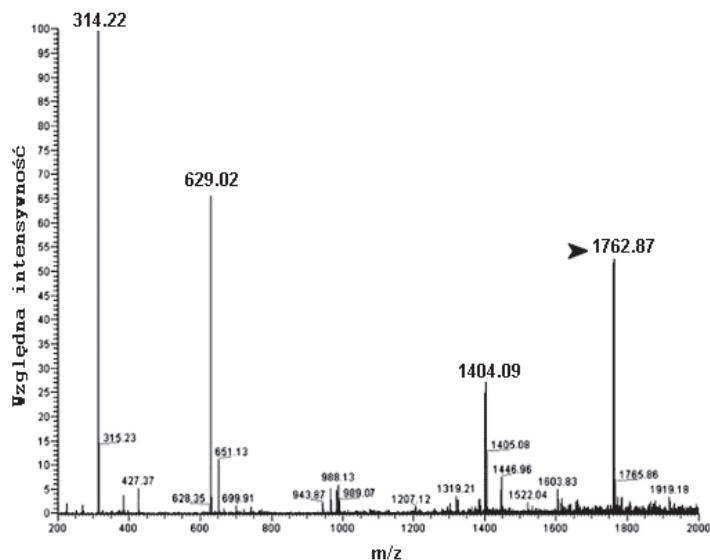
Rysunek 4. Aglikon aridicyny A [14]

Figure 4. Acridicine A aglycone [14]

Zmiany wartości przesunięcia chemicznego grup ANH oraz DNH wskazują, że również reszta D-iGln uczestniczy w tworzeniu kompleksu. Dalsze analizy wskazały również, że łańcuch boczny reszty D-iGln skierowany jest w kierunku 6 pierścienia aromatycznego aglikonu [15].

Oprócz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystano również inne techniki do badań wzajemnego oddziaływania w tworzącym się kompleksie pomiędzy fragmentem peptydoglikanu a wankomocyną. W tym celu wykorzystano powszechnie znaną technikę analityczną, taką jak wysoko-

sprawną chromatografię cieczową (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Cieszy się ona również dużym zainteresowaniem wśród syntetyków, wykorzystujących ją do określania czystości otrzymywanych związków oraz ich oczyszczania, a także coraz częściej znajduje zastosowanie do badania tworzenia się kompleksów pomiędzy różnego typu związkami. Hermount wraz ze współpracownikami [16] wykorzystał tę metodę do badania zdolności tworzenia się kompleksów pomiędzy wankomycyną a fragmentem tripeptydowym (*N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) i jego analogami (*N*-*t*BuO-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala i *N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala). Do rejestracji wyników wykorzystany został diodearray detektor 996 UV przy długości fali 280 nm i kolumna Symmetry-ShieldTM RP C18. Fazę mobilną stanowił bufor octanu amonu (pH 5,0; 70 mM) (A) i acetonitril (B), przy zastosowanym gradiencie 95% A \rightarrow 5% A, w czasie 20 min. Wykorzystując różne stężenie „ligandów” stwierdzili, że przy stosunku molowym 1:25 (wankomycyna : fragment peptydowy) ma miejsce „zanik” wolnej wankomycyny o 52,2% i 73,9% w wyniku tworzenia się kompleksu odpowiednio z *N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala i *N*-*t*Bu-O-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala. W celu potwierdzenia tworzącego się kompleksu pomiędzy antybiotykiem a fragmentem peptydowym wykorzystano metodę ESI-MS. Jon molekularny 314 odpowiada masie molekularnej *N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala, 629,02 i 943,87 odpowiednio dimerowi i trimerowi pochodnej peptydowej, zaś 1404,09 fragmentacji wankomycyny (masa wankomycyny pomniejszona o grupę COOH) zaś 1762,87 wskazuje na tworzący się kompleks pomiędzy obydwoma typami związków (Rys. 5) [16].

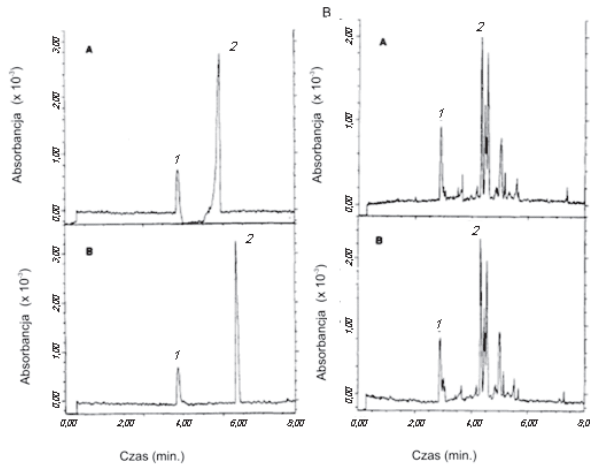


Rysunek 5. Analiza ESI oddziaływania wankomycyny z fragmentem peptydowym (*N*-Me-6-aminokaproilo-D-Ala-D-Ala) [16]

Figure 5. ESI analysis of interaction of vancomycin with a peptide fragment (*N*-Me-6-aminocaproilo-D-Ala-D-Ala) [16]

Wśród wielu technik analitycznych stosowanych do badań oddziaływania w tworzących się kompleksach typu ligand-receptor swoje zastosowanie znalazła również elektroforeza kapilarna. Okazała się metodą szybką i skuteczną w określaniu powinowactwa pomiędzy wankomycyną i fragmentami peptydowymi. Od kilku lat prezentowane są prace ukazujące zalety tej metody. Badania w głównej mierze przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu prekursora peptydoglikanu UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala wyizolowanego ze szczepu gronkowca złocistego 209P oraz prekursora UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Lac (z *L. casei* 7469) i UDP-*N*-acetylo-*D*-muramylo-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys-(*L*-Ala)-*D*-Ala-*D*-Lac (*L. mesenteroides* VR1) [17].

Pomiar wykonano w czasie 20 s przy natężeniu 7 μ A, z zastosowaniem buforu startowego (0,2 M glicyna, 0,03 M Tris) o pH 8,30 i stężeniu ligandu (wankomycyny) w buforze 25 mM. Stężenie nanoszonej próbki wynosiło 10 μ L prekursora peptydoglikanu i 10 μ L tlenu mesitylu. Zmiana czasu „retencji” z 4,3 min na 3,9 min potwierdziła tworzenie się kompleksu (Rys. 6). Podobna analiza przeprowadzona została dla próbek, w których *C*-terminalna reszta *D*-alaniny zastąpiona była *D*-mleczanem, ale w ich przypadku nie odnotowano żadnej zmiany na chromatogramie. Dodatkowo wykonana analiza Scatchard pozwoliła wykreślić stałą dysocjacji kompleksu prekursor peptydoglikanu – antybiotyk wynoszącą $K_d \sim 62,5 \mu\text{M}$ (stała wiązania – binding konstant – $K_b \sim 1,6 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$) [16].

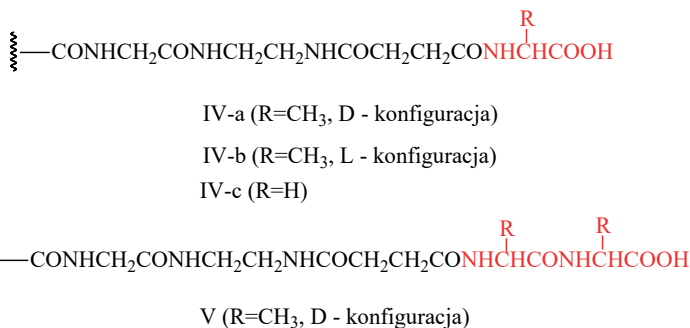


Rysunek 6. Ocena zdolności oddziaływania pentapeptydowego prekursora peptydoglikanu (A) *S. aureus* 209P, (B) *L. casei* 7469 z wankomycyną przy wykorzystaniu elektroforezy kapilarniej [17]

Figure 6. Evaluation of ability interaction of pentapeptide fragment of peptidoglycan precursor (A) *S. aureus* 209P, (B), *L. casei* 7469 with vancomycin using capillary electrophoresis [17]

Elektroforeza kapilarna coraz częściej wykorzystywana jest do badania oddziaływań pomiędzy enzymem a kofaktorem, proteiną-cukrem czy peptydem i antybiotykiem. Zaletą tej metody jest przypisanie różnych funkcji badanej próbce, zarówno roli receptora jak i ligandu.

Inne metody badania wzajemnego oddziaływania w tworzącym się kompleksie opierają się na wykorzystaniu poliakrylamidu. Yan wraz z współpracownikami zmodyfikował go resztami aminokwasowymi D-Ala, L-Ala, Gly oraz fragmentem peptydowym D-Ala-D-Ala wbudowane w linker [18]. Pełniły one rolę adsorbentów. Poprzez pomiar absorpcji określił on wzajemne powinowactwo „ligandu/adsorbentu” do antybiotyku. Zastosował dwa związki wankomycynę i demetylowankomycynę. Z przeprowadzonych analiz wynikało, że pochodna wankomycyny wykazywała się niższą zdolnością adsorpcyjną względem każdej zastosowanej pochodnej poliakrylamidowej, aniżeli jej pochodna i do tworzenia kompleksu konieczna jest obecność fragmentu dipeptydowego. Demetylowankomycyna dodatkowo tworzyła kompleks z resztami aminokwasowymi (Rys. 7, Tab. 5) [17].



Rysunek 7. Modyfikacja linkerów fragmentami peptydowymi [18]

Figure 7. Modification linker by peptide fragments [18]

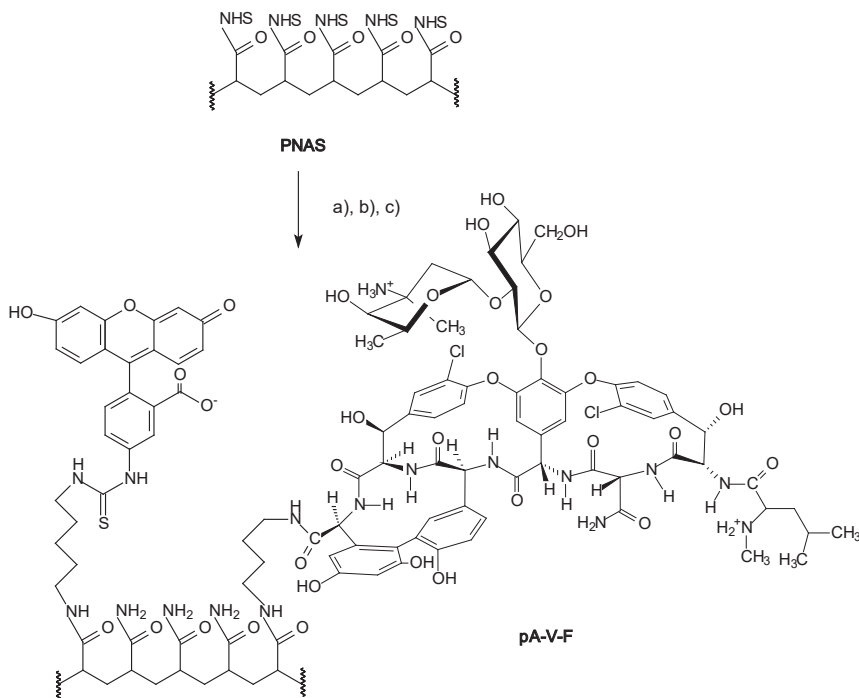
Table 5. Porównanie zmian absorpcji zmodyfikowanych dla fragmentów poliakrylamidu związanych w kompleksie z demetylowankomycyną lub wankomycyną [18]

Table 5. Comparison of changes absorption for a modified polyacrylamide fragments bound in a complex with demetylovancomycin or vancomycin [18]

| Adsorbent | Adsorpcja demetylowankomycyny | | Adsorpcja wankomycyny | |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| | Stężenie (mmol/g) | Stężenie/unieruchomiony ligand | Stężenie (mmol/g) | Stężenie/unieruchomiony ligand |
| IV-a | 0,35 | 0,83 | – | – |
| IV-b | 0,09 | – | – | – |
| IV-c | 0,29 | 0,56 | – | – |
| V | 0,59 | 1,44 | 0,53 | 1,29 |

Modyfikacja poliakrylamidu opierała się nie tylko na wbudowaniu w jego strukturę fragmentów peptydowych peptydoglikanu lecz również antybiotyku glikopeptydowego. Tego typu pracę przedstawił Whitesides i jego współpracownicy (Rys. 8) [19].

Model ten wykorzystuje zdolność tworzenia się kompleksu pomiędzy wankomycyną a C-terminalnym fragmentem dipeptydowym (D-Ala-D-Ala) pochodzącym z fragmentu mureiny. Zastosowany poliakrylamid pA zmodyfikowany został antybiotykiem glikopeptydowym – wankomycyną V (stanowiącym 5% polimeru) oraz grupą fluorescencyjną F (1%) (Rys. 8–10) [19].



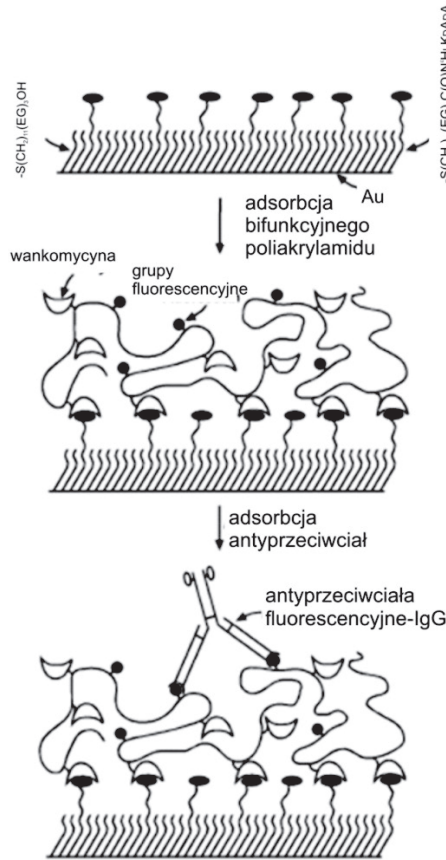
Rysunek 10. Synteza zmodyfikowanej pochodnej wankomycyny. Warunki syntezy: a) 0,02 ekwiwalentupochodnej fluorescencyjnej, Et_3N ; b) 0,01 ekwiwalentu pochodnej 5; c) $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (aq) [20]

Figure 10. Synthesis of modified derivative of vancomycin. Conditions of synthesis: a) 0.02 equiv. fluorescence derivative, Et_3N ; b) 0.01 equiv. derivative 5; c) $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (aq.) [20]

Wbudowanie grup fluorescencyjnych w strukturę pA opierało się na reakcji poly(*N*-akryloloksysukcynimidu) (PNAS) z 5-[(5-aminopentyl)tioureidylo] fluoresceiną (fluorescein cadaverine) w bezwodnym *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF) w obecności trietyloaminy. Natomiast modyfikacja pA-F wankomycyną związana była z przyłączeniem do niej linkera (pochodnej diaminobutylowej), a następnie przy wykorzystaniu środków sprzęgających HOBt i HBTU wbudowanie jej w strukturę poliakrylamidu (Rys. 9 i 10). Ilość przyłączonych grup fluorescencyjnych i antybiotyku określona została na podstawie analizy ^1H NMR oraz spektroskopii UV-VIS [20, 21].

Badania przeprowadzone zostały kilkutorowo. Wstępne analizy opierały się na wykorzystaniu SAMs (ang. *self-assembled monolayers*) na której zakotwiczone zostały fragmenty peptydowe (*N*- α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) [20, 21]. Powierzchnia

SAM została zaktywowana poprzez reakcję z $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ (1,8 mM) i $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OCH}_2\text{COOH}$ (0,2 mM) w etanolu [21]. Wolna grupa karboksylowa zaktywowana została *N*-hydroksysukcynimidem i przyłączony został do niej fragment tripeptydowy. Obecność fragmentu *D*-Ala-*D*-Ala potwierdzona została przy wykorzystaniu techniki spektroskopii w podczerwieni (ang. *Polarized Infrared External Reflectance Spectroscopy*, PIERS) [20].



Rysunek 11. Model powierzchni samonośnej z wbudowanymi fragmentami peptydowymi *D*-Ala-*D*-Ala wykorzystywanej do badania oddziaływania z bifunkcyjnym poliakrylamidem [20]

Figure 11. Surface model of peptide fragments *D*-Ala-*D*-Ala used for studying the effect with bifunctional polyacrylamide [20]

Tworzące się oddziaływania pomiędzy wankomycyną a fragmentem dipetydowym potwierdzone zostały przy wykorzystaniu techniki spektroskopii rezonansu powierzchniowego (ang. *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*, (SPR)) oraz mikroskopu fluorescencyjnego (ang. *Fluorescence Microscopy*), potwierdzając tworzenie się stabilnego kinetycznie kompleksu, dla którego k_{off} (stała szybkości rozpadu) wynosi około $2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Rys. 11) [20, 22].

Dodatkowo wykorzystanie metody fluorescencyjnej pozwoliło na określenie wzajemnego powinowactwa pomiędzy stosowanym antybiotykiem a produktami odpowiedzi immunologicznej organizmu (przeciwciałami czy makrofagami) lub z powierzchnią bakterii czy wirusów, gdzie grupa fluorescencyjna pełni rolę antygeny przeciwko którym organizm wytwarza specyficzne przeciwciała. Wykazano ponadto zdolność tworzenia kompleksu bifunkcyjnegopoliakrylamidu nie tylko z powierzchnią SAM lecz również z powierzchnią komórek bakteryjnych. W tym celu wykorzystano hodowlę szczepów *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* i *E. faecalis*. W przypadku bakterii Gram-ujemnych nie odnotowano tworzenia się kompleksu, co potwierdza, że wankomycyna nie jest skuteczna przeciwko tym bakteriom. Wykorzystanie przeciwciał [IgG(anty-fluor)] i metody cytometrycznej pozwoliło na kontrolę wzrostu komórek bakteryjnych szczepów podatnych na działanie wankomycyny, a także stworzyło dodatkowo możliwość wykorzystania tej techniki w przypadku szczepów VRSA [20].

UWAGI KOŃCOWE

Opracowane metody badań sił oddziaływania pomiędzy wankomycyną a fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatniej mogą posłużyć jako nowe techniki szybkiej selekcji nowych potencjalnych antybiotyków, w tym pochodnych glikopeptydowych. Skróci to niewątpliwie czas wprowadzenia nowych leków skierowanych do walki z zakażeniami wywołanymi przez bakterie Gram-dodatnie, a przede wszystkim *S. aureus*.

PODZIĘKOWANIA

Praca współfinansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.01.02-14-102/09) oraz DS 530-8455 -D 501-15.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] a) New York Times, 1945, 26 lipiec, 21; b) S.B. Levy, *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*, 1992.
- [2] D.H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, **38**, 1172.
- [3] M. Rekharsky, D. Heseck, M. Lee, S.O. Meroueh, Y. Inoue, Sh. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7736.
- [4] C. Picard, A. Puel, J. Bustamante, C.L. Ku, J.L. Casanova, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, **3**, 451.
- [5] H.A. Verbrugh, P.K. Peterson, B.Y. Nguyen, S.P. Sisson, Y.J. Kim, *Immunol.*, 1982, **129**, 1681.
- [6] J. Casal, D. Tarrago, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2003, **16**, 219.
- [7] D. Bogaert, P.W.H. Hermans, P.V. Adrian, H.C. Rumke, R. de Groot, *Vaccine*, 2004, **22**, 2209.

- [8] D.H. Williams, D.W. Butcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5700.
- [9] D.H. Williams, D.W. Butcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5697.
- [10] R. Kannan, C.M. Harris, T.M. Harris, J.P. Waltho, N.J. Skelton, D.H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2946.
- [11] G.M. Sheldrick, P.G. Jones, O. Kennard, D.H. Williams, G.A. Smith, *Nature (London)*, 1978, **271**, 223.
- [12] Williamson, M.P.; Williams, D.H. *J. Chem. Perkin. Trans.*, 1985, **1**, 949.
- [13] S.W. Fesik, T.J. O'Donnell, R.T. Gampe Jr, E.T. Olejniczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 3165.
- [14] L. Mueller, S.L. Heal, J.C. Hempel, P. Jeffs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 496.
- [15] L. Cegielski, S.J. Kim, A.W. Hing, D.R. Studelska, R.D. O'Connor, A.K. Mehta, J. Schaefer, *Biochemistry*, 2002, **41**, 13053.
- [16] O. Hernout, K. Berthoin, I. Delattre, P.M. Tulkens, S. Carryn, J. Marchand-Brynaer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, **17**, 5758.
- [17] J. Liu, K.J. Volk, M.S. Lee, M. Pucci, S. Handwerger, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2412.
- [18] H. Yan, Q. Zhao, J. Yuan, X. Cheng, B. He, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, **31**, 15.
- [19] V.M. Krishnamurthy, L.J. Quinton, L.A. Estroff, S.J. Metallo, J.M. Isaacs, J.P. Mizgerd, G.M. Whitesides, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3663.
- [20] S.J. Metallo, R.S. Kane, R.E. Holmlin, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4534.
- [21] J. Lahiri, L. Isaacs, B. Grzybowski, J.D. Carbeck, G.M. Whitesides, *Langmuir*, 1999, **15**, 7186.
- [22] C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7155.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca

PEPTYDOGLIKAN – BUDOWA, ROLA BIOLOGICZNA ORAZ SYNTEZA

PEPTIDOGLYCAN – STRUCTURE, BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL SYNTHESIS

**Justyna Samaszko-Fiertek*, Barbara Dmochowska,
Janusz Madaj**

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Cukrów
ul. Wita Stwosza 63, 80-303 Gdańsk
e-mail: j.samaszko-fiertek@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Peptydoglikan

1.1. Budowa

1.2. Rola biologiczna

1.3. Struktura trzeciorzędowa

1.4. Biosynteza

1.5. Synteza chemiczna

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Barbara Dmochowska w roku 1994 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: tworzenie czwartorzędowych soli *N-D*-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

ABSTRACT

The most important component of bacterial cell walls especially Gram-positive bacteria is peptidoglycan, called also murein, PGN. The first time this synonym was used in 1964 by Weidel and Pelzer [1]. Peptidoglycan is present in the outer layer of the cytoplasmic membrane and its structure. The structure of peptidoglycan depends on the bacteria strain. It is estimated that in Gram-negative bacteria, it occupies only about 10–20% of the total area of the cell wall, when in Gram-positive bacteria it is 50 and up to 90% of all space.

Problems with isolation with high purity of biological material shows the need for developing techniques for chemical synthesis of peptidoglycan fragments and their analogs. In past few years there has been a growing interest within the synthesis of compounds glycoprotein (glycopeptides, peptidoglycan, etc.). As a basis for the construction of cell walls of many bacteria.

Despite intensive research and gain significant knowledge of the physical and biological, chemical synthesis or biosynthesis (Fig. 5 and 6) of peptidoglycan, not so far failed to unambiguously determine its three-dimensional structure. The works of Kelman and Rogers [15] and Dimitriev [20] nearer picture of its structure. However, the time to develop *in vivo* visualization of cell structure it will be difficult to identify correctly peptidoglycan three-dimensional structure.

Due to the important biological roles of murein, many research centers have taken to attempt their chemical synthesis. For biological research began to use chemically synthesized peptidoglycan fragments which guaranteed both uniform and a certain structure. An important roles in the development of methods of chemical synthesis of peptidoglycan had H. Chowdhury work, Fig. 8 [35], Heseck, Fig. 9 and 10 [36, 37], Dziarskiego [38] and Boneca [39] and Inamury [34, 40].

Keywords: peptidoglycan, chemical synthesis, biosynthesis, biological activity

Słowa kluczowe: peptydoglikan, synteza chemiczna, biosynteza, rola biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Używane w tekście symbole aminokwasów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature zawartymi w Eur. J. Biochem., 1985, **138**, 9-37 oraz *A Short Guide to Abbreviations and Their Use In Peptide Science*, J. Peptide Sci., 1999, **5**, 465-471. W wypadkach nie objętych postanowieniami stosowano oznaczenia powszechnie przyjęte w chemii peptydów.

| | |
|------------|---|
| AFM | – ang. <i>Atomic Force Microscopy</i> |
| ATP | – adenozyno-5'-trifosforan |
| GalNAc | – <i>N</i> -acetylo-D-galaktozamina |
| GlcNAc | – <i>N</i> -acetylo-D-glukozamina |
| MDP | – muramyldipeptyd |
| MurG | – <i>N</i> -acetyloglukozaminylotransferaza |
| MraY | – specyficzna translokazy |
| MTP | – muramylotripeptyd |
| MurA | – transferaza enoilopirogroniowa |
| MurNAc | – kwas <i>N</i> -acetylo-D-muraminowy |
| NADPH | – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy |
| PGN | – ang. <i>peptidoglycan</i> |
| TEM | – transmisyjny mikroskop elektronowy |
| UDP-GlcNAc | – UDP- <i>N</i> -acetylo-D-glukozamina |
| UTP | – urydino-5'-trifosforan |

WPROWADZENIE

W życiu człowieka od zawsze towarzyszą jemu wszelkiego rodzaju drobnoustroje – grzyby, bakterie, wirusy, itp. Niektóre z nich mają dobroczynny charakter, a niekiedy nawet ich obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Część z nich odnalazła swoje zastosowanie w probiotykach np. bakterie kwasu mlekowego, tak bardzo ważne do stosowania w trakcie prowadzonej kuracji antybiotykowej. Chronią one przed rozwojem innych infekcji, grzybów i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania jelit. Niestety wiele bakterii ma charakter chorobotwórczy. Przyczyniają się do rozwoju wielu infekcji, prowadzących do groźnych, niekiedy wręcz nieuleczalnych chorób. W przeciągu ostatnich kilku lat powodem wielu poważnych schorzeń były bakterie Gram-dodatnie. Największa zjadliwość wśród nich przypisywana jest gronkowcowi złocistemu (*Staphylococcus aureus*). Szacuje się, że od 10 do 50% populacji ludzkiej jest na stałe lub okresowo nosicielami tego drobnoustroju, z czego u znacznej większości nie zaobserwowano występowania objawów chorobotwórczych. Żyją oni z tą bakterią w ciągłej symbiozie, są dla niej pewnego rodzaju żywicielem, nieustannie dostarczają jej pokarm, a w zamian gronkowiec chroni swojego „dobroczyńcę” przed innymi bakteriami. Niestety *Staphylococcus aureus* pomimo swojego „dobroczynnego wpływu”, jeśli tylko spotka sprzyjające warunki (np. obniżona odporność organizmu) zaczyna siać powszechny postrach. Gronkowiec złocisty uważany jest od wielu lat za jeden z podstawowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne ludzi. Odpowiedzialny jest on m.in. za zakażenia ran chirurgicznych, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych oraz zakażenia noworodków na oddziałach intensywnej terapii.

Pojawienie się coraz to nowszych, bardziej niebezpiecznych infekcji wywołanych przez kolejne szczepy bakteryjne przyczyniło się do konieczności poznania mechanizmów ich zjadliwości. Powstanie nowych i rozwinięcie się już istniejących technik analitycznych pozwoliło na kompleksową analizę budowy ściany komórkowej, jak również próby jej syntetycznego „odtworzenia”, co niewątpliwie ułatwia poznanie ogromu czynników ich wirulentności i patogenności bakterii. Wśród nich wyróżniamy m. in. zdolność wytwarzania toksyn czy enzymów zewnątrz wydzielniczych, jednakże w tym aspekcie dużą rolę odgrywa również sama budowa ściany komórkowej bakterii. Gronkowiec złocisty w głównej mierze zbudowany jest z peptydoglikanu (50–90%), który sam charakteryzuje się właściwościami immunostymulacyjnymi. Już w 1974 roku wykazano, że najmniejszym fragmentem adiutantomu czynnym jest muramyłodipeptyd (MDP), stymulujący wytwarzanie licznych cytokin. Jednakże fragmentu tego nie można wyodrębnić bezpośrednio ze ściany komórkowej bakterii, a można go otrzymać wyłącznie na drodze syntezy chemicznej.

Obserwowane problemy w dopracowaniu technik izolowania materiału biologicznego, odznaczającego się wysoką czystością zwróciły uwagę na konieczność rozwoju technik syntezy chemicznej określonych fragmentów, stanowiących analogi

tych, które zostały wyizolowane z materiału biologicznego. Sprawilo to, że nastąpił duży wzrost zainteresowania syntezą związków glikoproteinowych (glikopeptydów, peptydoglikanów, itp.), stanowiących podstawę budowy ścian komórkowych wielu bakterii. Od tego czasu opracowano wiele nowych technik uwzględniających syntezę odpowiednich fragmentów (cukrowych, peptydowych) zarówno w roztworze, jak i na nośniku stałym, a także bardziej zaawansowanych opartych na remodelowaniu glikoprotein czy metodzie *in vivo* supresyjnej tRNA.

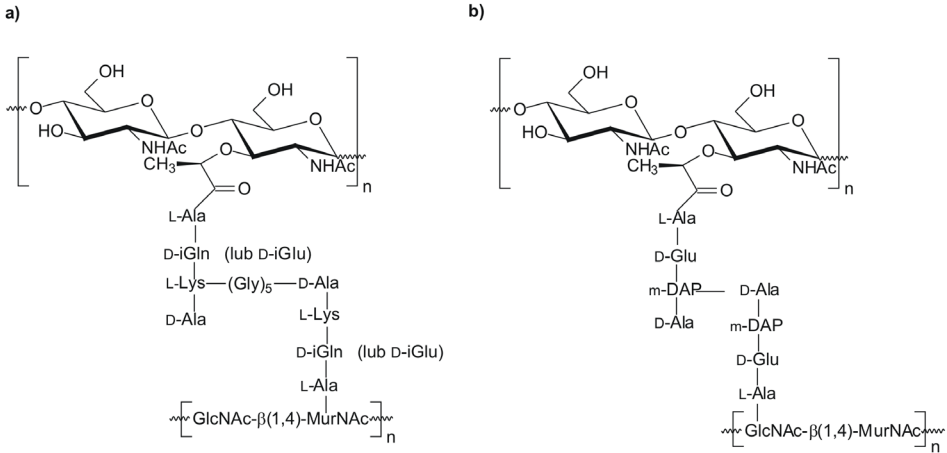
1. PEPTYDOGLIKAN

Ważnym składnikiem ścian komórkowych bakterii zarówno Gram-dodatniej, jak i Gram-ujemnej jest peptydoglikan, zwany również mureiną (PGN). Synonim ten został użyty po raz pierwszy w 1964 roku przez Weidela i Pelzera [1]. Peptydoglikan obecny jest w zewnętrznej warstwie membrany cytoplazmatycznej. W zależności od bakterii różni się on składem (budową), a przede wszystkim zajmowaną powierzchnią (grubością warstwy). Szacuje się, że w przypadku bakterii Gram-ujemnych zajmuje on tylko około 10–20% całkowitej powierzchni ściany komórkowej, a w przypadku bakterii Gram-dodatnich od 50 do nawet 90%.

1.1. BUDOWA

Peptydoglikany występujące w ścianie komórkowej bakterii zbudowane są z długich łańcuchów polisacharydowych, składających się z powtarzających się jednostek *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym. W niektórych peptydoglikanach zamiast reszty MurNAc występuje kwas *L*-talozaaminouronowy. Do grupy karboksylowej kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego przyłączony jest fragment peptydowy składający się z reszt *L*- i *D*-aminokwasów, a w przypadku kwasu *L*-talozaaminouronowego fragment ten składa się wyłącznie z *L*-aminokwasów [2].

Łańcuch peptydowy *S. aureus* zbudowany jest z reszt *L*-alaniny, kwasu *D*-izoglutaminowego (w przypadku niektórych szczepów gronkowca reszta ta zastąpiona jest *D*-isoglutaminą), *L*-lizyny oraz *D*-alaniny (Rys. 1a).



Rysunek 1. Przykłady peptydoglikanu występującego w przyrodzie [2]

Figure 1. Examples of peptidoglycan fragments [2]

W przypadku bakterii Gram-ujemnych w miejsce L-Lys występuje najczęściej *meso*-Dap (np. *Escherichia coli*, Rys. 1b). Ważnym elementem budowy mureiny są mostki peptydowe. Łączą one poszczególne łańcuchy glikanu nadając silnie usieciowaną, trójwymiarową, sztywną strukturę, co stanowi istotną cechę tego typu związków. Mostki peptydowe mogą różnić się od siebie w zależności od bakterii zarówno składem, jak i długością. Powoduje to, że wyróżniamy kilka typów mureiny. W typie A wiązanie poprzeczne powstaje pomiędzy grupą karbonylową D-alaniny z pozycji 4, a wolną grupą aminową aminokwasu diaminowego w pozycji 3 z sąsiedniego peptydu. W obrębie tej klasy wyróżniamy dodatkowo kilka podtypów. W przypadku A1 wiązanie peptydowe między obydwoma resztami jest bezpośrednie, ale może różnić się obecnością reszty diaminowej:

- A1 α – w tworzeniu wiązania uczestniczy L-lizyna;
- A1 β – grupa aminowa z łańcucha bocznego pochodzi od reszty L-ornityny;
- A1 γ – obecny jest kwas diaminopimelinowy (charakterystyczny dla większości bakterii Gram-ujemnych np. *E. coli*, rzadziej Gram-dodatnich, np. *L. monocytogenes*).

W mureinie podtypu A2 w tworzeniu mostków peptydowych biorą udział te same reszty aminokwasowe, które obecne są w fragmencie peptydowym.

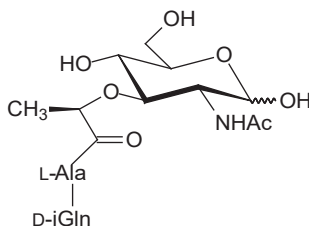
W momencie gdy mostek składa się z dwóch do siedmiu reszt aminokwasowych, mamy do czynienia z podtypem A3, dla którego charakterystycznym przedstawicielem jest gronkowiec złocisty. W skład jego peptydoglikanu wchodzi mostki pentaglicynowe, zaś w przypadku *S. pyogenes* dialanylowe [2]. Wiązania poprzeczne w mostkach utworzone przez aminokwasy dikarbosylowe (najczęściej D-asparaginę, D- lub L-glutaminę) występują w podtypie A4.

W przypadku mureiny typu B, mostki powstają pomiędzy resztą D-glutaminy w pozycji 2 jednego peptydu, a czwartą resztą aminokwasową (D-alaniną) sąsiedniego. Reszty te połączone są ze sobą przy pomocy aminokwasu diaminowego.

1.2. ROLA BIOLOGICZNA

Pierwszą linią obrony układu immunologicznego organizmów przeciwko mikroorganizmom jest rozpoznanie podstawowych składników ich budowy takich, jak peptydoglikan, lipopolisacharydy, lipoproteiny czy DNA bakteryjne. Związki te posiadają pewnego rodzaju mediatory, do których zaliczamy cytokiny, prostaglandynę czy tlenek azotu NO ułatwiające identyfikację obcych organizmów [36]. W wielu pracach peptydoglikanowi przypisuje się właściwości immunoadiuwantowe (immunostymulacyjne, ang. *immunopotentiator*), jednakże mechanizm ich działania jak dotąd nie został dokładnie poznany [7, 8].

Przez długie lata prowadzono pracę nad toksycznością, zjadliwością fragmentów mureiny i w 1974 roku odkryto, że najmniejszym fragmentem peptydoglikanu wykazującym minimum aktywności bakteryjnej (adiuwantowo czynnym) jest muramylodipeptyd MDP, N-acetylo-D-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (Rys. 2). Otrzymuje się go jedynie na drodze chemicznej syntezy [9], ponieważ enzymatyczna hydroliza materiału biologicznego prowadzi jedynie do otrzymania muramylotripeptydów (MTP), które wykazują się podobnie jak MDP właściwościami immunostymulacyjnymi.

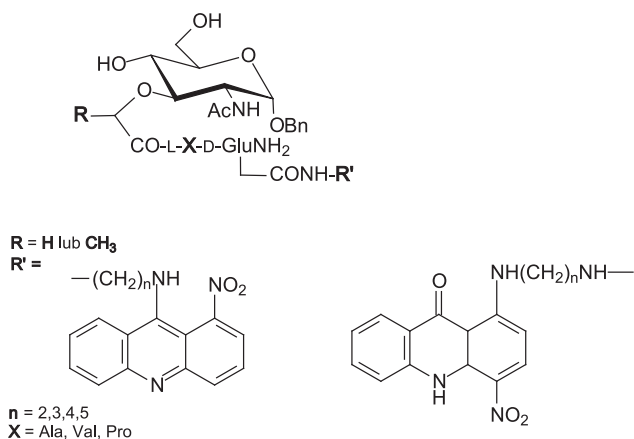


Rysunek 2. Budowa muramylodipeptydu (MDP)
Figure 2. Structure of muramyldipeptide (MDP)

Ze względu na znaczne właściwości biologiczne tego najmniejszego fragmentu przeprowadzono szeroki zakres badań mających na celu otrzymanie jego analogów. Starano się zwiększyć, a niekiedy nawet polepszyć jego właściwości farmakologiczne [10]. Synteza tego typu fragmentów nastręcza niekiedy wielu problemów. Pionierem w tego typu pracy był Arendt wraz ze swoimi współpracownikami [11]. Przedstawił on nowy sposób otrzymywania muramylopeptydów, będących pochodnymi peptydowymi o skomplikowanej strukturze. Zademonstrował syntezę muramylotrapeptydu, stanowiącego odpowiednik naturalnego fragmentu ściany komórkowej bakterii [12].

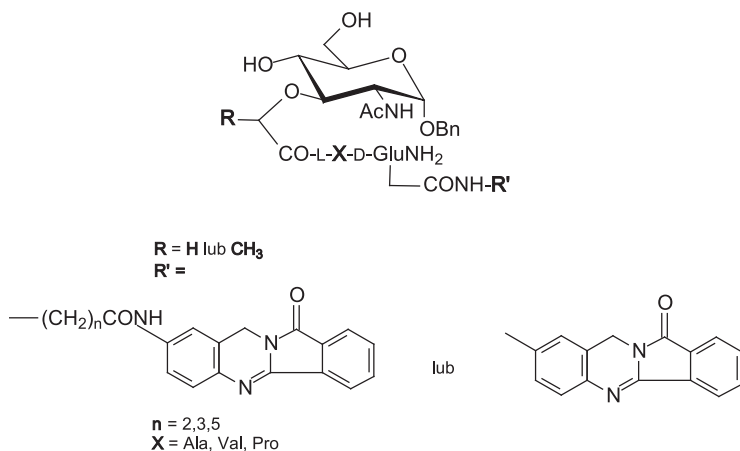
Warte uwagi są również prace Azuma i współpracowników, zajmujących się syntezą wielu pochodnych MDP. Część z nich stanowiły pochodne acylowane w pozycji C-6 reszty cukrowej różnymi kwasami karboksylowymi, m.in. kwasem mykolinowym. Niektóre z nich wykazały się silne właściwości przeciwnowotworowe, np. chinylowe pochodne analogu MDP [13].

Przez ostatnie kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat otrzymano bardzo wiele analogów MDP oraz nor-MDP o stwierdzonej lub potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej czy immunomodulacyjnej. Niektóre z nich stanowią pochodne 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu (Rys. 3) lub batracykliny (Rys. 4), tuftsyny oraz ich pochodnych. Nad tego typu połączeniami prace prowadzone są m.in. przez grupę prof. Dzierzbickej i prof. Kołodziejczyka [14].



Rysunek 3. Pochodne 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu [14]

Figure 3. 1-Nitroacridine/4-nitroacrydone derivatives [14]



Rysunek 4. Pochodne batracykliny [14]

Figure 4. Batracyclin derivative [14]

W budowie komórki peptydoglikan pełni wiele funkcji, odpowiedzialny jest m.in. za utrzymanie ciśnienia osmotycznego, kształt oraz nadaje jej wielkość. Stanowi przykład cylindrycznego lub kulistego nierozpuszczalnego polimeru, zapewniającego mechaniczną ochronę przed czynnikami zewnętrznymi oraz turgorem wewnątrzkomórkowym.

Ważnym etapem prac nad peptydoglikanem były badania nad jego grubością, a wysuwane wnioski zależne były od zastosowanej metody. Początkowo do pomiarów wykorzystywano transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), a próbkę odwadniano i utrwalano. Inna metoda opierała się na określeniu ilości znakowanych radioaktywnie składników mureiny, a następnie przy użyciu wzorów chemicznych dokonaniu odpowiednich wyliczeń. Na tej podstawie określono grubość mureiny dla *E. coli* wahającej się w granicach od 1 do 3 nm. Zastosowanie mikroskopii sił atomowych AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*) odzwierciedlało wyniki bliższe warunkom panującym *in vivo*. Pomiarzy prowadzone były w środowisku wodnym i wskazywały, że grubość warstwy dla *E. coli* wynosi około 6 nm, zaś dla gronkowca złocistego 20–40 nm.

1.3. STRUKTURA TRZECIORZĘDOWA

Pomimo intensywnych badań i zdobycia znacznej wiedzy o właściwościach fizycznych i biologicznych, syntezie chemicznej czy biosyntezie peptydoglikanu, nie udało się jak dotąd w sposób jednoznaczny określić jej trójwymiarowej struktury. Pierwsze hipotezy na jej temat powstawały już w latach 70-tych. Wówczas, ze względu na obecność wiązania $\beta(1\rightarrow4)$ O-glikozydowego w mureinie, sądzono, że polimery glikanowe wykazują analogię do chityny. Budowa jej wydaje się stosunkowo prosta i sztywne, do reszty MurNAc przyłączone są dodatkowo łańcuchy peptydowe, ułożone w jednym kierunku [15].

Kolejne hipotezy zwracały uwagę na konieczność tworzenia się wiązań wodorowych w obrębie struktury. Kelman i Rogers zasugerowali, że oddziaływania te powstają pomiędzy sąsiadującymi łańcuchami peptydowymi, pochodzącymi od dwóch różnych łańcuchów glikanu. Dalsze badania wskazywały, że wiązania wodorowe tworzą się w obrębie jednego peptydu, a nie jak wcześniej przypuszczano dwóch sąsiadujących, przyjmując postać $2_2,7$ helisy [15].

Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni i analizy rentgenograficznej pozwoliło ustalić, że łańcuchy cukrowe w przeciwieństwie do chityny nie są ani proste ani sztywne, lecz przyjmują postać prawoskrętnej helisy. Obrót następuje co 4 dwucukrowe podjednostki, z których pod kątem prostym wychodzą łańcuchy peptydowe, ułożone prostopadle względem siebie.

Kolejny proponowany model zakładał, że łańcuchy glikanu przyjmują kształt długich cylindrów (ang. *long cylinders*) [16] lub rozciągniętej liny (ang. *stretched ropes*) [17] otoczonej ciasną spiralą pojedynczych podstawników peptydowych. Poszczególne warstwy glikanu ułożone były względem siebie i powierzchni komórki

równolegle, dodatkowo obrócone o kąt 60° względem sąsiedniego łańcucha. W ten sposób warstwa mureiny przyjmowała kształt „sklejki” (ang. „plywood”-type). Wymusza ona duże konformacyjne zniekształcenie względem łańcuchów peptydowych, osiągając tym samym duży stopień ich usieciowania.

Zastosowanie metod modelowania molekularnego pozwoliło na zaproponowanie prostopadłego ułożenia łańcuchów glikanu do powierzchni komórki bakteryjnej, tzw. model rusztowy (ang. *scaffold model*). Gwarantuje on wysoki stopień usieciowania sięgający nawet 80–90%, co zgodne jest z uzyskanymi wcześniej danymi eksperymentalnymi [18, 19]. Za tym modelem przemawiają obliczenia i badania wykonane m.in. przez Dimitrieva [20].

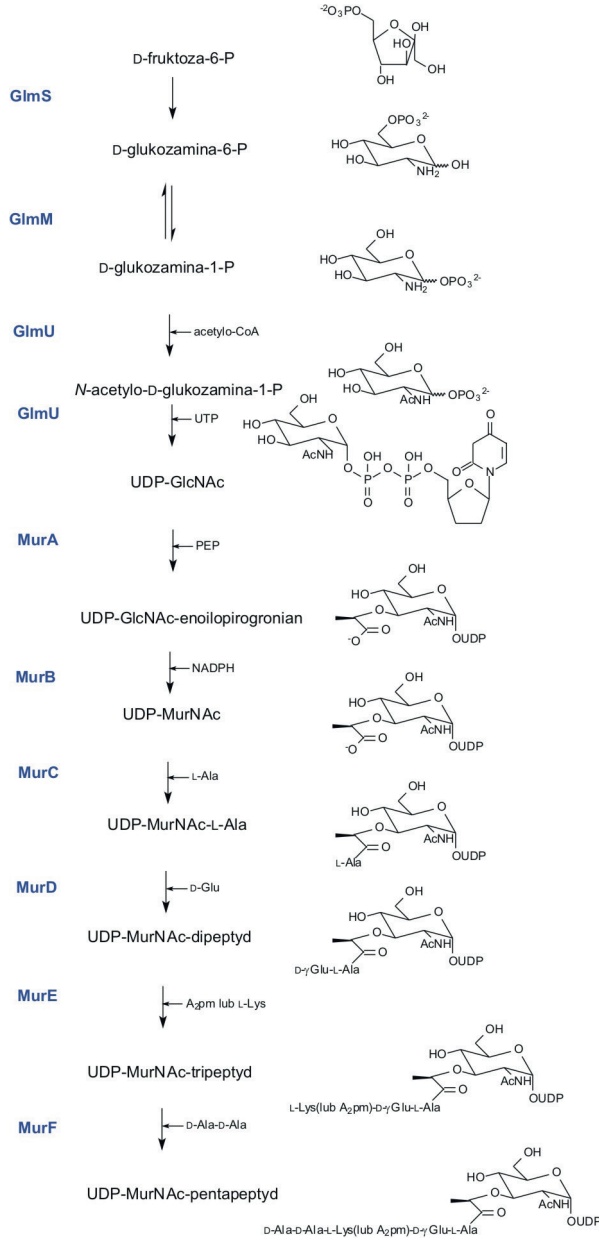
Do czasu opracowania metod wizualizacji *in vivo* budowy komórki na poziomie molekularnym trudno będzie wskazać właściwą teorię ułożenia łańcuchów mureiny. Związane jest to z różnorodnością typów peptydoglikanu występujących w przyrodzie, stopniem ich usieciowania oraz ilością tworzących się warstw. Zasadnicze różnice dotyczą mureiny bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Przypuszcza się, że *S. aureus* jest przykładem najbardziej usieciowanego i niezwyklego typu mureiny i jedynie metoda rusztowa może w pełni odzwierciedlać jego strukturę.

1.4. BIOSYNTENZA

Historia badań nad biosyntezą fragmentu peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii sięga już półwiecza. Park jako pierwszy wyizolował z hodowli gronkowca złocistego „traktowanego” penicyliną prekursor nukleotydu odpowiedzialnego za rozrost peptydoglikanu, a było to w czasach gdy nie wiadano jeszcze o istnieniu takiej makromolekuły [21].

Lata intensywnych badań doprowadziły do wysunięcia wniosku, że na biosyntezę mureiny składa się wiele kluczowych etapów. Dokładne określenie/rozgraniczenie, który z nich jest najważniejszy jest bardzo trudne, ale można dokonać podstawowego podziału w zależności od miejsca w komórce, w którym zachodzi ten proces [22, 23]:

- 1) Cytoplazma – w tej części gromadzone są prekursory peptydoglikanu, zbudowane z reszty *N*-acetylo-*D*-glukozaminy i kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego, do którego grupy karboksylowej przyłączone są krótkie fragmenty peptydowe (Schemat 1) [24];

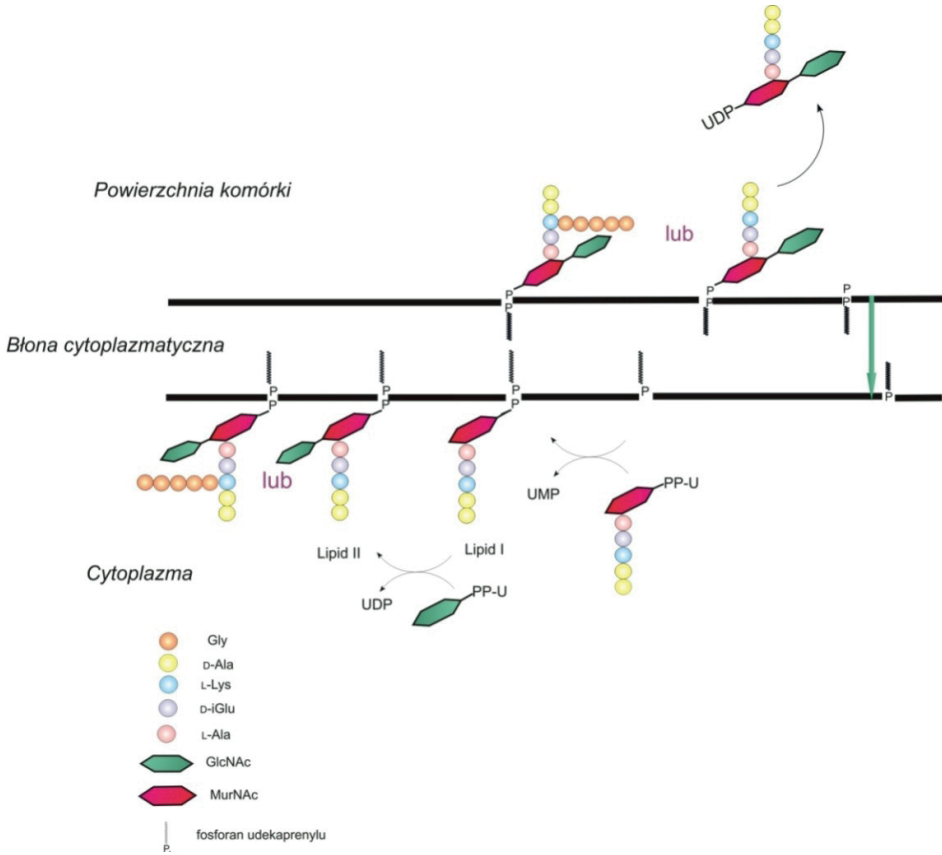


Schemat 1. Synteza prekursorów peptydoglikanu [22]

Scheme 1. Synthesis of precursor of peptidoglycan [22]

- 2) Monomery mureiny następnie przekształcane są w produkty pośrednie – pochodne lipidowo disacharydowo-peptydowe połączone wiązaniem fosforowym (ang. *lipid intermediate disacchride-(peptide)-pyrophosphate*)

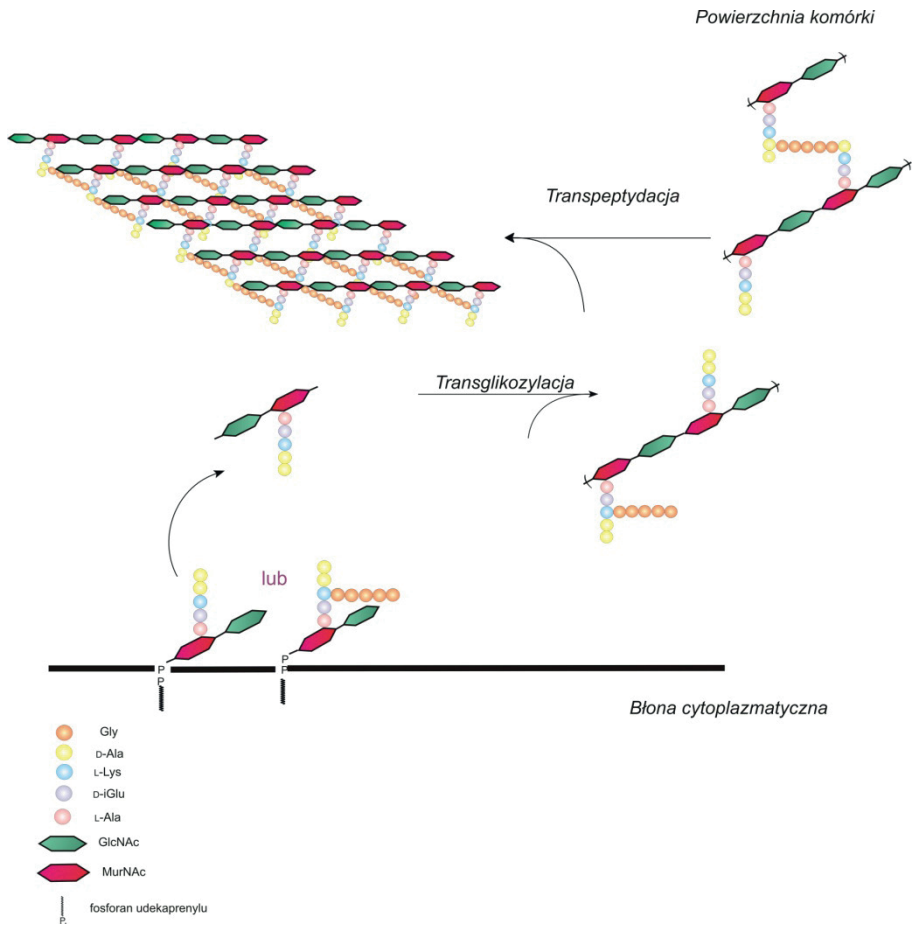
undecaprenol). Powstałe prekursory transportowane są na nośnik lipidowy, który występuje w błonie komórkowej, a następnie przenoszone są przez nią z równoczesnym odłączeniem lipidowego przenośnika-fosforanu undekaprenyłu (Rys. 5). Proces ten przebiega na pograniczu trzech warstw – cytoplazmy, zewnętrznej warstwy komórki, a przede wszystkim w błonie cytoplazmatycznej.



Rysunek 5. Przeniesienie prekursorów peptydoglikanu przez błonę cytoplazmatyczną [25]

Figure 5. The transfer of the peptidoglycan precursor across the cytoplasmic membrane [25]

Ostatni etap polega na polimeryzacji przetransportowanych fragmentów mureiny. Zachodzi on na zewnętrznej warstwie błony komórkowej, w tym momencie ważną rolę odgrywają dwa typy enzymów: glikozylotransferazy – odpowiedzialne za tworzenie się łańcuchowych form glikanów oraz transpeptydazy – prowadzące do powstania usieciowanej, sztywnej struktury mureiny (Rys. 6) [26, 27].

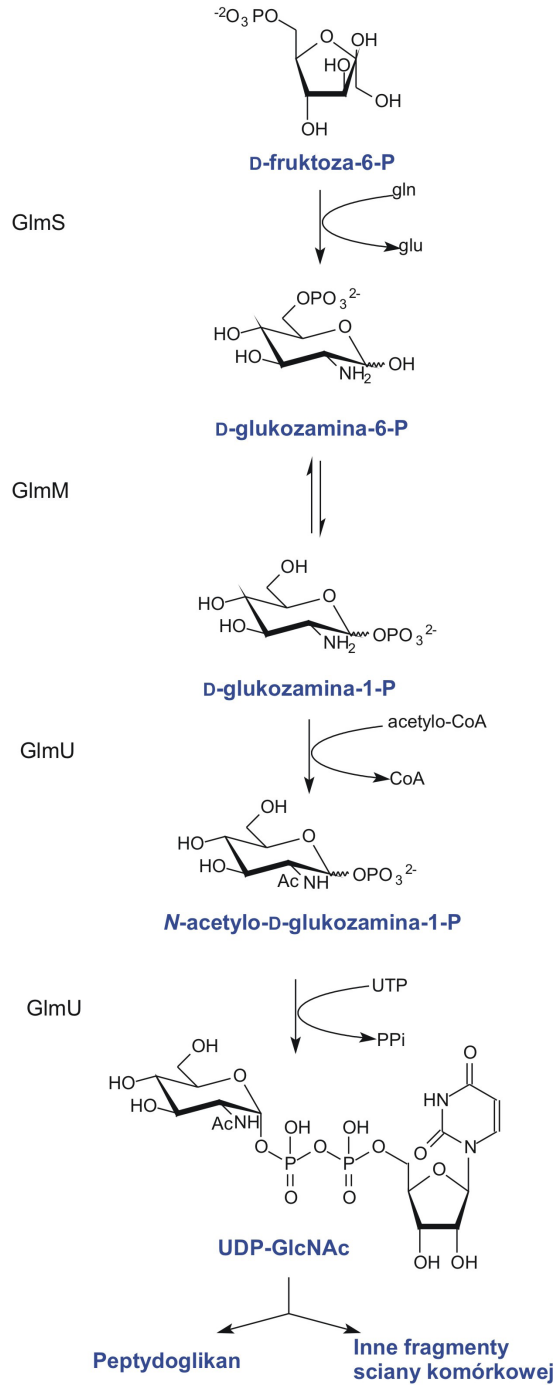


Rysunek 6. Etap działania transpeptydaz i glikozylotransferaz [25]

Figure 6. Place of action of transpeptidase and glycosyltransferase [25]

Biosynteza mureiny jest procesem bardzo złożonym, każdy jej etap pełni ściśle określone funkcje i jest konieczny do prawidłowego rozrostu ściany komórkowej bakterii.

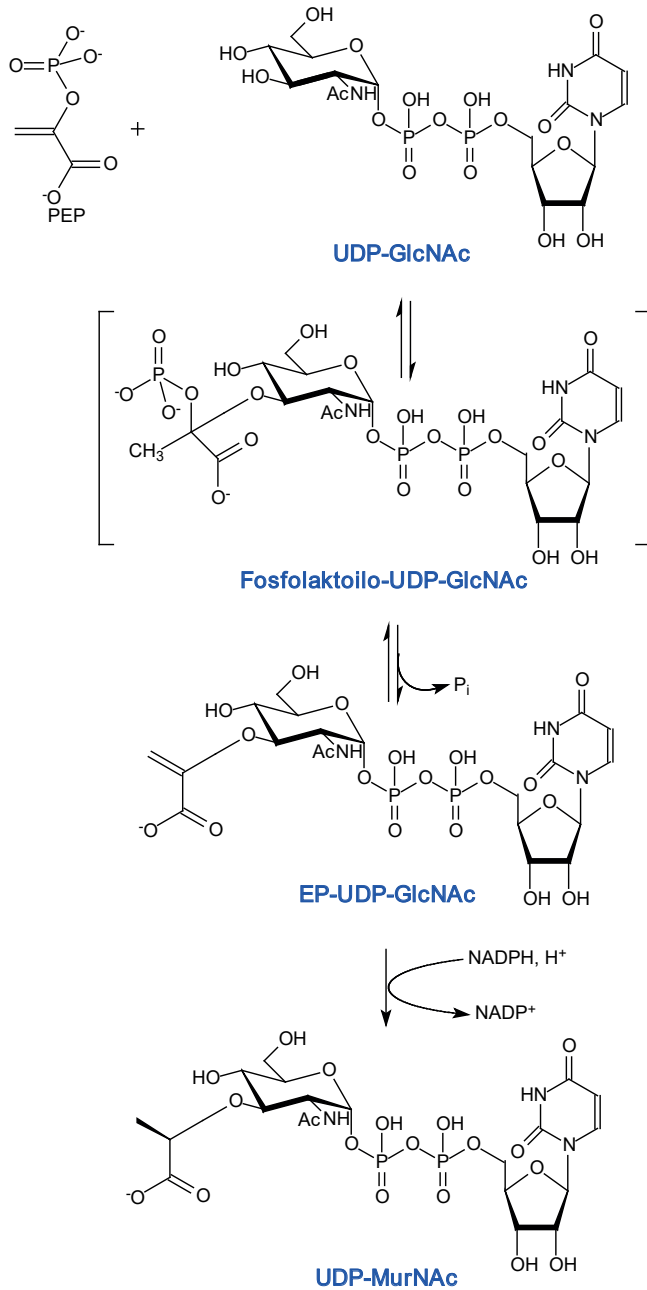
Za najważniejszy prekursor w tworzeniu peptydoglikanu uważana jest UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamina (UDP-GlcNAc). Formowana jest z 6-fosforanu-*D*-fruktozy (Schemat 2). Bierze również udział w powstawaniu innych makromolekuł opartych na strukturze *N*-acetylo-*D*-glukozaminy, takich jak kwasy tejchojowe (w przypadku bakterii Gram-dodatnich) oraz lipopolisacharydy i antygeny enterobakteryjne (bakterie Gram-ujemne) [22, 27–30].

Schemat 2. Powstawanie UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamina (UDP-GlcNAc) [22]Scheme 2. Formation of UDP-*N*-acetyl-*D*-glucosamine (UDP-GlcNAc) [22]

Przekształcenie 6-fosforanu-D-fruktozy w 6-fosforan-D-glukozaminy (Schemat 2) w pierwszym etapie katalizowane jest przez białymowy kompleks L-glutaminazę i aminotransferazę 6-fosforanu-D-fruktozy, która kodowana jest przez gen *glmS* [31]. N-Terminalny koniec domeny glutaminazy odpowiedzialny jest za hydrolizę L-glutaminy, w wyniku której uwalniana jest cząsteczka amoniaku, podczas gdy C-terminalny koniec domeny izomerazy przekształca amoniak i fosforan-6-D-fruktozy w fosforan-6-D-glukozaminy. Następnie ma miejsce przeniesienie grupy fosforanowej z atomu węgla 6 na grupę anomeryczną, w wyniku czego powstaje fosforan-1-D-glukozaminy. Reakcja ta katalizowana jest przez gen *glmM* w przypadku *E.coli*, natomiast w *S. aureus* rolę tę przypisuje się *femD* lub *femR315* [32, 33]. Ważnym etapem biosyntezy jest reakcja acetylowania grupy aminowej fragmentu cukrowego. Istotną rolę w tym procesie odgrywa pochodna koenzymu A. W wyniku przeniesienia grupy acetylowej z acetylo-CoA na 1-fosforan-D-glukozaminy, przy udziale transacetylazy, powstaje N-acetylo-D-glukozamino-1-fosforan. Związek ten w reakcji z UTP ulega dalszym przekształceniom do UDP-N-acetylo-D-glukozaminy (UDP-GlcNAc). Etap ten katalizowany jest przez pirofosfatazę [22].

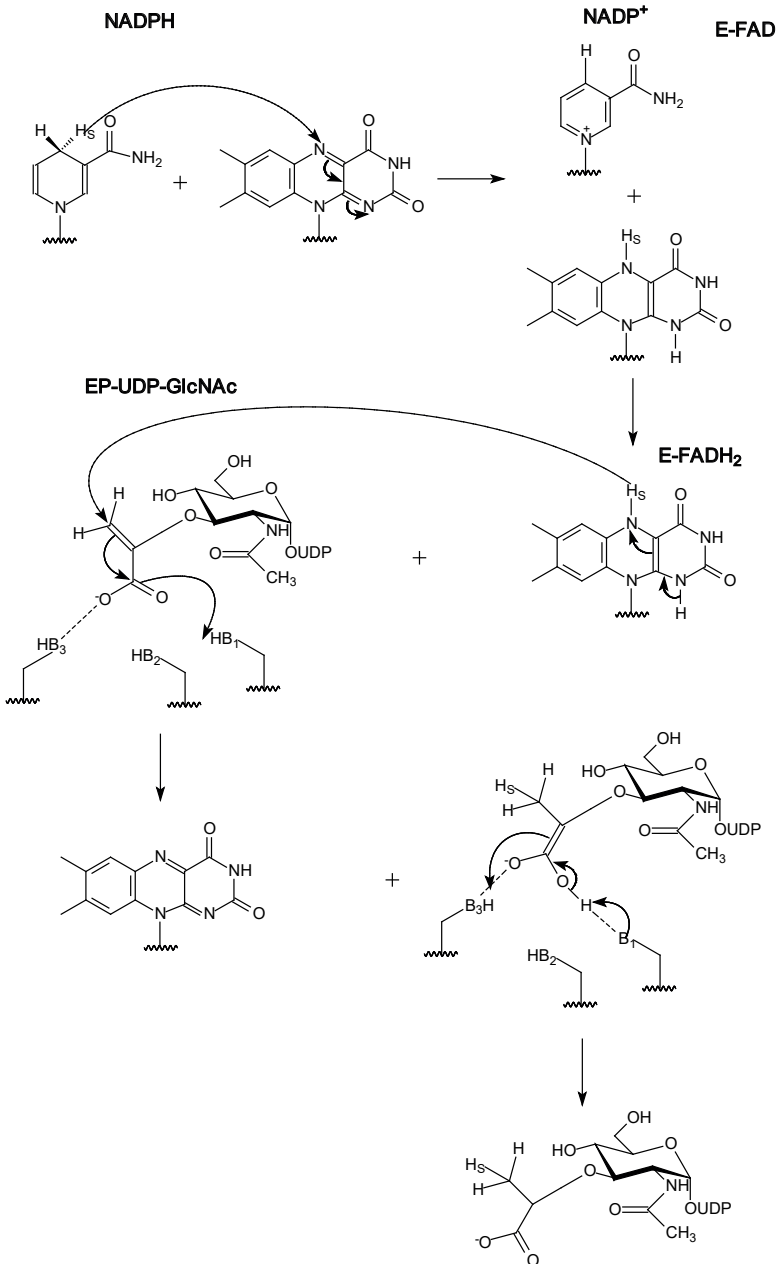
UDP-GlcNAc stanowi istotny, jeśli nie najważniejszy produkt całej biosyntezy. Ponieważ stanowi nie tylko podstawę do syntezy usieciowanej formy peptydoglikanu, poprzez przekształcenie go w pochodną kwasu UDP-N-acetylo-D-muraminowego (UDP-MurNAc), lecz również innych elementów ściany komórkowej bakterii (lipopolisacharydów, kwasów teichojowych itp.).

Ważnym elementem mureiny oprócz pochodnej D-glukozaminy jest pochodna kwasu N-acetylo-D-muraminowego (UDP-MurNAc). Synteza tego fragmentu przebiega w dwóch etapach, z których pierwszy katalizowany jest przez transferazę MurA, a kolejny przez reduktazę MurB. Transferaza enoilopirogroniowa (MurA) tworzy wiązanie eterowe pomiędzy α -fosfoenolopirogronianem, pochodzącego z PEP, a trzecim atomem węgla (C-3) pochodnej UDP-GlcNAc (Schemat 3).



Schemat 3. Otrzymywanie kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (UDP-MurNAc) [22]
 Scheme 3. Preparation of *N*-acetyl-*D*-muramic acid (UDP-MurNAc) [22]

W kolejnym etapie powstający UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamino-3-enoilopirronian redukowany jest przez NADPH do *D*-mleczanu, co dokonuje się przy udziale reduktazy MurB (Schemat 4) [22].

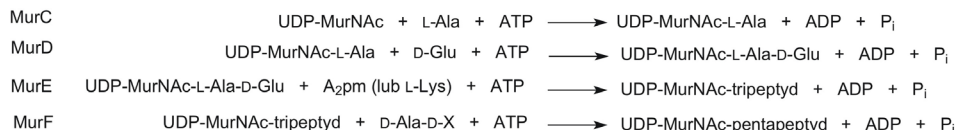


Schemat 4. Mechanizm działania reduktazy MurB [22]

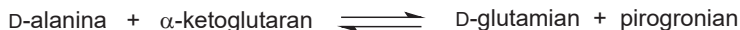
Scheme 4. Mechanism of action MurB reductase [22]

Istotnym momentem formowania peptydoglikanu jest przyłączenie poszczególnych reszt aminokwasowych. Proces ten zachodzi przy udziale specyficznych enzymów oraz ATP. Przebiega on w kilku etapach. Wolna grupa karboksylowa pochodząca z cząsteczki UDP-MurNac pełni rolę akceptora wiązania peptydowego. Do niej przyłączana jest pierwsza reszta aminokwasowa, którą dla większości bakterii jest L-alanina. Odbywa się to przy udziale ligazy MurC. W kolejnym etapie dołączany jest kwas D-glutaminowy (Schemat 5a), będący produktem genu *murI*, odpowiedzialnego za syntezę D-glutaminianu z α -ketoglutaranu (Schemat 5b).

a)



b)

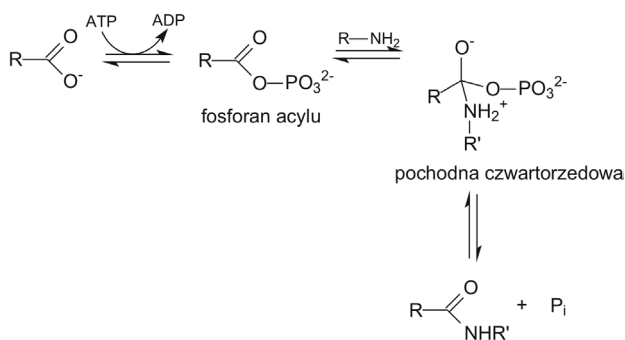


Schemat 5. Mechanizm przyłączenia kolejnych reszt aminokwasowych do kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego [22]

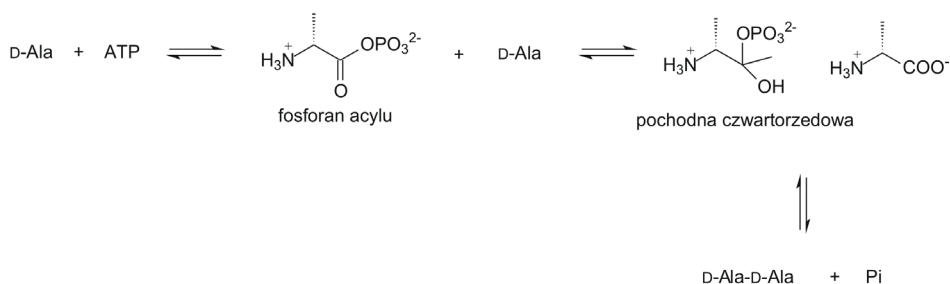
Scheme 5. The substitution of amino acid residues to *N*-acetyl-*D*-muramic acid [22]

W pozycji trzeciej najczęściej przyłączaną resztą jest L-lizyna. U części bakterii w jej miejsce podstawiana jest reszta kwasu *mezo*-diaminopimelinowego ($A_2\text{pm}$ lub Dap), a w sporadycznych przypadkach miejsce to zastąpione jest przez resztę L-homoseryny, resztę 3-hydroksy- $A_2\text{pm}$, kwasu diaminobutyłowy (ang. *diaminobutyric acid*) czy L-ornitynę.[22] Warto zwrócić uwagę, że pierwsze reszty aminokwasów przyłączane są oddzielnie, jako samodzielne jednostki, natomiast ostatnie dwie reszty w postaci fragmentu dipeptydowego (D-Ala-D-Ala) (Schemat 5a i 6). Fragment ten powstaje w wyniku działania dwóch enzymów racemazy (DdlB), która przekształca resztę L-alaniny w jej D-pochodną oraz ligazy D-alanina:D-alanina (DdlB) syntezującej fragment dipeptydowy. Podczas biosyntezy tego fragmentu ma miejsce zastąpienie C-terminalnej reszty D-alaniny inną resztą aminokwasową, np. D-waliną, glicyną, D-hydroksymaślanem, a w przypadku *S. aureus* najczęściej jest to reszta D-mleczanu. Stanowi to swoisty system odporności bakterii przeciwko stosowanym terapiom antybiotykowym. Istnieją również bakterie, w których *N*-terminalna reszta D-alaniny została zastąpiona przez resztę D-waliny, D-seryny lub D-aminomaślan lub glicynę.

a)



b)



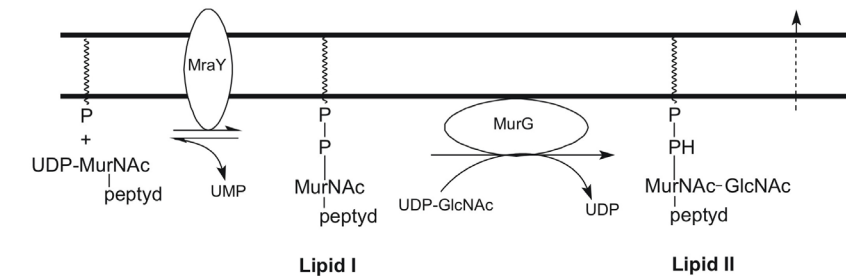
Schemat 6. Mechanizm powstawania fragmentu dipeptydowego (D-alanylo-D-alaniny) [22]

Scheme 6. Formation dipeptide fragment (D-Ala-D-Ala) [22]

Bardzo ważny jest fakt, że wcześniej opisane etapy biosyntezy zachodzą w cytoplazmie komórki bakteryjnej. Mają one na celu namnażanie tak ważnych dla prawidłowego rozrostu mureiny prekursorów, które to następnie przetransportowane zostają z wewnętrznej części komórki bakteryjnej na zewnętrzną warstwę ściany komórkowej. Na ten proces składa się kilka etapów. W pierwszym momencie do powstałego MurNac-pentapeptydu przyłączony zostaje fosforan undekaprenylu (zwany również baktroprenolem). Występuje on w błonie cytoplazmatycznej i pełni rolę przenośnika lipidowego jednostek budulcowych (peptydoglikanu, lipopolisacharudów czy kwasów teichojowych Rys. 7). W wyniku działania specyficznej translokazy (MraY) powstaje kompleks, noszący nazwę lipidu I (C55-PP-MurNac-pentapeptyd). Związek ten reaguje z UDP-GlcNac. Reakcja ta katalizowana jest przez glikozylotransferazy (MurG), w wyniku czego tworzy się wiązanie β(1→4) O-glikozydowe. Reakcja zachodzi pomiędzy grupą hydroksylową przy 4 atomie węgla pochodnej MurNac a 1 atomem węgla z pochodnej GlcNac, co prowadzi do powstania lipidu II (pochodnej disacharydowopentapeptydowej). Na tym etapie ma miejsce tworzenie się krótkiej liniowej formy peptydoglikanu. Do łańcucha bocznego reszty L-lizyny przyłączane są kolejne reszty aminokwasowe. W przypadku *S. aureus* są to reszty glicyny w wyniku czego powstaje mostek pentapeptydowy.

Powstały lipid II transportowany jest na zewnętrzną stronę błony komórkowej, gdzie następnie jest wbudowywany w istniejącą strukturę peptydoglikanu. Obecne tam transglikozyazy (białka PBP oraz lityczna transglikolaza Mlt) katalizują reakcję zachodzącą pomiędzy grupą hydroksylową przy 4 atomie węgla pochodnej MurNAc pochodzącej z przetransportowanego disacharydopentapeptydu, a anomerycznym atomem węgla z GlcNAc istniejącej mureiny. W wyniku zachodzącego procesu odłączana jest cząsteczka baktroprenolu (C55-PP). W wyniku reakcji hydrolizy związek ten jest regenerowany i w postaci C55-P przenoszony na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej, gdzie ulega dalszym reakcjom z pochodną muramylopentapeptydową.

błona cytoplazmatyczna



cytoplazma

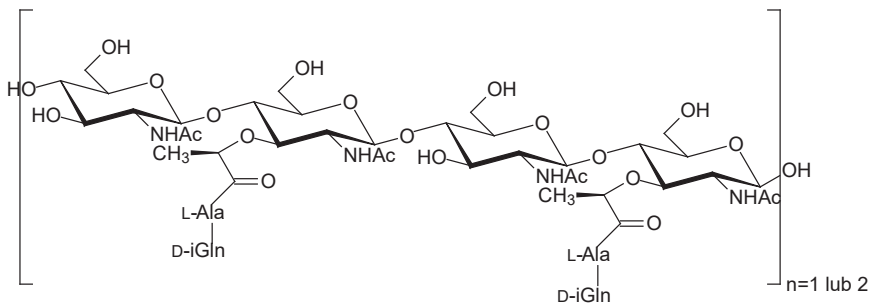
Rysunek 7. Mechanizm transportowania prekursora peptydoglikanu [22]
Figure 7. The mechanism of transport peptidoglycan precursor [22]

W zewnętrznej warstwie ściany komórkowej oprócz reakcji transglikozylacji prowadzącej do wydłużenia się formy łańcuchowej mureiny, zachodzą również procesy transpeptydacji. Polegają one na tworzeniu się poprzecznych wiązań peptydowych pomiędzy nowymi jednostkami budulcowymi a istniejącymi fragmentami peptydoglikanu. Sprawia to, że struktura mureiny przyjmuje usieciowaną postać, podobną do sakulusu (woreczka mureinowego). Transpeptydacja opiera się na usunięciu C-terminalnej reszty D-alaniny, a w jej miejsce przyłączane są istniejące mostki peptydowe.

1.5. SYNTEZA CHEMICZNA

Ze względu na istotne role biologiczne jakie spełniają fragmenty mureiny, a także problem z ich izolowaniem z materiału biologicznego wiele ośrodków naukowych podjęło się próby ich chemicznej syntezy. Do badań biologicznych zaczęto wykorzystywać fragmenty peptydoglikanu syntezowane chemicznie, co gwarantowało zarówno jednolitą i pewną strukturę, a zarazem wysoką czystość stosowanych związków.

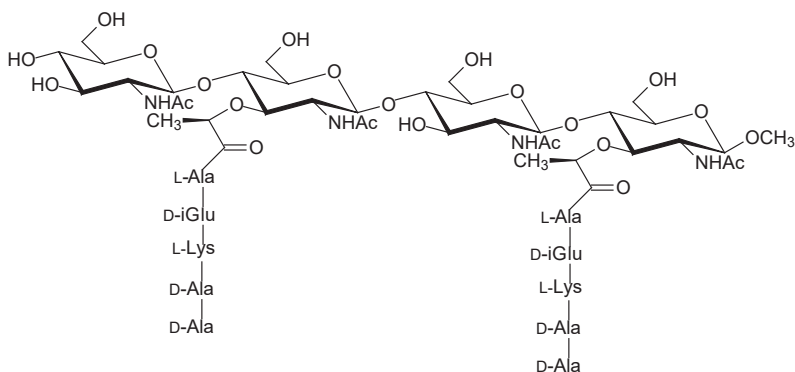
Przez długi okres czasu dużym zainteresowaniem cieszyły się syntezy fragmentów muramylo-dipeptydowych (MDP), będących najkrótszymi fragmentami peptydoglikanu adiuwantowo czynnymi. Okazało się jednak, że dłuższe fragmenty peptydoglikanu wykazują się innymi właściwościami biologicznymi w porównaniu z MDP, dlatego też, synteza takich fragmentów stała się źródłem zainteresowania kilku ośrodków badawczych. W 2001 roku pojawiła się praca opisująca syntezę fragmentu tetrasacharydowego oraz oktasacharydowego peptydoglikanu (Rys. 8). Składały się one z powtarzających się jednostek disacharydowych, zbudowanych z reszty *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (GlcNAc) i kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (MurNAc) połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym [34]. Do grupy karboksylowej pochodzącej z reszty MurNAc przyłączone zostały fragmenty dipeptydowe *L*-alaniny-*D*-izoglutaminy (*L*-Ala-*D*-iGln) [35].



Rysunek 8. Fragment tetra- i oktasacharydowy peptydoglikanu [34, 35]
 Figure 8. Tetra- and octasacchride peptidoglycan fragments [34, 35]

Prowadzone badania nad czynnikami wywołującymi szok septyczny (ang. *septic shock*) nasuwały wniosek, że odpowiedzialne są za niego ogólnoustrojowe stany zapalne wywołane w skutek obecności peptydoglikanu (PGN) we krwi pacjentów.

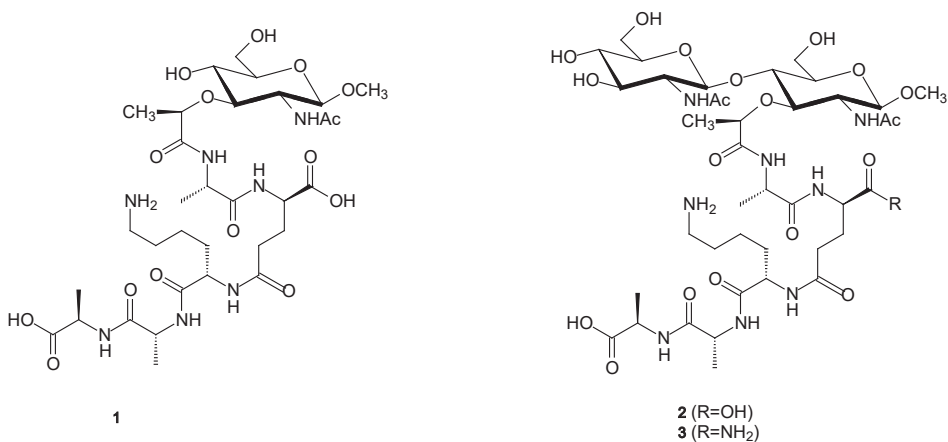
Badania nad coraz bardziej złożoną strukturą mureiny doprowadziły do publikacji w 2004 r., w której Heseka i jego współpracownicy przedstawili syntezę tetrasacharydu, w którym do reszty kwasu mlekowego kwasu *N*-acetylo-*D*-muramyloowego przyłączony był pentapeptyd. Otrzymane przez nich połączenie stanowi podłużny fragment peptydoglikanu ze ściany komórkowej bakterii Gram-dodatniej [36].



Rysunek 9. Fragment terasacharydowy otrzymany przez Heseka i in. [36]

Figure 9. Tertasaccharide fragment prepared by Heseka et al. [36]

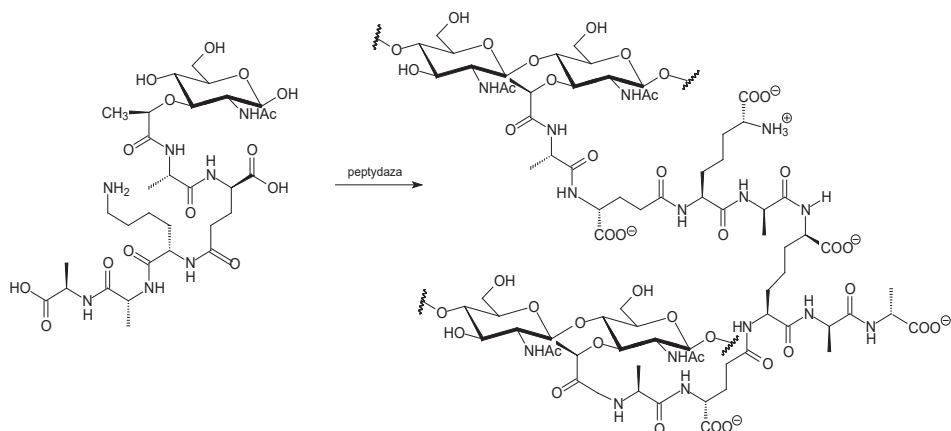
Oprócz tego otrzymali krótsze fragmenty peptydoglikanu, odpowiednio mono-, disacharydowe, które wykorzystali do badania wzajemnego oddziaływania z wankomycyną [37].



Rysunek 10. Pochodne mono- i disacharydowe peptydoglikanu [37]

Figure 10. Mono- and disaccharide derivatives of the peptidoglycan fragment [37]

Dodatkowo fragmenty disacharydowe posłużyły im do przygotowania dime-rów peptydoglikanu (Schemat 7).



Schemat 7. Dimery peptydoglikanu [38]

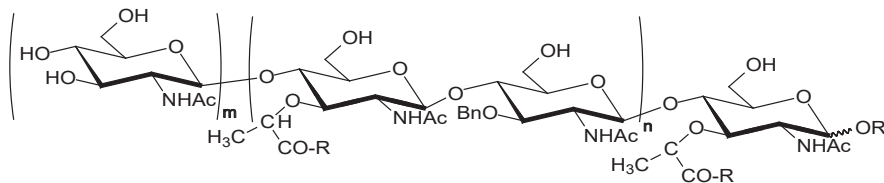
Scheme 7. Dimers of peptidoglycan [38]

Dużym zainteresowaniem oprócz syntezy określonych fragmentów peptydoglikanu, cieszą się również badania biologiczne otrzymanych związków. Związane jest to z bardzo dobrymi właściwościami immunopotentatywnymi (ang. *immunopotentiating*) fragmentów mureiny. Podejrzewa się, że PGN odpowiedzialny jest za stymulację receptorów TLR 2 oraz membrany CD14 (mCD14). Badania prowadzone przez dwie niezależne grupy badawcze Dziarskiego [38] i Boneca [39] doprowadziły do wysunięcia sprzecznych wniosków.

Inamura wraz ze współpracownikami [40] podjęli próbę zbadania wpływu długości łańcucha zarówno peptydowego oraz cukrowego na aktywność mCD14 i TLR2. W tym celu wykorzystano fragmenty tetrasacharydowe z przyłączonym fragmentem di-, tri-, tetra- oraz pentapeptydowym, a także oktasacharyd z podstawionym fragmentem dipeptydowym. Okazało się, że niepodstawione fragmenty glikanu nie wykazują się właściwościami immunostymulacyjnymi. Wskazuje to, że obecność fragmentów peptydowych jest konieczna do wywołania odpowiedzi immunologicznej. Największą aktywnością odznaczał się fragment trisacharydowy z przyłączoną pochodną tripeptydową (Tab. 1).

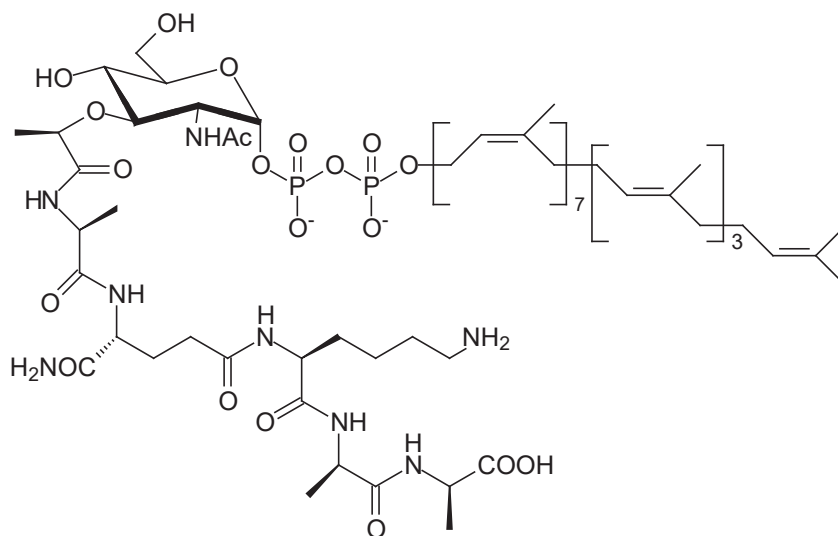
Tabela 1. Fragmenty peptydoglikanu otrzymane przez Inamurę i jego współpracowników mające wpływ na aktywność mCD14 i TLR2 [40]

Table 1. Peptidoglycan fragments prepared by Inamura, et al. with affecting the activity of mCD14 and TLR2 [40]



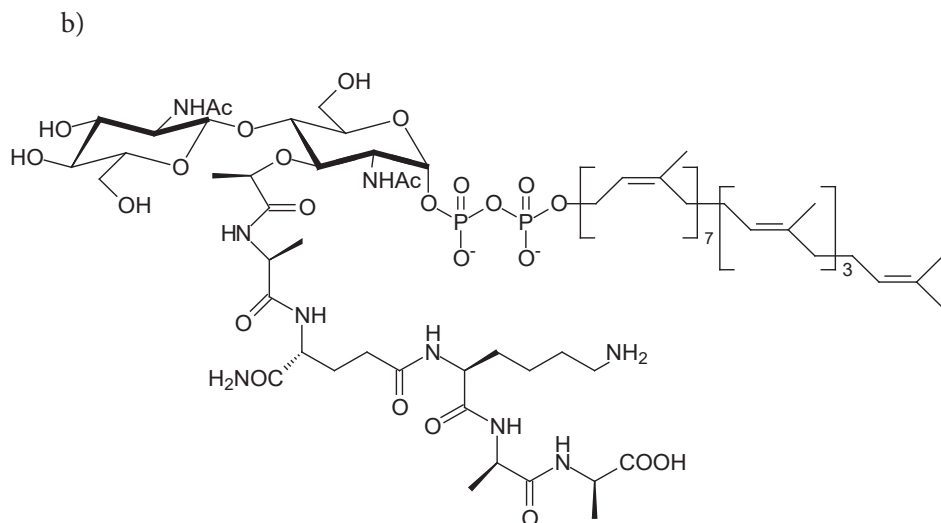
| Związek | R' | R |
|---------|--------------|------------------------------------|
| 4 | H | L-Ala-D-iGln |
| 5 | H | L-Ala-D-iGln-L-Lys |
| 6 | H | L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala |
| 7 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac) |
| 8 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala |
| 9 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala |
| 10 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala |
| 11 | α -Pr | OH |

a)



Rysunek 11. Struktura lipidu I oraz lipidu II otrzymanego przez prof. van Nienwenhze i Blaszczyka [41]

Figure 11. Structure of lipid I and II prepared by van Nienwenhze i Blaszczyk [41]



Rysunek 11. Ciąg dalszy

Figure 11. Continuation

Przeprowadzono także próby otrzymania prekursorów biosyntezy peptydoglikanu. Grupie profesora Blaszcak udało się przeprowadzić z wielkim sukcesem syntezę zarówno fragmentu lipidu I oraz lipidu II (Rys. 11) [41].

UWAGI KOŃCOWE

Synteza fragmentów peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii jest procesem bardzo złożonym i wymaga zastosowania wielu ortogonalnych względem siebie osłon grup funkcyjnych przyłączanych reszt aminokwasowych, czy grup hydroksylowych fragmentu cukrowego. Jednakże otrzymanie tego typu fragmentów na drodze chemicznej pozwala na uzyskanie materiału biologicznego o wysokiej czystości. Proces ten jest jednym z elementów niezbędny do poznania istoty wirulentności i toksyczności ściany komórkowej bakterii.

PODZIĘKOWANIE

Praca współfinansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.01.02-14-102/09) oraz DS 530-8455-D 501-15.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] W. Weidel, H. Pelzer, *Adv. Enzymol. RAMB*, 1964, **26**, 193.
- [2] a) W.W. Navarre, O. Schneewind, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63**, 174; b) A.K. Rai, S.B. Rai, D.K. Rai, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003, **626**, 53; c) J. Heijenoort, *Glycobiology*, 2001, **11**, 25R; d) N. Kubasch, R.R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 2710.
- [3] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 232.
- [4] a) S. Bauer, C.J. Kirchning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G.B. Lipford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 9237; b) A.J. Ulmer, T.E. Rietschel, H. Heine, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2002, **14**, 53.
- [5] a) B. Pulendran, K. Palucka, J. Banchereau, *Science*, 2001, **293**, 253; b) R. Medzhitov, C.A. Jane-way Jr., *Science*, 2002, **296**, 298; *Chem.*, 1973, **27**, 349.
- [6] T.E. Rietschel, J. Schletter, B. Weidemann, V. El-Samalouti, U.Z.T. Mattern, U. Seydel, H. Brade, D.H. Flad, S. Kusumoto, D. Guta, R. Dziarski, J.A. Ulmer, *Microb. Drug Resist.*, 1998, 4.
- [7] A.M. Kołodziejczyk, A.S. Kołodziejczyk, *Post. Bioch.*, 1987, **33**, 203.
- [8] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, *Polish J. Chem.*, 2003, **77**, 373.
- [9] F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **59**, 1317.
- [10] a) A. Adam, E. Lederek, *Med. Res. Rev.*, 1984, **4**, 111; b) A. Adam, E. Lederer, *Immunology*, 1988, **1**, 205; c) J.P. Devlin, K.D. Hargrave, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 4327; d) A. Hasegawa, H. Okumura, M. Kiso, *Res. Bull. Fac. Arg. Gifu University*, 1979, **42**, 169; *C.A.*, 93, 239878z (1980); e) K. Matsumoto, H. Ogawa, T. Kusama, O. Nagase, N. Sawaki, M. Inage, S. Kusumoto, T. Shiba, I. Azuma, *Infect. Immun.*, 1981, **32**, 748; g) S. Kusumoto, M. Inage, T. Shiba, I. Azuma, Y. Yamamura, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **49**, 4899.
- [11] a) A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Rocz. Chem.*, 1972, **46**, 1707; b) A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Rocz. Chem.*, 1974, **48**, 1707.
- [12] A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Pol. J. Chem.*, 1974, **48**, 1921.
- [13] S. Kobayashi, T. Fukuda, H. Yukimasa, M. Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 3182.
- [14] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3606; K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A. Myśliwski, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 978.
- [15] a) H. Formanek, S. Formanek, H. Wawra, *Eur. J. Biochem.*, 1974, **46**, 279; b) H. Formanek, K.H. Schleifer, H.P. Seidel, *FEBS Lett.*, 1976, **70**, 150; c) M.V. Kelemen, H. Rogers, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 992.
- [16] a) H. Labischinski, G. Barnickel, H. Bradaczek, P. Giesbrecht, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **95**, 147; b) H. Labischinski, G. Barnickel, D. Naumann, P. Keller, *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1985, **136A**, 45.
- [17] H. Labischinski, H. Maidhof, *Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts*, [w:] J.M. Ghuyssen, R. Hackenbeck (Red.), *Bacterial cell wall*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands., 1994, 23.
- [18] D. Gally, A.R. Archibald, *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **139**, 1907.
- [19] M.A. Snowden, H.R. Perkins, A.W. Wyke, M.V. Hayes, J.B. Ward, *J. Gen. Microbiol.*, 1989, **135**, 3015.
- [20] B.A. Dmitriev, F.V. Toukach, O. Holst, E.T. Rietschel, S. Ehlers, *Journal of Bacteriology*, 2004, **186**, 7141.
- [21] J.T. Park, *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 877.
- [22] J. van Heijenoort, *Nat. Prod. Rep.*, 2001, **18**, 503.

- [23] a) Z. Markiewicz, Z.A. Kwiatkowski, *Bakterie Antybiotyki Lekooporność*, 2008, Wydawnictwo Naukowe PWN; b) J. van Heijenoort, [w:] *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen, R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 39.
- [24] M. Ge, Z. Chen, R. Onishi, J. Kohler, L.L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, Ch. Thompson, D. Kahne, *Science*, 1999, **284**, 507.
- [25] a) C. Goffin, J.-M. Ghuyesen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 1079; b) J. van Heijenoort, *Glycobiology*, 2001, **11**, 25R.
- [26] a) M. Matsuhashi, in *Bacterial Cell Wall*, ed. J.-M. Ghuyesen and R. Hakenbeck, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 55; b) J.-M. Ghuyesen, G. Dive, [w:] *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen, R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 103.
- [27] H.M. Pooley, D. Karamata, *In Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 187.
- [28] C.R.H. Raetz, [w:] *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Red.), ASM Press, Washington, D.C., 1996, 1035.
- [29] P.D. Rick, R.P. Silver, [w:] *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Red.), ASM Press, Washington, D.C., 1996, 104.
- [30] R.J. White, *Biochem. J.*, 1968, **106**, 847.
- [31] H.C. Wu, T.C. Wu, *J. Bacteriol.*, 1971, **105**, 455.
- [32] L. Jolly, S. Wu, J. van Heijenoort, H. de Lencastre, D. Mengin-Lecreulx, A. Tomasz, *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 5321.
- [33] P. Glanzmann, J. Gustafson, H. Komatsuzawa, K. Ohta, B. Berger-Bächli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, **262**, 202.
- [34] S. Inamura, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7613.
- [35] A.R. Chowdhury, A. Siriwardena, G.J. Boons, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7805.
- [36] D. Heseck, M. Lee, K. Morio, S. Mobashery, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2137.
- [37] C. Fuda, D. Heseck, M. Lee, K. Morio, T. Nowak, Sh. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2056.
- [38] R. Dziarski, D. Gupta, *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5212.
- [39] L.H. Travassos, S.E. Girardin, D.J. Philpott, D. Blanot, M.A. Nahori, C. Werts, I.G. Boneca, *EMBO Rep.*, 2004, **5**, 1000.
- [40] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 232.
- [41] M.S. VanNieuwenhze, S.C. Mauldin, M. Zia-Ebrahimi, B.E. Winger, W.J. Hornback, Sh.L. Saha, J.A. Aikins, L.C. Blaszczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3656.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca

SWOBODNA POWIERZCHNIA WODY I JEJ FIZYKOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI

FREE SURFACE OF WATER AND ITS PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Maria Paluch

*Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii,
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: paluch@chemia.uj.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Struktura i gęstość powierzchni swobodnej wody
2. Lepkość powierzchniowa
3. Przewodność powierzchniowa
4. Przenikalność elektryczna powierzchniowa
5. Potencjał powierzchniowy
6. Filmy adsorpcyjne i monowarstwy nierozpuszczalne

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Maria Paluch ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Stopnie naukowe magistra (1959 r.) i doktora chemii (1966 r.) uzyskała pod kierunkiem Profesora Bogdana Kamińskiego. Habilitowała się w roku 1980. Tytuł profesora otrzymała w roku 2000. W latach 1959–1974 pracowała w Zakładzie Fizykochemii Zjawisk Powierzchniowych Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Krakowie. Od roku 1975 do przejścia na emeryturę (2006 r.) była zatrudniona na Wydziale Chemii UJ jako adiunkt, docent, profesor nadzwyczajny i profesor zwyczajny, pełniąc w latach 1992–2006 funkcję kierownika Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii oraz od roku 1981 do 2015 r. kierownika Zespołu Fizykochemii Powierzchni. Obecnie jako profesor emerytowany aktywnie uczestniczy w działalności Wydziału Chemii UJ.

W latach 1968–1969 przebywała w laboratorium Van't Hoffa Uniwersytetu w Utrechcie w Holandii u słynnego współtwórcy teorii DLVO prof. J. Th. G. Overbeeka. W kręgu jej głównych zainteresowań naukowych są prowadzone i publikowane przez nią badania związane jednoznacznie z chemią fizyczną powierzchni. Wyróżnić wśród nich można cztery grupy zagadnień, którym poświęciła lub poświęca szczególną uwagę, a mianowicie badania zjawisk występujących na granicy faz roztwór wodny/powietrze, sił oddziaływania i trwałości cienkich czarnych filmów swobodnych, zastosowania metod fizykochemicznych do określania mechanizmu działania dodatków detergencyjno dyspergujących uszlachetniających oleje silnikowe, mechanizmu działania elektrody międzyfazowej jako wskaźnika przy ilościowym oznaczaniu związków organicznych w apolarnych rozpuszczalnikach.

ABSTRACT

The purpose of this paper is to show how interesting is free surface of water and how many problems connected with its properties were investigated. Some of them were studied in twenty century, another are quite new. The special attention was drawn to orientation of water molecules at water/air interface and connected with this orientation electric surface potential drop existing at the free surface. To date, there is no consensus both as to its value and sign. This is due to the impossibility of direct measurement of the surface potential, which caused that many scientists have attempted to estimate the value and sign of this potential indirectly by measuring other physical parameters or using simulation methods.

The paper present also such properties of water/air interface as: surface density, surface viscosity, dielectric permittivity, surface conductivity, surface tension and their changes as a result of adsorption process. As we can see from the review outlined in the paper the free surface of water in spite of long and different of studies is still fascinating for many scientists.

Keywords: water/air interface, structure of free surface of water, surface potential of water

Słowa kluczowe: granica faz woda/powietrze, struktura powierzchni swobodnej wody, potencjał powierzchniowy wody

WPROWADZENIE

W przyrodzie żywej i martwej występuje bardzo wiele najrozmaitszych granic międzyfazowych. Zachodzące na nich różne zjawiska odgrywają istotną rolę w wielu procesach mających miejsce zarówno w materii ożywionej jak i martwej. Jedną z najpowszechniej występujących granic faz jest swobodna powierzchnia wody. Stanowi ona więcej niż 70% powierzchni ziemi. Dlatego sama woda jak i jej granica faz woda/powietrze interesowały już od dawna wielu uczonych. Przedmiotem zainteresowania były właściwości fizykochemiczne granicy międzyfazowej i możliwości ich zmian pod wpływem najrozmaitszych czynników. Częsteczki wody jak wiadomo mogą tworzyć pomiędzy sobą wiązania wodorowe. Występowanie tych wiązań powoduje szczególne termodynamiczne właściwości ciekłej wody. Dla ich wyjaśnienia podawane są różne modele struktury wody. Najogólniej można je podzielić na dwie grupy: modele ciągłe [1–8] i modele mieszane, dwustrukturalne [9–13]. W modelach ciągłych rozpatruje się przekształcenie struktury na drodze zmian geometrii wiązań bez ich rozrywania. W modelach mieszanych wysuwa się przypuszczenie o rozrywaniu wiązań wodorowych przy przemianach struktury pod wpływem zewnętrznych oddziaływań. Przesunięciem równowagi pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami i klastrami [9, 11–13] bądź lodopodobnymi szkieletami [10] tłumaczy się w tej grupie modeli termodynamiczne anomalie wody. Nowsze dane świadczą raczej na korzyść modeli ciągłych. Woda wykazuje swoje właściwości tylko wówczas jeżeli zajmuje taką objętość, że może stworzyć odpowiednią strukturę. Jest to szczególnie ważne w przypadku wody występującej w cienkich filmach, a z takimi zjawiskami spotykamy się w procesach pienienia, emulsyfikacji, zwilżania itp. oraz w układach biologicznych, w których zakłada się, że jest ona w stanie różniącym się od normalnej wody [14]. Tak więc nie tylko oddziaływania powierzchni na których lub pomiędzy którymi są warstewki wody, ale również grubość warstwek wody ma istotne znaczenie dla jej właściwości.

1. STRUKTURA I GĘSTOŚĆ POWIERZCHNI SWOBODNEJ WODY

Powierzchnia swobodna wody ma inne właściwości niż wnętrze fazy ciekłej. W takiej polarnej cieczy jaką jest woda powierzchniowa energia swobodna jest sumą energii oddziaływań dyspersyjnych, Debye'a, Keesoma i wiązań wodorowych [15]. Wzrost powierzchni swobodnej jest wynikiem przesunięcia cząsteczek z wnętrza wody na jej powierzchnię. W stanie równowagi cieczy z parą, szybkość parowania jest równa szybkości kondensacji i cząsteczka wody przebywa przeciętnie na powierzchni zaledwie $3 \cdot 10^{-6}$ s. Wynika to z następujących wyliczeń, które przedstawiono w poz. [16] cytowanej literatury. Cząsteczki w warstwie powierzchniowej wody wykazują tak samo intensywne ruchy termiczne jak w fazie objętościowej. Liczbę zderzeń cząsteczek w czasie 1s, pochodzących z powierzchni 1 cm^2 fazy gazowej według teorii kinetycznej można obliczyć z wyrażenia:

$$\frac{p}{\sqrt{2\pi mkT}}$$

gdzie p jest prężnością pary w temperaturze T , m – masą cząsteczki, k – stałą Boltzmann. Ponieważ nie każde zderzenie powoduje kondensację, liczba cząsteczek przechodzących z fazy gazowej do warstwy powierzchniowej jest równa wyrażeniu podanemu powyżej pomnożonemu przez współczynnik kondensacji α . W stanie równowagi liczba cząsteczek ulegających kondensacji jest równa liczbie cząsteczek odparowujących w czasie 1 s z 1 cm² powierzchni cieczy, czyli bezwzględna szybkość parowania wynosi:

$$V_{ads} = \frac{\alpha \cdot p}{\sqrt{2\pi mkT}}$$

Dla wody w temperaturze 20°C i $p = 17,5$ mm Hg, $\alpha = 0,03$; stąd wynika $V_{ads} = 0,3 \cdot 10^{23}$ uwalnianych/adsorbowanych cząsteczek z powierzchni 1 cm² w czasie 1 s. Biorąc pod uwagę rozmiary molekuly wody, 1 cm² powierzchni wody może jednocześnie pomieścić maksymalnie 10¹⁵ cząsteczek. Z tego też powodu wynika wyżej podana wartość czasu przebywania cząsteczki na powierzchni swobodnej.

Utworzenie nowej powierzchni swobodnej wody związane ze zmianą energii swobodnej układu woda/para wodna definiowane jest jako napięcie powierzchniowe.

Z eksperymentalnych zależności napięcia powierzchniowego od parametrów stanu można uzyskać różne informacje:

- z temperaturowej zależności napięcia powierzchniowego można określić wartość powierzchniowej entropii,
- z zależności napięcia powierzchniowego od składu można określić skład warstwy powierzchniowej.
- z zależności napięcia powierzchniowego od ciśnienia – Rusanow określił [17, 18] autoadsorpcję i gęstość powierzchniową wody oraz pośrednio strukturę warstwy powierzchniowej.

Rusanow do określenia ww wielkości zastosował następujące równania:

$$\Gamma = -\rho^\alpha \left(\frac{d\sigma}{pd} \right)_T$$

$$\frac{\rho^\alpha - \rho^\delta}{\rho^\alpha} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{d\sigma}{pd} \right)_\Gamma$$

gdzie, Γ (mol/cm²) oznacza autoadsorpcję wody, ρ^α – gęstość wody we wnętrzu fazy, ρ^δ – gęstość warstwy powierzchniowej wody o grubości τ , σ – napięcie powierzchniowe, p – ciśnienie.

Badania Rusanowa prowadzone były dla przedziału ciśnienia 1–80 kg/cm² w temperaturach 20–50°C. Gęstość powierzchniowa wody i autoadsorpcja określone zostały dla monowarstwy, biwarstwy i decywarstwy Według Rusanowa wyznaczona w takich warunkach wartość autoadsorpcji wody wynosi $2,1 \cdot 10^{-10}$ mola/cm² zaś gęstość powierzchniowa monowarstwy wody jest mniejsza od gęstości objętościowej o 15–7%. Opisane zachowanie Rusanow tłumaczy obniżeniem powierzchniowej gęstości wody, które z kolei zostało spowodowane inną strukturą warstwy powierzchniowej wody w stosunku do wnętrza jej fazy.

2. LEPKOŚĆ POWIERZCHNIOWA

Lepkość warstwy powierzchniowej wody względem jej wnętrza jest różna. Lepkość powierzchniowa η_s jest definiowana jako iloraz siły stycznej działającej na jednostkową powierzchnię do gradientu prędkości w warstwie powierzchniowej [19]. W układzie CGS lepkość powierzchniowa η_s , wyrażana jest w jednostkach zwanych puazami powierzchniowymi (sp), co w przeliczeniu na jednostki podstawowe CGS można zapisać, $1 \text{ sp} = 1 \text{ g/s}$. Jednostką lepkości objętości wnętrza cieczy η jest tzw. 1 puaz = $1 \text{ g} \cdot 1 \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ s}^{-1} = 0,1 \text{ Ns/m}^2$. Zależność pomiędzy tymi dwiema wielkościami jest następująca:

$$\eta = \eta_s / d$$

gdzie d jest grubością fazy powierzchniowej (dla wielu monowarstw wartość ta wynosi około 10^{-7} cm). W temperaturze 20°C dla warstwy powierzchniowej wody o grubości 10-ciu monowarstw lepkość powierzchniowa wynosi $0,3 \cdot 10^{-8}$ sp. Gdy swobodna powierzchnia wody zostanie pokryta monowarstwą Langmuira lub filmem adsorpcyjnym lepkość ta ulega znacznemu wzrostowi i przyjmuje wartości w granicach 0,001–1 sp. Badania lepkości powierzchniowej, dotyczące zarówno rozmaitych metod pomiarowych jak i wpływu struktury filmu na jego lepkość dla różnych filmów na subfazie wodnej, chociaż prowadzono od dziesięcioleci są nadal obiektem zainteresowania wielu badaczy [20–30].

3. PRZEWODNOŚĆ POWIERZCHNIOWA

Prócz lepkości powierzchniowej granica faz woda/powietrze wykazuje również różną od wnętrza przewodność elektryczną. Definiowana jest ona następująco [19]. Jeżeli na powierzchni wody umieścić dwa równoległe cienkie druty o długości l w odległości b od siebie, to przewodność powierzchni pomiędzy nimi będzie $K_s \cdot l/b$, gdzie K_s jest powierzchniową przewodnością właściwą i ma wymiar Ω^{-1} . Biorąc pod uwagę przewodność czystej wody podaną przez Kohlrauscha ($4,4 \times 10^{-8} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$) i warstwę wody o grubości dziesięciu monowarstw (ok. 31 Å), powierzchniowa prze-

wodność właściwa wody jest rzędu $10^{-14} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$. Najczęściej prowadzonymi badaniami eksperymentalnymi przewodności powierzchniowej były pomiary wzrostu przewodności fazy ciekłej po wytworzeniu na jej powierzchni warstwy adsorpcyjnej. Najwcześniejszymi badaniami były pomiary elektrycznych właściwości filmów pianowych prowadzone przez Reynoldsa i Druckera [31]. Przewodność różnych monowarstw wytworzonych na powierzchni swobodnej wody jest rzędu $10^{-9} \Omega^{-1}$ [32–34].

4. PRZENIKALNOŚĆ ELEKTRYCZNA POWIERZCHNIOWA

Przenikalność elektryczna wnętrza fazy ciekłej wody w 25°C jest równa, $\varepsilon = 79$ [35]. Cząsteczka wody ma nieliniową budowę. Dwa atomy wodoru są związane z atomem tlenu pod kątem $104,5^\circ$. Długość wiązania wynosi $0,958 \text{ \AA}$ [36]. Cząsteczka wody jako całość jest elektrycznie obojętna, ale środek ciężkości ładunku dodatniego nie pokrywa się ze środkiem ciężkości ładunku ujemnego i cząsteczka jako całość posiada trwały elektryczny moment dipolowy równy $\mu = 1,84 \text{ D}$ [37].

Wartość przenikalności elektrycznej na powierzchni wody w stosunku do jej wnętrza jest różna. Wynika to m.in. z tego, że cząsteczki wody w warstwie powierzchniowej znajdują się w innym otoczeniu niż cząsteczki wody we wnętrzu fazy, a zatem w fazach tych jest różna możliwość orientacji dipoli co pociąga za sobą różne wartości przenikalności elektrycznej. Wartość przenikalności elektrycznej wnętrza fazy wodnej jest większa w porównaniu z wartościami innych związków których cząsteczki wykazują moment dipolowy podobnego rzędu jak cząsteczki wody. Jedną z przyczyn takiego zachowania jest mała objętość molowa wody.

W literaturze nie ma podanych jednoznacznych wartości przenikalności elektrycznej granicy faz woda/powietrze. Wynika to z braku zgodności co do struktury powierzchni swobodnej wody. Brak takich danych powoduje, że bardzo często przyjmuje się założenie, że jest ona równa $\varepsilon = 1$ [19, 38, 39]. Niektórzy uczeni uważają, że jest ona równa $\varepsilon = 6$ [40].

W ostatnich latach Teschke i de Souza [41, 42] wykorzystali spektroskopię sił atomowych (AFM) w celu zbadania zależności wartości przenikalności elektrycznej od grubości warstwy powierzchniowej. Stwierdzili, że dla warstwy powierzchniowej o grubości mniejszej niż 5 nm , przenikalność elektryczna na granicy faz woda/powietrze obniża się monotonicznie od 80 do 2 [43]. Ogólnie można stwierdzić, że przenikalność elektryczna wody w warstwie powierzchniowej o grubości nie mniejszej niż około 1 nm zmienia się od wartości jakie ma we wnętrzu fazy do tej jaka jest charakterystyczna dla powietrza.

5. POTENCJAŁ POWIERZCHNIOWY

Wiele kontrowersji do chwili obecnej budzi pytanie jaka jest struktura granicy faz woda/powietrze, czy ma ona właściwości kwasowe czy zasadowe, jak jest naładowana dodatnio czy ujemnie, jakiego znaku i jaką wartość ma skok potencjału powierzchniowego. Odpowiedź na większość z powyższych pytań zależy od tego jaką przyjmie się orientację cząsteczek wody na powierzchni swobodnej. Potencjał powierzchniowy χ , jest zdefiniowany jako różnica pomiędzy potencjałem wewnętrznym fazy ciekłej φ (potencjał Galwaniego) a potencjałem zewnętrznym fazy gazowej (para) ψ (potencjał Volty) [44–46]: $\chi = \varphi - \psi$.

Profesor Bogdan Kamiński, twórca polskiej szkoły fizykochemii powierzchni, przyjmował że dipole wody zawarte w parze wodnej unoszące się nad powierzchnią swobodną wody mają znacznie wyższą energię swobodną niż cząsteczki wody z asocjowane w fazie ciekłej [47, 48]. W procesie parowania i kondensacji przy przejściu przez granicę faz, cząsteczki wody orientuje się względem fazy ciekłej biegunem dodatnim przy którym natężenie wytwarzanego pola elektrycznego jest większe [49], tzn. układają się atomami wodoru w kierunku ośrodka (tj. wnętrza fazy ciekłej), o większej przenikalności elektrycznej, co daje wyraźny skok potencjału elektrycznego [49]. Według Kamińskiego wystarczy założyć, że co dziesiąta cząsteczka wody z tych które mieszczą się na 1 cm^2 powierzchni jest zorientowana atomami wodoru do wnętrza fazy wodnej, żeby skok potencjału miał rząd wielkości 1V i był dodatni od strony fazy ciekłej, a ujemny od strony fazy gazowej [48, 49]. O tego rzędu wartościach – skoku potencjału powierzchniowego wody – według Kamińskiego, świadczą również wyniki pomiarów zmian potencjału powierzchniowego i napięcia powierzchniowego dla roztworów wodnych ok. 200 substancji organicznych posiadających różne stężenia i pH. Wykorzystując te wyniki, (umieszczając na jednym wykresie możliwie dużą liczbę pomiarów) Kamiński skonstruował diagram podający zależność mierzonych zmian potencjału elektrycznego od zmian napięcia powierzchniowego. Ekstrapolując na tym diagramie zmiany potencjału powierzchniowego do zerowej wartości napięcia powierzchniowego Autor wspomnianych prac oszacował skok potencjału powierzchni swobodnej wody na bliski około 1 V. Kamiński uważa, że skok potencjału powierzchni czystej wody musi być większy niż maksymalne zmiany tego skoku powstałe w wyniku adsorpcji substancji powierzchniowo czynnej. I tak na przykład bardzo słaby elektrolit jakim jest lepidyna w roztworze wodnym o stężeniu 0,01 M, gdy jest w stanie niezjonizowanym, zmienia potencjał o 800 mV, podobnie działają nieelektrolity, a także słabe kwasy i zasady w stanie niezjonizowanym. Stąd według Kamińskiego potencjał powierzchni swobodnej wody powinien być większy a zatem co najmniej rzędu 1 V. Interpretacja potencjału powierzchniowego wody podana przez Kamińskiego spotkała się z krytyką Frumkina [50]. Frumkin [50–53] przyjmuje również, że cząsteczki wody na powierzchni swobodnej są skierowane atomami wodoru do wnętrza fazy ciekłej a tlenem w stronę fazy gazowej, ale, że wartość potencjału granicy woda/para wodna jest rzędu 0,1–0,2 V a więc dużo mniejsza. Do takiego wniosku doszedł

Frumkin w oparciu o badania potencjału powierzchniowego roztworów elektrolitów [51, 52] oraz niektórych związków organicznych (alkohole, estry).

Jaki jest kierunek znaku (+/-) oraz wartości skoku potencjału powierzchni swobodnej wody można wnioskować z pomiarów współczynnika temperaturowego tego potencjału. Jeżeli wziąć pod uwagę że wielkość potencjału powierzchniowego jest uwarunkowana orientacją drobin w warstwie powierzchniowej cieczy, to wzrost temperatury zmniejsza stopień orientacji, winien więc prowadzić do zmniejszenia absolutnej wartości potencjału powierzchniowego. Mówiąc inaczej znak współczynnika temperaturowego potencjału powierzchniowego powinien być odwrotny do znaku potencjału powierzchniowego, a zatem pomiar współczynnika temperaturowego potencjału powierzchniowego powinien pozwalać na określenie znaku tego potencjału. Niestety określenie wielkości współczynnika temperaturowego nie jest dostępną bezpośrednim pomiarem. Frumkin oraz Randles i Schiffrin, [54] wyznaczyli temperaturową zależność potencjału powierzchniowego, metodami pośrednimi i uzyskali ujemną wartość współczynnika temperaturowego co wskazuje na orientację cząsteczek wody na powierzchni swobodnej wody atomami tlenu w stronę powietrza.

Z innych doświadczalnych prób określenia potencjału powierzchni swobodnej wody należy wymienić próby jego wyznaczenia z pomiarów elektrochemicznych w oparciu o różnicę potencjałów odpowiednio zbudowanych ogniw. Wymienić tu należy badania Gomera i Trytona [55], Farrella i McTigue [56] oraz Trassattiego [57, 58].

Pytanie czy powierzchnia swobodna wody ma własności kwasowe czy zasadowe, jaka jest orientacja cząsteczek wody na powierzchni, czy przeważają na niej jony hydroniowe czy hydroksylowe próbowano również określić w oparciu o pomiary potencjału zeta. Już od dawna (1861 r.) znany jest fakt, że pęcherzyki powietrza w wodzie mają ładunek ujemny i wędrują w polu elektrycznym do elektrody dodatniej. Podobnie zachowują się kropelki wody w powietrzu. Potencjał zeta pęcherzyka powietrza w dejonizowanej wodzie wyznaczony przez Graciaa et al. [59] wynosi -65 mV. Beattie [60-62] uważa, że ujemny znak granicy: faza wodna/powietrze przy obojętnym pH wody jest następstwem występowania w warstwie powierzchniowej jonów hydroksylowych. Przeciwnego zdania jest Vacha i współpracownicy [63], którzy sądzą, że swobodna powierzchnia wody ma własności kwasowe z związane z obecnością jonów hydroniowych (H_3O^+ , H_5O^{2+}) i jest naładowana dodatnio. Swoje konkluzje opierają oni na symulacjach dynamiki molekularnej stosując różne modele dla uwodnionego protonu. W wyniku tych symulacji wielu autorów [64-69] przyjmuje występowanie zwiększonej ilości jonów hydroniowych na powierzchni wody i kwaśnych roztworach wodnych. Te obserwacje są poparte przez rezultaty technik powierzchniowej selektywnej nieliniowej spektroskopii VSFG (vibrational sum-frequency generation) – generacja sumy częstości w zakresie poczerwieni [69-71] i SHG (ang. *second harmonic generation*) – generacja drugiej harmonicznej [72, 73]. Molekularne uzasadnienie tego efektu według Vacha [63] jest następujące.

Jon hydroniowy ze swoimi silnie dodatnio naładowanymi wodorami i słabo ujemnie naładowanym tlenem jest bardzo dobrym donorem w wiązaniu wodorowym a słabym akceptorem. Z tego względu we wnętrzu wody prowadzi on do rozrywania lokalnego usieciowania wiązania wodorowego. Natomiast na powierzchni swobodnej jon hydroniowy orientuje się wodorami do cząsteczek we wnętrzu wody i sąsiadujących cząsteczek podczas gdy tlen jest skierowany do fazy gazowej [69, 73]. Ani spektroskopowe pomiary, ani molekularne symulacje nie wskazują na silne skłonności jonów hydroksylowych do powierzchni [69,71]. W przeciwieństwie do jonu hydroniowego jon hydroksylowy ze swoim silnie naładowanym negatywnie tlenem jest doskonałym akceptorem w wiązaniu wodorowym, podczas gdy zdolność do tworzenia wiązania wodorowego jego słabo dodatnio naładowanego wodoru jest niewielka. Stąd na powierzchni wody należy oczekiwać zwiększenia stężenia jonów hydroniowych, podczas gdy zwiększenie jonów hydroksylowych nie występuje. Pozwala to na przyjęcie, że powierzchnia wody ma charakter kwaśny.

Kontrowersji dotyczącej właściwości elektrycznych granicy faz woda/powietrze nie rozstrzygają w pełni do chwili obecnej określone wartości skoku potencjału elektrycznego. Oprócz metod jego doświadczalnego wyznaczenia podanych już poprzednio, próbowano go również wyliczyć wykorzystując do tego chemiczne i rzeczywiste energie swobodne hydratacji jonów. Zgodnie z terminologią Langego i Miscenki [73] chemiczna swobodna energia hydratacji jest to energia oddziaływania pomiędzy jonami i cząsteczkami rozpuszczalnika, zaś rzeczywista energia hydratacji przedstawia zmianę energii swobodnej jonu przy jego przejściu z próżni do roztworu. Rzeczywista swobodna energia hydratacji różni się od chemicznej o pracę przejścia jonu przez skok potencjału istniejącego na granicy faz roztwór wodny/powietrze. Rzeczywista energia hydratacji jonu może być wyznaczona doświadczalnie na podstawie pomiaru kontaktowej różnicy potencjałów pomiędzy elektrodą i roztworem. Wartość chemicznej energii hydratacji jonu nie daje się wyznaczyć doświadczalnie nawet na drodze pośredniej i może być tylko obliczona za pomocą określonego założenia lub modelu opisującego oddziaływanie pomiędzy jonami i cząsteczkami rozpuszczalnika. Jednak w większości przypadków obliczenia tego rodzaju dają tylko przybliżone wyniki. Stąd i próby przybliżonej oceny wartości potencjału powierzchniowego wody za pomocą wyznaczonych doświadczalnie rzeczywistych i obliczonych na podstawie jakiegoś założenia, chemicznych energii hydratacji, nie dają jednoznacznych rezultatów. Wyliczenia takie prowadzili między innymi Vervey [74], Miscenko i Kwiat [75], Hush [76], Strehlow [78] i Passoth [78]. W obliczeniach tych porównywali rzeczywiste energie hydratacji znalezione na podstawie pomiarów napięć Volty pomiędzy elektrodą i roztworem z obliczonymi teoretycznie chemicznymi energiami hydratacji. Większość autorów posługujących się tą metodą jest zdania, że potencjał powierzchniowy granicy faz woda/powietrze jest ujemny i jest zawarty w granicach $-0,2$ do $-0,4$ V. Jeżeli jednak zastosować teorię energii solwatacji Laidlera i Pegisa [79] otrzymamy dla potencjału powierzchniowego wartość około $+1,4$ V, która jest znacznie większa od podanej przez poprzednio wymienianych autorów, jednak np. z punktu widzenia interpretacji Kamień-

skiego możliwa. Trasatti [57, 58] wyznaczył wartość potencjału powierzchniowego wody jako równą 0,13 V w oparciu o różnice potencjału Volty na granicy faz rtęć/woda przy potencjale zerowego ładunku [80].

Znak i wartość potencjału powierzchniowego wody próbowano również określić na drodze teoretycznej. Badania te mają długą historię. Wymienić tu należy prace Weyela [81], Stillingera i Ben-Naima [82], Flechtera [83] Crooxtona [84], Matsumoto i Kataoka [85], Wilsona, Pohorville i Pratta [86] oraz Barracloungh, McTique i Leong Ng [87] Autorzy ci w swoich obliczeniach stosowali metody dynamiki molekularnej. Szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się znaczny rozwój technik obliczeniowych i zastosowanie ich do wyjaśnienia właściwości równowagowych na granicy faz woda/para wodna [88]. Wiele uwagi poświęca się określeniu potencjału powierzchniowego przy użyciu technik symulacji molekularnej. W oparciu o ulepszone metody obliczeniowe przyjęto, że potencjał powierzchniowy granicy faz woda/powietrze nie równa się zero. Jego wartość zależy od przyjętego w obliczeniach modelu wody. Dla różnych modeli wody takich jak SPC/E, SPC, CC, RWL, TIPS2, dd+QQ, TIP4P, ST2, TIPSP jego wartość jest ujemna i zawarta w granicach od -18 mV do -890 mV [89–91]. Wyjątek stanowi wartość podana przez Leunga [92] wynosząca +3,63 V. Różne wartości potencjału powierzchniowego wody podawane przez różnych badaczy wynikają z braku zgodności co do przyjmowanej orientacji cząsteczek wody na granicy faz woda/powietrze. I tak np. Fan [93] sugeruje, że cząsteczki wody w dwuwarstwie powierzchniowej są skierowane grupami OH do fazy gazowej. Gan [94] w swoich pracach uwzględnia ruchy drgające cząsteczek wody przy orientacji na powierzchni swobodnej.

Ogólnie należy stwierdzić, że do chwili obecnej nie ma całkowitej zgodności odnośnie orientacji cząsteczek wody na granicy faz woda/powietrze. Przeważa pogląd, że powierzchnia swobodna wody jest od strony powietrza naładowana ujemnie.

6. FILMY ADSORPCYJNE I MONOWARSTWY NIEROZPUSZCZALNE

Wymienione wyżej różne właściwości powierzchni swobodnej wody ulegają dużym zmianom w wyniku wytworzenia na niej filmu adsorpcyjnego lub nierozpuszczalnej monowarstwy z innej substancji. Filmy adsorpcyjne zwane też filmami Gibbsa powstają w wyniku dyfuzji do granicy faz rozpuszczonych we wnętrzu wody połączeń chemicznych o budowie amfifilowej (niepolarno-polarnej). W zależności od struktury części polarnej mogą to być połączenia anionowe, kationowe, obojętne lub obojętne. W fazie objętościowej roztworu oddziaływania między cząsteczkami wody i cząsteczkami substancji rozpuszczonej są dużo słabsze od wzajemnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami wody, co prowadzi do gromadzenia się cząsteczek substancji rozpuszczonej na powierzchni swobodnej. Sama powierzchnia swobodna wody ma również, jak to było podane poprzednio, właściwości inne niż wewnątrz fazy ciekłej ze względu na to, że siły kohezji między cząsteczkami

w fazie powierzchniowej nie są skompensowane. Istnieje siła działająca stycznie do powierzchni przeciwdziałająca jej powiększeniu zwana napięciem powierzchniowym.

W opisie termodynamicznym zjawisk zachodzących na granicy faz roztwór wodny/powietrze stosowane są dwie metody. Pierwsza z nich opracowana przez Gibbsa [95], opiera się na pojęciu określonej geometrii powierzchni rozdzielającej współistniejące fazy. Podstawowe równanie opisujące stan warstwy granicznej ma prostą postać:

$$S^s dT + Ad\sigma + m_i^s d\mu_i = 0$$

gdzie A jest wielkością powierzchni granicznej, S^s , $m_i^s \mu_i$ zaś entropią, liczbą moli składników i potencjałem chemicznym składników odniesionymi do powierzchni rozdziału, T – temperaturą, σ – napięciem powierzchniowym. Równanie to można stosować zarówno do płaskich jak i zakrzywionych powierzchni rozdziału.

Druga z metod, wykorzystywana głównie dla płaskich powierzchni rozdziału, przyjmuje dla warstwy granicznej pewną grubość. Warstwa graniczna jako odrębna faza została wprowadzona do termodynamiki powierzchni przez Guggenheima [96]. Przyjmuje się, że warstwa graniczna ω składająca się z określonej ilości substancji m_i^ω , ma powierzchnię A , objętość V^ω , i średnią grubość $\tau = V\omega/A$. Panuje na niej także ciśnienie; dla granicy ciecz/gaz nosi ono nazwę napięcia powierzchniowego. Równanie adsorpcji dla płaskiej powierzchni granicznej ma postać [97]:

$$Ad\sigma = -S^\omega dT + V^\omega dp - \sum_{i=1}^n m_i^\omega d\mu_i$$

Zarówno równanie Gibbsa jak i powyższe równanie charakteryzują się dużą prostotą matematyczną. Są jednak niewygodne w zastosowaniu, ze względu na to, że zawierają potencjały chemiczne składników, a te jak wiadomo są funkcjami (często niewiadomymi) temperatury, ciśnienia i składu. Równania te po wprowadzeniu nadmiaru powierzchniowego i odpowiedniego wyboru powierzchni rozdziału faz przechodzą w znaną izotermę adsorpcji Gibbsa [103] oraz równanie Guggenheima-Adama [98].

Ogólny przegląd opisu termodynamicznego powierzchni został przedstawiony przez Defay'a i Prigogina [99, 100]. Klasyczna termodynamika dla układów ciągłych jak również dla powierzchni dotyczy warunków równowagi. Jakkolwiek, istnieje wiele procesów i układów dalekich od warunków równowagi np. komórki biologiczne. Wyżej wymienieni autorzy ujęli to w ujednoczone wyrażenie użyteczne dla dużej liczby układów związanych z chemią powierzchni.

Zarówno filmy adsorpcyjne jak i nierozpuszczalne monowarstwy Langmuira jak to już wspomniano wyżej, zmieniają właściwości powierzchni swobodnej wody. Często mierzoną wielkością prócz napięcia powierzchniowego jest pomiar skoku potencjału elektrycznego po wytworzeniu na powierzchni monowarstwy. Skok

ten określony jako ΔV jest związany ze zmianami potencjału powierzchniowego χ i potencjału ψ w elektrycznej warstwie podwójnej [19]:

$$\Delta V = \Delta\chi + \Delta\psi$$

Zmiany $\Delta\chi$ zależą od momentu dipolowego hydrofilowej grupy adsorbowanej cząsteczki, reorientacji cząsteczek wody w bezpośrednim sąsiedztwie grup hydrofilowych i momentu dipolowego hydrofobowej części adsorbowanej cząsteczki. Jest trudno wyodrębnić te trzy składowe. Frumkin [50] i Adam [101, 102] przyjmują, iż efekt pochodzący od reorientacji cząsteczek wody jest mały. Ilościowo różnicę potencjału ΔV przedstawia się w oparciu o analogię warstwy podwójnej z kondensatorem płaskim [103]. Dwie przewodzące płytki znajdujące się w odległości d , zawierające ładunek o gęstości ρ wykazują zgodnie z formułą Helmholtza różnicę potencjałów:

$$\Delta V = 4\pi\rho d/\varepsilon$$

ε jest przenikalnością elektryczną. Rzeczywisty rozkład ładunków wywołany obecnością efektywnego momentu dipolowego $\bar{\mu}$ przedstawiony w postaci płaskiego kondensatora o okładkach równoległych, przy założeniu, że na 1 cm² jest n dipoli daje wyrażenie:

$$\rho d = ned = n\bar{\mu}$$

Stąd

$$\Delta V = \frac{4\pi n\bar{\mu}}{\varepsilon} = 4\pi n\mu \cos\theta$$

Przyjmując, że $\varepsilon = 1$ i $\mu = \bar{\mu}\cos\theta$, gdzie θ jest kątem nachylenia dipoli do linii normalnej do powierzchni okładek.

Davies i Rideal [19] przyjęli, że efektywny moment dipolowy $\bar{\mu}$ jest równy:

$$\bar{\mu} = \bar{\mu}_1 + \bar{\mu}_2 + \bar{\mu}_3$$

Te trzy składowe to efektywne momenty dipolowe pochodzące od reorientacji cząsteczek wody ($\bar{\mu}_1$), części hydrofilowej ($\bar{\mu}_2$) i hydrofobowej ($\bar{\mu}_3$) zaadsorbowanej cząsteczki. Wielkości te zostały uzupełnione o lokalne przenikalności elektryczne w sąsiedztwie grup hydrofilowych i hydrofobowych [104–107]. Dokładne dane dotyczące tych uzupełnień zawarte są w pracy Dynarowicz [108].

W literaturze spotyka się również pomiary dynamicznej wartości potencjału ΔV . W pracy Ter-Minasian-Saraga [109] zaprezentowany jest wpływ na wartość ΔV

gęstości powierzchniowej dipoli i rozkładu jonów na powierzchni w zależności od czasu. Potencjał powierzchniowy ΔV polarnych monowarstw może być wyrażony:

$$\Delta V = 4\pi \Gamma \frac{\bar{\mu}}{\varepsilon} + \psi_G$$

W wyrażeniu tym Γ , $\bar{\mu}$, ε i ψ_G są odpowiednio: gęstością filmu, molekularnym elektrycznym momentem dipolowym, przenikalnością elektryczną i potencjałem Gouy'a w dyfuzyjnej elektrycznej warstwie podwójnej. Stąd zmiany tego potencjału w czasie:

$$\frac{d\Delta V}{dt} = 4\pi \frac{\bar{\mu}}{\varepsilon} \left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_{\frac{\bar{\mu}}{\varepsilon}} + \left(\frac{d\psi_G}{d\Gamma} \right)_{\frac{\bar{\mu}}{\varepsilon}} \left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_{\frac{\bar{\mu}}{\varepsilon}} + 4\pi \Gamma \frac{1}{dt} \left(\frac{\bar{\mu}}{\varepsilon} \right)_{\Gamma} + \left(\frac{d\psi_G}{dt} \right)_{\Gamma}$$

W równaniu tym pierwszy i drugi człon dotyczy zmian potencjału ΔV ze zmianą powierzchniowej gęstości przy stałej orientacji dipoli, z których zbudowany jest film, trzeci człon odpowiada udziałowi w zmianach tego potencjału ze zmianami orientacji dipoli, zaś czwarty człon związany jest z redystrybucją jonów w warstwie dyfuzyjnej Gouy'a.

Powstanie na powierzchni swobodnej wody monowarstw z innej substancji może również zmieniać znacznie temperaturę powierzchni wody i opóźniać parowanie a także wpływać na konwekcję i turbulენტne ruchy obecne na powierzchni [110].

UWAGI KOŃCOWE

W ciągu ostatnich dziesięcioleci w wielu pracach prezentowane są badania wpływu zarówno adsorpcyjnych jak i nierozpuszczalnych monowarstw na najróżniejsze właściwości powierzchni swobodnej wody. Ale nie tylko te badania są interesujące, interesująca jest również charakterystyka granic międzyfazowych oddzielających wodne roztwory od wnętrza makromolekuł, miceli i membran. Struktury te mogą do otoczenia kierować naładowane lub polarne grupy chemiczne i wpływać na właściwości otoczenia, co ma istotne znaczenie dla wielu procesów tak w przyrodzie martwej jak i żywej. Jak z tego wynika, zarówno badania swobodnej powierzchni wody jak i granic międzyfazowych układów w których woda jest jedną z faz są bez przerwy aktualne. Na wiele stawianych w tej dziedzinie pytań nie ma jednoznacznych odpowiedzi. W tym krótkim przeglądzie literaturowym zasygnalizowany został obecny stan wiedzy dotyczący fizykochemicznych właściwości granicy faz woda/powietrze.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.D. Bernal, R.M. Fowler, *J. Chem. Phys.*, 1933, **1**, 515.
- [2] F.A. People, *Proc. R. Soc.*, 1951, **A205**, 163.
- [3] G.N. Zacepina, *Zh. Fiz. Khim.*, 1973, **47**, 2005.
- [4] J.R. O'Neil, L.N. Adanu, *J. Phys. Chem.*, 1969, **73**, 1553.
- [5] M.C.R. Symous, *Nature*, 1972, **239**, 257.
- [6] Y. A. Barker, R.O. Watts, *Chem. Phys. Lett.*, 1969, **3**, 144.
- [7] A. Rachman, F.H. Stillinger, *J. Chem. Phys.*, 1971, **55**, 3336.
- [8] F.H. Stillinger, A. Rachman, *J. Chem. Phys.*, 1972, **57**, 1281.
- [9] E. Eucken, *Z. Electrochem.*, 1948, **52**, 255.
- [10] M.S. Frank, A.S. Quist, *J. Chem. Phys.*, 1961, **34**, 603.
- [11] G. Nemethy, M.A. Scheraga, *J. Chem. Phys.*, 1962, **36**, 3382.
- [12] R.P. Marchi, M. Eyring, *J. Phys. Chem.*, 1964, **68**, 221.
- [13] B.R. Lentz, A.T. Hagler, M.A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 1974, **78**, 1531.
- [14] G.N. Ling, *N.Y. Acad. Sci.*, 1965, **125**, 401.
- [15] H. Sontag, *Lehrbuch der Kolloidwissenschaft*, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1977.
- [16] A. Scheludko, *Chemia Kolloidów*, WNT, Warszawa 1968.
- [17] A.J. Rusanow, N.N. Kochurowa, W.N. Chabarow, *Dok. Akad. Nauk. SSSR*, 1972, **202**, 380.
- [18] W.N. Chabarow, A.J. Rusanow, N.N. Kochurowa, *Kolloid. Zh.*, 1978, **38**, 120.
- [19] J.T. Davies, E.K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, Acad. Press., New York and London 1963.
- [20] L. Fourt, W.D. Harkins, *J. Phys. Chem.*, 1938, **42**, 897.
- [21] T. Sasaki, M. Kizimuka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1952, **25**, 318.
- [22] S. Härd, R.D. Neuman, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1981, **83**, 315.
- [23] M. Hähnerfuss, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1989, **107**, 84.
- [24] M. Sacchetti, C. Zografi, *J. Chem. Phys.*, 1993, **99**, 563.
- [25] M.L. Kurnas, D.K. Schwarz, *Phys. Rev. E*, 1977, **56**, 3378.
- [26] C.F. Brooks, G.G. Fuller, C.F. Frank, C.W. Frank, C.R. Robertson, *Langmuir*, 1999, **15**, 24.
- [27] M. Sacchetti, M. Yu, G. Zografi, *Langmuir*, 1993, **9**, 2168.
- [28] P. Erni, P. Fischer, E.J. Windhab, V. Kusnezov, H. Stettin, J. Läger, *Rev. Sci. Instrum.*, 2003, **74**, 4916.
- [29] A. Frank, Hodder, *Ann. Trans. Nord. Rheolog. Soc.*, 2009, 17.
- [30] B. Scheid, S. Dorbolo, L.R. Arriaga, E. Rio, *Phys. Rev. Lett.*, 2012, **209**, 264502.
- [31] A.W. Reynolds, A. W. Rücker, *Proc. Roy. Soc.*, 1893, **53**, 394.
- [32] *Surface Forces in Thin Films and Dispersed Systems*, D. Platikanov, N. Rangelov, B.W. Deriaguin (Red.), Vol. 4, 1975, str. 246.
- [33] T. Yamanaka, T. Tano, K. Tozak, M. Hayashi, *Chem. Lett.*, 1994, **6**, 1143.
- [34] E.N. Swayne, J. Newman, J.C. Radke, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1998, **203**, 69.
- [35] J. Kirkwood, *J. Chem. Soc.*, 1939, 7, 911.
- [36] *Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions*, Chemical Society, London 1958.
- [37] J.W. Smith, *Electric Dipole Moments*, Butterworth Scientific Publ., London 1955.
- [38] Z. Koczorowski, [w:] *Volta and Surface Potential at Liquid/Liquid Interface, Theory and Methods*, A.G. Volkov, D.W. Deamer [Red.], CRC Press, Inc, 1966, str. 16.
- [39] R. Parsons, [w:] *Modern Aspects of Electrochemistry*, I. O'M Bokriss, B.M. Conway (Red.), Ch. 3, Vol. 1, Butterworths, London 1954.

- [40] E. Gileadi, E. Kirowa-Eisner, J. Penciner, *Interfacial Electrochemistry*, Addison-Wesley Publ. Company, Inc, London 1975, str. 15.
- [41] O. Teschke, E.F. de Souza, *Langmuir*, 2003, **19**, 5357.
- [42] O. Teschke, G. Ceotto, E.F. de Souza, *Phys. Rev. E*, 2003, **68**, 3140.
- [43] O. Teschke, E.F. de Souza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 3856.
- [44] J. Koryta, J. Dworak, L. Kavan, *Principles of Electrochemistry*, John Wiley and Sons, New York 199.
- [45] A.J. Bard. L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons, New York 1980.
- [46] W.R. Fawcett, *Liquids, Solutions and Interfaces: From Macroscopic Description to Modern Microscopic Details*, Oxford University Press, New York 2004.
- [47] B. Kamiński, *Bull. Int. Acad. Polon. Sci. Crocovie*, Cl.III. Ser. A., 1937, 430.
- [48] B. Kamiński, *Wiad. Chem.*, 1960, **14**, 619.
- [49] B. Kamiński, *Rocz. Chem.*, 1937, **17**, 497.
- [50] A.N. Frumkin, *Electrochim. Acta*, 1960, **2**, 351.
- [51] A.N. Frumkin, *Z. Phys. Chem.*, 1924, **109**, 34.
- [52] A.N. Frumkin, *Z. Phys. Chem.*, 1924, **111**, 190.
- [53] A.N. Frumkin, Z.A. Jofa, M.A. Gerovich, *Zh. Fiz. Khim.*, 1956, **30**, 1455.
- [54] J.E.B. Randles, D.Y. Schiffrin, *J. Electroanal. Chem.*, 1965, **10**, 480.
- [55] R. Gomer, G. Tryson, *J. Chem. Phys.*, 1977, **66**, 4413.
- [56] J.R. Farrel, P. McTique, *J. Electroanal. Chem.*, 1984, **163**, 129.
- [57] S. Trasatti, *Electrochim. Acta*, 1987, **32**, 843.
- [58] S. Trasatti, *J. Chem. Soc. Faraday*, 1974, **170**, 1752.
- [59] A. Graciaa, G. Morel, P. Saulner, L. Lachaise, R.S. Schechter, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1995, **172**, 131.
- [60] J.K. Beattie, *Colloid Stability, The Role of Surface Forces – Part. II*, T. Tadros (Red.), Wiley – Vch, Vol. 2, 2007, str. 153.
- [61] J.K. Beattie, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 330.
- [62] J.K. Beattie, A.M. Djerdiev, G.G. Warr, *Faraday Discuss.*, 2009, **141**, 31.
- [63] R. Vacha, V. Buch, A. Milet, J.P. Devlin, P. Jungwirth, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 4736.
- [64] L.X. Dang, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 6351.
- [65] M.K. Petersen, S.S. Iyenger, T.J.F. Day, G.A. Yoth, *J. Phys. Chem.*, 2004, **108**, 14804.
- [66] J.W. Shin, N.I. Hammer, E.G. Diken. M.A. Johnson, R.S. Walters, T.G. Jaeger, M.A. Duncan, R.A. Christie, D.K. Jordan, *Science*, 2004, **304**, 1137.
- [67] M. Miyazaki, A. Fujii, T. Ebata, N. Mikami, *Science*, 2004, **304**, 1134.
- [68] M. Mucha, T. Fregato, L.M. Levering, H.C. Allen, D.J. Tobias, L.X. Dnng, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 7617.
- [69] S. Gopalakrishnan, D. Liu, C.H. Allen, M. Kuo, M.J. Shult, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1155.
- [70] T.L. Tarbuck, S.T. Ota, G.L. Richmond, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14519.
- [71] P.B. Petersen, R.J. Saykally, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 2006, **57**, 333.
- [72] P.B. Petersen, R.J. Saykally, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 7976.
- [73] E. Lange, K.P. Miscenko, *Z. Phys. Chem.*, **130**, 149, 1.
- [74] E. Vervey, *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas*, 1942, **61**, 127.
- [75] K.P. Miscenko, E.I. Kwiat, *Zh. Fiz. Kchim.*, 1954, **28**, 1451.
- [76] N.S. Hush, *Aust. J. Sci. Rec.*, 1948, **1**, 480.
- [77] H. Strehlow *Z. Electrochem.*, 1952, **56**, 119.
- [78] G. Passoth, *Z. Phys. Chem.*, 1954, **204**, 275.
- [79] K. Laidler, C. Pegis, *Proc. Roy. Soc.*, 1957, **248**, 80.
- [80] J. Koryta, J. Dworak, *Elektrochemia*, PWN, Warszawa 1980.
- [81] W.A. Weyl, *J. Coll. Sci.*, 1951, **6**, 389.

- [82] F.H. Stilliner, A. Ben-Naim, *J. Chem. Phys.*, 1967, **47**, 4431.
- [83] N.H. Flechter, *Philos. Mag.*, 1968, **18**, 1287.
- [84] C.A. Croxton, *Physica A*, 1981, **106**, 239.
- [85] M. Matsumoto, Y. Kataoka, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 3233.
- [86] M.A. Wilson, A. Pohorille, L.R. Pratt, *J. Chem Phys.*, 1988, **88**, 3281, *ibid.*, 1989, **90**, 5211.
- [87] C.G., Barraclough, P.T. McTigue, Y. Leung Ng, *J. Electroanal. Chem.*, 1992, **329**, 9.
- [88] P. Jungwirth, D.J. Tpbias, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1259.
- [89] V.P. Sokhan, D.J. Tildesley, *Molec. Phys.*, 1997, **92**, 625.
- [90] E.N. Brodskaya, V.V. Zakharov, *J. Phys. Chem.*, 1955, **102**, 4595.
- [91] S.M. Kathmann, J.-F. W. Kuo, C.J. Mundy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16556.
- [92] K. Leung, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 496.
- [93] Y. Fan, X. Cen, L. Yang, P.S. Cremer, Y.Q. Gao, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 11672.
- [94] W. Gan, D. Wu, Z. Zhang, H. Wang, *Chim. J. Chem. Phys.*, 2006, **19**, 1360.
- [95] J.W. Gibbs, *Collected Works*, Vol. I, University Press, New Haven 1948.
- [96] E.A. Guggenheim, *Trans. Faraday Soc.*, 1940, **36**, 397.
- [97] A.J. Rusanow, *Wiestnik Leningr. Uniw.*, 1959, **16**, 71.
- [98] E.A. Guggenheim, N.K. Adam, *Proc. Roy. Soc. (London)*, A, 1933, **139**, 218.
- [99] R. Defay, J. Prigogine, A. Sandfelg, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1977, **58**, 499.
- [100] R. Defay, J. Prigogine, A. Bellmans, D.H. Everett, *Surface Tension and Adsorption*, Langmas, Green, London 1966.
- [101] N.K Adam, *The Physics and Chemistry of Surfaces*, Oxford Univ. Press London, New York 1941.
- [102] K. Adam, J. Harding, *Proc. Roy. Soc. A*, 1932, **138**, 411.
- [103] A. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley and Sons, New York 1990.
- [104] J. Demchak, T. Fort, *J. Coll. Inter. Sci.*, 1974, **46**, 191.
- [105] Koczorowski, S. Kurowski, S. Trasatti, *J. Electroanal. Chem*, 1992, **329**, 25.
- [106] O.N. Oliveira, D.M. Taylor, M. Morgan, *Thin Solid Films*, 1992, **210**, 76.
- [107] O.N. Oliveira, D.M. Taylor, T.J. Lewis, S. Salvagno, C.J.M. Stirling, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.1*, 1989, **85**, 1009.
- [108] P. Dynarowicz, *Adv. Coll. Inter. Sci.*, 1993, **45**, 215.
- [109] L. Ter-Minansion-Saraga, I. Panaiotov, J.S. Abitboul, *J. Col. Inter. Sci.*, 1997, **72**, 54.
- [110] L. Jaris, *J. Coll. Sci.*, 1962, **17**, 512.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 marca 2015

„HORYZONTY NAUKI 2015 – FORUM PRAC DYPLOMOWYCH”

Na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w dniu 28 maja 2015 r. po raz siódmy odbyła się konferencja studencka „Horyzonty Nauki 2015 – Forum Prac Dyplomowych”. Wcześniej konferencja funkcjonowała pod nazwą „Giełda Prac Dyplomowych”, a w roku 2012 nosiła nazwę „Gotowi do pracy”. Bez względu na nazwę, formuła konferencji jest taka sama i łączy naukowy charakter przedsięwzięcia z targami pracy, bowiem uczestniczą w niej przedstawiciele firm prezentujący profile działania swoich przedsiębiorstw i możliwości kariery zawodowej. Najważniejszymi uczestnikami konferencji są studenci prezentujący wyniki własnych badań wykonanych w ramach prac licencjackich, magisterskich i doktorskich. Przygotowują prezentacje w formie komunikatów ustnych i plakatów.

Organizatorem pierwszych dwóch edycji był Wydział Chemii UJ, a uczestnikami byli studenci tego Wydziału. Od roku 2011 konferencja organizowana jest przez Wydział Chemii oraz Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej. Każda kolejna edycja cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Uczestniczą w niej studenci wszystkich stopni i kierunków studiów prowadzonych na tych dwóch Wydziałach. Odnotowano także udział studentów z Wydziału Farmacji, Biochemii, Biologii i Biotechnologii, a nawet Instytutu Psychologii. Konferencja ma charakter międzynarodowy, gdyż czynny udział biorą w niej także studenci zagraniczni, uczestnicy programu „Erasmus”. Studenci studiów doktoranckich aktywnie uczestniczą w pracach Komitetu Organizacyjnego

Konferencja „Horyzonty Nauki – Forum Prac Dyplomowych” na trwałe wpięła się w kalendarz imprez środowiskowych z udziałem organizacji samorządowych takich jak Wojewódzki Urząd Pracy w Krakowie, Grodzki Urząd Pracy w Krakowie, Małopolskie Centrum Przedsiębiorczości. Jednym z patronów honorowych konferencji od pierwszej edycji jest Polskie Towarzystwo Chemiczne.

Ważnym elementem tej konferencji są nagrody i wyróżnienia przyznawane w równym stopniu za wartość merytoryczną prezentacji jak i sposób prezentowania, bowiem jednym z celów konferencji jest pokazanie sylwetki absolwenta UJ. Główną nagrodą jest Nagroda im. Włodzimierza Jarzęby. Nagrody przyznają także Dziekani Wydziału Chemii UJ i Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, Polskie Towarzystwo Chemiczne, Polskie Towarzystwo Fizyczne, Towarzystwo Doktorantów UJ, Fundacja Studentów i Absolwentów UJ „Bratniak”, Program „Erasmus Mundus”. Firmy uczestniczące w konferencji oprócz nagród fundują także staże i szkolenia.

W ubiegłorocznej edycji konferencji przyjęto nową formę nagradzania najciekawszych prezentacji jako propozycję przygotowania artykułów, które zostaną opublikowane na łamach czasopisma „Wiadomości Chemiczne”. W niniejszym wyborze

zaprezentowano prace trojga laureatów wyróżnionych przez Krakowski Oddział PTChem. Zostali nimi Krzysztof Bartyzel absolwent kierunku chemia, Sofia Lendor studentka kierunku chemia oraz Sabina Ożóg absolwentka kierunku ochrona środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Ewa Witek
Przewodnicząca Krakowskiego Oddziału PTChem

**HORYZONTY NAUKI 2015
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 28 MAJA 2015**

**PRZEŁĄCZNIKI MOLEKULARNE:
RODZAJE I ZASTOSOWANIA**

**THE MOLECULAR SWITCHES:
TYPES AND APPLICATIONS**

Krzysztof Bartyzel

*Uniwersytet Jagielloński
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: krzysztof.bartyzel5@gmail.com*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

1. Wprowadzenie
2. Fotochromowe przełączniki molekularne
3. Przełączniki molekularne typu gospodarz–gość
4. Przełączniki molekularne oparte na katenach i rotaksanach

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane



Krzysztof Bartyzel urodził się w 1990 roku w Stalowej Woli. W 2009 roku ukończył Liceum Ogólnokształcące w klasie o profilu biologiczno-chemicznym w Zespole Szkół Ponadgimnazjalnych nr 1 im. gen. Władysława Sikorskiego w Stalowej Woli. W tym samym roku rozpoczął studia I stopnia na kierunku Biologia z geologią, specjalność- ochrona przyrody na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Tamtejsze zajęcia z chemii organicznej zainspirowały go do podjęcia w 2010 roku studiów I stopnia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UJ. Tytuł licencjata uzyskał w 2013

roku, po czym kontynuował edukację chemiczną na studiach magisterskich. Pracę w Zespole Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej prof. dr hab. Jacka Młynarskiego rozpoczął już na III roku studiów. Pracę dyplomową, wykonaną pod opieką dr Jarosława Wilamowskiego, na temat „Synteza ligandów organicznych do nowych fotochromowych przełączników molekularnych” obronił 24 czerwca 2015 roku, uzyskując tytuł magistra.

ABSTRACT

A subject of this work is group of organic compounds known as molecular switches. Molecular switches are described as chemical compounds which molecules have at least two thermodynamically stable states. Conversion between these states is reversible and may be induced by such factors as change of the temperature or flow of the electric current or irradiation of the molecule with the light of particular wavelength [1]. Especially interesting are photochromic molecular switches. In this group the conversion is triggered by irradiation with a light of a particular wavelength [2]. Because of its unique properties, this type of compounds is extensively studied by the scientists, who investigate their photochromic properties as ways of using them in coordination with lanthanide metals and construction of novel molecular materials [3]. Especially interesting group of photochromic molecular switches is class named diarylethenes. This type of compounds after irradiation with UV light undergo cyclization, which is reversible under light of the visible spectrum (Figure 1). The other important group of photochromic molecular switches is class of compounds possessing in their structure chiroptic unit. The irradiation of the molecule with left- and right-handed circularly polarized light leads to change of the absolute configuration (Fig. 8) [1]. This type of switches may be used in construction of synthetic molecular motors which is widely studied subject nowadays [1]. The other groups of molecular switches are host- guest molecular switches and mechanically- interlocked molecular switches. In the first mentioned before group the bistable states differ in their affinity for guests (Fig. 15) [14]. The second one is based on the group of compounds named catenanes and rotaxanes. They can be described as two chemical individuals, mechanically interlocked in each other, which are not connected with chemical bonds (Fig. 19). This kind of molecular switches are used in construction of the logic gates [1].

Keywords: molecular switches, dithienylethenes, molecular materials, electrocyclization reaction

Słowa kluczowe: przełączniki molekularne, ditienuoeteny, materiały molekularne, reakcja elektrocyklizacji

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ**Skróty opisowe:**

| | |
|---------------|--|
| CD | - dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i>) |
| <i>l</i> -CPL | - światło spolaryzowane kołowo lewostronnie |
| <i>r</i> -CPL | - światło spolaryzowane kołowo prawostronnie |
| <i>ee</i> | - nadmiar enancjomeryczny (ang. <i>enantiomeric excess</i>) |
| pss | - stan fotostacjonarny (ang. <i>photostationary state</i>) |
| SMM | - jednocząsteczkowe magnesy (ang. <i>single-molecule magnets</i>) |
| UV | - światło z zakresu ultrafioletowego |
| Vis | - światło z zakresu widzialnego |

Związki chemiczne i rozpuszczalniki:

| | |
|------|-----------------------|
| DMSO | - dimetylosulfotlenek |
|------|-----------------------|

Podstawniki:

| | |
|----|---------|
| Me | - metyl |
|----|---------|

WPROWADZENIE

Przełączniki molekularne są to cząsteczki zdolne do odwracalnego przejścia między dwoma (lub więcej) termodynamicznie stabilnymi stanami posiadającymi odmienną budowę cząsteczki. Przejście to może zostać wywołane przez wiele czynników, wśród których można wymienić m.in. zmianę temperatury, natężenia płynącego prądu, pH czy długości fali światła oddziałującego z molekułą [1]. Najważniejszą cechą przełączników molekularnych jest to, że poszczególne stany, w których dana cząsteczka może występować różnią się od siebie swoimi właściwościami, zarówno fizycznymi jak i chemicznymi [2]. Przełączniki molekularne możemy podzielić ze względu na mechanizm zachodzenia przejścia pomiędzy ich stanami na kilka klas:

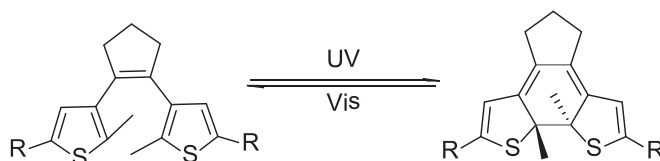
- przełączniki molekularne typu gospodarz-gość;
- przełączniki molekularne oparte na katenanach i rotaksanach;
- fotochromowe przełączniki molekularne [1].

Znaczenie przełączników molekularnych w technologii rośnie, z coraz większym naciskiem na ich fotochromową odmianę, wykorzystywaną przy produkcji materiałów światłoczułych stosowanych przy optycznym zapisie i przetwarzaniu informacji (nośniki holograficzne), ale także w produkcji światłowodów, czy optoelektronice [2, 4, 5].

W niniejszym artykule zostaną w skrócie przedstawione ww. klasy przełączników molekularnych z opisem ich innowacyjnych właściwości i zastosowań.

1. FOTOKROMOWE PRZEŁĄCZNIKI MOLEKULARNE

Fotochromowe przełączniki molekularne są obecnie najliczniejszą i najczęściej badaną grupą przełączników molekularnych. Przejście pomiędzy dwoma stanami cząsteczki odbywa się tutaj pod wpływem naświetlania danej molekuły światłem o określonej długości fali [2]. Ich nazwa pochodzi od zjawiska fotochromizmu. Polega ono na wywołanej światłem odwracalnej przemianie pomiędzy dwoma izomerami posiadającymi różne widma absorpcyjne (Schemat 1).

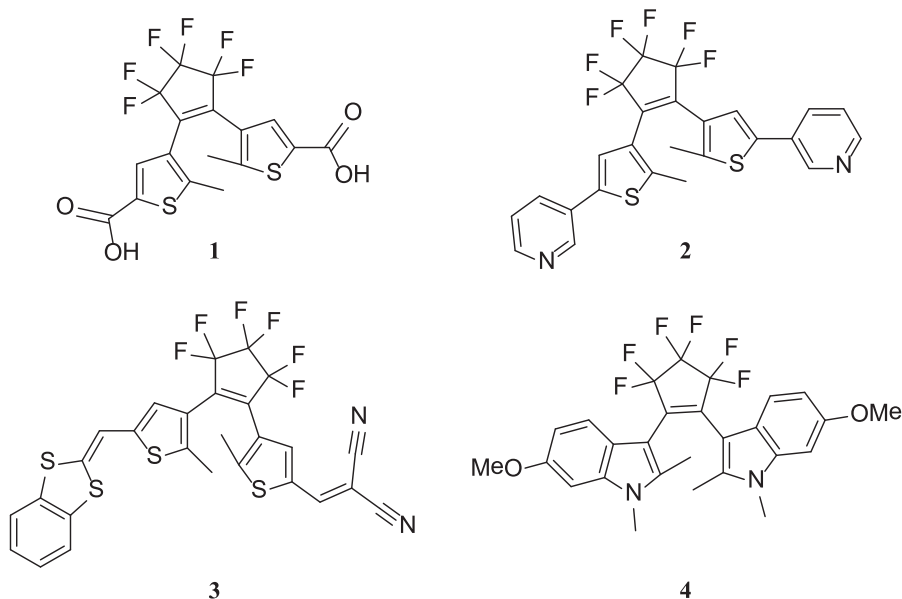


Schemat 1. Przejście pomiędzy dwoma stanami fotochromowych przełączników molekularnych

Scheme 1. Conversion between two photochromic states of molecular switches

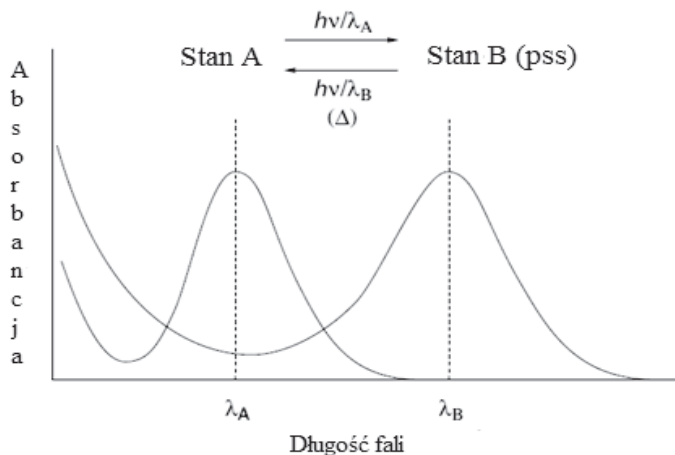
Na schemacie powyżej przedstawiono ogólną strukturę związków z grupy ditienyloetenów. Związki z tej grupy wykazują nie tylko silne właściwości fotochromowe, ale oprócz tego cechują się wysoką czułością, wytrzymałością przy wielu cyklach

przejsć pomiędzy stanami elektronowymi, stabilnością termiczną oraz reaktywnością w stanie stałym, co sprawia, że są bardzo szeroko stosowane [6]. Szczególnie użyteczne są diaryloeteny z układem perfluorowanego cyklopentenu w swojej strukturze (Schemat 2).



Schemat 2. Przykłady związków z grupy ditienuoetenów
Scheme 2. Examples of the compounds of dithienylethenes group

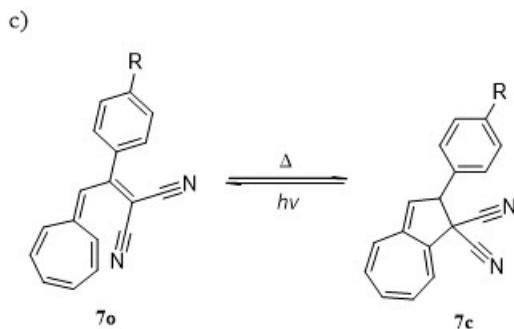
Najważniejszą cechą, która różni oba fotochromowe stany związku jest fakt, że posiadają one inne właściwości fizyczne oraz chemiczne. W wyniku zmiany struktury zmianie mogą ulec wartości takich wielkości jak współczynnik załamania światła, podatność dielektryczna, moment dipolowy, przewodność elektryczna, lepkość czy potencjał redoks [7]. Na Wykresie 1 przedstawiono różnicę maksimum absorpcji dla dwóch poszczególnych stanów fotochromowego przełącznika molekularnego [1].



Wykres 1. Różnica maksimum absorpcji pomiędzy dwoma fotochromowymi stanami cząsteczki
 Chart 1. The difference between maxima of absorption of two photochromic states of molecule

Różnica pomiędzy widmami absorpcyjnymi jest szczególnie ważna ze względu na fakt, że zmiana właściwości cząsteczki jest z nią powiązana i jest możliwa do oznaczenia tylko jeżeli oba maksima absorpcji są od siebie wyraźnie oddzielone. Przejście między jednym stanem cząsteczki a drugim można bardzo łatwo zaobserwować, nawet bez dokonywania pomiarów konkretnych wielkości, gdyż w wielu przykładach związków przejawia się ono zmianą barwy. Jako przykład można podać przedstawiony wyżej związek 7, który w świetle widzialnym występuje w postaci bezbarwnych kryształów, natomiast po naświetleniu światłem z zakresu UV zmienia barwę na ciemnoniebieską. Na schemacie 3 przedstawiono przykłady ditienuoetenów, podstawionych grupami chlorkowymi, karboksylowymi i kwasu borowego wraz z ich zmianą barwy po przejściu do formy cyklicznej (odpowiednio czerwoną, ciemnoniebieską i fioletową).

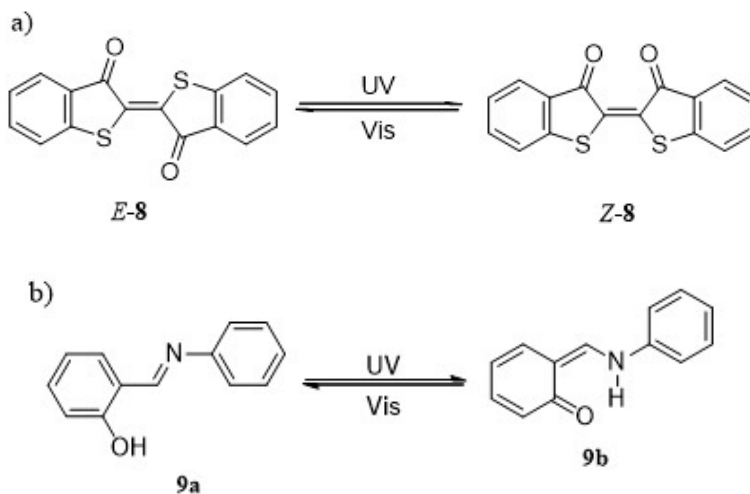
Przedstawiona na Schemacie 1 reakcja prezentowała przejście między dwoma stanami przełącznika molekularnego. Jest to często spotykany mechanizm, w którym w wyniku fotoindukowanej reakcji elektrocyklicznej dochodzi do zamknięcia lub otwarcia cząsteczki z jednoczesną zmianą jego właściwości. Ditienuoeteny to nie jedyna grupa związków, w której można zaobserwować zamykanie/otwieranie pierścienia w wyniku naświetlania światłem UV/Vis. Do tego typu związków można zaliczyć, m.in. fulgidy 5, pochodne dihydroindolizyny 6, jonu flawyliowego, dihydroazulenu 7 (Schemat 4) [1]. Przedstawione na schemacie indeksy „o” i „c” oznaczają odpowiednio formę otwartą oraz cykliczną.



Schemat 4. Zamknięcie/otwarcie pierścienia w fotochromowych przełącznikach molekularnych: c) dihydroazulen

Figure 4. Closing/opening ring in the photochromic molecular switches: c) dihydroazulene

Cyklizacja i otwarcie pierścienia to nie jedyna zmiana strukturalna, jakiej mogą ulec fotochromowe przełączniki molekularne. Pod wpływem światła z zakresu UV może dojść do zmiany konfiguracji *Z/E*, co na Schemacie 5 zostało przedstawione na przykładzie związku **8** lub wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu (związek **9**) [5].

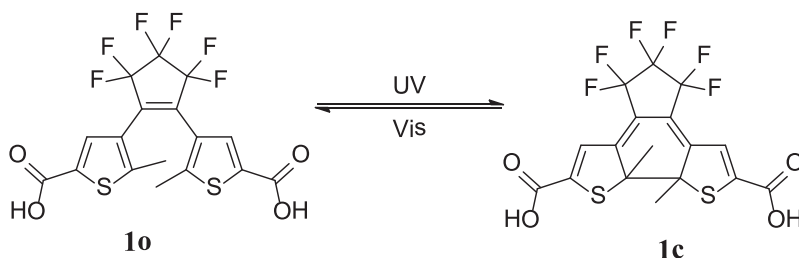


Schemat 5. a) izomeria *Z/E* tioindyga pod wpływem światła UV/Vis; b) tautomeria keto-enolowa *N*-salicylidenoaniliny

Figure 5. a) isomerization *E/Z* of thioindigo under influence of UV/Vis light; b) keto-enol tautomerism in *N*-salicylideneaniline

Fotochromowe przełączniki molekularne znalazły swoje zastosowanie przy projektowaniu materiałów molekularnych. W konstrukcji nowych materiałów molekularnych korzysta się z szerokiego wachlarza bloków budulcowych, zastosowanie których pozwala otrzymywać wielofunkcyjnie zaprojektowane materiały. W zależności od wykorzystanego bloku budulcowego finalny związek może być

badany pod kątem jego właściwości magnetycznych, optycznych, elektrycznych czy mechanicznych. Od kilku lat prowadzone są badania mające na celu wprowadzenie wielofunkcyjności do jednocząsteczkowych magnesów (SMM). SMM są specjalnym rodzajem związków kompleksowych wykazujących wolną relaksację magnetyczną i magnetyczną histerezę pochodzenia molekularnego. W skrócie tłumacząc, każda cząsteczka SMM może być traktowana i wykorzystywana jako nanomagnes. Badania prowadzone nad SMM mają na celu przede wszystkim opracowanie magnetycznych jednocząsteczkowych urządzeń do przechowywania i przetwarzania informacji na poziomie molekularnym. W pracach prowadzonych w tym kierunku swoją rolę znalazły również ditenyloeteny. Pozwoliły one opracować nowe magnesy molekularne dodatkowo reagujące na światło, co nadaje im unikalne i wielofunkcyjne właściwości. Przeprowadzone badania wykazały, że w celach konstrukcji światłoczułych magnesów molekularnych można wykorzystać związek **1** (Schemat 6) razem z jonami lantanowców, takimi jak terb, dysproz i holm, które wykazują dużą osiową anizotropię magnetyczną. Dzięki obecności dwóch grup karboksylowych w strukturze ditenyloetenu przedstawiony związek jest zdolny do kompleksowania dwóch jonów metali. Tak powstały związek kompleksowy może być badany pod kątem jego właściwości magnetycznych, spektroskopowych i fotomagnetycznych [3].



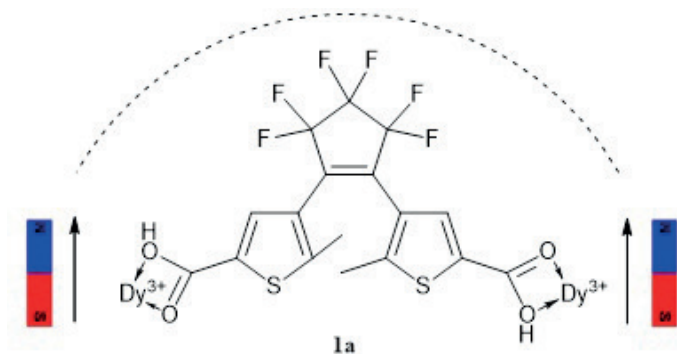
Schemat 6. Związek **1** jako przełącznik molekularny

Figure 6. Compound **1** as molecular switch

Jak wykazały wstępne badania, przejście pomiędzy formami otwartą i pierścieniową ma olbrzymi wpływ na właściwości badanego kompleksu. Znane są związki kompleksowe, w których kwas bis-1,2-tienylokarboksylowy **1** został skoordynowany z lantanowcami tworząc polimery koordynacyjne:

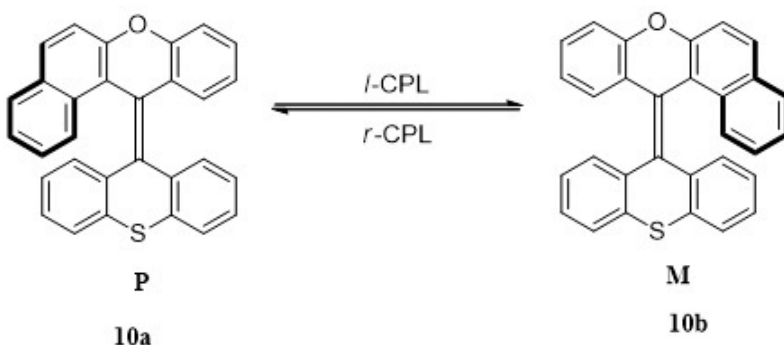
- a) $\{[\text{Dy}_2^{\text{III}}(\mathbf{1})_3(\text{DMSO})_3(\text{MeOH})] \cdot 10 \text{ MeOH}\}_n$
- b) $\{[\text{Ho}_2^{\text{III}}(\mathbf{1})_3(\text{DMSO})_3(\text{MeOH})] \cdot 10 \text{ MeOH}\}_n$

W obu związkach ditenyloeten pełni funkcję mostka pomiędzy dwoma jonami lantanowca. Oba kompleksy wykazują wolną magnetyczną relaksację charakterystyczną dla SMM (Schemat 7) [3].



Schemat 7. Kompleks związku **1** jako magnes molekularny
 Figure 7. Coordination complex of compound **1** as molecular magnet

Wyjątkowo interesującą grupą fotochromowych przełączników molekularnych są przełączniki zawierające w swojej strukturze jednostkę chiroptyczną. Oznacza to, że odwracalna przemiana między dwiema formami cząsteczki prowadzi do zmiany jej konfiguracji absolutnej. Zmieniona cząstka cechuje się wszystkimi wcześniej wymienionymi właściwościami przełączników molekularnych, ale także ze względu na chiralność może zostać wykorzystana na więcej sposobów. Najważniejszą cechą różniącą chiralne przełączniki molekularne od fotochromowych jest czynnik powodujący zmianę formy. O ile w przypadku wcześniej opisywanych przełączników głównym impulsem wywołującym przejście było światło z zakresu UV/Vis, o tyle w przypadku cząsteczek chiralnych używa się światła spolaryzowanego kołowo (CPL) w prawą lub lewą stronę, a samą detekcję obu stanów prowadzi się z wykorzystaniem dichroizmu kołowego (Schemat 8) [1].



Schemat 8. Fotochromizm chiroptycznych przełączników molekularnych pod wpływem światła spolaryzowanego kołowo w lewą lub prawą stronę
 Figure 8. Photochromism of the chiroptical molecular switches under left- and right-handed circularly polarized light

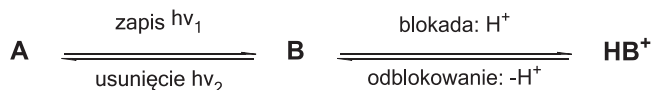
Przedstawiony na Schemacie 8 przełącznik cząsteczkowy **10** stanowi przykład modelowego przełącznika tego typu. Ze względu na niefaworyzowane oddziaływa-

nia steryczne wokół centralnego wiązania podwójnego, cząsteczka jest zmuszona do przyjęcia kształtu helikalnego, co powoduje, że chiralność takiej cząsteczki wynika z zniekształcenia płaskiej struktury całej molekuly. Badania prowadzone w tym zakresie potwierdziły, że najlepsze wyniki uzyskuje się dla przełączników o strukturze zatłoczonych sterycznie alkenów (odpowiednio wysokie wartości czynnika anizotropii g , który wiąże się z wartością nadmiaru enancjomerycznego w pss (Wzór 1), wysoka stabilność termiczna enancjomerów $\Delta G_{\text{rac}} > 21 \text{ kcal mol}^{-1}$, wysoka wydajność kwantowa fotoracemizacji) [1].

$$ee_{\text{pss}} = \frac{g}{2} = \frac{\Delta\varepsilon}{2\varepsilon}$$

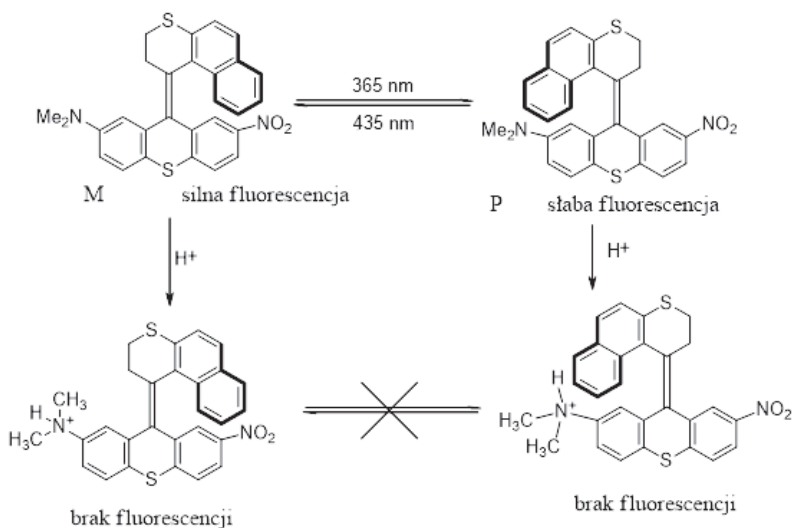
Wzór 1. Nadmiar enancjomeryczny w stanie fotostacjonarnym
Equation 1. Enantiomeric excess in photo-stationary state

Chiralne przełączniki molekularne są szeroko stosowane przy zapisie informacji. Możliwości w tym zakresie są uwarunkowane przez odpowiedź bramki logicznej. W celu umożliwienia zachowania informacji, cząsteczka musi cechować się odpowiednią fotochemiczną reaktywnością bramkową. Dana molekula nie może ulegać zmianie po naświetleniu pod warunkiem, że nie podlega ona żadnemu zewnętrznemu czynnikowi, zarówno fizycznemu jak i chemicznemu. Na Schemacie 9 przedstawiono typowy cykl zapisu informacji zawierający fotoizomeryzację i protonację cząsteczki [1].



Schemat 9. Cykl zapisu i przetwarzania informacji
Figure 9. Write/erase cycle of information

Przełączniki posiadają olbrzymi potencjał do przechowywania informacji. Do dnia dzisiejszego powstało wiele chemicznych bramkowych układów mających zastosowanie przy zapisie informacji, posiadających zdolności do regulacji właściwości fotochromowych oraz m.in. fluorescencji, wiązania z jonami czy właściwości elektrochemicznych. Na Schemacie 10 przedstawiono chiralny układ bramkowej odpowiedzi oparty na podstawionym alkenie. Poprzez protonowanie grupy dime-tyloaminowej przy układzie tioksantenu możliwe jest całkowite wygaszenie fluorescencji, która w cząsteczce nieprotonowanej w zależności od konfiguracji może być silna lub słaba [1].



Schemat 10. Fotoprzełącznik fluorescencji

Figure 10. Photoswitch of the fluorescence

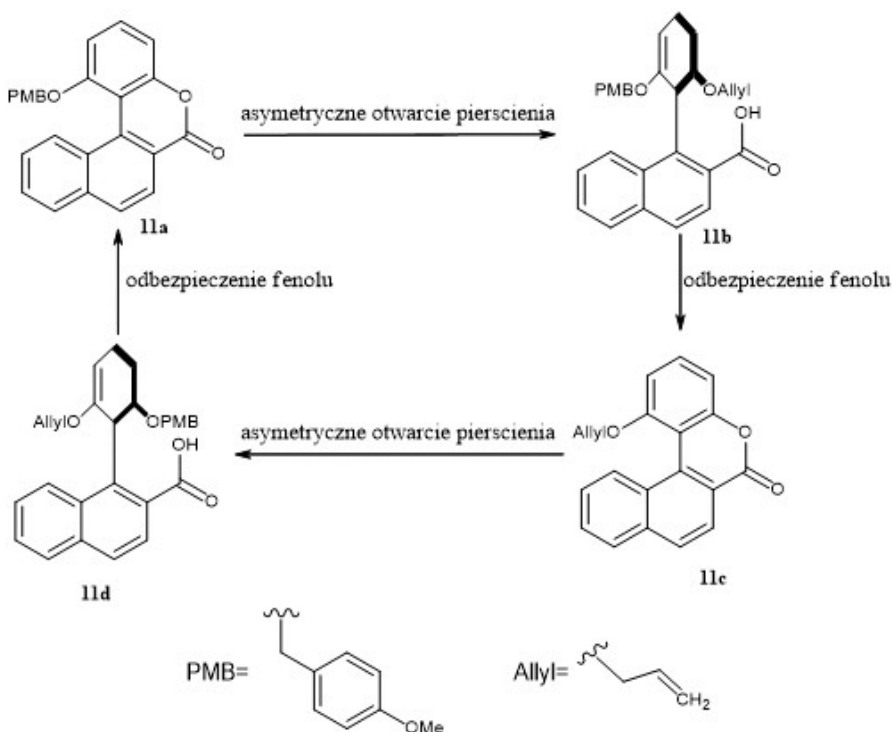
Ze względu na mechanizm, w jaki dochodzi do przechodzenia z jednej formy w drugą chiralnych przełączników molekularnych naukowcy zainteresowali się możliwością ich wykorzystania w roli motorów (silników) molekularnych. Sam motor można najprościej zdefiniować jako urządzenie zdolne do pochłaniania energii i przekształcania jej w pracę mechaniczną. Motory molekularne (oraz inne maszyny molekularne) pełnią ważne funkcje w organizmach żywych. Wśród przykładów można wymienić, m.in. białka motoryczne konwertujące energię Gibbsa uwalnianą w trakcie hydrolizy ATP na pracę mechaniczną, a także białka motoryczne odpowiedzialne za skurcze mięśni czy Eport wewnątrzkomórkowy, takie jak kinezyrna i miozyna. Biologiczne motory są też wykorzystywane w procesach transkrypcji RNA i replikacji DNA (polimerazy) czy też w wiciach (flagellach) bakterii umożliwiających im ruch [1].

Motory molekularne posiadają o wiele większą wydajność energetyczną w porównaniu do makrosilników produkowanych przez człowieka, dlatego też w ostatnich latach podjęto badania mające na celu otrzymanie syntetycznych maszyn molekularnych. Sama idea syntetycznego motoru molekularnego została zaproponowana przez pioniera nanotechnologii Richarda Feynmana w 1959 r. w jego słynnym wystąpieniu „There’s Plenty of Room at the Bottom”. Syntetyczny silnik molekularny powinien spełniać trzy podstawowe warunki, wg definicji Feynmana:

- musi być zdolny do wykonywania powtarzalnego obrotu o 360° ;
- musi być zdolny do pochłaniania energii;
- wykonywany obrót musi się odbywać w jednym kierunku.

Pierwszy sukces w tej dziedzinie udało się osiągnąć w 1999 roku grupie T.R. Kelly'ego, która opracowała model syntetycznego motoru molekularnego, wykonującego obroty wywoływane reakcją chemiczną. Zaproponowana maszyna składała się tryptycenu będącego częścią rotującą oraz helicenu i była zdolna do wykonania obrotu o 120° [8].

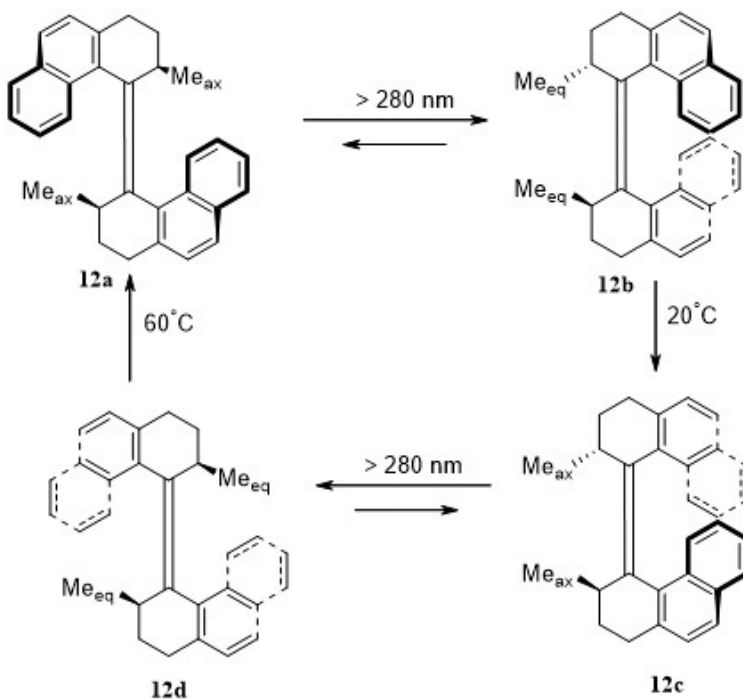
Opisany wyżej silnik był dopiero połowicznym sukcesem, gdyż nie spełniał on warunku o powtarzalnym obrocie o 360° . Pierwszy spełniający wszystkie podane wyżej warunki motor molekularny udało się otrzymać Benowi L. Ferindze i jego grupie. Opracowali oni projekt motoru zbudowanego z laktonu biarylowego, który pod wpływem chiralnych reagentów ulegał stereoselektywnemu otwarciu pierścienia, co skutkowało obrotem o 90° . Nie co później Feringa rozwinął tę ideę i opracował model motoru **11** zdolnego do obrotu o 360° (Schemat 11).



Schemat 11. Mechanizm działania syntetycznego motoru molekularnego **11** opartego na reakcji chemicznej
 Figure 11. Mechanism of synthetic molecular motor **11** based on the chemical reaction

Prawdziwym przełomem w tej dziedzinie było jednak opracowanie przez grupę Feringi, syntetycznego motoru molekularnego, w którym czynnikami powodującymi obrót było naświetlanie cząsteczki światłem z zakresu UV/Vis oraz zmiana temperatury [9]. W tym celu Feringa wykorzystał opisane wcześniej chiralne przełączniki molekularne oparte na zatłoczonym sterycznie alkenie. Pierwszy model składał się

z układu bisfenantrylidenu [10] połączonego wiązaniem podwójnym (Schemat 12). Dalsze badania w tym zakresie pokazały, że o wiele lepsze wyniki można uzyskać poprzez wprowadzenie do cząsteczki układów heterocyklicznych [11].

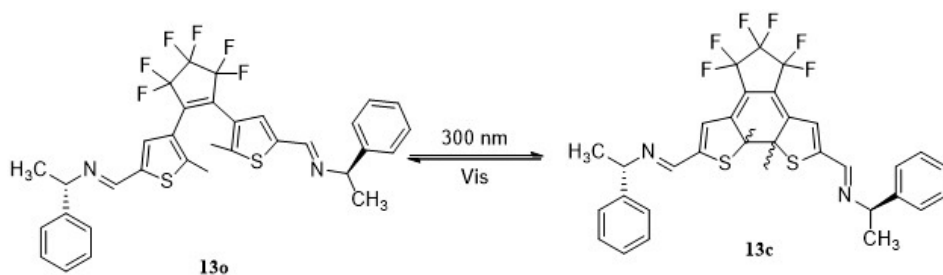


Schemat 12. Pierwszy motor molekularny kierowany światłem
Figure 12. The first light-driven molecular motor

Wiele z obecnie znanych zastosowań motorów molekularnych, takich jak na przykład wic molekularna, będąca analogiem wici bakteryjnej czy też nanosamochody, również wykorzystujące silniki molekularne traktuje się obecnie bardziej jako ciekawostkę naukową. Jednak w 2006 roku Feringa opublikował artykuł w *Nature* [12], którym przedstawił motor molekularny zdolny do wykonania pracy i wywołania efektu makroskopowego. Chiralny motor umieszczony w ciekłym kryształach po jego naświetleniu spowodował wewnętrzną reorganizację struktury kryształu i odwracalną zmianę barwy. Dokonane do tej pory na tym polu odkrycia sprawiają, że naukowcy bacznie się przyglądają tej grupie maszyn molekularnych, gdyż być może umożliwią one kiedyś konstrukcję układów działających poza stanem równowagi termodynamicznej co jest obecnie wielkim wyzwaniem dla nauki.

Badania nad chiralnymi przełącznikami molekularnymi mogą zostać wykorzystane do badań nad fotochromowymi właściwościami wcześniej wspomnianych ditienyloetenów. Cyklizacja pod wpływem światła UV prowadzi do utworzenia dwóch centrów stereogenicznych w cząsteczce badanego ditienyloetenu. Powstałe centra stereogeniczne w wyniku konrotacyjnego mechanizmu zamykania pierście-

nia mogą posiadać konfigurację (*S,S*) lub (*R,R*). Ich rozdział na chiralnej kolumnie chromatograficznej jest bardzo wydajny, jednak w jego wyniku dochodzi do otwarcia pierścienia i utraty centrów stereogenicznych. Jak pokazały badania grup Irie i Lehna bardzo dobre wyniki w tym temacie daje wprowadzenie do cząsteczki dityenyoletenu pomocnika chiralnego. W takiej sytuacji zarówno forma **13o** jak i **13c** są chiralne i proces cyklizacji prowadzi do powstania diastereoizomerów (Schemat 13) [1].



Schemat 13. Chiralny przełącznik oparty na bis-iminie dityenyoletenu **13**

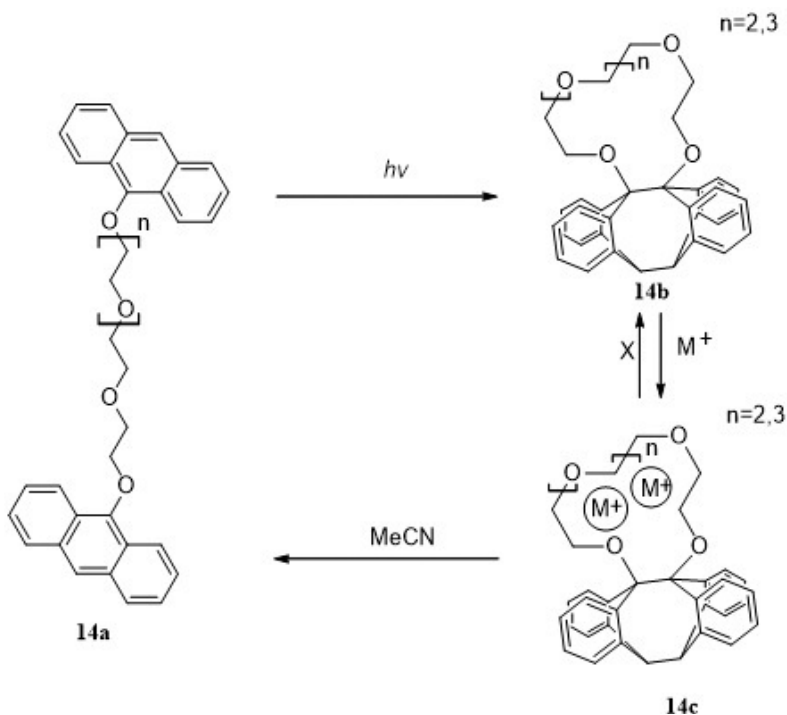
Figure 13. Chiral switch based on dithienylethene bis-imine **13**

Przedstawiony na schemacie wyżej przełącznik posiada w swojej strukturze dwie reszty (*S*)- α -fenyloetyloaminy. Pomiar widm CD pokazały znaczące różnice w ilości pasm i ich położeniu pomiędzy formą cykliczną i otwartą.

Fotochromowe przełączniki molekularne oparte na dityenyoletenach znajdują w ostatnim czasie co raz więcej ciekawych zastosowań. Niemal każdego tygodnia pojawiają się kolejne publikacje naukowe przedstawiające nowe odkrycia związane z tą grupą związków. W ostatnim czasie odkryto, że dityenyoleteny mogą być wykorzystane przy badaniu procesu apoptozy komórek. Jak zauważono, komórka zawierająca dityenyoleten w formie pierścieniowej uruchamia kaskadę kaptaz prowadzącą do apoptozy komórki. Tymczasem dityenyoleten w formie otwartej nie powoduje tego efektu [13]. Przełączniki innych typów, np. oparte na azobenzeniu mogą być wykorzystane jako molekularne układy słoneczno-ciepne, które są zdolne do przechowywania energii cieplnej pochodzącej ze Słońca. Przechodzenie między formami *E/Z* azobenzenu prowadzi do gromadzenia lub uwalniania energii cieplnej [14]. Również możliwe jest zastosowanie przełączników do wprowadzania leków do zakażonych komórek. Odbywa się to poprzez wbudowanie cząsteczki w kanał błonowy. Molekuła pod wpływem światła lub zmiany pH powoduje otwarcie kanału w docelowej komórce i umożliwia wprowadzenie do jej wnętrza leku [11]. To tylko kilka z wielu odkryć dokonanych na tym polu w ostatnim czasie. Grupa fotochromowych przełączników molekularnych ciągle się rozwija i w przyszłości może znaleźć jeszcze więcej zastosowań.

2. PRZEŁĄCZNIKI MOLEKULARNE TYPU GOSPODARZ-GOŚĆ

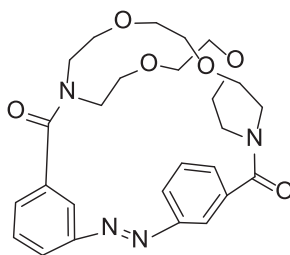
W przełącznikach molekularnych typu gospodarz-gość poszczególne stany cząsteczki różnią się swoim powinowactwem do drugiej molekuly, pełniącej funkcję gościa. Pierwsze przykłady tego typu przełączników były oparte na eterach koronowych. W 1978 roku pojawił się pierwszy przełączalny gospodarz, który po naświetleniu światłem o odpowiedniej długości fali ulegał cyklizacji do eteru koronowego. Zawierał on w swojej strukturze pierścienie antracenu, które pod wpływem światła ulegały dimeryzacji. Tak powstały eter koronowy jest zdolny do przyjęcia dwóch kationów metali alkalicznych. Co ciekawe, w tym przypadku relacja gospodarz-gość nie ulega rozpadowi nawet pod wpływem światła widzialnego. Dopiero wykorzystanie silniej kompleksujących czynników umożliwia „uwolnienie” gościa i jednocześnie rozerwanie struktury gospodarza (Schemat 14) [15].



Schemat 14. Pierwszy przełącznik molekularny typu gospodarz-gość
Figure 14. The first host-guest molecular switch

W 1980 roku Shinkai przedstawił przełącznik 15, w którym fragmenty antracenu zostały zastąpione przez układ azobenzenu (Schemat 15). W tym przypadku oddziaływanie cząsteczki ze światłem wywołuje zmianę izomerizacji *Z/E* ugrupowania azowego co powoduje zwiększenie pierścienia makrocyklicznego. Kiedy grupa azowa przyjmuje konfigurację *E* wówczas

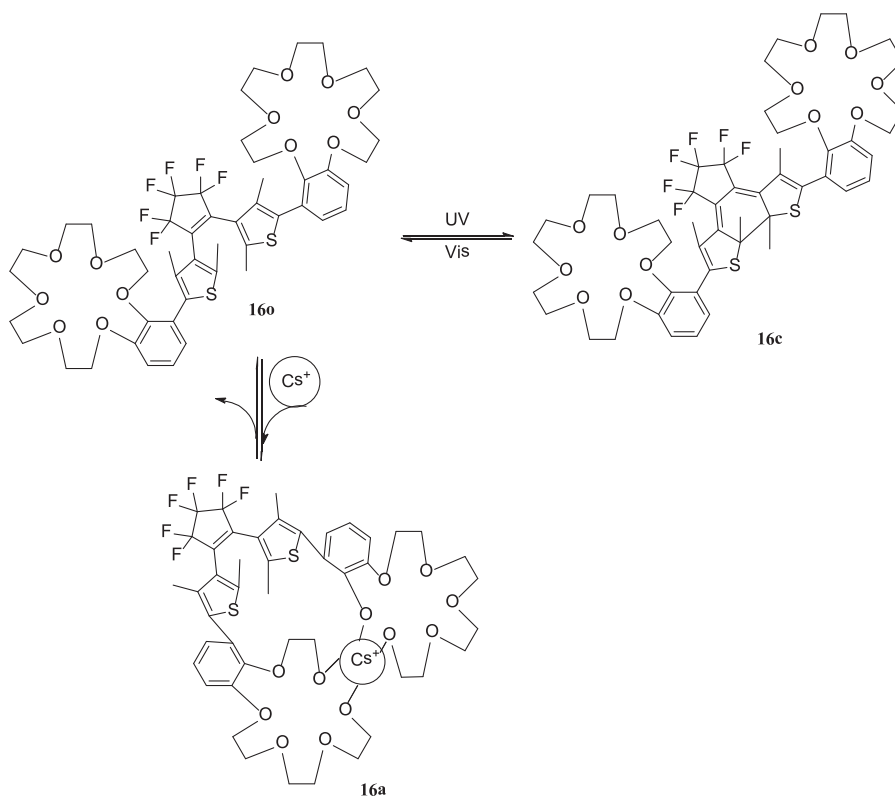
eter koronowy preferencyjnie wiąże się z jonami amonowym, litowym i sodowym, natomiast w konfiguracji Z łączy się z jonami potasowym i rubidowym. Bez dostępu światła dochodzi do odwrócenia izomeryzacji [16].



15

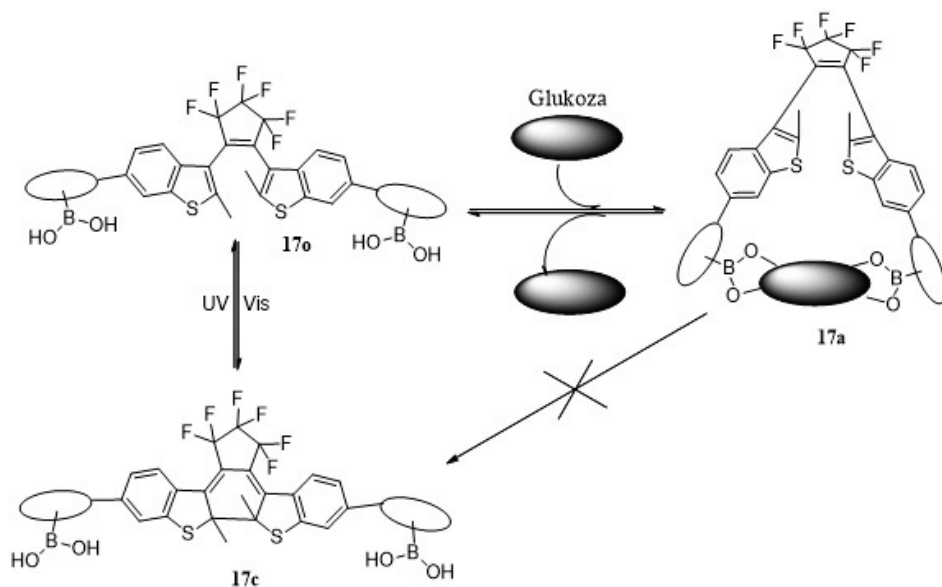
Schemat 15. Struktura przełącznika molekularnego typu gospodarz–gość opartego na azobenzenie
Figure 15. The structure of host-guest molecular switch based on azobenzene

Również ditenyloeteny mogą po odpowiedniej modyfikacji zostać wykorzystane jako przełączniki typu gospodarz–gość (Schemat 16).



Schemat 16. Działanie przełącznika molekularnego typu gospodarz–gość opartego na ditenyloetenie
Figure 16. The way of working of host-guest molecular switch based on dithienylethene

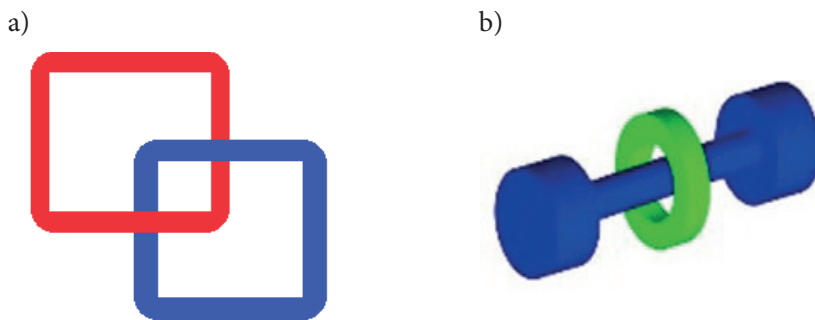
W formie „otwartej”, w której ugrupowania eteru koronowego znajdują w konformacji równoległej względem siebie, związek przedstawiony na schemacie wyżej może związać się z dużym jonem metalu, np. z cezem, podczas gdy w formie cyklicznej równoległe ustawienie pierścieni nie jest możliwe i nie może dojść do wiązania z jonem metalu. Nie tylko jony metali mogą być wykorzystywane w przełącznikach typu gospodarz–gość. Również cząsteczki glukozy są stosowane jako „goście” w tego typu przełącznikach. Wykorzystuje się do tego przełączniki molekularne posiadające w swojej strukturze kwas boranowy. Sacharydy posiadają wiele grup hydroksylowych dzięki czemu mogą one utworzyć wiązanie estrowe z kwasem boranowym, jednak tak jak wcześniej jest to możliwe tylko kiedy ditienyloeten znajduje się w formie otwartopierścieniowej (Schemat 17) [1].



Schemat 17. Działanie przełącznika molekularnego typu gospodarz–gość wiążącego sacharydy
 Schemat 17. Mechanism of host–guest molecular switch binding saccharides

3. PRZEŁĄCZNIKI MOLEKULARNE OPARTE NA KATENANACH I ROTAKSANACH

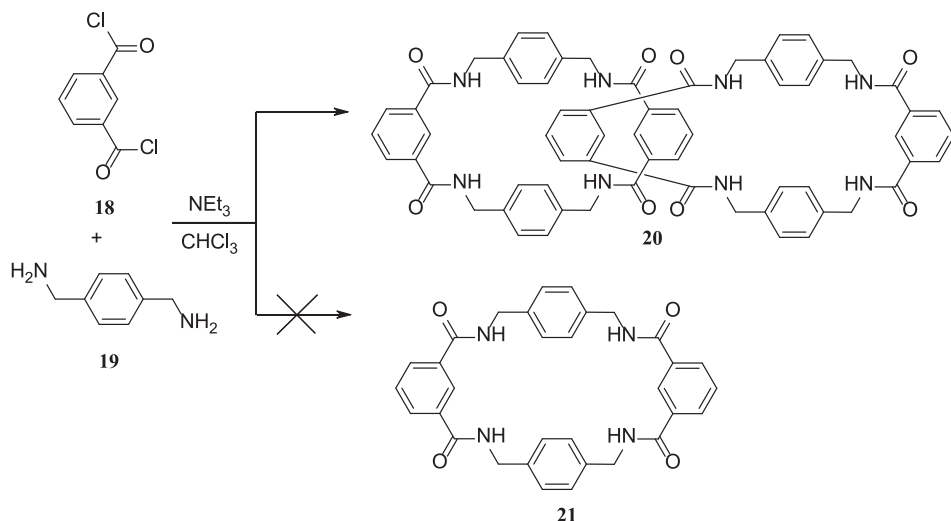
Katenany i rotaksany to cząsteczki złożone z dwóch lub więcej wzajemnie w siebie wbudowanych składników. W obu przypadkach składniki te są łączone razem przez mechaniczne wiązania, dodatkowo wzmocnione przez niekowalencyjne oddziaływania wiążące. Można je więc uznać za topologiczne izomery pierścieniowych komponentów, z których są zbudowane (Schemat 18).



Schemat 18. Schematycznie przedstawiony układ przełączników molekularnych opartych na: a) katenanach; b) rotaksanach [17]

Figure 18. Schematically illustrated system of mechanically-interlocked molecular switches based on: a) catenanes; b) rotaxanes [17]

Pierwsze próby syntezy związków tej klasy były dyskutowane już na początku XX wieku, jednak pierwsze katenany i pierwsze rotaksany udało się otrzymać dopiero w latach 60. ubiegłego wieku. Początkowo metody ich syntezy cechowały się niskimi wydajnościami i skomplikowanymi procedurami, ale wraz z postępem chemii supramolekularnej udało się opracować o wiele lepsze metody, w których wychodząc z tanich i łatwo dostępnych materiałów można otrzymać produkty z wysoką wydajnością. Katenany obecnie otrzymuje się wykorzystując tzw. strategię statystyczną syntezy. Wykorzystuje ona prawdopodobieństwo (bardzo niewielkie) zajścia reakcji makrocyklizacji, podczas przenikania prekursora liniowego przez drugi składnik makrocykliczny. Jednak takie syntezy cechują się bardzo niską wydajnością ze względu na niskie prawdopodobieństwo zajścia reakcji utworzenia katenanu względem prawdopodobieństwa utworzenia produktu cyklizacji lub polimeru. Jednak jeżeli przeprowadzi się reakcję kondensacji chlorku izoftaloilu **18** i *p*-ksylilenodiaminy **19** produktem, otrzymywanym z wydajnością 20% jest [2] katenan **20** (liczba w nawiasie kwadratowym oznacza liczbę splecionych ze sobą pierścieni), nie zaś produkt jednopierścieniowy **21** (Schemat 19). Jest to związane ze stabilizacją struktury za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy utworzonymi w reakcji fragmentami 1,3-diamidowymi i grupami karbonyłowymi chlorku kwasowego [18].

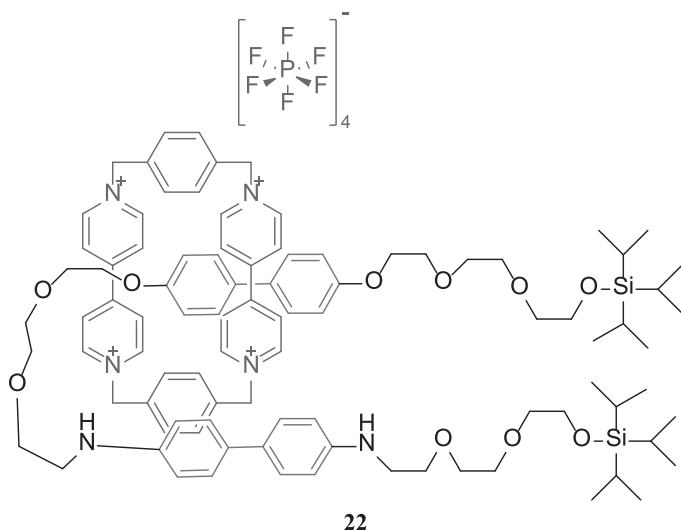


Schemat 19. Metoda syntezy [2] katenanu 20

Figure 19. Method of synthesis of [2]catenane 20

Katenany są to związki chemiczne składające się z co najmniej dwóch niezwiązanych ze sobą wiązaniami chemicznymi indywiduów chemicznych o strukturze makrocyklicznej. Obydwa pierścienie mogą względem siebie rotować, co jest podstawą dla ich zastosowania w roli przełączników molekularnych. Struktura rotaksanów jest podobna do katenanów z tą różnicą, że składają się one z pierścienia makrocyklicznego, który oplata drugą cząsteczkę posiadającą strukturę liniową. Element liniowy posiada na swoich końcach rozbudowaną przestrzennie grupę funkcyjną, uniemożliwiającą pierścieniowi ucieczkę poza oś rotaksanu. W tym wypadku również część makrocykliczna może swobodnie poruszać się wzdłuż osi dzięki czemu rotaksany mogą zostać wykorzystane przy konstrukcji przełączników i maszyn molekularnych [1].

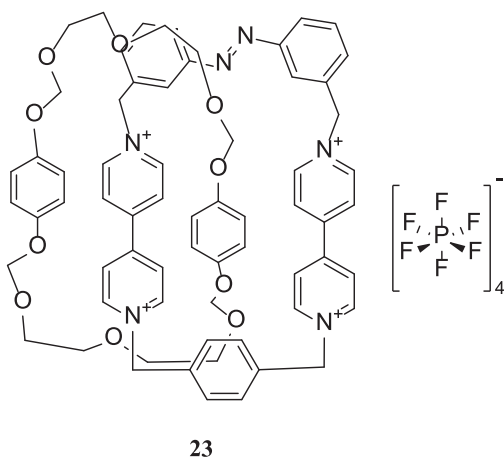
Przełączniki molekularne oparte na katenanach i rotaksanach są najmłodszym, odkrytym dopiero w latach 90. ubiegłego wieku, typem przełączników. Pierwszy tego typu przełącznik 22 został przedstawiony przez Stoddarta w 1991 roku i był oparty na rotaksanie. Cząsteczka liniowa, zawierająca grupy bifenylowe pełniła w nim rolę swego rodzaju „suwnicy”. Na zakończeniach osi znajdowały się punkty, między którymi mógł oscylować makrocykliczny, zawierający ugrupowania para-kwatowe fragment układu (Schemat 20) [19].



Schemat 20. Przełącznik molekularny oparty na rotaksanie Stoddarta

Figure 20. Molecular switch based on Stoddart rotaxane

Z opisu tego przełącznika wynika, że mechanizm działania tego typu układów opiera się na możliwości swobodnego przemieszczenia się względem siebie. W zależności od wzajemnego ułożenia obu części związku mogą one znajdować się w jednym z dwóch stanów, co jest wykorzystywane tak samo jak formy cykliczne i otwartopierścieniowe w ditietyloetenach. Pierwszy działający przełącznik molekularny oparty na katenanie pojawił się w 1993 roku i został opracowany przez Fritza Vögtle (Schemat 21).



Schemat 21. Przełącznik molekularny oparty na katenanie Vögtle

Figure 21. Molecular switch based on Vögtle catenane

Mechanizm działania tego przełącznika opiera się na obecności w jego strukturze azobenzenu, który pod wpływem światła może zmienić konfigurację wiązania podwójnego. Dodatkowo w tym samym pierścieniu znajdują się ugrupowania parakwatowe, które pełnią funkcję stacji dokującej. Drugi pierścień makrocycliczny składa się układu eteru koronowego z grupami fenyłowymi, które wykazują powinowactwo do parakwatów. Kiedy wiązanie podwójne w azobenzenu posiada konfigurację *E*, wtedy cykliczny układ polieteru może swobodnie rotować względem pierwszego pierścienia. Kiedy natomiast dojdzie do naświetlenia całego układu dochodzi do zmiany konfiguracji wiązania podwójnego na *Z* i wszelkie rotacje zostają zablokowane [20].

Od tamtej pory ta grupa przełączników molekularnych przeżyła prawdziwy rozkwit. Katenany i rotaksany znalazły bardzo szerokie zastosowanie także w innych maszynach molekularnych. Są one obecnie wykorzystywane przede wszystkim przy zapisie informacji w bramkach logicznych. W 2007 roku przeprowadzono eksperyment mający na celu zbadanie możliwości ich wykorzystania jako pamięci dynamicznej DRAM, w którym zastosowano rotaksan zawierający w swojej strukturze jednostki tetratriafulwalenowe oraz dioksynaftyłowe, które ulegają wzajemnemu przesunięciu, kiedy przez układ przepływał prąd prowadzący do utlenienia fulwalenu. Cała konstrukcja urządzenia pozwala na przechowanie 160 tys. bitów na powierzchni o wielkości komórki leukocyta [21].

UWAGI KOŃCOWE

W pracy przedstawiono jedynie najważniejsze przykłady bardzo szerokiej i rozbudowanej grupy związków jakimi są przełączniki molekularne. Obecnie co raz większą uwagę poświęca się polimerom fotochromowym, które w tej pracy nie zostały opisane. Można tutaj wymienić takie ich przykłady jak chiralne fotochromowe peptydy oraz ciekłe kryształy o właściwościach fotochromowych [1]. Już teraz przełączniki molekularne posiadają wiele zastosowań w technologii i nauce, a wraz z rozwojem tej grupy związków ich rola będzie stale wzrastać.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Profesorowi Jackowi Młynarskiemu za umożliwienie realizacji badań w Jego Zespole, a także za ciągłą motywację do cięższej pracy.

Dziękuję Doktorowi Jarosławowi Wilamowskiemu za cierpliwość oraz za wszystkie rady i pomoc w trakcie realizowanych badań.

Doktorowi Inżynierowi Sebastianowi Basiowi dziękuję za opiekę, nie tylko w przeciągu ostatniego roku, ale także całej naszej współpracy oraz za pomoc merytoryczną, na którą mogłem liczyć w każdej chwili.

Dziękuję również całemu Zespołowi Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej za całą serdeczność i wsparcie okazane w trakcie pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B.L. Feringa, *Molecular Switches*, WileyVCH, 2001.
- [2] L. Lucas, J. van Esch, *Tetrahedron Letters*, 1999, **40**, 1775.
- [3] D. Pinkowicz, M. Ren, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 12502.
- [4] A. Myles, N. Branda, *Macromolecules*, 2003, **36**, 298.
- [5] E. Ortył, Praca doktorska: *Zjawiska fotochromowe w wybranych polimerach*, Wrocław 2005.
- [6] S. Gilat, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, 1995, **1**, 275.
- [7] S. Polyakova, V. Belov, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 3301.
- [8] T.R. Kelly, H. De Silva, *Nature*, 1999, **401**, 150.
- [9] N. Koumura, R.W.J. Zijlstra, B.L. Feringa, *Nature*, 1999, **401**, 152.
- [10] M.K. J. Ter Wiel, N. Koumura, B.L. Feringa, *Chirality*, 2000, **12**, 734.
- [11] http://www.benferinga.com/research_sub1.php#motors.
- [12] R. Wesley, B.L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.*, 2006, **1**, 25.
- [13] J. Okuda, Y. Tanaka, K. Sumaru, *Chem. Commun.*, 2015.
- [14] A. Lennartson, A. Roffey, *Tetrahedron Letters*, 2015, **56**, 1457.
- [15] S. Desvergne, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 403.
- [16] S. Shinkai, T. Nakaji, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5860.
- [17] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cd/Rotaxane_cartoon.jpg.
- [18] J. Gawroński, K. Gawrońska, *Współczesna synteza organiczna: Wybór eksperymentów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012, rozdział 8.5.
- [19] J.F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5131.
- [20] https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_switch#cite_note-12.
- [21] J.E. Green, A. Boukai, E. Delonno, *Nature*, 2007, **445**, 414.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lipca 2015

**HORYZONTY NAUKI 2015
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 28 MAJA 2015**

**CHARAKTERYSTYKA ZAŻYCIOWYCH
I POŚMIERTNYCH PRZEMIAN KARBAMAZEPINY
ORAZ WYBRANYCH RODZAJÓW
ALTERNATYWNEGO MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO
NA POTRZEBY ANALIZ
TOKSYKOLOGICZNO-SĄDOWYCH**

**CHARACTERISTICS OF PERIMORTEM
AND POSTMORTEM TRANSFORMATIONS OF
CARBAMAZEPINE AND SELECTED ALTERNATIVE
BIOLOGICAL MATRICES FOR THE PURPOSE OF
FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSES**

Sofia Lendor

*Pracownia Chemii Sądowej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: sofia.lendor@gmail.com*

Abstract

Wprowadzenie

1. Karbamazepina: obszar zastosowań, dawki terapeutyczne i toksyczność
 - 1.1. Zażyciowe przemiany karbamazepiny w organizmie
 - 1.2. Metabolizm pośmiertny
2. Wybrane rodzaje materiałów biologicznych i ich pośmiertne przemiany
 - 2.1. Kości
 - 2.2. Maż gnilna
 - 2.3. Szpik kostny

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Sofia Lendor podjęła studia na kierunku chemia na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2010 roku. W 2013 rozpoczęła studia magisterskie o specjalności Chemia sądowa i konserwatorska. Obecnie przygotowuje się do obrony pracy magisterskiej na temat „Determination of psychoactive substances in human bone marrow by HPLC-MS and CE-MS”, do której badania prowadziła w Pracowni Chemii Sądowej. Jej zainteresowania naukowe obejmują między innymi analizę toksykologiczną substancji wykazujących właściwości psychoaktywne i środków odurzających w ludzkim materiale biologicznym, w szczególności

w sekcyjnych biologicznych materiałach alternatywnych.

ABSTRACT

This article is focused on the data concerning properties of carbamazepine, an antiepileptic drug commonly used in everyday medical practice but also frequently misused leading to many reported cases of intoxication. Due to high prevalence of this drug detailed data concerning its pharmacokinetics and pharmacodynamics can be found as well as metabolic paths that have been proven or have not been confirmed yet. For the purpose of toxicological analyses of samples collected postmortem it is also essential to know the possible transformations of an analyte due to microbial metabolism and postmortem changes of the sample matrix. In forensic cases of unavailable or unusable blood samples when advanced stage of decomposition processes in the found body occurs, alternative matrices are required. Presented review describes three types of such matrices: bones, bone marrow and grease in the context of their postmortem changes and suitability as the source of toxicological information.

Keywords: carbamazepine, postmortem metabolism, alternative biological matrices, bone marrow, bones

Słowa kluczowe: karbamazepina, metabolizm pośmiertny, alternatywne materiały biologiczne, szpik kostny, kości

WPROWADZENIE

Szerokie zastosowanie danego leku w praktyce lekarskiej wielokrotnie wiąże się z jego dużą dostępnością, a to z kolei może pociągać za sobą częste występowanie zatruć. Sytuacja taka ma miejsce w szczególności w przypadku leków oddziałujących na ośrodkowy układ nerwowy. Karbamazepina jest lekiem przeciwpadaczkowym, który odpowiada powyższemu opisowi, w związku z czym bardzo często stanowi substancję podlegającą oznaczeniom dla potrzeb toksykologii klinicznej i sądowej. Mnogość zanotowanych przypadków zatruć karbamazepiną stwarza możliwość dokładnego scharakteryzowania farmakokinetyki tego leku, a także procesów metabolicznych jakim podlega zarówno w organizmach żywych jak i pośmiertnie. Fakt dokładnego zbadania szlaków biotransformacji karbamazepiny powoduje z kolei konieczność poszukiwania efektywnych metod izolacji i oznaczania tego leku obok jego wielu metabolitów, wśród których występują także substancje aktywne farmakologicznie. Dodatkowe źródło informacji do badań mogą stanowić alternatywne materiały biologiczne, w szczególności w przypadkach zaawansowanego rozkładu gnilnego ciała. Analiza tych materiałów wymaga specjalnego podejścia i może przyczynić się zarówno do korzystnego poszerzenia wiedzy na temat badanego przypadku, jak i spowodowania trudności interpretacyjnych wynikających ze słabego poznania niektórych rodzajów materiału biologicznego, a także mnogości czynników wpływających na jego pośmiertne przemiany.

Niniejsza praca zawiera charakterystykę karbamazepiny wraz z przeglądem przypadków zatruć tym lekiem, a także jego przemian zachodzących za życia i po śmierci. Ponadto, scharakteryzowano trzy rodzaje alternatywnego materiału biologicznego: kości, szpik kostny i maź gnilną w kontekście pośmiertnych przemian tych materiałów.

1. KARBAMAZEPINA: OBSZAR ZASTOSOWAŃ, DAWKI TERAPEUTYCZNE I TOKSYCZNOŚĆ

Leki przeciwpadaczkowe są powszechnie stosowane w celu przeciwdziałania napadom padaczkowym poprzez hamowanie samorzutnej depolaryzacji błony komórkowej neuronów, powodującej wywołanie potencjału czynnościowego, prowadzącego do wystąpienia napadu drgawek epileptycznych. Farmakoterapia z zastosowaniem leków przeciwpadaczkowych jest zazwyczaj długotrwała, a jej powodzenie zależy od prawidłowego określenia postaci choroby oraz właściwie dobranej dawki leku bądź leków oraz ich wzajemnych interakcji w przypadku terapii wielolekowej [1].

Karbamazepina (CBZ) jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwpadaczkowych, należącym do grupy pochodnych dibenzoazepiny. Preparaty farmaceutyczne dostępne na rynku to m.in. *Tegretol*, *Amizepin*, *Conzepin*, *Timonil*,

Finlepsin, *Neurotop* i in. Dominującą drogą podawania jest doustne przyjmowanie tabletek lub syropów [2].

W terapii przeciwpadaczkowej karbamazepina stosowana jest przede wszystkim jako środek zapobiegający i łagodzący napady kloniczno-toniczne, a także napady częściowe z objawami prostymi i złożonymi. Nie jest to jednak wyłączone zastosowanie tego leku. Ze względu na działanie psychotropowe karbamazepiny, stosuje się ją w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej, zespołów maniakalnych i schizofrenii [2]. Występowanie podobieństw strukturalnych karbamazepiny i związków chemicznych z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych spowodowało powstanie przesłanek do przypuszczeń, że karbamazepina może wykazywać działanie przeciwdepresyjne. Badania potwierdziły w większym stopniu jej skuteczność w profilaktyce przeciwdepresyjnej niż w leczeniu ostrych zaburzeń depresyjnych [3].

Dawkowanie karbamazepiny zależy jest od czynników takich jak wiek pacjenta, typ leczonej choroby, a także wystąpienie poprawy klinicznej lub jej brak. Z tego też powodu zakres stosowanych dawek jest szeroki i wynosi od 200 do 1600 mg na dobę, natomiast średnia dobową dawką wynosi od 400 do 600 mg. Zaleca się, aby dawka terapeutyczna w każdym przypadku została dobrana na podstawie wyników monitorowania stężenia leku w surowicy [2]. Stężenie terapeutyczne karbamazepiny w surowicy wynosi zazwyczaj od 4 do 12 mg/L [4]. W Tabeli 1 zestawiono przykłady wyników badań nad korelacją między przyjętą dawką karbamazepiny, a jej stężeniem w surowicy, które odpowiada osiągnięciu stanu stacjonarnego leku w organizmie.

Tabela 1. Zależność między dawką a stężeniem karbamazepiny w osoczu
Table 1. Relationship between plasma concentration and dosage of carbamazepine

| Liczba pacjentów | Zakres dawek | Zakres stężeń w surowicy [mg/L] | Średnie stężenie w surowicy [mg/L] | Lit. |
|------------------|---|---------------------------------------|--|------|
| 248 | 2,86–37,5 [mg/kg/dzień] | 0,6–19,6 | 5,3 | [5] |
| 24 | 8–30 [mg/kg/dzień] | 3–13 | 8 | [6] |
| 22 | 300–800 (tabletki) 375–1000 (czopki) [mg/dzień] | 4,8–7,8 4,5–7,4 | 6,3 5,9 | [7] |
| 21 | 300–1200 [mg/dzień] | 4,5–14,1 | 9,3 | [8] |

Szerokie rozpowszechnienie karbamazepiny w lecznictwie wynika z relatywnie niewielkiej toksyczności tego leku, która spowodowała uznanie go za lek stosunkowo bezpieczny. Do częstej stosowalności tej substancji przyczynił się również brak potencjału uzależniającego, należy jednak wspomnieć o występowaniu zjawiska tolerancji wśród osób, u których konieczne jest ciągle zażywanie leku. Duża

dostępność karbamazepiny w połączeniu z niskim indeksem terapeutycznym są przyczynami występowania częstych zatruc tą substancją, jednak śmierć w wyniku zatrucia występuje rzadko [9].

W zależności od źródła, minimalna dawka karbamazepiny niebezpieczna dla życia szacowana jest od 5 g [4] do powyżej 6 g [10]. Ze względu na fakt, iż w niektórych przypadkach (zwłaszcza śmiertelnych) utrudnione jest przeprowadzenie wywiadu mającego na celu ustalenie dawki przyjętej przez ofiarę zatrucia, korzystniejsze jest posługiwanie się stężeniami karbamazepiny w surowicy. Przy stężeniu między 2,4 a 10,5 mg/L u badanych osób zarejestrowano wystąpienie efektów toksycznych, natomiast symptomy ostrego zatrucia obserwowano u osób, u których stężenie karbamazepiny w surowicy wykazywało wartości od 3,2 do 21 mg/L [4]. Obydwa przedziały stężeń częściowo się nakładają, ponieważ wystąpienie objawów zatrucia uzależnione jest od wielu czynników, m.in., drogi podania leku, czasu od jego zażycia czy osobniczego tempa metabolizmu. Może także dojść do opóźnienia wystąpienia objawów zatrucia spowodowanego zażyciem leku w postaci wolno uwalniającej się. Inną możliwością jest utrzymywanie się objawów mimo spadku stężenia karbamazepiny w organizmie, spowodowane farmakologiczną aktywnością jej głównego metabolitu, 10,11-epoksydu karbamazepiny [9].

W wielu przypadkach zatruc ze skutkiem śmiertelnym, karbamazepina jest zaledwie jednym z ksenobiotyków obecnych w materiale sekcyjnym. Ze względu na dosyć częste zażywanie karbamazepiny w celach samobójczych, w badanym materiale wykryć można także leki uspokajające i przeciwdepresyjne, narkotyki i alkohol etylowy. Przykładem może być 20 przypadków śmiertelnych zatruc związanych z karbamazepiną, przebadanych w Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1996–2001. Stężenia CBZ w materiale sekcyjnym wynosiły od 1,5 do 78,6 mg/L, jednak w 8 przypadkach karbamazepina nie była jedynym lekiem wykrytym w badany materiale [9]. Innym przykładem są oznaczenia CBZ i metabolitów: 10,11-epoksydu karbamazepiny oraz 10,11-dihydroksykarmamazepiny w materiale sekcyjnym, przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Sądowej Collegium Medicum w Krakowie. Materiał do badań pobrano od 16 osób, wśród których znajdowały się ofiary zatruc śmiertelnych ale także m. in. samobójstw, wypadków lub zabójstwa. W czterech przypadkach nastąpienie zgonu przypisano wysokiemu stężeniu CBZ w organizmie. W innych przypadkach zanotowano obecność CBZ na poziomach stężeń od terapeutycznych do śmiertelnych, a ponadto wysokie stężenia innych ksenobiotyków, m.in. etanolu, morfiny i benzodiazepin. Wyniki te wskazały na istotność uwzględnienia interakcji między ksenobiotykami w interpretacji przyczyn śmierci związanych z zatruciami [33].

W Tabeli zestawiono dane na temat opisywanych w literaturze przypadków, w których wystąpienie objawów ostrego zatrucia bądź śmierci uznano za spowodowane przedawkowaniem karbamazepiny.

Tabela 2. Przypadki zatruc karbamazepiną
Table 2. Reported cases of carbamazepine intoxications

| Wiek i płeć pacjenta | Przyjęta dawka CBZ | Stężenie CBZ [mg/L] | Czas od przyjęcia lub zabiegów* | Materiał biologiczny | Inne obecne ksenobiotyki | Najpoważniejsze skutki zatrucia | Lit. |
|----------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------------|--|------|
| 48 lat, M | brak danych | > 20,0 | > 24 h | surowica | brak | niewydolność wielonarządowa, śpiączka | [12] |
| 24 lata, K | 56 g | 36,9 | 6 h | surowica | oksaprozyna | ostra niewydolność nerek, tachykardia zatokowa | [13] |
| 43 lata, M | 400 mg/4 razy/dzień | 16,1 | - | surowica | brak | utrata słuchu | [14] |
| 11 lat, M | 2,6 g | brak danych | - | surowica | brak | śpiączka, delirium | [15] |
| 19 lat, K | 8,0 g | 57,7 | - | surowica | brak | depresja OUN | [16] |
| 48 lat, M | 60-80 g | 25,6 | płukanie żołądka, C | surowica | brak | niewydolność oddechowa | [17] |
| 32 lata, K | 32 g | 32,9 | 2,5 h C | surowica | paracetamol 45 mg/L | drgawki, hipoksja, hipotensja | [18] |
| 38 lat, K | 8,0 g | > 400,0 | - | surowica | brak | śpiączka | [19] |
| 31 lat, K | 60 g | 46,3 | 4 dni, C, nawadnianie jelit | surowica | diazepam, nitrazepam, etanol | śpiączka, napady drgawkowe | [20] |
| 23 miesiące | 500 mg/dzień | 22,0 34,8 78,5 | oznaczono po śmierci | krew, mózg, wątroba | fenytoina | śmierć | [21] |
| 14 lat, M | 6,0 g | 22,5 | 12 h płukanie żołądka, C | krew | brak | utrata świadomości, brak reakcji na bodźce dźwiękowe | [22] |
| 13 lat, K | 4,8 g | 34,0 | 9 h płukanie żołądka, C | krew | brak | utrata świadomości | [22] |
| 13 lat, K | 5,6 g | 20,0 | - | krew | brak | utrata świadomości, napady toniczno-kloniczne | [22] |
| 2 lata, M | 10 mg/kg 6 miesięcy | 6,0 | - | surowica | brak | erytroblastopenia | [23] |
| 15 lat, K | 4,6 g | 44,8 | 6 h | surowica | brak | utrata przytomności | [26] |

* „czas od przyjęcia lub zabiegów” to dane określające przybliżony czas, jaki upłynął od przyjęcia CBZ do wykonania oznaczenia leku lub zabiegów jakie przeprowadzono w celu przyspieszenia eliminacji CBZ przez oznaczeniem (C = węgiel aktywny)

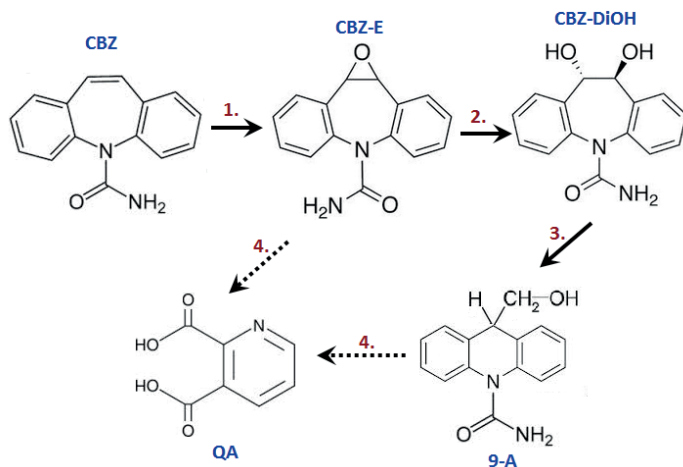
Sposoby leczenia zatruc karbamazepiną mogą różnić się w zależności od występujących objawów, jednak na ogół stosuje się usuwanie leku z żołądka za pomocą jego płukania lub podawania węgla aktywnego w krótkim czasie po rozpoznaniu zatrucia, a także wspomaganie czynności życiowych, których efektywność została zaburzona na skutek zatrucia. W przypadkach bardzo ostrych zatruc, gdy intensywne terapia podtrzymująca nie przynosi efektów, stosuje się pozaustrojową eliminację karbamazepiny technikami hemoperfuzji lub hemodializy [10].

1.1. ZAŻYCIOWE PRZEMIANY KARBAMAZEPINY W ORGANIZMIE

Przemiany karbamazepiny w organizmie żywym są dość dobrze zbadane. W literaturze można znaleźć informacje na temat głównych metabolitów oraz procesów odpowiedzialnych za ich powstawanie, a także enzymów biorących udział w tych procesach. Badania nad metabolizmem karbamazepiny są jednak nadal prowadzone, a ich potrzeba wynika z faktu, iż co jakiś czas notowane są budzące zainteresowanie lub nieznane dotychczas efekty toksyczne u pacjentów poddanych terapii farmakologicznej z zastosowaniem karbamazepiny [25]. Ważną rolę w procesach metabolicznych tej substancji przypisuje się także złożonym interakcjom lekowym, które mogą być skutkiem poddawania pacjenta terapii wielolekowej. Konsekwencją tych interakcji są często obserwowane toksyczne efekty interferencyjne, które mogą prowadzić do obniżenia lub podwyższenia stężenia leku w surowicy. W połączeniu z farmakologicznymi efektami wywoływanymi przez aktywne metabolity karbamazepiny, zjawiska takie przyczyniają się do dużego zróżnicowania procesów biotransformacji leku, a w konsekwencji do trudności w interpretacji wyników analiz sądowo-lekarskich [11].

Biodostępność karbamazepiny po podaniu doustnym wynosi powyżej 70% [4]. Od 75% do 80% związku ulega wiązaniu z białkami osocza, z których większość stanowią albuminy [10]. 72% przyjętej dawki wydalane jest wraz z moczem [2], z czego mniej niż 10% [4], a zwykle około 2% [10] stanowi niezmienną metabolicznie karbamazepina. Większość pozostałej części wydalana jest z kałem, jednak należy wspomnieć, że karbamazepina przenika także do mleka matki [10] oraz do śliny ze stosunkiem stężeń osocze:ślina na poziomie 3:5 [4].

Dane literaturowe pozwalają na zobrazowanie wybranych etapów metabolizmu karbamazepiny za pomocą schematu przedstawionego na Rysunku 1. Strzałkami ciągłymi zaznaczono dobrze poznane etapy przemian tego leku, natomiast strzałki przerywane odpowiadają procesom, których dokładne scharakteryzowanie wymaga dalszych badań.



Rysunek 1. Wybrane szlaki metaboliczne karbamazepiny. CBZ = karbamazepina; CBZ-E = 10,11-epoksyd karbamazepiny; CBZ-DiOH = *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroksykarmamazepina; 9-A = hydroksymetylo-10-karbamoiloakrydan; QA = kwas chinolinowy

Figure 1. Selected metabolic pathways of carbamazepine (CBZ = carbamazepine; CBZ-E = carbamazepine-10,11-epoxide; CBZ-DiOH = 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine; 9-A = 9-hydroxymethyl-10-carbamoylacridan; QA = quinolinic acid)

CBZ-E jest najważniejszym metabolitem karbamazepiny, ze względu na jego aktywność farmakologiczną, podobną do aktywności związku macierzystego (również wykazuje działanie przeciwdrgawkowe).[10] Metabolit w 50%-tach wiąże się z białkami osocza, natomiast 2% epoksydu wydalane jest z moczem.[4] W surowicy i mózgu CBZ-E osiąga 50% stężenia karbamazepiny.[1] Wykazano także stabilną korelację między stężeniem CBZ a CBZ-E w osoczu oraz w ślinie, gdzie stosunki stężeń wynosiły odpowiednio 21–22% i 33–34%. Co ważne, korelacja ta była dosyć odporna na niewielkie zmiany dawek, a także wiek i płeć pacjentów [8]. W związku z powyższym, oznaczanie 10,11-epoksydu karbamazepiny może dostarczyć informacji na temat stężeń związku macierzystego w organizmie, co jest szczególnie przydatne w przypadkach, gdy próbki do badań zostały pobrane po dłuższym czasie od zatrucia lub po śmierci.

CBZ-E ulega dalszemu metabolizmowi do *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroksykarmamazepiny (CBZ-Di-OH) w reakcji katalizowanej przez hydrolazę epoksydową (nr 2 na Rys. 1). Około 25% biodostępnej dawki karbamazepiny jest wydalane z moczem w postaci tego właśnie metabolitu [4]. CBZ-DiOH jest związkiem nie wykazującym działania farmakologicznego [3]. Notowane są przypadki, w których na skutek niedoboru hydrolazy epoksydowej, u pacjentów przyjmujących karbamazepinę i inne aromatyczne leki przeciwpadaczkowe, dochodzi do wystąpienia niebezpiecznego dla zdrowia i życia zespołu DRESS (ang. *Drug Reaction with Eosiniphillia and Systemic Symptoms*) [24].

Przemiana CBZ-Di-OH do 9-hydroksymetylo-10-karbamoiloakrydanu karbamazepiny (9-A) odbywa się za sprawą enzymu mieloperoksydazy, obecnej w leuko-

cytach (nr 3 na Rys. 1). Powstający metabolit jest podejrzewany o aktywność biologiczną ze względu na podobieństwo strukturalne do innych aktywnych metabolitów [26]. Aktywność ta została potwierdzona tylko dla syntetycznego 9-A [47]. W alternatywnej ścieżce metabolicznej, 9-A może być produktem przemiany CBZ-E lub bezpośrednio CBZ.

Dwie alternatywne przemiany metaboliczne oznaczone numerem 4 na Rysunku 1 są przykładami przemian, które dotąd nie zostały dokładnie wyjaśnione. Ze względu na zdolność CBZ do przenikania przez barierę krew-mózg (choć w ograniczonym zakresie), obok metabolizmu przez enzymy wątrobowe, rozważano także możliwość metabolizowania związku macierzystego przez enzymy komórek śródbłonna ośrodkowego układu nerwowego. Ze względu na nieobecność CBZ w komórkach OUN, za prekursor QA uznano CBZ-E, a przemawiały za tym porównywalne wartości szybkości przemian CBZ-E oraz QA. Udział komórek OUN w metabolizmie jest o tyle ważny, że może doprowadzić do niekontrolowanej akumulacji metabolitów, w tym przypadku kwasu chinolinowego, który wykazuje neurotoksyczność i może wywoływać napady drgawek przy stężeniach wykrytych w komórkach mózgu badanych pacjentów (ok. 10 $\mu\text{mol/L}$) [25].

Opisane powyżej przemiany nie wyczerpują zagadnienia metabolizmu karbamazepiny, ponieważ związek ten jest źródłem łącznie około 30 metabolitów [10]. Należą do nich między innymi iminostilben, grupa produktów hydroksylacji pierścienia aromatycznego oraz izomery tych produktów, a także produkty sprzęgania z kwasem glukuronowym [3]. Źródłem zainteresowania w toksykologii klinicznej i sądowej są jednak głównie te metabolity, które wykazują aktywność farmakologiczną lub toksyczne właściwości, a ich stężenia pozwalają na wykonanie oznaczeń i wyciągnięcie wniosków na temat obecności i stężeń związku macierzystego w organizmie.

1.2. METABOLIZM POŚMIERTNY

Jak wiadomo, przemiany ksenobiotyków w organizmach nie ustają w momencie zgonu. Biochemiczne i biologiczne procesy, które zachodzą po śmierci mogą w znacznym stopniu wpływać na wyniki oznaczeń w materiale sekcyjnym, w związku z czym wyniki te niekoniecznie odzwierciedlają stężenia analitów w chwili śmierci [36].

Na wyniki analiz toksykologicznych wykonywanych na próbkach sekcyjnych, a także na wiarygodność tych wyników, mają wpływ między innymi: rodzaj analitu, inne ksenobiotyki obecne w organizmie, czas jaki upłynął od nastąpienia zgonu, przyczynę zgonu oraz losy organizmu bezpośrednio przed nim (np. treść żołądkowa) [27]. Duże znaczenie ma także temperatura i wilgotność otoczenia oraz inne warunki atmosferyczne, przy czym czynniki te inaczej wpływają na przemiany substancji chemicznych w zwłokach niepochowanych i pochowanych. W tym drugim przypadku do czynników wartych uwzględnienia należy także rodzaj pochówku, co

wiąże się z wpływem substancji zawartych w otaczającej ciało glebie [28]. Należy wreszcie wspomnieć o pośmiertnym metabolizmie mikrobiologicznym, przeprowadzonym przez mikroorganizmy obecne w ciele za życia (np. bakterie z przewodu pokarmowego, jamy ustnej czy płuc lub grzyby, których obecność jest skutkiem infekcji), a także inne bakterie i grzyby kolonizujące zwłoki po śmierci [27].

Ze względu na trudności występujące w badaniach, niektóre pośmiertne procesy prowadzące do przemian ksenobiotyków nie zostały dość dobrze poznane. Przykładem może być tzw. agonalna inwazja bakterii, podczas której mikroorganizmy gwałtownie rozprzestrzeniają się po organizmie w chwili bezpośrednio poprzedzającej nadejście zgonu. Proces ten określany jest jako teoretyczny ze względu na trudności w określeniu, czy obecność bakterii nie była spowodowana przedśmiertną infekcją [27]. Do dobrze poznanych zjawisk należy aktywność niektórych enzymów, przejawiająca się jeszcze przez jakiś czas po nastąpieniu zgonu. Skutkiem tej aktywności może być zwiększenie stężenia metabolitów kosztem stężenia ksenobiotyku macierzystego w porównaniu do stosunku stężeń w chwili śmierci. Powiązaniem procesem jest także uwalnianie enzymów podczas autolizy komórek, wskutek czego dochodzi do rozpadu białek wiążących ksenobiotyki i wzrost stężenia niezwiązanych frakcji analitu [27].

Pośmiertna redystrybucja ksenobiotyków (ang. *postmortem redistribution*, PMR) może zachodzić zgodnie z dwoma głównymi mechanizmami. Pierwszym z nich jest dyfuzja przez naczynia krwionośne do otaczających tkanek. Drugi mechanizm obejmuje bezpośrednią dyfuzję ksenobiotyków pomiędzy przylegającymi organami. Obydwa mechanizmy zachodzą w organizmie równolegle, przy czym czas, jaki upłynął od śmierci do wystąpienia danego zjawiska, zależy między innymi od rodzaju ksenobiotyku [36].

Powszechność występowania mikroorganizmów wspomagających tanatochemiczne procesy materiału biologicznego, powoduje pojawienie się pośmiertnych procesów gnilnych, wskutek których może dojść zarówno do biodegradacji ksenobiotyków, jak i ich syntezy. W pośmiertnie pobranych próbkach ludzkiego materiału biologicznego zidentyfikowano wiele gatunków bakterii, spośród których *Rhodococcus rhodochrous* jest przykładem gatunku zdolnego do metabolizowania karbamazepiny. W badaniach przeprowadzonych przez Gauthier i in. zaobserwowano, że biodegradacja CBZ z udziałem tych bakterii może prowadzić do obniżenia pierwotnego stężenia leku o 15% w ciągu 28 dni. Zastosowanie HPLC-MS pozwoliło na wykrycie dwóch stabilnych metabolitów, będących produktami tych przemian. Co ciekawe, metabolity powstałe w wyniku metabolizmu bakteryjnego nie były obecne w próbkach poddanych degradacji abiotycznej. Ze względu na trudność prowadzenia tego typu badań na próbkach rzeczywistych, powyższe dane pochodzą z modelowych badań laboratoryjnych. Można jednak przypuszczać, że w dogodnych warunkach *Rhodococcus rhodochrous* będzie zachowywał zdolność do obniżania stężeń karbamazepiny w próbkach sekcyjnych w zaawansowanym stadium procesów gnilnych [29].

Bakterie z rodzaju *Sterptomyces* zawdzięczają zdolność do metabolizowania karbamazepiny obecności układu enzymatycznego przeprowadzającego hydroksylację zależną od cytochromu P-450. Produktami tych przemian są CBZ-E oraz 10-11-dihydro-10-hydroksykarbamazepina. Aktywność hydroksylacji i epoksydacji CBZ przez wspomniane bakterie jest silnie zależna od warunków hodowli. Najbardziej aktywny gatunek (*Sterptomyces violascens*) w optymalnych warunkach miał zdolność do przeprowadzania hydroksylacji ze średnią szybkością 210 mg/L/dzień [30].

W literaturze można także znaleźć dane na temat mikrobiologicznego pośmiertnego metabolizmu karbamazepiny, dotyczącego przemian dokonywanych przez grzyby, które wykorzystują lek jako substrat do własnych procesów metabolicznych.

Kropidlak czarny (*Aspergillus niger*) to jeden z gatunków zdolnych do przeprowadzania biodegradacji karbamazepiny. Grzyb ten występuje w wilgotnych miejscach o ograniczonym dostępie światła, przeważnie w glebie. Procesy gnilne zachodzące po śmierci w organizmie stwarzają korzystne warunki do rozwoju tego gatunku. Może on jednak występować także w żywych organizmach, wywołuje wówczas infekcje spowodowane np. wdychaniem zarodników [31]. W badaniach Gauthier i in. zarejestrowano 9-procentowy spadek stężenia CBZ w ciągu 10 dni od umieszczenia mikroorganizmów na pożywce zawierającej lek. Już po 5 dniach następowały znaczące spadki stężenia analitu. Za obniżenie stężenia CBZ odpowiedzialne były dwa mechanizmy. Pierwszym z nich były przemiany metaboliczne grzyba, których skutkiem było zarejestrowanie sygnałów pochodzących od metabolitów. Drugi mechanizm, czyli adsorpcja leku na biomacie, odpowiedzialny był za spadek stężenia CBZ nie skutkujący pojawieniem się metabolitów [29].

Kolejnymi gatunkami grzybów o potwierdzonej zdolności do metabolizowania karbamazepiny są *Cunninghamella elegant* i *Umbelopsis ramanniana*. Gatunki te posiadają wiele enzymów fazy I i fazy II szlaków metabolicznych ssaków, dzięki czemu mogą być wykorzystywane jako organizmy modelowe do badania metabolizmu ksenobiotyków u ludzi. Dobrze znana jest zdolność do biotransformacji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) przez gatunek *Cunninghamella elegant*, który umożliwiony jest dzięki obecności enzymów z grupy cytochromów P450. Enzymy te biorą także udział w przemianach karbamazepiny, która wykazuje strukturalne podobieństwo do TLPD. W wyniku badań przeprowadzonych z zastosowaniem techniki HPLC-MS, w przypadku obu gatunków zidentyfikowano dwa główne metabolity: CBZ-E oraz 3-hydroksykarbamazepinę. 25-dniowa inkubacja gatunku *Cunninghamella elegant* skutkowała 43-procentowym spadkiem pierwotnego stężenia CBZ z wytworzeniem dwóch wymienionych wcześniej metabolitów, a także dodatkowo 2-hydroksykarbamazepiny. Biotransformacji przez gatunek *Umbelopsis ramanniana* uległo 23% pierwotnej ilości CBZ. W tym przypadku dodatkowym wykrytym metabolitem był niezidentyfikowany związek chemiczny, prawdopodobnie 1-hydroksykarbamazepina lub 4-hydroksykarbamazepina. Warto

dodać, że produkty metabolizmu grzybiczego zarejestrowano już po 1 dniu inkubacji [39].

Z powyższych danych wynika, że metabolity powstające w wyniku metabolizmu bakteryjnego lub grzybiczego wykazują zgodność z tymi, które są produktami przemian przeprowadzanych przez organizm ludzki. W związku z tym można się spodziewać, że w warunkach korzystnych dla rozwoju określonych mikroorganizmów (a warunki takie zapewnia ciało w stadium rozkładu gnilnego), ubytek stężenia leku macierzystego będzie znaczny. Opisane zjawiska powodują, że oznaczanie karbamazepiny i innych leków w próbkach materiału sekcyjnego jest dużym wyzwaniem analitycznych, ze względu na trudność we właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Interpretacja ta wymaga znajomości jak największej liczby czynników wpływających na przemiany zachodzące w organizmie po śmierci, a zdobycie tej wiedzy nie zawsze jest możliwe.

2. WYBRANE RODZAJE ALTERNATYWNYCH MATERIAŁÓW BIOLOGICZNYCH I ICH POŚMIERTNE PRZEMIANY

Wraz z postępującą degradacją zwłok, wzrasta ilość czynników, które należy uwzględnić w celu właściwego doboru działań analitycznych. Rozwiązanie napotkanych problemów często wymaga posiadania wiedzy z zakresu wielu dziedzin, m.in. chemii, biologii, biochemii, mikrobiologii, entomologii, medycyny sądowej i in. [33]. W analizach toksykologicznych przeprowadzanych w przypadkach podejrzenia o mechanizm śmierci z zatrucia, najczęściej pobieranymi materiałami są krew i mocz. W zależności od przyczyny śmierci, czasu jaki upłynął od nastąpienia zgonu i warunków, w których przebywało ciało, może się jednak okazać, że pobranie i analiza wspomnianych materiałów nie są możliwe. Wówczas korzystnym rozwiązaniem jest sięgnięcie po alternatywne materiały biologiczne, których mnogość dostarcza ludzkie ciało. Do materiałów tych można zaliczyć płyny ustrojowe (maż stawowa, płyn mózgowo rdzeniowy, żółć, płyn z gałki ocznej, płyn błędnikowy), wydzieliny (ślina, pot, łzy), twory naskórka (włosy, paznokcie), a także tkanki (kości, szpik kostny) [44]. Każdy z wymienionych materiałów posiada własny, specyficzny zestaw cech, decydujących o jego przydatności w analizach toksykologicznych. Kości są materiałem szczególnie przydatnym w analizach próbek sekcyjnych i ekshumowanych, ze względu na bardzo długi czas zachowania tego materiału i stosunkowo małą podatność na procesy biodegradacji. Szpik kostny i maż gnilna są z kolei materiałami rzadziej używanymi i przez to mniej poznanymi i scharakteryzowanymi, ale wykazującymi potencjał w zastosowaniu jako materiały do pośmiertnych analiz toksykologicznych.

2.1. KOŚCI

Kości nie są materiałem stosowanym w rutynowych analizach toksykologicznych. Stanowią jednak jedno z najważniejszych pośmiertnych źródeł DNA [31]. Liczba publikowanych badań dotyczących oznaczania leków w tkance kostnej stale rośnie, przy czym są to głównie badania na modelach zwierzęcych. Do ksenobiotyków oznaczonych jak dotąd w kościach należą: ketamina, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, benzodiazepiny, morfina, leki przeciwpyschotyczne i przeciwpadaczkowe. Prowadzone są także badania mające na celu lepsze poznanie mechanizmów wychwytu ksenobiotyków przez tkankę kostną, dystrybucji ksenobiotyków zależnej od rodzaju kości, a także stosunków stężeń związków macierzystych i metabolitów. Potrzeba szczegółowego scharakteryzowania powyższych aspektów dotyczących kości wynika z dużego potencjału tego materiału w dostarczaniu cennych i często jedynych informacji na temat ksenobiotyków obecnych w zdegradowanych szczątkach ludzkich. W przypadku włók podlegających zaawansowanym procesom gnilnym oraz szczątków ekshumowanych, kości są często jedynym materiałem nadającym się do analizy [34].

Watterson i in. przeprowadzili wiele badań z zakresu ilościowych analiz leków w kościach pochodzących od szczurów. Udowodniono, że głównym czynnikiem wpływającym na stężenie ksenobiotyków jest rodzaj kości oraz jej anatomiczne umiejscowienie. Największe znaczenie ma względna ilość istoty gąbczastej i istoty zbitiej, rodzaj obecnego szpiku kostnego, a także stopień unaczynienia kości. Zauważono także wpływ sąsiedztwa kości z jamami ciała (np. jamą klatki piersiowej) na zawartość ksenobiotyków w próbkach. Ma to znaczenie zwłaszcza w kontekście rozkładu gnilnego ciała, kiedy kości narażone są na kontakt z upłynnionymi tkankami, zawierającymi pewne ilości ksenobiotyków. W konsekwencji niektóre kości są materiałem bardziej przydatnym do analiz niż inne, a przydatność ta może być zależna m.in. od położenia ciała [46].

Duża odporność mechaniczna i trwałość kości jest ich przystosowaniem do pełnionych w organizmie funkcji. Cechy takie jak mała zawartość wody i enzymów mają korzystny wpływ na zachowanie kości po śmierci, ponieważ powodują mumifikację materiału, zamiast jego gnicia. Kość stanowi także naturalną barierę dla promieniowania słonecznego oraz mikroorganizmów przyspieszających procesy rozkładu [31].

Proces zeszkieletowania prowadzi do całkowitego zniszczenia tkanek miękkich i ekspozycji suchych kości. W zależności od tego, czy włók pozostawały na wolnym powietrzu lub też były pochowane, proces ten może trwać od 1,5 do ponad 10 lat. Znaczne przyspieszenie zeszkieletowania zachodzi za sprawą działań zwierząt, które mogą doprowadzić do zniszczenia tkanek miękkich nawet w ciągu 40 dni [36].

Ogrom procesów chemicznych, biochemicznych i fizycznych zachodzących zarówno na wolnym powietrzu, jak i w grobie powoduje, że kości również podlegają procesom pośmiertnej degradacji, mimo większej odporności na te czynniki w porównaniu z innymi rodzajami materiału biologicznego. Ogół procesów prowa-

dzących do dezintegracji kości jako całości nazywany jest wietrzeniem kości i przebiega w 6 umownych etapach. Czas trwania każdego z etapów zależy od zaistniałych warunków i rodzaju kości. Wietrzenie kości obejmuje zarówno ich powierzchnię, jak części podpowierzchniowe. Proces ten zachodzi szybciej w przypadku kości niepochowanych. Następuje także proces kolonizacji kości przez grzyby, bakterie i zwierzęta oraz rośliny. Produkty przemiany materii tych organizmów powodują osłabienie i przebarwienia kości [37].

Pośmiertne przemiany kości mogą skutkować pojawieniem się na ich powierzchni przebarwień o bardzo różnorodnych odcieniach. Żółto-brązowe zabarwienie pochodzi zwykle od składników gleby. Ciemna czerwono-brązowa barwa to pozostałość po hemolizie, natomiast ciemna czerwono-szara barwa wskazuje na zabrudzenie powstałe na skutek kontaktu z płynami gnilnymi. Białe zabarwienie kości może być skutkiem wybielania pod wpływem promieniowania słonecznego. Odcienie zieleni, w tym kolor szaro-zielony i oliwkowy pochodzą od najczęściej występujących gatunków grzybów, czyli gatunków z rodzin *Aspergillus* i *Penicillium*. W zależności od innych obecnych mikroorganizmów, kości mogą przyjmować także inne barwy. Pojawienie się zabarwienia, jego intensywność i powierzchnia mogą różnić się zależnie od tego czy kości zostały pochowane, a następnie odsłonięte, czy też kolejność była odwrotna [38].

2.2. MAŻ GNILNA

W dostępnej literaturze trudno znaleźć jakiegokolwiek doniesienia na temat wykorzystania mazi gnilnej jako materiału do analiz toksykologicznych. Nie zostały również scharakteryzowane cechy fizykochemiczne tego materiału. Można zatem przypuszczać, że przydatność mazi gnilnej ogranicza się do specjalnych przypadków, w których nie ma możliwości pobrania materiału o lepiej znanych właściwościach.

Maż gnilna zaczyna tworzyć się podczas rozpadu gnilnego zwłok, kiedy upłynione tkanki osadzają się na porowatych powierzchniach kości. Podczas następującego później procesu zeszkielewania, w zależności od zaistniałych warunków, na suchych kościach może pozostać pewna ilość mazi [34].

Bliższe przyjrzenie się tej substancji pozwala dostrzec, że jest to materiał niejednorodny, którego skład zależy od warunków, w jakich się wytworzył, a także od miejsca, z którego został pobrany. W próbkach pobranych z powierzchni czaszki można zaobserwować obecność włosów, natomiast jeśli maż została pobrana z rozpadającej się powierzchni kości, mogą być w niej obecne ukruszone fragmenty tkanki kostnej. Barwa mazi gnilnej jest zmienna (od jasnobrązowej do czarnej), podobnie jak jej konsystencja (od kruchej do plastycznej). Na podstawie powyższych danych wynikających z obserwacji można zatem stwierdzić, że maż gnilna jako produkt rozpadu gnilnego zwłok jest materiałem o zmiennym składzie. W związku z tym można się

spodziewać, że wyniki analiz tego materiału będą wykazywały małą powtarzalność oraz mogą stwarzać trudności interpretacyjne.

2.3. SZPIK KOSTNY

Szpiik kostny jest silnie ukrwioną tkanką o dużej zawartości tłuszczów, dzięki czemu może magazynować ksenobiotyki wprowadzone do organizmu [40]. Otaczająca jamę szpikową kość stanowi naturalną fizyczną barierę zapobiegającą kontaminacji szpiku, a bariera ta może w pewnym stopniu kontynuować swoją rolę nawet podczas wystąpienia urazu kości. Szpiik kostny ulega procesom gnilnym zachodzącym po śmierci, jednak procesy te zostają opóźnione, mimo silnego ukrwienia tkanki [43]. Wszystkie wymienione cechy są bardzo korzystne z punktu widzenia zastosowania szpiku kostnego jako materiału do analiz toksykologicznych, jednak niewystarczająca znajomość wszystkich aspektów pośmiertnej analizy szpiku powoduje, że nie jest to materiał wykorzystywany rutynowo. Podobnie jak w toksykologii, także w medycynie sądowej badanie szpiku kostnego nie jest rutynową procedurą. Histopatologiczna analiza szpiku może dostarczać wielu cennych informacji na temat przyczyny i czasu zgonu oraz chorób występujących przed śmiercią [41, 42]. Pomoc w ustalaniu przyczyny śmierci może również stanowić badanie szpiku pod kątem obecności okrzemek, w przypadkach podejrzenia o utonięcie [39]. Najczęściej jednak szpiik kostny wykorzystywany jest w dziedzinie genetyki sądowej, gdzie jest cennym źródłem DNA i RNA ze względu na wspomniane wcześniej właściwości umożliwiające zachowanie materiału genetycznego w dobrym stanie, mimo postępującego rozkładu gnilnego reszty ciała [43].

Wnikliwe scharakteryzowanie szpiku kostnego jest niezbędne do przeprowadzenia wiarygodnych analiz toksykologicznych i jednoznacznej interpretacji ich wyników. W związku z tym prowadzone są badania mające na celu określenie wpływu takich czynników jak np. rodzaj szpiku i miejsce jego pobrania, a także określenie korelacji między stężeniami ksenobiotyków w szpiku i innych matrycach. Najważniejsza wydaje się jednak próba odpowiedzi na pytania czy stężenia ksenobiotyków w pośmiertnych próbkach szpiku odzwierciedlają stężenia we krwi przed śmiercią oraz czy procesy farmakokinetyczne zachodzące w tym materiale pozwalają na wiarygodne oznaczenie ksenobiotyków [40]. Jak dotąd w kręgach naukowych nie została ustalona standardowa procedura pobierania szpiku kostnego [41].

Szpiik kostny jest najlepiej chronioną tkanką w organizmie. Osłona w postaci kości stanowi barierę chroniącą przed następującą po śmierci degradującą działalnością grzybów, bakterii, zwierząt i roślin, a także przed kontaminacją związkami zawartymi w glebie oraz produktami przemian gnilnych tkanek miękkich [44]. W momencie rozpadu lub pęknięcia kości, szpiik zostaje jednak narażony na wszystkie te czynniki i może nie być przydatny jako materiał do analiz [45]. W przypadkach naruszenia integralności kości, np. na skutek urazu, powinna być rozpatrzona

także możliwość pośmiertnej redystrybucji ksenobiotyków do szpiku kostnego, zwłaszcza dyfuzja z treści żołądkowej [40].

Wraz z upływem czasu od nastąpienia zgonu, w szpiku kostnym mogą zachodzić zmiany morfologiczne i przebarwienia, zależne od zaistniałych warunków. Początkowo czerwona lub żółta substancja o konsystencji żelu może stopniowo ciemnieć i przejść w formę brązowej oleistej cieczy, wysuszyć się do postaci brązowego lub żółtego proszku lub też podlegać przeobrażeniu tłuszczowo-woskowemu [40].

Podobnie jak kości, szpik kostny jest niejednorodną matrycą, której skład tłuszczowy i komórkowy zależy od miejsca pobrania i cech osobniczych źródła próbki [44]. Akumulacja ksenobiotyków w szpiku może zachodzić w różnym stopniu w zależności od zawartości wody w materiale. Do wykorzystania szpiku kostnego w analizach toksykologicznych konieczne jest uwzględnienie tych i wielu innych czynników, a ze względu na ich mnogość interpretacja wyników może być trudna i korzystne może okazać się dysponowanie wynikami z analizy lepiej poznanych matryc biologicznych.

UWAGI KOŃCOWE

Analiza toksykologiczna materiału sekcyjnego jest dziedziną, w której standardowe metody analityczne i procedury przygotowywania próbek mogą okazać się zawodne. W związku z tym niejednokrotnie konieczne jest zastosowanie specjalnego podejścia. Z wielu możliwych rodzajów materiału do badań należy w odpowiedni sposób wyselekcjonować i pobrać taki, którego analiza zapewni wiarygodne wyniki oraz umożliwi ich jednoznaczną interpretację. Interpretację tą znacznie komplikuje mnogość procesów zachodzących po śmierci oraz zależność tych procesów od bardzo wielu czynników. Niezbędna jest znajomość zarówno żączyowych jak i pośmiertnych przemian oznaczanych substancji, a także materiałów, w których dokonuje się oznaczeń. Powoduje to konieczność zastosowania indywidualnego podejścia do każdej analizy w dążeniu do uwzględnienia jak największej liczby zachodzących procesów oraz odpowiedniego doboru materiału do badań.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Kostowski, P. Kubikowski, *Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej*, Wyd. 5, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
- [2] *Indeks leków medycyny praktycznej*, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 1999.
- [3] *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*, A.F. Schatzberg, I.C. Nemeroff (Red.), American Psychiatric Publishing, 2009
- [4] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Red.), Wyd. 3, Pharmaceutical Press, Londyn 2004.
- [5] D.A. Svinarov, C.E. Pippenger, *Ther Drug Monit*, 1996, **18**(6), 660.

- [6] J.J. MacKichan, E.M. Zola, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1984, **18(4)**, 487.
- [7] J. Arvidsson, H.L. Nilsson, P. Sandstedt, G. Steinwall, B. Tonnyby, G. Flesch, *J. Child Neurol.*, 1995, **12(2)**, 114.
- [8] P. Petit, R. Lonjon, M. Cociglio, A. Sluzewska, J.P. Blayac, B. Hue, R. Alric, R. Pouget, R., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, **41(6)**, 541.
- [9] K. Reguła, B. Szpiech, K. Galer, M. Wiergowski, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.*, 2002, **52(4)**, 357.
- [10] *Zarys toksykologii klinicznej*, J. Pach (Red.), Wyd. 1, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009.
- [11] R. Wachowiak, J. Tobolski, D. Klimaszyk, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.*, 2004, **4**, 223.
- [12] T.G. Li, Y. Yan, N.N. Wang, M. Zhao, *Am. J. Emerg. Med.*, 2011, **29(5)**, 518.
- [13] M. Ozsarac, M. Sever, S. Gokova, S. Ersel, M. Sezis, *Turk. J. Med. Sci.*, 2011, **31(3)**, 702.
- [14] I. Teudt, A. Meier-Cillien, T. Grundmann, *Laryngo. Rhino. Otol.*, 2012, **91(3)**, 187.
- [15] M. Ahmed, T. McCarthy, *J. Pediatr. Epilepsy.*, 2012, **1(1)**, 65.
- [16] S. Yaylaci, M.V. Demir, B. Acar, S. Sipahi, A. Tamer, *Indian J. Pharmacol.*, 2012, **44(3)**, 417.
- [17] M. Ram Prabahaar, K. Raja Karthik, M. Singh, R.B. Singh, S. Singh, J. Dhamodharan, *Hemodial. Int.*, 2011, **15(3)**, 407.
- [18] J.L. Harder, M. Heung, A.M. Vilay, B.A. Mueller, J.H. Segal, *Hemodial. Int.*, 2011, **15(3)**, 412.
- [19] B. Saygan-Karamursel, S. Guven, L. Onderoglu, O. Deren, T. Durukan, *J. Perinat. Med.*, 2005, **33(1)**, 72.
- [20] A. Graudins, G. Peden, R.P. Drowsett, Massive overdose with controlled-release carbamazepine resulting in delayed peak serum concentrations and life-threatening toxicity, 2002, **14(1)**, 89.
- [21] V. V. Venci, M.M. Rowcliffe, M.M., L. Wollenberg, M.M. Rainka, F.M. Gengo, *Forensic. Sci. Med. Pathol.*, 2013, **9**, 73.
- [22] K. Bek, S. Kocak, O. Ozkaya, Y. Yilmaz, O.F. Aydin, C.S. Tasdoven, Carbamazepine poisoning managed with hemodialysis and hemoperfusion in three adolescents, 2007, **12**, 33.
- [23] H. Ozkaya, G. Aydemir, A.B. Akcan, M. Kul, F. Karademir, S. Aydmoz, S. Suleymanoglu, *Turk. J. Haematol.*, 2012, **29(2)**, 195.
- [24] P. Teng, B. Tan, *Dermatol. Online J.*, 2013, **19(5)**, 18170.
- [25] C. Ghosh, N. Marchi, M. Hossain, P. Rasmussen, A.V. Alexopoulos, J. Gonzalez-Martinez, H. Yang, D. Janigro, *Neurobol. Dis.*, 2012, **46**, 692.
- [26] A. Duzova, E. Baskin, Y. Usta, S. Ozen, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2001, **20(4)**, 175.
- [27] D.M. Butzbach, *Forensic. Sci. Med. Pathol.*, 2010, **6**, 35.
- [28] M. Dalpe-Scott, M. Degouffe, D. Garbutt, M. Drost, *Can. Soc. Forensic. Sci. J.*, 1995, **28(2)**, 113.
- [29] H. Gauthier, V. Yargeau, D.G. Cooper, *Sci. Total. Environ.*, 2010, **408**, 1701.
- [30] S.I. Kang, S.Y. Kang, H.G. Hur, *Appl. Microbiol. Biot.*, 2008, **79**, 663.
- [31] A.A. Martinez-Ramirez, J. Strien, J. Sanft, G. Mall, G. Walther, F.T. Peters, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 8443.
- [32] M. Kittelmann, R. Lattmann, O. Ghisalba, *Biosci. Biotech. and Bioch.*, 1993, **57(9)**, 1589.
- [33] G. Skopp, *Forensic. Sci. Int.*, 2004, **142**, 75.
- [34] *Encyclopedia of Forensic Sciences*, J.A. Siegel, P.J. Saukko (Red.), Academic Press, 2013.
- [35] N. Desrosiers, C.C. Betit, J.H. Watterson, *Forensic. Sci. Int.*, 2009, **188**, 23.
- [36] S. Raszeja, W. Nasiłowski, J. Markiewicz, *Medycyna sądowa. Podręcznik dla studentów*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1993.
- [37] A.K. Behrensmeyer, *Paleobiology*, 1978, **4(2)**, 150.
- [38] M.A. Huculak, T.L. Rogers, *J. Forensic. Sci.*, 2009, **54(5)**, 979.
- [39] T. Delabarde, Ch. Keyser, A. Tracqui, D. Charabidze, *Forensic. Sci. Int.*, 2013, **228**, e1.
- [40] N. Cartiser, F. Bevalot, L. Fanton, Y. Gaillard, J. Guitton, *Int. J. Legal. Med.*, 2011, **125**, 181.

-
- [41] L. Tattoli, M. Tsokos, J. Sautter, J. Anagnostopoulos, E. Maselli, G. Ingravallo, M. Delia, B. Solarino, *Forensic. Sci. Int.*, 2014, **234**, 72.
- [42] P. Roll, A. Beham, Ch. Beham-Shmid, *Forensic. Sci. Int.*, 2009, **186**, e17.
- [43] N.L. van Doorn, A.S. Wilson, E. Willerslev, T.P. Gilbert, *J. Forensic. Sci.*, 2011, **56(3)**, 720.
- [44] L.M. McIntyre, C.V. King, M. Boratto, O.H. Drummer, *Ther Drug Monit*, 2000, **22(1)**, 79.
- [45] N.M. Lafreniere, J.H. Watterson, *Forensic. Sci. Int.*, 2010, **194**, 60.
- [46] J.H. Watterson, H.M. Cornthwaite, *J. Anal. Toxicol.*, 2013, 565.
- [47] N. Wad, C. Guenat, G. Kramer, *Ther Drug Monit*, 1997, **19(3)**, 314.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lipca 2015

HORYZONTY NAUKI 2015
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 28 MAJA 2015

FOTOKATALITYCZNA DEGRADACJA HERBICYDÓW
– NOWE KATALIZATORY NA BAZIE TiO₂

PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF HERBICYDES
– NEW CATALYSTS BASED ON TiO₂

Sabina Ożóg

Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: sabinaozog@interia.eu

Abstract

Streszczenie

Wprowadzenie

1. Fotokataliza i fotokatalizatory
2. Tlenek tytanu(IV) jako fotokatalizator
3. Modelowe zanieczyszczenia wody
4. Nowe fotokatalizatory na bazie TiO₂ do degradacji herbicydów
5. Projekt 4G-PHOTO CAT – fotokatalityczna degradacja herbicydów w warunkach polowych
6. Badania i wyniki

Piśmiennictwo cytowane

Sabina Ożóg – absolwentka kierunku ochrona środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w roku 2015. Uczestniczka stażu w ramach projektu „Na podbuj rynku”, odbytego w Akademickim Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH pod opieką dr hab. Konrada Szaciłowskiego prof. AGH. Zainteresowania: wpływ zanieczyszczeń na środowisko naturalne.

ABSTRACT

Over the past few decades a rapid increase in standard of living is observed. Rapid urbanization and development of new technologies, which are focused on the needs of a modern society, influence negatively the environment. The present policy of sustainable development is focused on the principles of rational use of scarce resources and raw materials. New technologies should comply with a number of requirements: efficiency, low costs and a low impact on the environment. Photocatalytic processes are the answer for these requirements. Photocatalysis can be used in many aspects of everyday life, offering self-cleaning surfaces, photo-drugs (e.g. for photodynamic therapy) and even photovoltaic devices.

Photocatalytic degradation of pollutants in the presence of inorganic photocatalysts (e.g. TiO₂ or ZnO) is one of the available methods of removing impurities from aqueous and gaseous phases. The main advantage of this process is the lack of wastes and formation of carbon dioxide, water and simple inorganic ions as end-products.

The aim of our work was to develop new TiO₂-based photocatalysts doped with tungsten and molybdenum oxides. A series of materials with different content of the dopants, calcined at various temperatures, was prepared. The photocatalytic activity of the materials was determined following the degradation of two model herbicides: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). These compounds are used for the control of weed growth on crop plantations, but in a high dosage they can lead to destruction of the plants. They are readily soluble in water, therefore their use is simple, but brings a great risk to aquatic organisms and people.

Photocatalytic degradation of herbicides is the main goal of the 4G-PHOTO-CAT project. The efforts are directed towards development of a low-cost photocatalytic paint, that could be used in reactors for groundwater purification. The active ingredient of the paint is a composite material based on TiO₂ modified with other metal oxides.

Keywords: TiO₂, photocatalytic degradation, 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic (2,4,5-T), 4G-PHOTO-CAT

Słowa kluczowe: TiO₂, degradacja fotokatalityczna, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T), 4G-PHOTO-CAT

WPROWADZENIE

Przez ostatnie kilkadziesiąt lat obserwowany jest szybki rozwój cywilizacji i postęp gospodarczy, a co za tym idzie wzrost poziomu życia społeczeństwa. Gwałtowna urbanizacja, rozwój przemysłu oraz wdrażanie nowych technologii ukierunkowane na potrzeby ludzkości już od pewnego czasu znajdują negatywne odzwierciedlenie w środowisku naturalnym. Obecnie wdrażana i realizowana polityka zrównoważonego rozwoju skupia się na zasadach racjonalnego korzystania z zasobów, recyklingu i odnawialnych źródłach energii, które mają zaspokoić wyczerpujące się obecnie naturalne surowce oraz zmniejszać negatywne skutki ludzkiej działalności na środowisko.

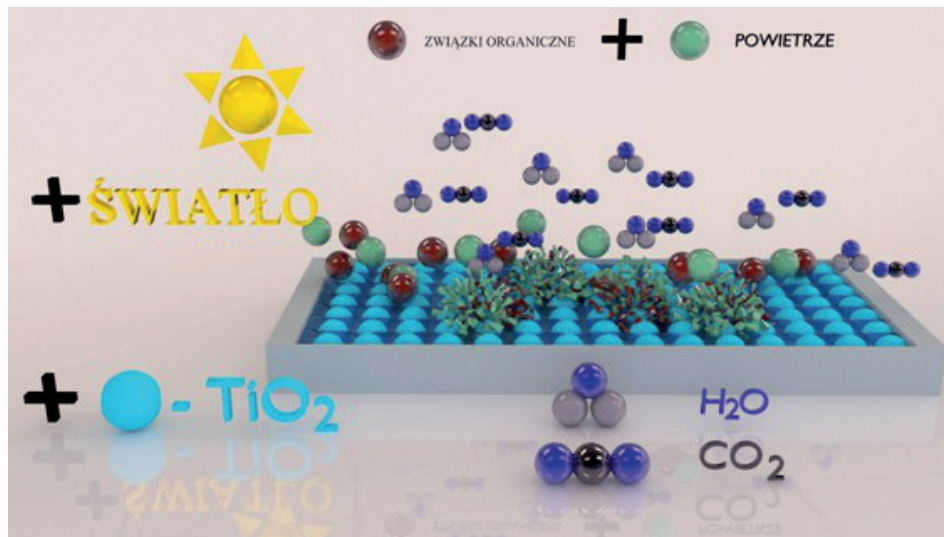
Przed nowymi technologiami, które mają ograniczać negatywny wpływ przemysłu na środowisko, stawiany jest szereg wymagań takich jak: efektywność, niski koszt i minimalny wpływ na środowisko naturalne. To właśnie procesy fotokatalityczne zachodzące pod wpływem światła słonecznego idealnie wpasowują się w te wymagania. Procesy te znalazły już zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu: w oczyszczaniu wody, powietrza i dezynfekcji [1], jak również w selektywnej syntezie związków organicznych [2]. Fotokataliza znajduje obecnie również zastosowanie w medycynie (terapia fotodynamiczna i inaktywacja mikroorganizmów) i fotowoltaice (barwnikowe ogniwa słoneczne) [3]. Procesom fotokatalitycznym poświęcono do tej pory ponad 32000 publikacji naukowych (wg bazy Scopus, hasło „photocatalysis”) [4] oraz ponad 3100 zgłoszeń patentowych (wg bazy Espacenet, hasło: „photocatalysis”) [5]. Tego typu technologie wdrażają także polskie firmy, np. w produkcji urządzeń chłodniczych z fotokatalitycznym oczyszczaniem powietrza [6] lub samoczyszczącego betonu [7].

1. FOTOKATALIZA I FOTOKATALIZATORY

Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) fotokatalizą jest proces, w którym zmiana szybkości reakcji lub jej inicjacja zachodzi pod wpływem promieniowania UV, widzialnego lub podczerwonego w obecności fotokatalizatora, który absorbuje światło i bierze udział w przemianie chemicznej substratów reakcji. Obecnie fotokataliza heterogeniczna, czyli wykorzystująca fotokatalizator w innej fazie niż substraty reakcji, znajduje zastosowanie w wielu procesach. Istnieje możliwość wdrożenia technologii pozwalających na usuwanie zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych zarówno z fazy ciekłej jak i gazowej. Jedną z głównych zalet tego typu procesów jest fakt, iż niepożądane szkodliwe związki chemiczne można utlenić do dwutlenku węgla i wody oraz jonów nieorganicznych nieszkodliwych dla środowiska. Dodatkowo, przy zastosowaniu materiałów aktywnych w warunkach naświetlania światłem słonecznym minimalizuje się koszty eksploatacji technologii, korzystając z łatwo dostępnego źródła

energii. Do najbardziej popularnych półprzewodników stosowanych w procesach przemysłowych należą TiO_2 , ZnO oraz ZnS [7].

Podczas naświetlania fotokatalizatora półprzewodnikowego generowane są ładunki, które na powierzchni mogą reagować z zaadsorbowanymi zanieczyszczeniami, tlenem lub wodą. Reakcje redoks tlenu i wody prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu (np. anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylowego), które następnie utleniają zanieczyszczenia organiczne [5, 6]. Działanie fotokatalizatora przedstawiono schematycznie na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat procesów fotokatalitycznych zachodzących w obecności światła na powierzchni TiO_2 (na podstawie [6])

Figure 1. Photocatalytic processes taking place at the surface of TiO_2

2. TLENEK TYTANU(IV) JAKO FOTOKATALIZATOR

W niniejszej pracy jako fotokatalizator użyty został tlenek tytanu(IV). Dytlenek tytanu jest obecnie powszechnie stosowany w wielu gałęziach przemysłu: kosmetycznym, malarskim, motoryzacyjnym, medycznym, lotniczym itd. [6, 8, 9]. Za tak szerokim zastosowaniem ditlenku tytanu w przemyśle przemawia szereg jego zalet. Tlenek tytanu(IV) jest stabilny fotochemicznie i chemicznie, jest obojętny biologicznie, a przede wszystkim nietoksyczny dla środowiska i człowieka. Ważną jego zaletą jest prosta produkcja i jej niskie koszty [10].

Tlenek tytanu(IV) jest substancją stałą o barwie białej. W XX wieku tlenkiem tytanu(IV) zastąpiono szkodliwy ołów w białych farbach. Ze względu na właściwości fotokatalityczne stosowany jest on również w procesach oczyszczania wody, powietrza oraz sterylizacji (inaktywacji bakterii i mikroorganizmów). Obecnie

wykorzystuje się go na przykład do usuwania barwników oraz pochodnych fenoli ze ścieków przemysłowych, które szczególnie zagrażają środowisku i organizmom wodnym [11–13].

Ze względu na dość wysoką wartość przerwy energetycznej (ok. 3,2 eV) materiał wykazuje aktywność fotokatalityczną tylko w warunkach naświetlania światłem UV (do ok. 390 nm). Ładunki fotogenerowane na powierzchni TiO_2 wykazują silne właściwości utleniające oraz redukujące [14]. Wartości potencjałów krawędzi pasm są odpowiednie do wytwarzania reaktywnych form tlenu: utleniania wody do rodnika hydroksylowego lub redukcji tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego, co dodatkowo zwiększa możliwości zastosowania materiału w procesach fotokatalitycznych. TiO_2 wykazuje niską absorpcję światła z zakresu widzialnego. Niestety, procesy prowadzone w warunkach naświetlania światłem ultrafioletowym wykorzystują tylko niewielki procent dostępnego światła słonecznego, dlatego podejmuje się próby zwiększenia zakresu absorpcji przez modyfikację TiO_2 .

Tlenek tytanu uzyskiwany może być w procesach siarczanowych i chlorowych [15]. Zarówno metoda siarczanowa jak i chlorowa wykorzystuje podstawowe tytanośne surowce, jakimi są ilmenit i szlaka tytanowa. Metoda siarczanowa polega na rozdrobnieniu ilmenitu i ogrzaniu go ze stężonym kwasem siarkowym. W reakcji powstaje mieszanina tlenosiarczanu tytanu oraz siarczanów żelaza(II) i żelaza(III). Kolejno, po oddzieleniu soli żelaza, roztwór tlenosiarczanu tytanu jest alkalizowany, co prowadzi do wytrącenia wodorotlenku – $\text{TiO}(\text{OH})_2$. Następuje odfiltrowanie i ogrzanie wodorotlenku powyżej 1000°C , w wyniku czego otrzymuje się ditlenek tytanu [15].

Metoda chlorowa otrzymywania TiO_2 polega na nasyceniu ilmenitu gazowym chlorem w obecności koksu. Wynikiem tej reakcji jest czterochlorek tytanu (TiCl_4). Kolejno następuje destylacja czterochloru tytanu i w następnym etapie jego spalanie, czego efektem końcowym jest Cl_2 i TiO_2 [15].

O właściwościach TiO_2 w dużej mierze decyduje metoda i warunki jego syntezy. Oprócz wymienionych, do najczęściej stosowanych metod syntezy należą:

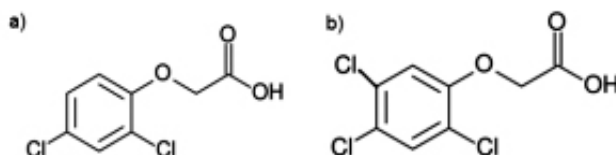
- metoda zol-żel obejmująca hydrolizę soli tytanu lub alkoholanów tytanu w celu otrzymania zolu lub koloidu, a następnie polimeryzację prowadzącą do wytworzenia żelu TiO_2 [15, 16];
- metody solwatotermalne – są to syntezy, w trakcie których ściśle kontroluje się ciśnienie i temperaturę [15];
- chemiczne lub elektrochemiczne utlenianie metalicznego tytanu [11, 15].

Bardzo ważny jest etap kalcynacji, ponieważ to on decyduje o zawartości poszczególnych odmian krystalicznych TiO_2 , a tym samym o aktywności fotokatalitycznej materiału.

3. MODELOWE ZANIECZYSZCZENIA WODY

Do testów aktywności fotokatalitycznej w badaniach laboratoryjnych wykorzystuje się różne modelowe zanieczyszczenia. W początkowych etapach prac zwykle używa się barwników organicznych, które reagują zarówno z ładunkami generowanymi na powierzchni półprzewodnika, jak i z reaktywnymi formami tlenu. Wstępne testy mają na celu ustalenie, które z materiałów można stosować w dalszych badaniach prowadzonych na zanieczyszczeniach docelowych, często trudniejszych do usunięcia. W tym projekcie jako modelowe zanieczyszczenia wykorzystano dwa herbicydy: kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) oraz kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T). Herbicydy te zostały wykorzystane w latach 1961–1971 przez armię amerykańską podczas wojny w Wietnamie. Na tereny Wietnamu zrzucono tzw. herbicydy tęcze (Agent Orange), które miały na celu trwałe uszkodzenie roślinności i plonów, co z kolei doprowadziło do klęski głodu, powstania mutacji oraz śmierci wielu tysięcy ludzi zamieszkujących tamte tereny. Badania pokazują, że na terenie Wietnamu herbicydy te wciąż zalegają w glebie i wodach gruntowych w postaci pierwotnej lub szkodliwych pochodnych chlorowcowych [17].

Kwasy 2,4-D i 2,4,5-T (Rys. 2) należą do grupy herbicydów, czyli związków stosowanych w różnych sytuacjach do zwalczania chwastów. Niektóre z nich, które mają zdolność do pobudzania i hamowania wzrostu roślin, nazywane są „regulatorami wzrostu”. Herbicydy mogą działać wybiórczo niszcząc niektóre gatunki roślin lub nieselektywnie, całkowicie niszcząc całą populację roślinną. Herbicydy reagują kontaktowo, np. parząc, lub układowo powodując zaburzenia czynności układów enzymatycznych i procesów fizjologicznych roślin. Istotne zagrożenie dla środowiska naturalnego i ludzi stanowią niektóre herbicydy organiczne, zwłaszcza pochodne kwasu chlorofenoksyoctowego, dinitrofenole, związki bispirydylowe i wiele innych [18]. Toksyczność tych kwasów wyrażona dawką LD₅₀ wynosi 300–1000 mg/kg masy ciała. W związku z tym herbicydy te zaliczane są do III i IV klasy toksyczności [18].



Rysunek 2. Wzory strukturalne herbicydów: a) kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, b) kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy

Figure 2. Structures of selected herbicides: a) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, b) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid

Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy jest zarówno herbicydem jak i regulatorem wzrostu roślin. W skład środka używanego pod tą nazwą wchodzi zarówno sole sodowe i amonowe jak i estry. Jest jednym z najpowszechniej stosowanych pestycydów. Działa chwastobójczo poprzez pobudzenie układu hormonalnego roślin, co prowadzi do niekontrolowanego rozrostu roślin i niszczenia ich. Udowodniony jest

negatywny wpływ kwasu na rośliny, ptaki, małe bezkręgowce i ryby. Zatrucie dużą dawką kwasu 2,4-D powoduje śmierć w wyniku migotania komór serca [19, 20]. W celu usunięcia 2,4-D należy poddać go mineralizacji lub zdegradować w solach. Niestety, metody te charakteryzuje niska wydajność rozkładu [21]. Prowadzono badania w kierunku utylizacji szkodliwego kwasu w osadzie czynnym, jednak długi czas aklimatyzacji, który wynosi ok. 4 miesiące, spowodował ograniczenie badań w tym kierunku.

Kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy jest szeroko stosowanym w rolnictwie środkiem chwastobójczym. Ulega on biodegradacji trudniej niż 2,4-D, co być może wynika z obecności dodatkowego atomu chloru w cząsteczce.

Istnieją bakterie, które zdolne są do rozkładu obydwu kwasów, np.: *Pseudomonas cepacia*. Kwas 2,4-D może być biodegradowany przez takie bakterie jak: *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter Wolf II*, *Acinetobacter sp.* Kwas 2,4,5-T usuwany jest przez bakterie: *Burkholderia cepacia* i *Nocardioideus simplex* [22].

Wykazano także, że jest możliwa fotokatalityczna degradacja tych związków w obecności TiO_2 .

4. NOWE FOTOKATALIZATORY NA BAZIE TiO_2 DO DEGRADACJI HERBICYDÓW

Zwiększenie aktywności ditlenku tytanu w świetle widzialnym można osiągnąć poprzez modyfikację jego powierzchni. W tym celu prowadzi się badania nad domieszkowaniem TiO_2 , kompozytami różnych półprzewodników i modyfikacją powierzchni TiO_2 związkami organicznymi [5].

Najłatwiejszym sposobem modyfikacji w objętości jest wprowadzenie modyfikatora w trakcie syntezy TiO_2 , co prowadzi do wbudowania kationów w sieć krystaliczną TiO_2 . Na aktywność fotokatalityczną ma również wpływ morfologia oraz obróbka termiczna materiału. Jako domieszki można stosować jony metali alkalicznych, metali przejściowych i niemetalu lub inne materiały o charakterze półprzewodnikowym [23]. Wybrane domieszki powinny charakteryzować się potencjałem utleniania-redukcji o wartości pomiędzy potencjałem pasma przewodnictwa i walencyjnego TiO_2 . Domieszki mogą działać w dwojaki sposób:

1. jako pułapki dla generowanych ładunków przedłużając ich czas życia,
2. jako donor lub akceptor elektronów.

W obydwu przypadkach materiał może zostać wzbudzony promieniowaniem o niższej energii niż wartość szerokości przerwy wzbronionej półprzewodnika [6, 23].

Do celów tej pracy jako modyfikatory TiO_2 wybrano tlenek wolframu(VI), tlenek molibdenu(VI), wolframian sodu oraz molibdenian sodu.

Tlenek wolframu(VI) (WO_3) wykazuje charakter kwasowy, natomiast tlenek wolframu(IV) – charakter zasadowy. Wolfram znalazł zastosowanie głównie

w przemyśle jako składnik dużej twardości stali konstrukcyjnych, narzędziowych i pancernych [24]. Szerokość przerwy wzbronionej WO_3 wynosi ok. 2,77 eV [25]. Tlenek wolframu jest półprzewodnikiem, który w stanie wzbudzonym oferuje silne właściwości utleniające [26]. Tlenek molibdenu(VI) MoO_3 ma charakter kwasowy, natomiast tlenek molibdenu(IV) wykazuje charakter zasadowy [24]. Wartość szerokości przerwy wzbronionej MoO_3 wynosi ok. 2,9 eV [13].

Szerokości przerw wzbronionych wybranych tlenków wskazują, że WO_3 i MoO_3 mogą wykazywać aktywność w warunkach naświetlania światłem widzialnym. Materiały kompozytowe TiO_2 - WO_3 oraz TiO_2 - MoO_3 syntezowano metodą zol-żel – przeprowadzono hydrolizę izopropanolanu tytanu(IV) w obecności komercyjnie dostępnego tlenku lub soli wybranego metalu. Otrzymano dwa rodzaje materiałów różniących się charakterem domieszki w objętości tlenku tytanu. Przygotowane materiały różnią się też zawartością domieszek. Kompozyty prażono w trzech różnych temperaturach, co pozwoliło uzyskać tlenek tytanu o różnej strukturze krystalograficznej.

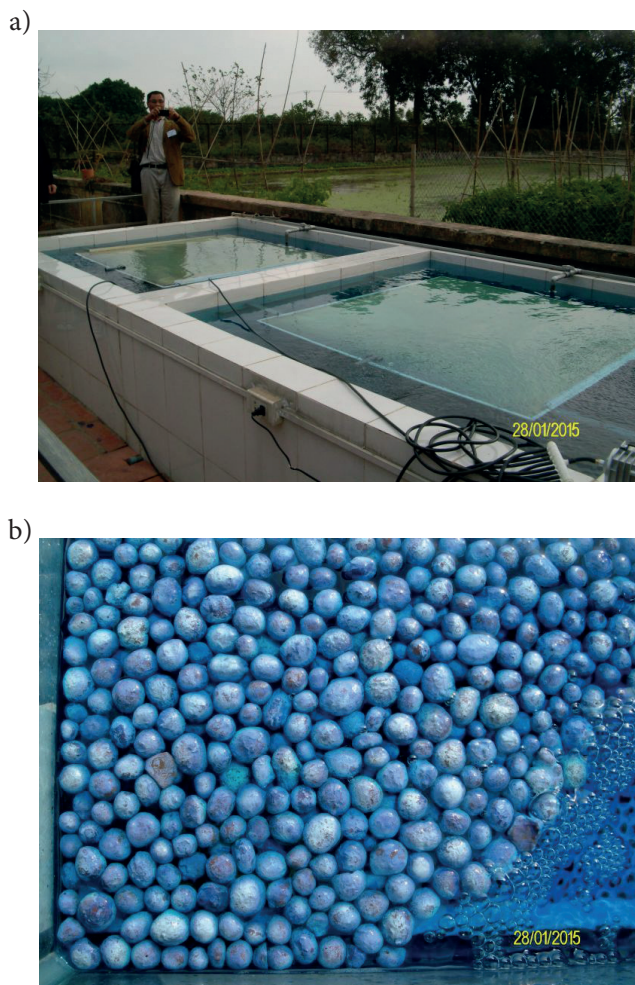
Tlenek tytanu występuje w trzech odmianach krystalograficznych: anatazu, rutylu i brukitu. W trakcie syntezy powstaje najpierw forma amorficzna, która podczas wygrzewania stopniowo przechodzi w anataz, a następnie w temperaturze ok. 600°C w rutyl. Temperatura tego przejścia może ulegać zmianie, między innymi w zależności od zastosowanych domieszek [11]. To właśnie anataz i rutyl znajdują najwięcej zastosowań. Te dwie formy różnią się strukturą krystalograficzną oraz aktywnością fotokatalityczną. Za bardziej aktywny uznaje się anataz, chociaż istnieje również wiele doniesień na temat aktywności rutylu. Z kolei kompozyty zawierające obydwie formy krystaliczne (np. P25 firmy Evonik) wykazują aktywność fotokatalityczną znacznie wyższą niż którakolwiek z form samodzielnie.

5. PROJEKT 4G-PHOTOCAT – FOTOKATALITYCZNA DEGRADACJA HERBICYDÓW W WARUNKACH POŁOWYCH

Utylizacją herbicydów zajmują się naukowcy zrzeszeni w konsorcjum projektu 4G-PHOTOCAT [27]. Głównym założeniem projektu jest nawiązanie współpracy pomiędzy ośrodkami akademickimi oraz przemysłowymi zajmującymi się zagadnieniem fotokatalizy. W skład konsorcjum wchodzi 7 ośrodków akademickich oraz 3 ośrodki przemysłowe z pięciu krajów Unii Europejskiej (Niemcy, Wielka Brytania, Czechy, Polska i Finlandia) oraz dwóch krajów Stowarzyszenia Narodów Azji Południowo-Wschodniej (ASEAN) (Malezja i Wietnam).

Celem projektu jest stworzenie receptury farby fotokatalitycznej, która mogłaby być wykorzystana w reaktorach do oczyszczania wód gruntowych z opisanych powyżej herbicydów. Aktywnym składnikiem farby będzie materiał kompozytowy na bazie TiO_2 z dodatkiem tlenków innych metali – materiałów analogicznych do opisanych wyżej.

Testy polowe są obecnie prowadzone w Wietnamie (rys. 3), jednak reaktor fotokatalityczny może znaleźć także zastosowanie na obszarach rolniczych w innych regionach świata. Testowane są dwa typy podłoży dla farby fotokatalitycznej: płyty, które umieszcza się pod powierzchnią wody (Rys. 3A) i lekki materiał unoszący się na wodzie (Rys. 3B). Do tej pory osiągnięto dobre rezultaty w procesie degradacji błękitu metylenowego (barwnik) w obecności farb na bazie niemodyfikowanego TiO_2 . Obecnie testowane są farby zawierające materiały kompozytowe wytworzone w trakcie projektu.



Rysunek 3. A) Reaktory fotokatalityczne do oczyszczania wody (fotokatalizator immobilizowany jest na płytach tuż pod powierzchnią wody), B) fotokatalizator naniesiony na podłoże unoszące się na wodzie (fotografie: dr M. Buchalska)

Figure 3. A) In-field photolytic reactors with the plates covered with a photocatalyst; B) a floating support covered with a photocatalyst

6. BADANIA I WYNIKI

Przeprowadzono syntezę zol-żel materiałów modyfikowanych o czterech różnych stężeniach modyfikatora. Po syntezie otrzymane materiały prażono w trzech różnych temperaturach: 450, 600 i 900°C. Otrzymane materiały scharakteryzowano następującymi metodami: spektroskopia UV-vis, XRD oraz pomiar aktywności fotokatalitycznej względem różnych substratów. Efektem końcowym pracy było porównanie otrzymanych wyników i próba wykazania zależności między zawartością domieszki, strukturą krystalograficzną TiO_2 a aktywnością fotokatalityczną materiałów.

Domieszki wpływają na aktywność otrzymanych materiałów. W przypadku fotokatalitycznej degradacji 2,4-D najlepszym modyfikatorem okazał się WO_3 . Spośród materiałów modyfikowanych przy udziale związków wolframu najwyższą zdolnością degradacji herbicydu wykazały się materiały prażone w temperaturze 600°C. Materiały te również wykazały najwyższą aktywność w procesie utleniania kwasu tereftalowego do kwasu hydroksytereftalowego, co wskazuje na wysoką wydajność generowania rodników hydroksylowych. Pomiary XRD pokazały, iż próbki te są mieszaniną dwóch form krystalograficznych TiO_2 , anatazu i rutylu, przy czym zawierają one więcej anatazu. Materiały modyfikowane prażone w temperaturze 900°C wykazują najmniejszą zdolność degradacji herbicydu. Domieszkowanie TiO_2 związkami molibdenu powoduje obniżenie aktywności w procesie degradacji 2,4-D.

Najlepszym modyfikatorem w degradacji kwasu 2,4,5-trichloroctowego jest również WO_3 , jednak w tym przypadku obserwuje się także wzrost aktywności materiałów domieszkowanych molibdenem. Jest to wynik zaskakujący, ponieważ materiały te nie wykazywały zwiększonej zdolności generowania rodników hydroksylowych w porównaniu z niemodyfikowanym TiO_2 . Być może świadczy to o tym, że za degradację kwasu odpowiedzialne są również inne reaktywne formy tlenu.

Do najistotniejszych wniosków płynących z niniejszej pracy należy zaliczyć to, że dzięki domieszkowaniu TiO_2 udało się zwiększyć jego aktywność. Najlepszym z testowanych modyfikatorów okazał się WO_3 . Interesujący jest również fakt, że ścieżki degradacji dwóch herbicydów o bardzo podobnej budowie cząsteczki (rola rodników hydroksylowych w tym procesie) są znacząco różne.

PODZIĘKOWANIA

Praca magisterska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Macyka, prof. UJ oraz pod opieką dr Marty Buchalskiej w Zespole Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej, Zakład Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Praca została wykonana w ramach projektu "4G-PHOTO-CAT" (nr grantu: 309636) finansowanego przez 7 Program Ramowy przy współfinansowaniu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu: W13/7.PR/2013).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Bodzek, M. Rajca, *Ecol. Chem. Eng.*, 2012, **19**, 489.
- [2] S.E. Braslavsky, A.M. Braun, A.E. Cassano, A.V. Emeline, M.I. Litter, L. Palmisano, V.N. Parmon, N. Serpone, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 931.
- [3] B. Ohtani, B. Pal, S. Ikeda, *Catal. Surv. Asia*, 2003, **7**, 165.
- [4] www.scopus.com
- [5] www.worldwide.espacenet.com
- [6] www.bolarus.com.pl/TiO2
- [7] www.gorazdze.pl/pl/tiocem
- [8] A.D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*, Wyd. 2 (the „Gold Book”), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [9] O. Carp, C.L. Huisman, A. Reller, *Prog. Solid State Chem.*, 2004, **32**, 57
- [10] P.K.J. Robertson, *J. Cleaner Prod.*, 1996, **4**, 203.
- [11] R.J. Tayade, P.K. Surolia, R.G. Kulkarni, R.V. Jasra, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2007, **8**, 455.
- [12] *Matematyka. Fizyka. Chemia. Encyklopedia szkolna* PWN, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2013.
- [13] H. Yang, X. Li, A. Wang, Y. Wang, Y. Chen, *Chin. J. Catal.*, 2014, **35**, 140.
- [14] T. Van Gerven, G. Mul, J. Moulijn, A. Stankiewicz, *Chemical Engineering and Processing*, 2007, **46**, 781.
- [15] J.H. Braun, A. Baidins, R.E. Marganski, *Prog. Org. Coat.*, 1992, **20**, 105.
- [16] G.D. Sulka, J. Kapusta-Kołodziej, A. Brzózka, M. Jaskuła, *Electrochim. Acta*, 2010, **55**, 4359.
- [17] www.npic.orst.edu/factsheets/2,4-DTech.pdf
- [18] P.A. Lurker, F. Berman, R.W. Clapp, J.M. Stellman, *Environ. Res.*, 2014, **130**, 34.
- [19] W. Seńczuk, *Toksykologia współczesna*, PZWL, Warszawa, 2002.
- [20] C. Girardi, K.M. Nowak, O. Carranza-Diaz, B. Lewkow, A. Miltner, M. Gehre, A. Schäffer, M. Kästner, *Sci. Total Environ.*, 2013, **444**, 32.
- [21] J.-M. Fontmorin, S. Hugué, F. Fourcade, F. Geneste, D. Floner, A. Amrane, *Chem. Eng. J.*, 2012, **95-96**, 208.
- [22] T. Hirakawa, Y. Nosaka, *Langmuir*, 2002, **18**, 3247.
- [23] M. Long, W. Cai, Z. Wang, G. Liu, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, **420**, 71.
- [24] D. Beydoun, R. Amal, G. Low, S. McEvoy, *J. Nanopart. Res.*, 1999, **1**, 439.
- [25] B. Viswanathan, M. Aulice Scibioch, *Photoelectrochemistry. Principles and Practices*, Alpha Science International Ltd., Oxford U.K, 2014.
- [26] X. Liu, Y. Yan, Z. Da, W. Shi, C. Ma, P. Lv, Y. Tang, G. Yao, Y. Wu, P. Huo, Y. Yan, *Chem. Eng. J.*, 2014, **241**, 243.
- [27] www.4g-photocat.eu

Praca wpłynęła do Redakcji 2 września 2015

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2015

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2015 r. będzie wynosiła **220 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2014 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

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

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

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

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



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



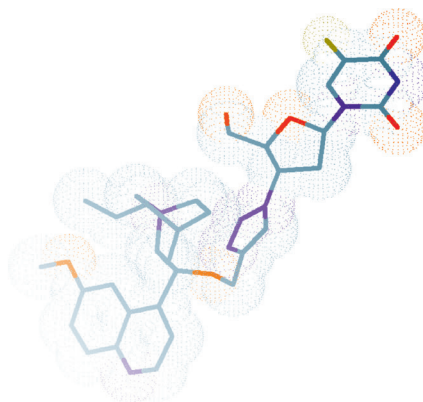
UNIWERSYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Opracowanie nowych leków przeciwrakowych jest kluczowym obszarem badań chemii medycznej. Na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu otrzymano szereg wysoce aktywnych związków cytotoksycznych o wysokim potencjale komercyjnym.

Dzięki projektowi **UDA-POIG.01.03.02-30-067/12**,
„Ochrona patentowa pochodnych azydonukleozydów o działaniu przeciwrakowym”
zarejestrowano 4 zgłoszenia patentowe w Europie (PCT), USA, Kanadzie, Japonii oraz Chinach, które oczekują na udzielenie patentów w w/w krajach.



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Koszty

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

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

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

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

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

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

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

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

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

• **Tabele, rysunki, fotografie**

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

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

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

• **Piśmiennictwo cytowane**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

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

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Badanie oddziaływania wankomycyny z fragmentem peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii | 491 |
| Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Barbara DMOCHOWSKA, Janusz MADAJ: Peptydoglikan – budowa, rola biologiczna oraz synteza | 513 |
| Maria PALUCH: Swobodna powierzchnia wody i jej fizykochemiczne właściwości | 541 |
| „Horyzonty Nauki 2015 – Forum Prac Dyplomowych” | 559 |
| Horyzonty Nauki | |
| Krzysztof BARTYZEL: Przełączniki molekularne: rodzaje i zastosowania | 561 |
| Sofia LENDOR: Charakterystyka zażyciowych i pośmiertnych przemian karbamazepiny oraz wybranych rodzajów alternatywnego materiału biologicznego na potrzeby analiz toksykologiczno-sądowych . | 585 |
| Sabina OŻÓG: Fotokatalityczna degradacja herbicydów – nowe katalizatory na bazie TiO ₂ | 605 |
| Informacje | 617 |

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

| |
|---|
| Zbigniew GALUS: Badania kulometryczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego |
| Robert KONCKI: Enzymy w chemii analitycznej |
| Magdalena MAJ-ŻURAWSKA, Andrzej LEWENSTAM, Adam HULANICKI: Elektrody jonoselektywne czułe na jony magnezowe w badaniu specjacji magnezu w organizmie ludzkim |
| Agata MICHALSKA-MAKSYMIOUK, Krzysztof MAKSYMIOUK: Jonoselektywne sensory potencjometryczne i optyczne: podobne materiały konstrukcyjne, różne możliwości analityczne |
| Ewa Bulska, Marcin WOJCIECHOWSKI: Zastosowanie spektrometrii atomowej i spektrometrii mas w badaniu specjacji chemicznej |
| Sylwia DRAMIŃSKA, Jan F. BIERNAT, Renata BILEWICZ: Oznaczanie tlenu: od metody Winklera do czujników enzymatycznych |
| Luiza KĘPA, Joanna THEN-OBLUSKA, Marianna OTMIANOWSKA, Barbara WAGNER: Analiza rozmieszczenia pierwiastków w badaniach archeometrycznych z zastosowaniem mikropróbkowania laserowego w spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej |
| Beata KRASNODĘBSKA-OSTRĘGA, Joanna KOWALSKA, Katarzyna KIŃSKA, Monika SADOWSKA, Ewa BIADUŃ: Chemia analityczna w badaniu i ochronie środowiska |
| Anna ZAWADZKA, Zbigniew CZARNOCKI: Inhibitory cholinioesteraz w terapii choroby Alzheimera |
| Arkadiusz CIESIELSKI, Tadeusz Marek KRYGOWSKI, Michał Ksawery CYRAŃSKI: Historyczny rozwój koncepcji aromatyczności |
| Julita MALEJKO, Beata GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ: Nanosrebro: zastosowanie, migracja i metody oznaczania |
| Łukasz MARCINKOWSKI, Adam KŁOSKOWSKI, Jacek NAMIEŚNIK: Nowe rozwiązania metodyczne w zakresie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej |
| Janina KOPYRA: Oddziaływanie elektronów z cząsteczkami o biologicznym znaczeniu |
| Ewelina TOMECKA, Katarzyna TOKARSKA, Elżbieta JASTRZĘBSKA, Michał CHUDY, Zbigniew BRZÓZKA: Inżynieria komórkowa w systemach <i>Lab-on-a-chip</i> |
| Iwona UFNALSKA, Magdalena Zofia WILOCH, Małgorzata WESOŁY, Paweł ĆWIK, Marcin ZABADAJ, Patrycja CIOSEK, Urszula Elżbieta WAWRZYŃIAK, Wojciech WRÓBLEWSKI: Zastosowanie metod elektrochemicznych w bioanalizie: wybrane zagadnienia |
| Bogusław BUSZEWSKI, Paweł POMASTOWSKI: Wpływ heterogeniczności powierzchni biokolloidów na ich rozdzielanie elektroforetyczne |