

WIADOMOSCI *chemiczne*



2010

(64)

1-2

(751-752)

**ZWIĄZKI METALOORGANICZNE
W SYNTEZIE FOSFONIANÓW**

**METALLOORGANIC COMPOUNDS
IN SYNTHESIS OF PHOSPHONATES**

Monika Prokopowicz, Piotr Młynarz, Paweł Kafarski

*Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
e-mail: monika.prokopowicz@pwr.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Związki litoorganiczne w syntezie fosfonianów
2. Związki magnezoorganiczne w syntezie fosfonianów
3. Zastosowanie związków miedzioorganicznych
4. Zastosowanie związków cynko- i kadmoorganicznych
5. Związki metaloorganiczne w reakcjach przegrupowania
6. Zastosowanie związków metaloorganicznych w syntezie innych organicznych pochodnych fosforu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski urodził się w roku 1949 w Gdańsku. Studiował chemię na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, w 1977 roku uzyskał stopień doktora na macierzystym wydziale za pracę wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Mastalerza. Przewód habilitacyjny zakończył w roku 1990. Tytuł profesora nauk chemicznych otrzymał w roku 2000. Od 1992 roku kieruje Zakładem Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Sprawuje lub sprawował wiele funkcji kierowniczych: Dziekan oraz Prodziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, Zastępca Dyrektora Instytutu Chemii Uniwersytetu Opolskiego, Dyrektor Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Kierownik Zespołu Chemii Bioorganicznej w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej, Kierownik Zakładu Chemii Ekologicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Od wielu lat jest uczestnikiem prestiżowych polskich i zagranicznych stowarzyszeń zawodowych takich jak: Polskie Towarzystwo Chemiczne, European Peptide Society, International Council of Main Chemistry Group, American Chemical Society. Opublikował ponad dwieście pięćdziesiąt prac naukowych oraz był promotorem piętnastu prac doktorskich. Jego zainteresowania naukowe obejmują szeroko pojęte zagadnienia chemii związków aminofosfonowych oraz chemię ekologiczną.



Dr Piotr Młynarz urodził się w 1973 roku w Oleśnicy. Studiował na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie ukończył studia magisterskie oraz doktoranckie. W roku 2001 obronił pracę doktorską zatytułowaną „*Wpływ reszty histydynowej na specyfikę oddziaływań w metalopeptydach*”, którą wykonywał pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Kozłowskiego. Po ukończeniu studiów odbywał staż naukowy na Uniwersytecie w Sienie we Włoszech. Od 2002 roku pracuje w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej, gdzie jest zatrudniony na stanowisku adiunkta. Jego zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii organicznej i supramolekularnej związków fosfonowych i aminofosfonowych, a także wykorzystania spektroskopii NMR i MS w badaniu oddziaływań międzycząsteczkowych.



Mgr inż. Monika Prokopowicz urodziła się w 1981 roku w Oleśnicy. W 2005 roku ukończyła studia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, gdzie kontynuuje studia doktoranckie pod kierunkiem Prof. Pawła Kafarskiego. Tematem rozprawy doktorskiej są „*Fosfoniany jako potencjalne terapeutyki w chorobie Parkinsona*”. W tym czasie ukończyła także studia podyplomowe w Akademii Leona Koźmińskiego w Warszawie „*Prowadzenie i monitorowanie badań klinicznych*”. Jej zainteresowania naukowe to chemia medyczna, komputerowe projektowanie leków, synteza związków fosforoorganicznych oraz poszukiwanie skutecznych inhibitorów enzymatycznych istotnych w leczeniu chorób cywilizacyjnych.

ABSTRACT

Phosphonates constitute a class of compounds with variety of applications in organic synthesis (as reagents in the Horner-Wadsworth-Emmons reaction), medicine (biologically active compounds) or industry (as e.g. water softeners) [1, 2]. Therefore, the original synthetic methods were developed in order to obtain phosphonates possessing vast and desired properties [3].

This work focuses on the methods employing metalloorganic compounds to a new C-P bond formation. This approach is achieved in most cases by substitution at a trigonal phosphorus atom. The reactions are characterized by high yields and lack of side-products what facilitates the isolation and purification of the target compounds. These benefits are provided mainly by application of lithium and magnesium derivatives.

The other method involves modification of a ready molecule skeleton. The procedures utilizing a new C-C or C-halide bond formation are commonly used. Suitable for these synthetic routes are such soft nucleophiles as copper- zinc- and cadmium-organic compounds.

Additionally, examples of an application of mercury-, lead- and aluminium-organic reagents to the synthesis of other organic phosphorus compounds are discussed. Although their use is rather marginal, they appeared to be crucial for specific and original syntheses.

Keywords: phosphonates, metalloorganic compounds, phosphorus

Słowa kluczowe: fosfoniany, związki metalloorganiczne, fosfor

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	– grupa acetylowa
Alk	– grupa alkilowa
Ar	– grupa arylowa
Bn	– grupa benzylowa
Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Bu	– grupa butylowa
CyAlk	– grupa cykloalkilowa
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyformamid
Et	– grupa etylowa
LDA	– diizopropylamidek litu
LiHDMS	– bis(trimetylosililo)amidek litu
Me	– grupa metylowa
P(O)X ₃	– halogenek fosforu
Ph	– grupa fenylowa
Pr	– grupa propylowa
PX ₃	– trihalogenek fosforu
R	– podstawnik alkilowy lub arylowy
Tf	– grupa trifluorometylosulfonowa
THF	– tetrahydrofuran
TMEDA	– tetrametyloetylenodiamina
TMS	– grupa trimetylosililowa
TMSCl	– chlorotrimetylosilan
Ts	– tosyl (grupa <i>p</i> -toluenosulfonowa)
X	– chlorowec (Cl, Br, I)

WSTĘP

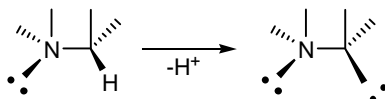
Popularne metody syntezy fosfonianów – takie jak Abuzowa i Michaelisa-Beckera zawodzą w przypadkach, gdy celem otrzymania jest arylofosfonian. Spowodowane jest to niewielką reaktywnością chlorowcoarenów w reakcjach podstawienia nukleofilowego. Co prawda, przez zastosowanie wysokiej temperatury można wymusić podstawienie, zwłaszcza gdy nukleofil fosforowy posiada wysoką aktywność (np. sól fosforynu dietylowego), jednak z drugiej strony w takich warunkach mogą nastąpić reakcje uboczne lub wręcz rozkład produktu.

Podstawienie chlorowca w wyniku oddziaływania $P(O)X_3$ z karboanionem prowadzi do powstania nowego wiązania C–P, stanowi więc ważne uzupełnienie metody Arbuzowa i podobnych procedur. Podstawą tej metody jest wykorzystanie związków metaloorganicznych jako głównych reagentów. Różnorodność pod względem struktury i reaktywności związków posiadających wiązanie metal–węgiel sprawia, że są one często wykorzystywane do otrzymywania połączeń fosforoorganicznych. Największe znaczenie mają związki rtęcio-, ołowio-, glino-, kadmo-, cyno- magnez- i litoorganiczne, przy czym w syntezie fosfonianów używa się głównie trzech ostatnich. W pracy tej spośród licznych istniejących metod wybrano głównie te, które są uniwersalne i za pomocą których uzyskuje się największą wydajność.

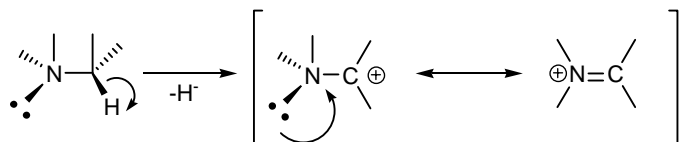
1. ZWIĄZKI LITOORGANICZNE W SYNTEZIE FOSFONIANÓW

Związki litoorganiczne należą do połączeń charakteryzujących się wysoką reaktywnością i często są wyjściowymi reagentami do uzyskiwania innych pochodnych metaloorganicznych [4].

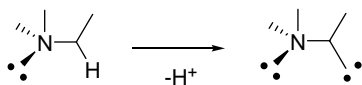
Stabilność tych związków zależy głównie od hybrydyzacji atomu węgla, z którym lit tworzy wiązanie oraz od rodzaju atomu w pozycji 2. Proste układy, w których atom litu jest związany z atomem węgla o hybrydyzacji sp^3 , jak ma to miejsce w pochodnych alkilowych, wykazują bardzo dużą reaktywność i małą stabilność. Jeżeli atom węgla, na którym w wyniku litowania tworzy się karboanion, posiada hybrydyzację sp^3 i znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie heteroatomu dysponującego wolną parą elektronową, to układ taki nie jest stabilny z uwagi na oddziaływanie odpychające dwóch wolnych par elektronowych umiejscowionych na sąsiadujących atomach:



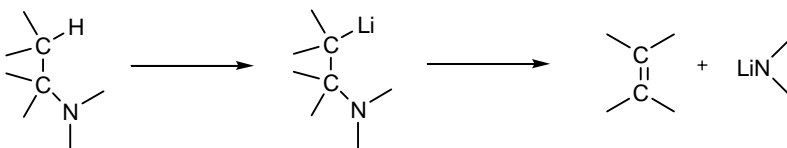
W takim układzie preferowana będzie utrata anionu wodorkowego:



Z tego powodu w aminach łatwiej jest oderwać anion wodorkowy niż proton z sąsiadującego z atomem azotu węgla. Jeżeli atom ten posiada hybrydyzację sp^2 wtedy preferencyjnie zachodzi 2-litowanie. Wolne pary elektronowe leżą wówczas w różnych płaszczyznach i ich niekorzystne oddziaływanie jest zredukowane.



Możliwe jest również 3-litowanie układów zawierających heteroatom. Trudnością, jaką napotyka się w tym procesie, jest tendencja utworzonego karboanionu do ulegania reakcji eliminacji z utworzeniem olefiny:

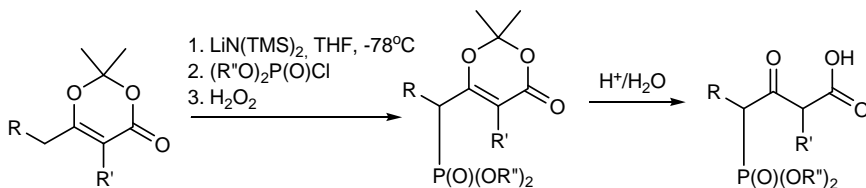


Trend ten maleje wraz ze wzrostem wewnętrznego naprężenia w tworzącym się następczo alkenie.

Spośród związków metaloorganicznych, to właśnie litopochodne posiadają najszersze spektrum zastosowań w syntezie fosfonianów.

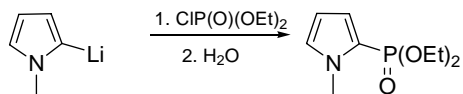
Związki litoorganiczne są silnymi odczynnikami alkilującymi i arylicyjnymi stosowanymi do tworzenia nowego wiązania C–P. Niestety, proste, niestabilizowane rezonansowo litopochodne (np. alkilolit) znajdują zastosowanie jedynie w przypadku, gdy reagent fosforowy posiada tylko jedno aktywne centrum zdolne do tworzenia wiązania C–P [5].

Znacznie szersze jest wykorzystanie soli litowych stabilizowanych anionów organicznych w reakcji ze związkami zawierającymi wiązanie P–X. W ten sposób można otrzymywać nie tylko fosfoniany [6], ale i fosfinitlenki [7] oraz fosforowe pochodne cyklopentadienyłowe [8] – (więcej w rozdz. 7).

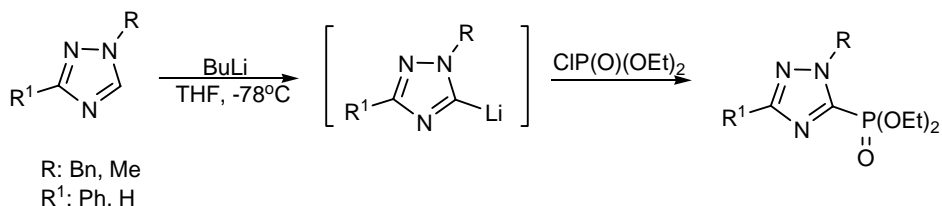


Litowanie może być dogodną metodą otrzymywania aromatycznych fosfonianów zawierających azot jako heteroatom.

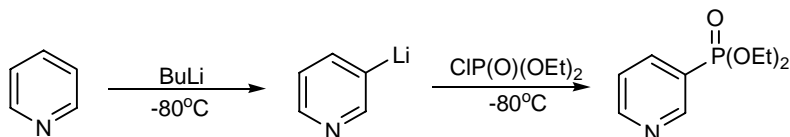
Przykładowo, opracowano dogodną metodę syntezy fosfonowych pochodnych pirolu wykorzystując łatwość, z jaką ulega litowaniu pozycja 2 w układach heteroaromatycznych. *N*-Metylopirol przekształcony w 2-litopochodną i poddany działaniu chlorofosforanu dietylowego tworzy 2-pirolilofosfonian dietylowy [9].



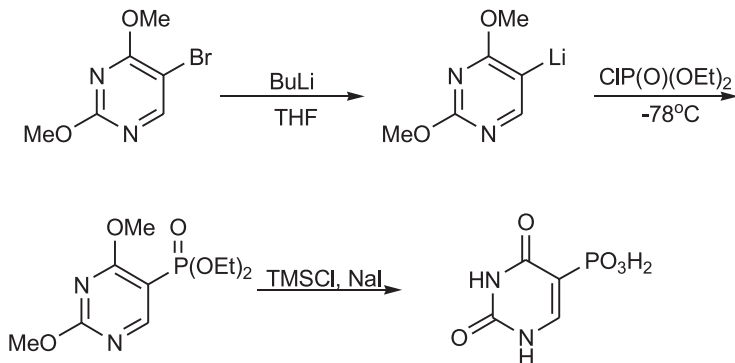
W analogiczny sposób otrzymano serię pochodnych 1,2,4-triazolu [10, 11] z wydajnością 44–72%.



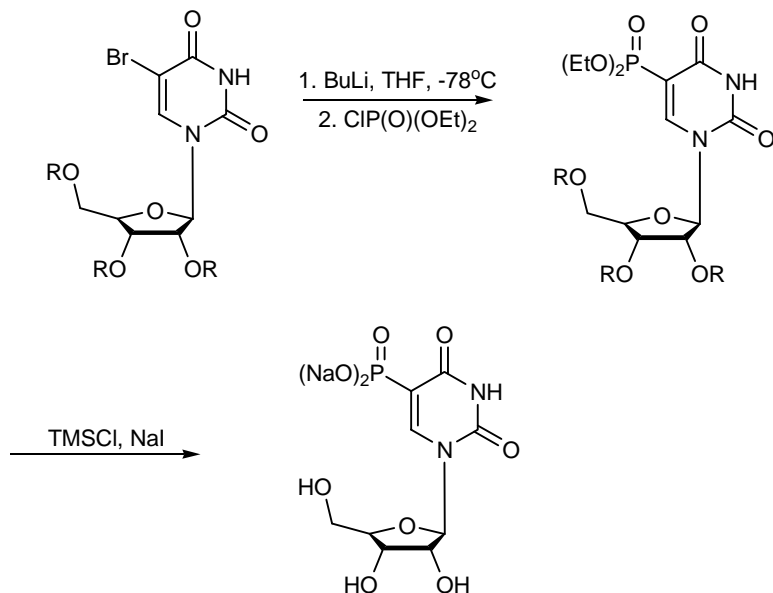
Z kolei litowanie pirydyny w pozycji C-3 i reakcja z chlorofosforynem dietylowym prowadzi do 3-pirydylofosfonianu (wydajność 36%) – [12].



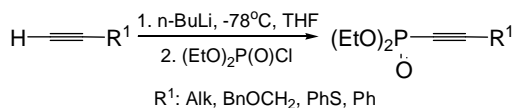
Ponadto, wykorzystując reakcję litowania-dehalogenowania można uzyskać fosfonowe pochodne zasady pirymidynowej – uracylu [13].



W podobny sposób otrzymano analog nukleozydu posiadający fragment uracylowy związany z resztą cukrową [14].

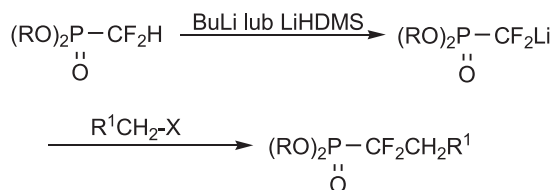


W niskiej temperaturze alkynylolit jest użytecznym odczynnikiem do syntezy 1-alkynylofosfonianów. Alkiny ulegają reakcji metalacji pod wpływem BuLi w THF, w obniżonej temperaturze, a utworzony acetylenek litu reaguje w następnym etapie z chlorofosforanem w tych samych warunkach. Taka procedura minimalizuje uboczne reakcje prowadząc do wysokich i odtwarzalnych wydajności w syntezie tej grupy związków [15–29].



Przykładowo synteza etynylofosfonianu dietylowego została opracowana z zastosowaniem bis(diizopropylamino)boracetylenku litu jako syntetycznego ekwiwalentu acetylenku litu. Po reakcji bis(diizopropylamino)boracetylenku litu z chlorofosforanem dietylowym w THF w temperaturze -78°C , grupę ochronną usuwa się poprzez hydrolizę w rozcieńczonym roztworze wodnym kwasu solnego [30–32].

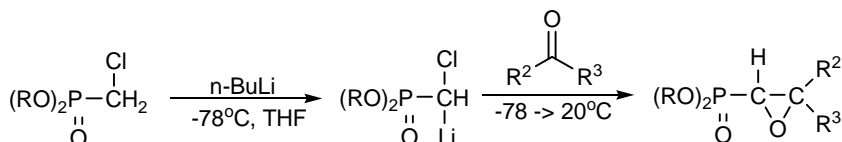
1-Lito-1,1-difluorometylofosfoniany są najczęściej otrzymywane *in situ* z difluorometylofosfonianów w obecności LDA lub LiHDMS. Z uwagi na ich niską stabilność i słabe właściwości nukleofilowe [33–36] te wysoce deaktywowane karboaniony wymagają obecności silnego elektrofila (1-rzędowych bromków [37–40] i jodków alkilowych [25, 41], benzyłowych [42] lub allilowych [37–40]) w celu uzyskania satysfakcjonujących rezultatów.



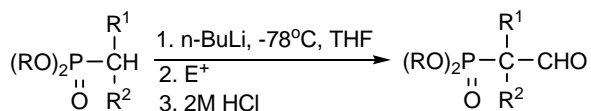
X: Cl, Br, I, OTf, OTs, OAc

Więcej wiadomości na temat zastosowania związków metaloorganicznych do otrzymywania fluorowanych fosfonianów opisano w literaturze przeglądowej [3(j)].

Gdy chlorometylofosfoniany dialkylowe są metalowane z użyciem *n*-BuLi w temperaturze -78°C , a następnie poddawane reakcji ze związkiem karbonylowym (aromatycznym, alifatycznym, cyklicznym) otrzymuje się 1,2-epoksyalkilofosfoniany z wydajnością 50–90% bez śladów produktów ubocznych [43, 44].

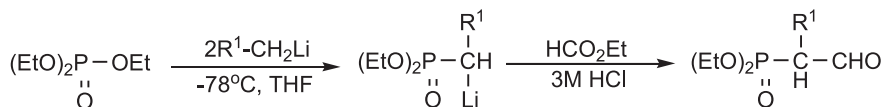


Przekształcenie alkilofosfonianów w 1-litopochodną, poddaną następnie reakcji z DMF lub *N*-formylmorfoliną w niskiej temperaturze prowadzi do przejściowej formy β -aminoalkoksydowej. W roztworze kwaśnym ulega ona przemianom do 1-formyloalkilofosfonianu z wydajnością ilościową [45, 46]. Podobny rezultat uzyskuje się używając HCO_2Et jako odczynnika formylującego. Dzięki tej metodzie można uzyskać pochodne alkilowe [47], allilowe [48], benzylowe i tioetylo-metylo- [49].



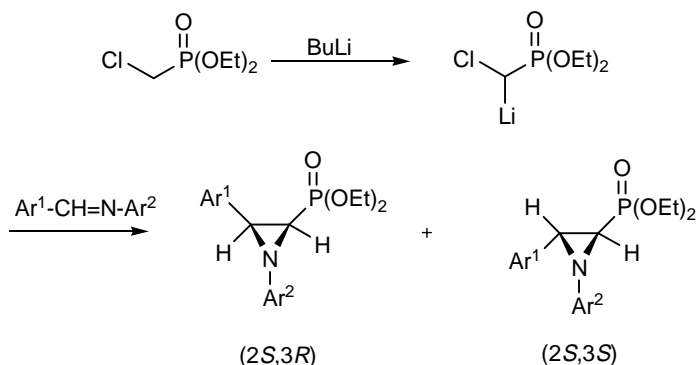
E^+ : HCO_2Et , Me_2NCHO , *N*-formylmorfolina

Fosforan trietylowy można łatwo przekształcić w 1-formyloalkilofosfonian bez izolowania produktów przejściowych z całkowitą wydajnością 90–94% [47, 50–52].



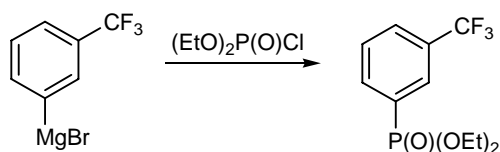
R^1 : Me, Et, *n*-Pr, *i*-Pr, *n*-Bu, *i*-Bu

Wykorzystując łatwość metalowania pozycji 2 w alkilofosfonianach, wychodząc z 1-chloro-1-litoalkilofosfonianu i aromatycznej iminy opracowano stereoselektywną metodę syntezy fosfonoazyrydyn [53, 54]. Powstający w przewodzie (95%:5%) izomer *trans* można łatwo oddzielić od formy *cis* na drodze chromatografii kolumnowej.

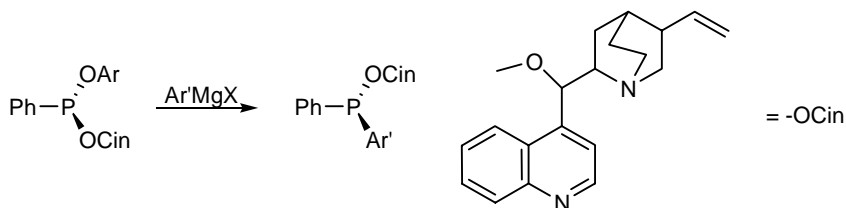


2. ZWIĄZKI MAGNEZOORGANICZNE W SYNTEZIE FOSFONIANÓW

Związki Grignarda służą do otrzymywania fosfonianów arylowych i alkilowych w reakcji z chlorofosforinami lub chlorofosforanami dialkilowymi. Problemem jednak jest uzyskanie odpowiedniej selektywności reakcji, ponieważ chlorofosforany i chlorofosforyny posiadają dwa reaktywne w stosunku do związków metaloorganicznych wiązania: P-Cl i P-O [55]. Do uzyskania odpowiedniej selektywności wykorzystuje się labilność wiązania P-Cl [56].

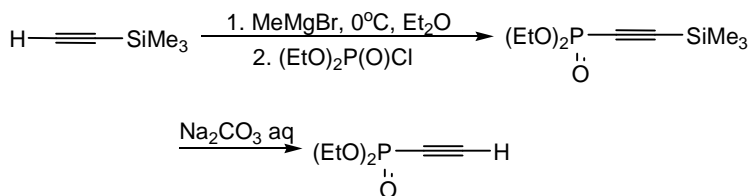


Podstawienie w estrach mieszanych arylo-alkilowych kwasów fosfinowych można również przeprowadzać z dużą selektywnością wykorzystując fakt większej reaktywności estrów fenoli, które są lepszymi grupami opuszczającymi [57].

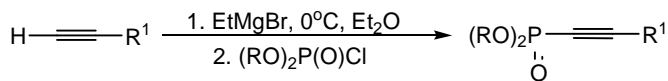


Alternatywną metodą syntezy alkinylofosfonianów jest rozwiązanie polegające na wykorzystaniu reaktywności bromków (najczęściej) alkynylomagnezowych w stosunku do chlorofosforanu dialkylowego.

W przypadku pochodnych acetyleny, grupa trimetylosililowa jest stosowana w celu zabezpieczenia terminalnego atomu wodoru [58].



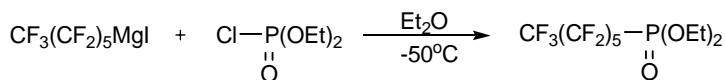
Co więcej, zastosowanie tej metody do syntezy wyższych homologów acetyleny daje równie dobre efekty. Nie trzeba wówczas stosować grup ochronnych, a bromek alkynylomagnezowy reaguje z chlorofosforanem dietylowym (stosowanym najczęściej) w temp. 0 lub -30°C , w zależności od użytego rozpuszczalnika [59–63]. Wydajność wynosi zwykle 50–76%, przy czym zależy ona od kolejności dodawania reagentów.



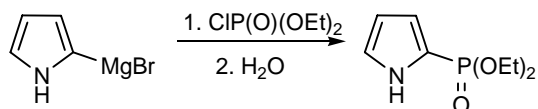
R: Alk, Ar

R¹: Alk, CyAlk, Ar

Jodek perfluoroheksylomagnezowy generowany *in situ* z jodku perfluoroheksylowego i jodku fenylomagnezowego reaguje z chlorofosforanem dietylowym w temperaturze -50°C dając perfluoroheksylofosfonian dietylowy z wydajnością 56% [64]. Jest to przykład ogólnej metody otrzymywania perfluorowanych alkilofosfonianów.



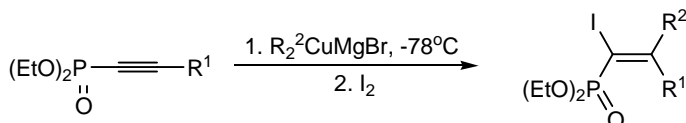
Synteza heterocyklicznych fosfonianów możliwa jest także z użyciem odczynników Grignarda. Wspomniano wyżej o reakcji 2-lito-*N*-metylopirolu z chlorofosforanem dietylowym. W analogiczny sposób reaguje bromek 2-pirolilomagnezowy tworząc 2-pirolilofosfonian dietylowy z wydajnością 30% [9].



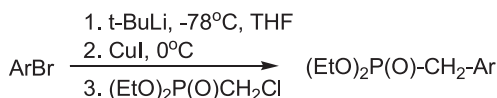
3. ZWIĄZKI MIEDZIOORGANICZNE

Mimo że związki organiczne miedzi nie są używane do syntezy wiązania C–P, to są one bardzo cenne jako odczynniki sprzęgające służące do funkcjonalizowania cząsteczek fosfonianów.

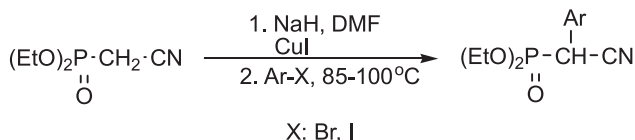
Traktując 1-alkinylofosfoniany miedzianami w niskiej temperaturze, a następnie działając na produkt przejściowy jodem uzyskuje się α -jodowinylofosfoniany z wydajnością 97–98% [65, 66].



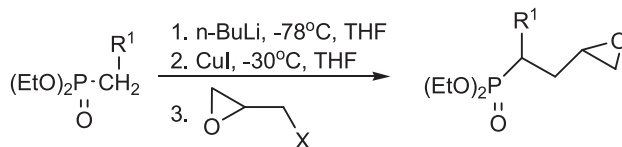
Pochodne benzylofosfonowe otrzymuje się z chlorometylofosfonianów przez sprzęganie ze związkami miedziorganicznymi uzyskanymi *in situ* z bromków arylowych [67]. Zastąpienie chlorometylofosfonianu jodopochodną powoduje spadek wydajności z 60% do 31%.



Arylowanie można również przeprowadzać wykorzystując łatwość w tworzeniu karboanionu w 1-cyjanometylofosfonianach i sprzęgając go z halogenkiem arylowym w obecności CuI [68, 69].



Epihalohydryny służą do bezpośredniego wprowadzania funkcji epoksydowej do cząsteczki fosfonianu po uprzednim wygenerowaniu karboanionu w pozycji 1. Metoda ta daje umiarkowane wydajności (30–47%) [70].

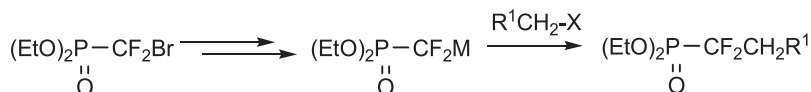


Atrakcyjną metodą syntezy 2-oksoalkilofosfonianów jest chemoselektywne acylowanie α -metalowanych alkilofosfonianów za pomocą chlorków kwasowych. W metodzie tej produktem przejściowym jest 1-litopochodna, która z uwagi na wysoką

4. ZWIĄZKI KADMO- I CYNKOORGANICZNE

Z powodu niskiej reaktywności, związki organiczne cynku i kadmu nie znalazły szerokiego zastosowania w syntezie fosfonianów. Zazwyczaj są one stosowane do tych samych celów, co związki Grignarda jednak reakcje zachodzą najczęściej z mniejszą wydajnością, a produkty są trudniejsze do wyodrębnienia.

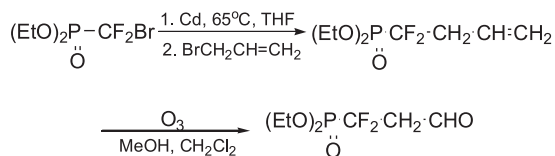
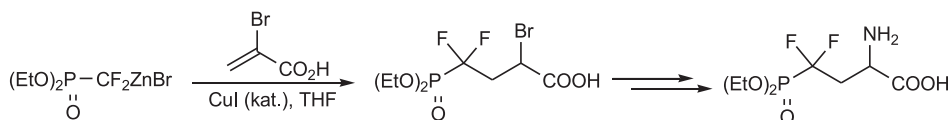
Związków kadmo- i cynkoorganicznych używa się także czasem jako odczynników sprzęgających, jak ma to miejsce w syntezie funkcjonalizowanych alkilofosfonianów [101].



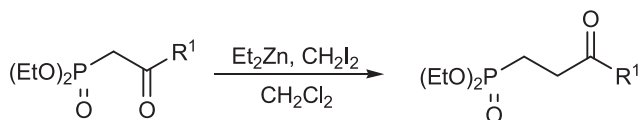
M: ZnBr, CdBr
X: Cl, Br, I, OTf

Wydajność reakcji nie przekracza 64%, a produktowi głównemu towarzyszą znaczne ilości zanieczyszczeń.

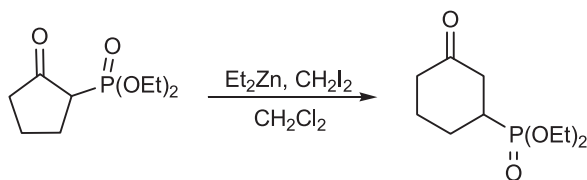
Poniższe reakcje obrazują obszar zastosowań tej grupy związków [102–106].



Dietylocynk stosowany łącznie z dijdometanem przekształcają 2-ketofosfoniany w 3-ketofosfoniany na drodze insercji grupy metylenowej (z pośrednim etapem wiodącym przez karbenoid) [107].

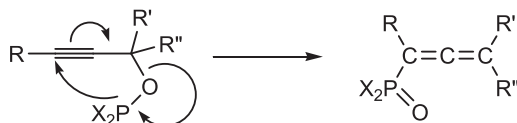


R¹: Me, Ph

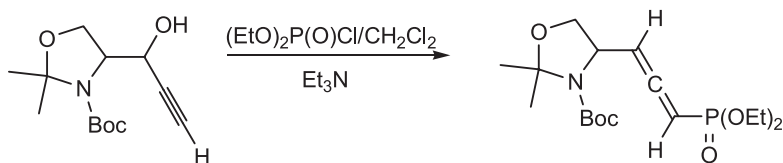


5. ZWIĄZKI METALOORGANICZNE W REAKCJACH PRZEGRUPOWANIA

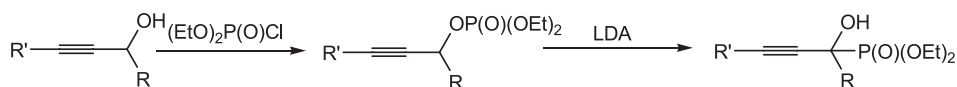
W ostatnich latach rosnące znaczenie zyskuje zastosowanie w syntezie związków fosforoorganicznych przegrupowania alkoholu propargilowego [108]. Przeprowadzając reakcję alkoholu propargilowego z PCl_3 w obecności amin trzeciorzędowych uzyskuje się allenylofosfoniany [109]. Powstawanie tego produktu związane jest z przegrupowaniem propargilofosfonianu zachodzącym w niektórych przypadkach nawet podczas przechowywania związku w temperaturze pokojowej [110].



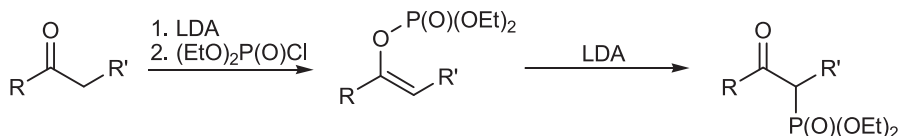
Poniżej podano przykład zastosowania alkoholu propargilowego w reakcji otrzymywania allenylofosfonianu [111].



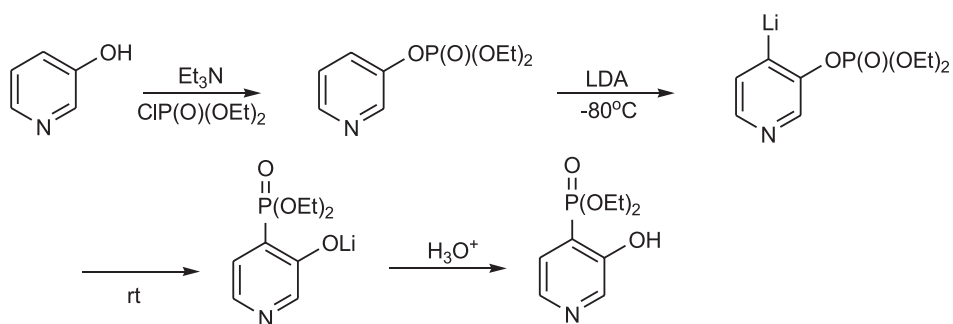
Ponadto, estry propargilowe mogą być dobrymi substratami do otrzymywania hydroksyfosfonianów. Przegrupowanie estrów zachodzi pod wpływem silnych zasad, na przykład LDA [112].



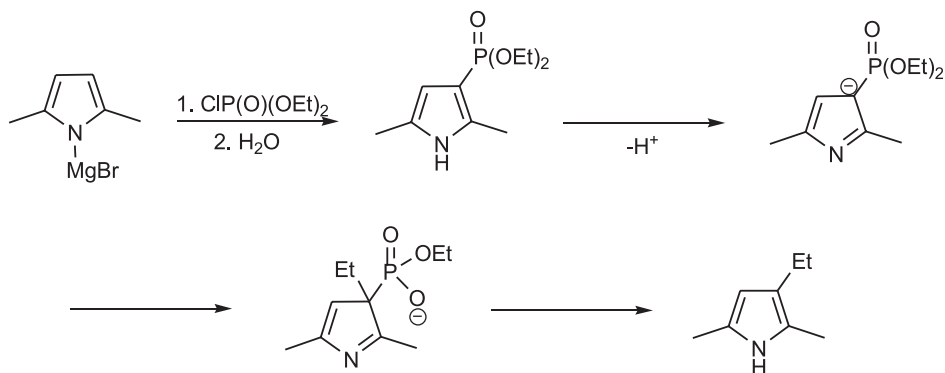
Kolejnym typem przegrupowania, w wyniku którego otrzymuje się fosfoniany, jest przegrupowanie fosforanowo-fosfonianowe. Przykładem może być zastosowanie fosforanów winylowych, na przykład produktów reakcji Perkowa, które pod wpływem LDA przegrupowują się do β -ketofosfonianów [113].



Jeżeli substratem tej reakcji jest fosforan fenolu, to produktem przegrupowania fosforanowo-fosfonianowego będzie odpowiedni 2-hydroksyfosfonian [114].

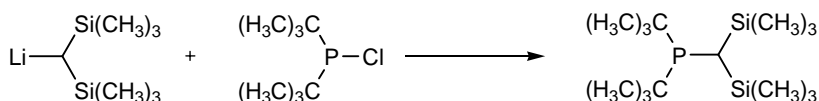


Zablokowanie pozycji 2 i 5 w pierścieniu pirolowym przez wprowadzenie dwóch grup metylowych nie prowadzi do utworzenia wiązania P–N, ale do podstawienia przy atomie węgla C-3 i następczej eliminacji grupy fosfonowej [9].

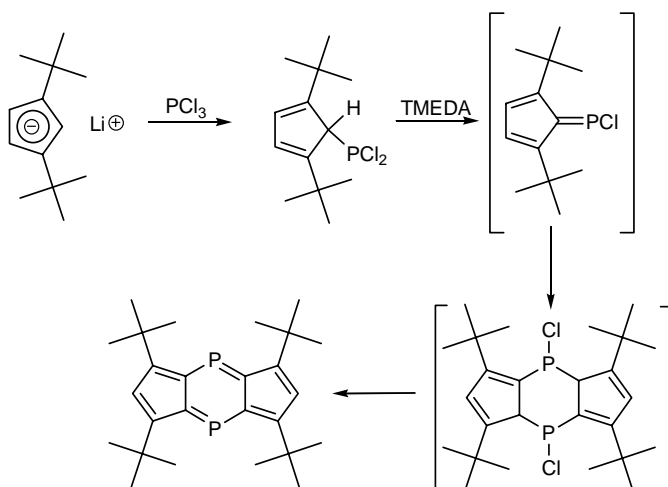


6. ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW METALOORGANICZNYCH W SYNTEZIE INNYCH ORGANICZNYCH POCHODNYCH FOSFORU

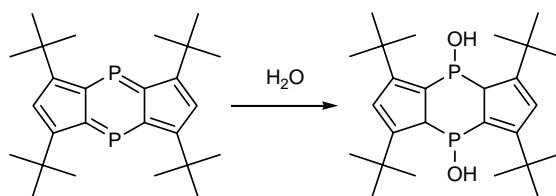
Jak wskazano wyżej, związki litoorganiczne znajdują szerokie zastosowanie w syntezie fosfonianów. Jednak posiadają one też znaczenie w otrzymywaniu innych związków fosforoorganicznych. Bardzo wysoka reaktywność pochodnych litoorganicznych sprawia, że selektywność reakcji spada wraz z ilością grup mogących ulec podstawieniu w drugim reagentcie. Litowane silany służą do otrzymywania fosfin [115–117].



Sole litowe, w których aniony są stabilizowane (np. pochodne ditianu) także służą do podstawienia atomu chlorowca w związkach typu PX_3 [118] i otrzymywania szerokiej gamy pochodnych fosforoorganicznych.



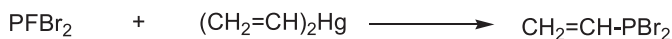
Uzyskany trójpierścieniowy produkt posiada ciekawe właściwości, gdyż reprezentuje układ antyaromatyczny. Środkowy pierścień bardzo łatwo przyłącza dwie cząsteczki wody tworząc bis-drugorzędowy fosfinitlenek.



Z uwagi na wysoką toksyczność, związki rtęcioorganiczne nie znalazły praktycznego zastosowania w chemii organicznej fosforu. Są one używane tylko wtedy, gdy inne metody zawodzą. W wyniku reakcji dialkilorrtęci z PX_3 tworzą się alkiłochlorowcofosfiny [119].



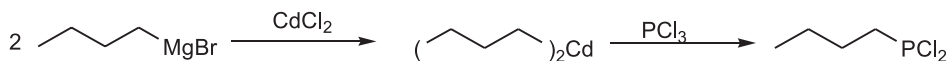
W przypadku, gdy do atomu fosforu przyłączone są różne atomy chlorowców, można selektywnie wykorzystać ich różną reaktywność do otrzymania pożądanego produktu. Podejście to zyskało praktyczne znaczenie w reakcji przyłączania reszt olefinowych do atomu fosforu [120]. W ten sposób otrzymuje się winylodibromofosfinę z dibromofluorofosfiny:



Związki ołowioorganiczne posiadają podobne zastosowanie jak związki organiczne rtęci [121] i stanowią alternatywę dla połączeń rtęciowych pomimo tego, że również charakteryzują się podobnym stopniem toksyczności. Przykładem reakcji z zastosowaniem związku ołowioorganicznego jest synteza etylodichlorofosfiny z PCl_3 i tetraetylołowiu.



Dialkilocadm, dzięki mniejszej reaktywności niż związki Grignarda (z których jest otrzymywany), wykazuje większą selektywność w reakcjach z chlorofosfinami [122].



Związki cynoorganiczne znalazły zastosowanie do tworzenia wiązania C–P w układach, gdzie atom węgla α posiada hybrydyzację sp^2 lub sp [123].

Jako alternatywę do odczynników Grignarda stosuje się związki glinoorganiczne charakteryzujące się większą selektywnością w reakcjach z pochodnymi posiadającymi jednocześnie wiązanie P–X, jak i P–O. Glianoacetylenki litu służą do sprzęgania grupy fosfonowej i reszty alkinylowej [124].



Związki glinoorganiczne służą także do wprowadzaniu grupy arylowej. Reakcje między PCl_3 a arenami przebiegają w obecności chlorku glinu, zgodnie z mechanizmem reakcji Friedla-Craftsa.

PODSUMOWANIE

Zaskakuje stosunkowo niewielka liczba doniesień o zastosowaniu związków metaloorganicznych w syntezie wiązania C–P. Są to raczej reakcje uzupełniające popularne metody Arbuzova i Michealisa-Beckera. Tym niemniej, niektórych fosfonianów nie sposób otrzymać nie stosując związków metaloorganicznych. Spośród nich największe znaczenie w syntezie fosfonianów i tworzeniu nowego wiązania C–P posiadają związki Grignarda [125] i litoorganiczne. Jednak ze względu na dużą reaktywność obu grup odczynników, synteza monopodstawionych pochodnych przez podstawienie zachodzące na atomie fosforu (np. z użyciem $PX_2(OR)$, PX_3 itp.) jest bardzo trudna lub praktycznie niemożliwa [126]. Dlatego w takich przypadkach zastępuje się je mniej reaktywnymi – a przez to bardziej selektywnymi – związkami glino-, kadmo- lub cynkoorganicznymi. Te ostatnie znalazły zastosowanie głównie do funkcjonalizowania fosfonianów przez tworzenie nowego wiązania C–C. Natomiast miedziany stosuje się jako reagenty sprzęgające nawet w reakcjach z tak reaktywnymi odczynnikami jak chlorki acylowe.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 6177.
- [2] D. Redmore, *Chem. Rev.*, 1971, **71**, 315.
- [3] (a) S. Hannesian, Y.L. Bennani, Y. Herve, *SynLett*, 1993, 35; (b) D.Y. Kim, D.Y. Rhie *Tetrahedron* 1997, **40**, 13603; (c) C. Stevens, A. Verbeke, N. DeKimpe, *SynLett*, 1998, 180; (d) J. Motoyoshiya, K. Hirata, *Chem. Lett.*, 1988, 211; (e) A.M. Chollet-Gravey, L. Vo-Quang, Y. Vo-Quang, F.L. Goffic, *Synth. Commun.*, 1991, **21**, 1847; (f) M. Borloo, X.Y. Jiao, H. Wojtowicz, P. Rajan, K. Verbuggen, K. Augustyns, A. Haemers, *Synthesis*, 1995, 1074; (g) V. Roubaud, F. Le Moigne, A. Mercier, P. Tordo, *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1994, **86**, 39; (h) F. Le Moigne, P. Tordo, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3365; (i) K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens *Chem. Rev.* 2004, **104**, 6177; (j) V.D. Romanenko, V.P. Kukhar, *Chem. Rev.*, 1006, **106**, 3868.
- [4] (a) A.R. Katritzky, G.W. Rewcastle, J.N. Lam, S. Sengupta, *Prog. Heterocycl. Chem.*, 1989, **1**, 1; (b) A.R. Katritzky, S. Sengupta, *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem Sci)*, 1988, **100**, 187.
- [5] H.G. Gruetzmacher, H. Pritzkow, *Angew. Chem.*, 1991, **103**, 721.
- [6] R.K. Boeckman, T.M. Kamenecka, S.G. Nelson, J.R. Pruitt, T.E. Barta, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 2581.
- [7] (a) V.I. Kalchenko, D.M. Rudkevich, O.A. Aleksyuk, L.N. Markovskii, *Zh. Obshch. Khim.*, 1991, **61**, 2155; (b) C.M. Whitaker, K.L. Kott, R.J. McMahon, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 3499.
- [8] S. Schard, K. Hafner, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 3829.
- [9] C.E. Griffin, R.P. Peller, J.A. Peters, *J. Org. Chem.*, 1965, **30**, 91.
- [10] D.K. Anderson, J.A. Sikorski, D.B. Rietz, L.T. Pilla, *J. Heterocycl. Chem.*, 1986, **23**, 1257.
- [11] D.K. Anderson, D.L. Deuwer, J.A. Sikorski, *J. Heterocycl. Chem.*, 1995, **32**, 893.
- [12] D.J. Collins, J.W. Hetherington, J.M. Swan, *Aust. J. Chem.*, 1974, **27**, 1355.
- [13] T. Maruyama, Z. Taira, M. Horikawa, Y. Sato, M. Honjo, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 2571.
- [14] M. Honjo, T. Maruyama, M. Horikawa, J. Balzarini, E. De Clercq, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, **35**, 3227.

- [15] A.J. Rudinskas, T.L. Hullar, *J. Med. Chem.*, 1976, **19**, 1367.
- [16] S.D. L'vova, Y.P. Kozlov, V.I. Gunar, *Zh. Obshch. Khim.*, 1977, **47**, 1251.
- [17] S.V. Stepanova, S.D. L'vova, V.I. Gunar, *Bioorg. Khim.*, 1978, **4**, 682; *Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 1978, **4**, 498.
- [18] A.J. Poss, R.K. Belter, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 4810.
- [19] R.M. Acheson, P.J. Ansell, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1987, 1275.
- [20] A. Knierzinger, A. Grieder, P. Schonholzer, *Helv. Chim. Acta*, 1991, **74**, 517.
- [21] S.M. Ruder, B.K. Norwood, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 3473.
- [22] R.W. Saalfrank, A. Welch, M. Haubner, U. Bauer, U. Liebigs Ann., 1996, 171.
- [23] J.M. Gil, J.W. Sung, C.P. Park, D.Y. Oh, *Synth. Commun.*, 1997, **27**, 3171.
- [24] E.A. Dikusar, L.B. Beresnevich, K.L. Moiseichuk, E.G. Zalesskaya, A.P. Yuvchenko, *Zh. Obshch. Khim.*, 1998, **68**, 576; *Russ. J. Gen. Chem.*, 1998, **68**, 539.
- [25] F. Slowinski, C. Aubert, M. Malacria, *Tetrahedron Lett.* 1999, **40**, 5849.
- [26] R.J. Baxter, G.R. Knox, M. McLaughlin, P.L. Pauson, M.D. Spicer, *J. Organomet. Chem.*, 1999, **579**, 83.
- [27] X.-Y. Jiao, W.G. Bentrude, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6088.
- [28] I. Pergament, M. Srebnik, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 217.
- [29] B.C. Bookser, Q. Dang, K.R. Reddy, *Metabasis Therapeutics*, Int. Patent Appl. WO 2001066553, 2001; *Chem. Abstr.*, 2001, **132**, 211059.
- [30] C. Blanchard, M. Vaultier, J. Mortier, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 8863.
- [31] D.W. Burt, P. Simpson, *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 2273.
- [32] R.M. Acheson, P.J. Ansell, J.R. Murray, *J. Chem. Res. (M)*, 1986, 3001.
- [33] G.M. Blackburn, D. Brown, S.J. Martin, M.J. Parrat, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1*, 1987, 181.
- [34] C.U. Kim, B.Y. Luh, P.F. Misco, J.J. Bronson, M.J.M. Hitchcock, I. Ghazzouli, J.C. Martin, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 1207.
- [35] D.J. Burton, Z.-Y. Yang, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 189.
- [36] S.R. Piettre, P. Raboisson, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2229.
- [37] M. Obayashi, E. Ito, K. Matsui, K. Kondo, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 2323.
- [38] C.F. Bigge, J.T. Drummond, G. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 7012.
- [39] S. Halazy, A. Ehrhard, A. Eggenspiller, V. Berges-Gross, C. Danzin, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 177.
- [40] D.L. Jakeman, A.J. Ivory, M.P. Williamson, G.M. Blackburn, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 4439.
- [41] S. Halazy, A. Ehrhard, C. Danzin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 315.
- [42] W.G. Stiran, S.G. Withers, *Biochemistry*, 1996, **35**, 15057.
- [43] G. Lavielle, M. Carpentier, P. Savignac, *Tetrahedron Lett.*, 1973, **14**, 173.
- [44] P. Coutrot, P. Savignac, *Synthesis*, 1978, 34.
- [45] E.E. Aboujaoude, N. Collignon, P. Savignac, *Synthesis*, 1983, 634.
- [46] G.A. Olah, L. Ohannesian, M. Arvanghi, *J. Org. Chem.*, 1984, **49**, 3856.
- [47] M.-P. Teulade, P. Savignac, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 405.
- [48] H. Al-Badri, E. About-Jaudet, J.C. Combert, N. Collignon, *Synthesis*, 1995, 1401.
- [49] I. Truel, A. Mohamed-Hachi, E. About-Jaudet, N. Collignon, *Synth. Commun.*, 1997, **27**, 1165.
- [50] P. Savignac, C. Patois, *Org. Synth.*, 1995, **72**, 241.
- [51] P. Savignac, M.P. Teulade, C. Patois, *Heteroatom. Chem.*, 1990, **1**, 211.
- [52] C. Patois, P. Savignac, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1993, **130**, 630.
- [53] P. Coutrot, A. Egladi, C. Grison, *Heterocycles*, 1989, **28**, 1179.
- [54] C. Stevens, M. Gallant, N. De Kimpe, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 3457.
- [55] (a) A. Burger, N.D. Dawson, *J. Org. Chem.* 1951, **16**, 1250 (b) Z.E. Golubski, *Synthesis*, 1980, 632.
- [56] R.C. Grabiak, J.A. Miles, G.M. Schwenzer, *Posph. Sulf.*, 1980, **9**, 197.

- [57] W. Chodkiewicz, D. Jore, W. Wodzki, *Tetrahedron Lett.*, 1979, 1069.
- [58] R.M. Acheson, P.J. Ansell, J.R. Murray, *Chem. Res. (M)*, 1986, 3001.
- [59] A.P. Bretskin, L.A. Vikhreva, N.N. Godovikov, V.S. Garbatyuk, S.N. Moralev, M.I. Kabachnik, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, 1988, 2118; *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci (Engl. Transl.)*, 1988, 1990.
- [60] J.M.J. Tronchet, A.P. Bonenfant, *Carbohydr. Res.*, 1981, **93**, 205.
- [61] M.S. Chattha, A.M. Aguiar, *J. Org. Chem.*, 1971, **36**, 2719.
- [62] J.M.J. Tronchet, A.P. Bonenfant, K.D. Pallie, *Helv. Chim. Acta*, 1979, **62**, 1622.
- [63] M. Guo, *Huaxue Shiji*, 2001, **23**, 51; *Chem. Abstr.*, 2001, **134**, 366959.
- [64] W. Cen, Y. Shen, *J. Fluorine Chem.*, 1991, **52**, 369.
- [65] J.M. Gil, D.Y. Oh, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2950.
- [66] T. Minami, T. Okauchi, R. Kuono, *Synthesis*, 2001, 349.
- [67] M.K. Poindexter, T.J. Katz, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 1513.
- [68] H. Suzuki, K. Watanabem Y. Qui, *Chem. Lett.*, 1985, 1779.
- [69] T. Minami, T. Isonaka, J. Ichikawa, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 7009.
- [70] P. Savignac, A. Breque, F. Mathey, *Synth. Commun.*, 1979, 487.
- [71] P. Savignac, F. Mathey, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **17**, 2829.
- [72] F. Mathey, P. Savignac, *Synthesis*, 1976, 766.
- [73] F. Mathey, P. Savignac, *Actes Congr. Int. Composes Phosphores, 1st*, 1977, 617; *Chem. Abstr.* 1978, **89**, 146979.
- [74] F. Mathey, P. Savignac, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 649.
- [75] P. Coutrot, P. Savignac, *Synthesis*, 1978, 36.
- [76] J.M. Varlet, N. Collignon, P. Savignac, *Synth. Commun.*, 1978, **8**, 335.
- [77] J.M. Varlet, N. Collignon, P. Savignac, *Can. J. Chem.*, 1979, **57**, 3216.
- [78] J. Motoyoshiya, M. Miyajima, K. Hirakawa, T. Kakurai, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 1326.
- [79] F. Kuo, P.L. Fuchs, *Synth. Commun.*, 1986, **16**, 1745.
- [80] S. Freeman, H.M. Siedel, C.H. Schwalbe, J.R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 9233.
- [81] C.H. Schwalbe, S. Freeman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, 251.
- [82] H.M. Seidel, S. Freeman, C.H. Schwalbe, J.R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8149.
- [83] J. Motoyoshiya, T. Yazaki, S. Hayashi, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 735.
- [84] M.S. McQueney, S.-I. Lee, W.H. Swarz, H.L. Ammon, P.S. Mariano, D. Dunaway-Mariano, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 7121.
- [85] M. Takemoto, A. Koshida, K. Miyazima, K. Suzuki, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 1106.
- [86] S. Freeman, W.J. Irwin, C.H. Schwalbe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1991, 263.
- [87] D.E. Rudisill, J.P. Whitten, *Synthesis*, 1994, 851.
- [88] H. Feistauer, R. Neidlein, *Helv. Chim. Acta*, 1995, **78**, 1806.
- [89] I. Gautier, V. Ratovelomanana-Vidal, P. Savignac, J.-P. Genet, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 7721.
- [90] K. Takatori, K. Tanaka, K. Matsuoka, K. Morishita, M. Kajiwara, *Synlett.*, 1997, 159.
- [91] P.L. Ornstein, T.J. Bleisch, M.B. Arnold, R.A. Wright, B.G. Johnson, D.D. Schoepp, *J. Med. Chem.*, 1988, **41**, 346.
- [92] P.L. Ornstein, T.J. Bleisch, M.B. Arnold, J.H. Kennedy, R.A. Wright, B.G. Johnson, J.P. Tizzano, D.R. Helton, M.J. Kallman, D.D. Schoepp, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 358.
- [93] J.M. Gil, J.H. Hah, K.Y. Park, D.Y. Oh, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3205.
- [94] P. Balczewski, M. Mikolajczyk, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 1153.
- [95] V. Aucagne, D. Gueyraud, A. Tatibouet, A. Quinsac, P. Rollin, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 2647.
- [96] C.-Y. Yuan, K. Wang, Z.-Y. Li, *Heteroat. Chem.*, 2001, **12**, 551.
- [97] A. Gassama, J. d'Angelo, C. Cave, J. Mahuteau, C. Riche, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3165.

- [98] P. Savignac, A. Berque, F. Mathey, J.M. Varlet, N. Collignon, *Synth. Commun.*, 1979, **9**, 287.
- [99] P. Coutrot, P. Savignac, *Synthesis*, 1978, 36.
- [100] M. Takemoto, A. Koshida, K. Miyazima, K. Suzuki, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 1106.
- [101] D.J. Burton, R. Takei, S. Shin-Ya, *J. Fluorine Chem.*, 1981, **18**, 197.
- [102] A.M. Kawamoto, M.M. Campbell, *J. Fluorine Chem.*, 1997, **81**, 181.
- [103] A.M. Kawamoto, M.M. Campbell, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, 1997, 1249.
- [104] R.D. Chambers, R. Jaouhari, D. O'Hagan, *J. Fluorine Chem.*, 1989, **44**, 275.
- [105] R.D. Chambers, R. Jaouhari, D. O'Hagan, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 5101.
- [106] R.E. Austin, D.G. Cleary, *Nucleosides, Nucleotides*, 1995, **14**, 1803.
- [107] C.A. Verbicky, C.K. Zercher, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 5615.
- [108] M. Muller, A. Mann, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 3289.
- [109] (a) M. Verny, R. Vessiere, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1968, 3004; (b) A.P. Boisselle, N.A. Meinhardt, *J. Org. Chem.*, 1962, **27**, 1828.
- [110] (a) V. Mark, *Tetrahedron Lett.*, 1962, 281; (b) R.C. Elder, L.R. Florian, E.R. Kennedy, R.S. Macomber, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 4177.
- [111] M. Muller, A. Mann, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 3289.
- [112] F. Benayound, D.J. deMendonca, C.A. Digits, G.A. Moniz, T.C. Sanders, G.B. Hammond, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5159.
- [113] T. Calogeropoulou, G.B. Hammond, D.F. Weimer, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 4185.
- [114] P.P. Onys'ko, E.A. Suvalowa, T.I. Chudakova, A.D. Sinita, *Heteroatom. Chem.*, 1993, **4**, 361.
- [115] W. Chodkiewicz, *J. Organomet. Chem.*, 1984, **C55**, 273.
- [116] W. Chodkiewicz, D. Jore, W. Wodzki, *Tetrahedron Lett.*, 1979, 1069.
- [117] H.-G. Gruetzmacher, H. Pritzkow, *Angew. Chem.*, 1978, **111**, 1845.
- [118] E. Juaristi, L. Valle, B.A. Valenzuela, M.A. Aguilar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2000.
- [119] L.R. Drake, C.S. Marvel, *J. Org. Chem.*, 1938, **2**, 387.
- [120] (a) H.D. Kaesz, F.G.A. Stone, *J. Org. Chem.*, 1959, **24**, 635 (b) E.L. Lines, L.F. Centofanti, *Inorg. Chem.*, 1974, **13**, 1517.
- [121] M.S. Kharasch, E.V. Jensen, Weinhouse, *J. Org. Chem.*, 1949, **14**, 429.
- [122] (a) J.P. van Lindhoudt, E.V. Van den Berghe, G.P. van der Kelen, *Spectrochim. Acta*, 1979, **35A**, 1307; (b) L.D. Quin, L.B. Littlefield, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 3508; (c) R.B. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4147.
- [123] W. Altoff, M. Fild, H.P. Rieck, R. Schmutzler, *Chem. Ber.*, 1978, **111**, 1845.
- [124] T.A. Yugadeev, R.K. Kushembaev, A.N. Nurgalieva, S. Zhumagaliev, G.M. Dzhakiyaev, N.N. Godovikov, *J. Gen. Chem. USSR*, 1980, **50**, 1804.
- [125] (a) R.H. Pickard, J. Kenyon, *J. Chem. Soc.*, 1906, **89**, 262; (b) A.E. Canavan, C. Eaborn, *J. Chem. Soc.*, 1959, 3751; (c) G.M. Bodner, M.P. May, L.E. McKinney, *Inorg. Chem.*, 1980, **19**, 1951; (d) P.W. Clark, B.J. Mulraney, *J. Organomet. Chem.*, 1981, **217**, 51; (e) J.P. van Lindhoudt, E.V. van den Berghe, G.P. van der Kelen, *Spectrochim. Acta*, 1980, **36A**, 17; (f) G.M. Kosolapoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 5508.
- [126] J.P. van Lindhoudt, E.V. van den Berghe, G.P. van der Kelen, *Spectrochim. Acta*, 1979, **35A**, 1307.

**PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA NOWYCH
NANOMATERIAŁÓW WĘGLOWYCH
W KONTROLOWANYM UWALNIANIU LEKÓW**

PERSPECTIVES OF APPLICABILITY
OF NEW CARBON NANOMATERIALS
FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY

**Agnieszka M. Pacholczyk, Artur P. Terzyk*,
Marek Wiśniewski**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Katedra Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy,
Zespół Fizykochemii Materiałów Węglowych,
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
aterzyk@chem.uni.torun.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Modelowe leki używane w badaniach nowych nośników
2. Nośniki w uwalnianiu leków
 - 2.1. Polimerowe nośniki stałe
 - 2.2. Materiały zawierające krzem
 - 2.3. Matryce węglowe
3. Zagrożenia dla zdrowia człowieka

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Agnieszka M. Pacholczyk ukończyła studia w 2007 roku na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Od 2007 roku odbywa studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMK. Pracę doktorską wykonuje pod kierunkiem dr hab. A.P. Terzyka, prof. UMK. Jest współautorką dwóch publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz kilku posterów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Jej główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół kumulacji i uwalniania leków z materiałów węglowych, w szczególności z nanorurek węglowych, oraz na chemicznej modyfikacji materiałów węglowych.

Dr hab. Artur P. Terzyk, prof. UMK ukończył studia w roku 1991 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (1995) pod tytułem *Kalorymetryczne badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w układzie: adsorbat–mikroporowaty węgiel aktywny* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. G. Rychlickiego (rozprawa została wyróżniona). Jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (1996 rok). Rozprawę habilitacyjną *Węgle aktywne – nowoczesne metody charakteryzacji oraz zastosowanie do adsorpcji substancji biologicznie czynnych* obronił (z wyróżnieniem) w roku 2005. Rozprawa została wyróżniona także nagrodą Prezesa Rady Ministrów. Jest współautorem dwóch monografii: PA. Gauden, A.P. Terzyk, *Zarys teorii adsorpcji par gazów w mikroporach materiałów węglowych*, WICHiR, Warszawa, 2002; Artur P. Terzyk, Piotr A. Gauden i P. Kowalczyk (Eds.), *Carbon Materials – Theory and Practice*, Research Signpost, 2008. Od 2008 roku pełni funkcję kierownika zespołu Fizykochemii Materiałów Węglowych. Jest członkiem komitetu naukowego konferencji ISSHAC, współautorem 140 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz 100 komunikatów konferencyjnych. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z adsorpcją z rozтворów, kalorymetrią adsorpcji oraz teoretycznym opisem procesów sorpcji zachodzących na materiałach węglowych z zastosowaniem modeli analitycznych i symulacji komputerowych.

Dr Marek Wiśniewski ukończył studia w roku 1998 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (2003) pod tytułem *Filmy węglowe jako materiały modelowe w badaniach mechanizmu katalitycznej redukcji tlenku azotu(II) za pomocą amoniaku* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. J. Zawadzkiego (rozprawa została wyróżniona). Jest współautorem ponad 30 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz ponad 40 komunikatów konferencyjnych. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół kalorymetrii adsorpcyjnej oraz syntezy nowych materiałów węglowych.

ABSTRACT

Drug delivery systems have many advantages compared to typical therapy and due to progress in nanotechnology still new systems are proposed for this purpose. The major advantages are for example: applicability of drugs poorly soluble in water, controlled transport, combined therapy where one or more drugs can be simultaneously applied and generally, better efficiency. In this review we analyze a group of „model” drugs applied for testing of those systems [5] and pay also attention to other important drugs [7, 8, 13, 14]. The applicability of older (for example polymers [2]) as well as new nanomaterials (silicas [6, 7, 9, 10, 12–17], gels [6, 18]) in drug delivery systems is discussed. Special attention is paid to new carbon materials *i.e.* carbon nanotubes and carbon nanohorns (Figs. 1–3) [1, 2, 20–24, 28–41]. We report recent advances in this field showing the potential applicability of those materials in drug delivery systems. Special attention is paid to the systems where anti-cancer drug cisplatin was covalently bound to the edges or incorporated inside single-wall carbon nanohorns. We also discuss the applicability of buckysomes, especially in delivery of hydrophobic anti-cancer drugs.

Finally reports about toxicity of new forms of carbon are discussed and it is shown that many of them lead to contradictory conclusions [22, 42–55].

Keywords: drug delivery, adsorption, carbon materials, carbon nanotubes, nanohorns

Słowa kluczowe: uwalnianie leków, adsorpcja, materiały węglowe, nanorurki węglowe, nanorogi

WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

ACE	– enzym konwertujący angiotensynę (ang. <i>angiotensin-converting enzyme</i>)
BCS	– biofarmaceutyczna klasyfikacja leków
BET	– model Brunauera-Emmetta-Tellera
C ₆₀	– fuleren o kształcie dwudziestościanu ściętego
CapH ₂	– Kaptopryl (ang. <i>Captopril</i>)
CDDP	– [Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂] – <i>cis</i> -diaminadichloroplatyna(II)
CNT	– nanorurki węglowe (ang. <i>carbon nanotubes</i>)
DMF	– dimetyloformamid (ang. <i>N,N-dimethylformamide</i>)
DSPE	– distearoilofosfatydyloetanolamina
f-CNT	– nanorurki węglowe z grupami funkcyjnymi
HMDS	– 1,1,1,3,3,3-heksametylodixiloksan
K10	– montmorylonit – mikroporowaty minerał ilasty z grupy glinokrzemianów
LP-Ia3d	– mezoporowaty materiał krzemionkowy o symetrii Ia3d
MCM-41	– mezoporowaty materiał krzemionkowy z heksagonalnym ułożeniem cylindrycznych porów
MCM-48	– mezoporowaty materiał krzemionkowy o regularnej strukturze trójwymiarowej
MWNT	– wielościenne nanorurki węglowe (ang. <i>multi-walled nanotubes</i>)
NIR	– bliska podczerwień (ang. <i>near-infrared</i>)
PEG	– glikol polietylenowy
PGA	– poliglikolid (poli(kwas glikolowy))
PLA	– polilaktyd (poli(kwas mlekowy))
SBA-15	– mezoporowaty materiał krzemionkowy z połączonym systemem porów
SEM	– elektronowa mikroskopia skaningowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SSRI	– selektywny inhibitor zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i>)
SWNH	– nanorogi/nanohorny (ang. <i>single walled carbon nanohorn</i>)
SWNHox	– utleniona forma nanorogów (ang. <i>oxidised single-walled carbon nanohorn</i>)
SWNT	– jednościenne nanorurki węglowe (ang. <i>single-walled nanotubes</i>)
SWNTox	– utleniona forma jednościennych nanorurek węglowych (ang. <i>oxidised single walled carbon nanotubes</i>)
STEM	– elektronowa mikroskopia transmisyjno-skaningowa (ang. <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>)

TEM	– elektronowa mikroskopia transmisyjna (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TMS	– tetrametylosilan (ang. <i>tetramethylsilane</i>)
VCM	– wankomycyna (ang. <i>vancomycin</i>)

WPROWADZENIE

W terapii, pacjentowi podaje się leki w pewnych odstępach czasu. Jest to konieczne, ponieważ są one przekształcane za pomocą enzymów (w serii reakcji) w metabolity i usuwane z organizmu. Takie postępowanie powoduje ograniczoną skuteczność i konieczność stosowania dużych dawek leków, co z kolei prowadzi do występowania licznych efektów ubocznych. W tej sytuacji rozwiązaniem mającym na celu poprawianie i uzyskanie lepszych efektów terapii, może okazać się stosowanie układu kontrolowanego uwalniania leków. Jego zadaniem jest dostarczenie związków w odpowiednim i jak najkrótszym czasie w ściśle określone miejsce, np. w pobliże komórek nowotworowych. Jednym ze sposobów realizacji tego zadania jest zastosowanie nośników leków. Kluczowym elementem jest użycie odpowiedniego materiału nośnika, który przede wszystkim nie może być toksyczny. Powinien też dobrze wiązać lek i umożliwić uwalnianie go w pożądanym miejscu w stężeniu na odpowiednim poziomie (powyżej leczniczego stężenia leku, ale poniżej jego działania toksycznego) [1]. Ponadto, nośnik taki musi spełniać odpowiednie wymogi technologiczne, gdyż wiele obiecujących nośników leków nie znajduje zastosowania ze względu na małą wydajność produkcji, czy też niestabilność w organizmie [1].

W najbliższej przyszłości w dziedzinie farmacji i biotechnologii wiele może zmienić zastosowanie nowych nanomateriałów, jako nośników do kontrolowanego uwalniania leków. Na tym polu rozwój i zastosowanie nanotechnologii otwiera, w porównaniu z tradycyjnymi metodami, nowe perspektywy, z których najważniejsze to:

- możliwość zastosowania w terapii słabo rozpuszczalnych w wodzie leków,
- ściśle kontrolowane dostarczanie leków w pożądanym miejscu,
- transport leków przez bariery błon komórkowych,
- możliwość uwalniania leków wielkocząsteczkowych,
- zastosowanie terapii „kombinowanej” z możliwością dostarczania dwóch lub większej liczby leków,
- możliwość obserwacji miejsc zainfekowanych poprzez zastosowanie indykatorów np. nanokryształów kropek kwantowych,
- uzyskanie szybszego działania i lepszej efektywności leków.

Pierwsze wzmianki dotyczące kumulacji i uwalniania leków pochodzą z roku 1960. Mówią one o zastosowaniu pęcherzyków tłuszczowych zwanych liposomami. Liposomy to małe pęcherzyki sferyczne wypełnione roztworem wodnymi i otoczone podwójną warstwą lipidową. Były one stosowane w terapii genowej ze względu na zdolność przenikania przez błony biologiczne [2]. Opracowania te zainicjowały prace nad kolejnymi organicznymi i nieorganicznymi materiałami do kontrolowanego uwalniania leków. Prace na temat użyteczności materiałów polimerowych do uwalniania dużych cząsteczek ukazały się w latach 70. ubiegłego wieku. Bardziej złożone układy zdolne do funkcjonowania w zdefiniowanych warunkach (np. przy określonych wartościach pH) pojawiły się w latach 80., gdzie badania również dotyczyły

w głównej mierze liposomów. Wydłużono czas działania tych układów poprzez wydłużenie okresu ich krążenia w organizmie (tzw. „chytre liposomy”). W latach 90. ubiegłego wieku podjęto badania nad włączeniem/dołączeniem glikolu polietylenowego do układu, co wydłużało czas działania liposomów i nanocząsteczek polimerowych [3, 4].

W ostatnim czasie odkrywanych jest coraz więcej nanomateriałów stosowanych jako nośniki w kontrolowanym uwalnianiu leków. Idealny nośnik powinien być przede wszystkim biokompatybilny. Właściwości biofizykochemiczne takie jak: rozmiar, ładunek, hydrofilowość powierzchni, ilość grup funkcyjnych na powierzchni nie powinny mieć wpływu na czas krążenia i biodystrybucji leku w organizmie. Powierzchniowe grupy funkcyjne powinny poprawić „wychwytywanie” leku przez receptory komórek i umożliwić utworzenie kompleksu aktywnego. Pomaga to osiągnąć lokalnie duże stężenie leku w krótkim czasie i wzmacnia efekt jego działania. Rozmiar i kształt stałych nanośników decyduje o przedostaniu się związku do wnętrza komórek [4].

Prezentowane opracowanie ma na celu przedstawienie najnowszych wyników badań nad najbardziej rozpowszechnionymi i nowymi nośnikami leków stosowanymi w ich kontrolowanym uwalnianiu, ze szczególnym zwróceniem uwagi na nowe materiały węglowe. Ich liczność (fulereny, nanorurki, grafeny, nanorogi, nanopipty, nanoślimaki węglowe itd.) jak i skuteczność w obszarze uwalniania leków rodzi jednak pytanie na temat ich toksyczności. Omówienie wyników badań nad toksycznością tych nośników jest dodatkowym przedmiotem niniejszego opracowania.

1. MODELWNE LEKI UŻYWANE W BADANIACH NOWYCH NOŚNIKÓW

Powodów, dla których wciąż poszukuje się nowych nośników lub matryc dla różnego rodzaju leków, i pracuje nad udoskonalaniem metod kontrolowanego uwalniania leków, jest bardzo wiele. Jednym z nich jest mała rozpuszczalność niektórych specyfików. Stosując różne medykamenty oczekuje się ich natychmiastowego działania, lecz zazwyczaj na efekty trzeba długo czekać. Może to być związane z szybkością rozpuszczania i transportu leków do odpowiedniego miejsca w organizmie.

Leki różnią się również charakterem kwasowo-zasadowym i lipofilowością. Czynniki te wpływają na przynależność analizowanych środków do różnych grup w biofarmaceutycznej klasyfikacji leków (BCS).

Przedmiotem badań nad oceną zdolności nośnika do uwalniania leków najczęściej są leki modelowe, takie jak: ibuprofen (niesteroidowy lek przeciwzapalny, przeciwbólowy i przeciwgorączkowy), antypiryna (syntetyczny lek przeciwbólowy i przeciwzapalny), gryzeofulwina (lek przeciwgrzybiczny), ranitydyna (lek stosowany w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy), furosemid (lek moczopędny,

stosowany m.in. w leczeniu obrzęków oraz wspomagająco w leczeniu nadciśnienia tętniczego) [5].

W literaturze można też spotkać się z pracami dotyczącymi oceny zdolności kumulacji i uwalniania przez sorbenty, takich leków jak:

- gentamycyna – antybiotyk z grupy aminoglikozydów, stosowany w bakteryjnych infekcjach, preparat nie wchłania się z przewodu pokarmowego i dlatego podawany jest pozajelitowo;
- erytromycyna – antybiotyk z grupy makrolidów właściwych, działa silnie bakteriostatycznie (ze względu na spektrum działania podobnie, ale nie identyczne do penicylin), erytromycyna jest przydatna w leczeniu u osób wykazujących alergię na inne antybiotyki;
- sertralina – lek typu SSRI (nowej generacji), działający antydepresyjnie, działanie leku pojawia się zwykle po około 2 tygodniach, nie powoduje on uzależnienia;
- kaptopryl – lek obniżający ciśnienie tętnicze krwi, należy do grupy leków blokujących enzym konwertazę angiotensyny II (ACE), dobrze rozpuszcza się w wodzie, jest niestabilny ze względu na obecność grupy tiolowej (która ulega utlenieniu), wymaga długiego czasu aktywacji;
- *cis*-platyna [$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$] – nieorganiczny związek chemiczny platyny, o działaniu cytostatycznym, stosowany jako lek w chemioterapii do leczenia kilku rodzajów nowotworu;
- wankomycyna – antybiotyk glikopeptydowy o działaniu bakteriobójczym, stosowany w ciężkich przypadkach zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi (opornymi na inne leki przeciwbakteryjne) oraz u chorych ze znaną nadwrażliwością na penicyliny i cefalosporyny;
- amfoterycyna B – lek przeciwgrzybiczny zaliczany do polienów, wywołuje wiele działań niepożądanych i toksycznych.

Oprócz badań nad lekami wymienionych powyżej prowadzi się również badania nad kumulacją i uwalnianiem np. witamin [6]. Ostatnio, najczęściej w literaturze jako modelowy lek pojawia się ibuprofen – przynależny do II klasy wg klasyfikacji BCS, do której należą substancje słabo rozpuszczalne i dobrze wchłaniane. Ibuprofen jest jednym z najczęściej kupowanych i używanych środków przeciwbólowych i przeciwzapalnych [7, 8].

2. NOŚNIKI W UWALNIANIU LEKÓW

2.1. POLIMEROWE NOŚNIKI STAŁE

Zastosowanie stałych nośników leków niewątpliwie umożliwiło użycie wielu leków, których aplikacja ograniczona była niemożnością ich transportowania i uwalniania w miejsce stanu chorobowego. W ostatniej dekadzie obserwuje się

znaczący postęp dotyczący metod syntezy nośników i sposobów ich modyfikacji. Zarówno w badaniach laboratoryjnych jak i klinicznych szeroko stosowane są materiały polimerowe. Najczęściej, są to biodegradowalne nanocząsteczki złożone z PLA, PGA lub ich kopolimery. Powierzchnie polimerów można modyfikować tak, aby wiązać z nią cząsteczki leku (kowalencyjnie lub za pomocą procesów fizycznych). Cząsteczkę leku można również włączyć do struktury nośnika na etapie syntezy polimeru [2]. Wymienione polimery posiadają jednak kilka wad, najważniejszą z nich jest niska odporność termiczna i niestabilność chemiczna. Są one również zbyt szybko eliminowane z organizmu, co niesie pewne ograniczenia w stosowaniu tych materiałów w systemie kontrolowanego uwalniania leków.

Inną, unikalną grupą polimerów są dendrymery, czyli silnie rozgałęzione makrocząsteczki, których rozmiary i kształt mogą być precyzyjnie kontrolowane. Cząsteczki leku w tych strukturach mogą zostać przyłączone do zakończeń dowolnej warstwy dendrymeru, lub zostać zaadsorbowane w przestrzeni między łańcuchami polimerowymi. Często stosowane są w terapii genowej ze względu na ich zdolność do wiązania cząsteczek DNA (elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforowymi cząsteczki DNA, a dodatnio naładowanymi grupami aminowymi polimeru) lub do kumulacji i uwalniania leków, np. penicyliny lub leków antynowotworowych [2].

2.2. MATERIAŁY ZAWIERAJĄCE KRZEM

Alternatywnymi nośnikami leków są materiały krzemionkowe ze względu na to, że są nietoksyczne, biokompatybilne i stabilne chemicznie. Materiałów tych często używa się również jako substancji wspomagających działanie leku. W praktyce stosuje się trzy rodzaje materiałów krzemionkowych: kserożele, materiały mezoporowate (takie jak MCM-41 lub SBA-15), oraz mezoporowate sferyczne materiały krzemionkowe.

Kserożele to materiały amorficzne i porowate. Uwalnianie leków osadzonych na tych nośnikach metodą zol-żel zależy głównie od struktury i porowatości kserożelu, oraz energii oddziaływań pomiędzy siecią żelu, a osadzonym lekiem. Na właściwości preparowanego nośnika, związane z szybkością uwalniania leku, można wpływać poprzez modyfikację parametrów syntezy np. zmieniając warunki suszenia i grzania, czy też dodając surfaktantu. Ponieważ otrzymany nośnik charakteryzuje się niejednorodnym rozmiarem porów, dlatego zazwyczaj szybkość desorpcji ograniczona jest głównie rozpuszczalnością leku w środowisku uwalniania.

Więcej zalet od żeli, wykazują mezoporowate materiały krzemionkowe. Duża powierzchnia właściwa, obecność mezoporów o małej dyspersji rozkładu ich szerokości, dobrze zdefiniowana struktura, pozwalają na impregnowanie zarówno małych jak i dużych cząsteczek leku. Szybkość uwalniania leku jest głównie kontrolowana dyfuzyjnie [6]. Nowe metody syntezy, biokompatybilność, stabilność termiczna i chemiczna, sprawiają, że materiały te świetnie sprawdzają się w roli nośni-

ków. Potwierdzają to liczne publikacje różnych zespołów badawczych dotyczące tematyki [9]. Wśród uporządkowanych materiałów krzemionkowych, najczęściej stosowany jako nośnik stały, jest MCM-41 [10]. MCM-41 to uporządkowany materiał posiadający heksagonalne mezopory (2–50 nm) o bardzo małej dystrybucji rozmiarów, dużej objętości (powyżej 1 cm³/g) i dużym polu powierzchni BET (powyżej 1000 m²/g). Od czasu, gdy został po raz pierwszy zsyntezowany w roku 1992, stosowany jest w wielu dziedzinach, m.in. katalizie, konstrukcji sensorów, separacji, sorpcji itp. [11]. Kontrolowane uwalnianie leków jest nową dziedziną jego wykorzystania. Szybkość i ilość uwalnianego leku można w tym układzie kontrolować za pomocą kilku parametrów, takich jak: struktura i skład nośnika, rozmiar porów, energia oddziaływania leku z matrycą. Obecność na powierzchni nośnika licznych grup silanolowych stwarza możliwość jej modyfikacji organicznymi grupami funkcyjnymi odpowiednimi dla kowalencyjnego wiązania danego leku, to z kolei umożliwia projektowanie wielu nowych układów. Rozmiar porów można modyfikować już na etapie syntezy. Uwalnianie leków z materiałów o mniejszych porach jest dużo wolniejsze. Ibuprofen pięć razy wolniej uwalnia się z MCM-41 mającego pory o średnicy 2,5 nm niż z tego samego materiału o porach 3,6 nm, zatem zmieniając rozmiar porów można wpływać na szybkość uwalniania leku [12, 13].

Qu i inni [13] porównali dwa mezoporowate materiały krzemionkowe jako nośniki CapH₂. Uznali oni, że najlepszymi materiałami do tego celu będą nośniki SBA-15 i MCM-41 o różnej wielkości porów. Tak jak i w poprzednich przypadkach kinetyka uwalniania leku zależała tutaj od wielkości porów oraz morfologii struktury, najszybciej desorpcja następowała z największych porów. Badane materiały są idealnymi kandydatami do uwalniania CapH₂, a ilość zaadsorbowanego leku zależy od wielkości pola powierzchni BET. Badania wykazały również, iż ważnym czynnikiem jest środowisko uwalniania i im niższe pH tym szybciej następowała desorpcja [13].

Doadrio i inni badali szybkość uwalniania gentamycyny z SBA-15 [14]. Autorzy zastosowali dwie metody przygotowania materiału, w postaci proszku i tabletki – nieznaczne różnice w szybkości uwalniania leku wynikały z pewnych ograniczeń w procesie dyfuzji z materiału w postaci tabletki – po 3 godzinach zostaje uwolnione 70% leku, co zapewnia maksymalną dostępną dawkę w organizmie. Jest to wielka zaleta, ponieważ lek aplikowany w tradycyjnej postaci zawiesiny, rozpuszcza się natychmiastowo, a czas jego działania jest znacznie krótszy [14].

Okazuje się, że nie tylko struktura porowata jest istotnym czynnikiem za pomocą którego można kontrolować proces dyfuzji, a tym samym szybkość uwalniania leku. Późniejsze badania dowodzą, że również ważna jest budowa oraz rodzaj grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni nośnika. Zastosowana przez Manzono i inni [15] funkcjonalizacja powierzchni materiału krzemionkowego grupami aminopropylowymi miała istotny wpływ na wzrost adsorpcji ibuprofenu. Wzrost ten powodowany jest oddziaływaniami grup karboksylowych leku z w/w grupami funkcyjnymi obecnymi nie tylko na powierzchni, ale także wewnątrz mezoporów MCM-41 [7, 15]. W celu efektywniejszej kontroli kinetyki procesu desorpcji erytro-

mycyny wykorzystano chemiczne oddziaływania matrycy z cząsteczkami leku. Autorzy prac [7, 15] jako nośnik dla ibuprofenu i erytromycyny zastosowali mezoporoowaty MCM-48 oraz LP-Ia3d z porami o średnicach 3,6 i 5,7 nm. Badania wykazały, że szybkość uwalniania leku zależy od wielkości porów matrycy i rozmiarów cząsteczki leku. Im mniejsze pory lub większa cząsteczka tym wolniejsze tempo uwalniania.

Gdy do powierzchni LP-Ia3d przyłączono hydrofobowe łańcuchy C8 nastąpił wzrost oddziaływań hydrofobowych, pomiędzy matrycą krzemionkową, a lipofilowymi cząsteczkami antybiotyku, który spowodował spowolnienie procesu desorpcji [7].

Horcajada [10] wskazał na ważną rolę obecności różnych grup funkcyjnych MCM-41 w szybkość uwalniania leku. Na powierzchni nośnika umieszczono grupy: chloropropylową, fenyłową, benzyłową, merkaptopropylową, cyjanopropylową i butylową. Jako modelowy lek zastosowano ibuprofen. MCM-41 z polarnymi grupami na powierzchni adsorbował więcej ibuprofenu niż materiał z grupami niepolarnymi. Kinetyka uwalniania leku może przebiegać zgodnie z dwoma mechanizmami: szybka desorpcja z zewnętrznej powierzchni i z szerokich porów materiału; wolna desorpcja z wnętrza małych porów, dla których potencjał oddziaływań lek-por jest największy. Najwolniej ibuprofen uwalniany był z materiału zawierającego grupy aminopropylową i merkaptopropylową co, jak stwierdzono, spowodowane jest tworzeniem wiązań wodorowych między grupami funkcyjnymi na powierzchni materiału, a grupą karboksylową obecną w cząsteczce ibuprofenu. Praca ta jest dobrym przykładem możliwości kontrolowania szybkości uwalniania leku poprzez świadome wytwarzanie odpowiedniego rodzaju grup funkcyjnych na powierzchni matrycy [10].

Nunes i in. [16] zaproponowali dwa rodzaje nośników dla sertraliny. Pierwszy nośnik K10 może okazać się przydatny w sytuacji wymagającej dostarczenia dużego stężenia leku w krótkim czasie, natomiast drugi z zastosowaniem MCM-41, w przypadku konieczności osiągnięcia optymalnego stężenia leku na stałym i zrównoważonym poziomie. Projektując szybko uwalniający układ, wykorzystano występowanie słabych oddziaływań między grupami aminowymi obecnymi w cząsteczce sertraliny z grupami anionowymi znajdującymi się na powierzchni K10. W przypadku zaś zastosowania MCM-41 tworzące się silne wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami leku, a grupami silanolowymi materiału krzemionkowego znacznie spowalniają uwalnianie leku [16].

Inną metodę wpływu na szybkość uwalniania ibuprofenu z nośników krzemionkowych zaproponowali Tang i in. [17] Modyfikację materiału krzemionkowego za pomocą HMDS zastosowano po impregnacji ibuprofenem. Grupy TMS na powierzchni, a raczej przy wejściach do porów MCM-41, uniemożliwiły szybką desorpcję leku. Metoda ta jest efektywnym sposobem projektowania powierzchni nośnika w celu uzyskania wpływu na proces uwalniania leków [17].

W literaturze można też spotkać się z pracami, gdzie jako nośniki leków proponuje się hydrożele. Materiały te spełniają jeden z podstawowych warunków, jaki stawia się nośnikom leków – są biodegradowalne. Strukturę żelu można zmodyfikować różnymi grupami funkcyjnymi, a prowadzenie procesu syntezy w obecności medykamentu umożliwia włączenie go w strukturę żelu. Enzymatyczny rozkład hydrożelu *in vivo* za pomocą, np. karboksypeptydazy Y umożliwia uwolnienie leku, co wskazuje na możliwość jego uwalniania przez karboksypeptydazy w organizmie. Hydrożele są stabilne tylko w określonym środowisku i szybko zostają rozkładane przez różne enzymy, co ogranicza czas działania uwalnianego leku w organizmie [18].

Analizując doniesienia literaturowe można stwierdzić, że w przyszłości najprawdopodobniej wzrośnie również zainteresowanie sferycznymi materiałami krzemionkowymi. Posiadają one większą pojemność adsorpcyjną od popularnie stosowanego mezoporowatego materiału krzemionkowego, jak na przykład MCM-41 [2, 6, 19].

2.3. MATRYCE WĘGLOWE

Selektywny i skuteczny nośnik leków powinien spełniać kilka warunków, z których najważniejszym jest jego biokompatybilność. Wiele układów, gdzie zastosowano liposomy, polimerowe micelle i materiały krzemionkowe jest już na etapie badań klinicznych. Zapotrzebowanie na takie materiały jest bardzo duże ze względu na ich szeroki zakres stosowania w licznych stanach chorobowych. Dlatego ciągle poszukiwane są nowe materiały, które mogłyby spełnić oczekiwania stawiane przed nośnikami leków [20]. Rozwój nanotechnologii sprawił, iż do tego celu zaczęto stosować również różnorodne materiały węglowe – węgle aktywne, nanorurki czy nanorogi węglowe.

Nanorurki węglowe (CNT) posiadają interesujące właściwości fizykochemiczne, takie jak: duża powierzchnia właściwa, wytrzymałość mechaniczna, duże przewodnictwo elektryczne i termiczne. Kombinacja tych unikalnych właściwości sprawia, że CNT są potencjalnymi kandydatami do stosowania w różnych dziedzinach, m.in. w biomedycynie [21].

Grupa Lacerdy jako pierwsza zwróciła uwagę na możliwość zastosowania nanorurek w systemach kontrolowanego uwalniania leków [22]. Ważną cechą nanorurek jest możliwość regulowania ich biokompatybilności poprzez modyfikacje chemiczne. Na przykład, Ford i in. [23] zwracają uwagę na ogromne możliwości zastosowań nanorurek węglowych pokrytych węglanem wapnia do produkcji kompozytów do protez kości. Cechą charakterystyczną nanorurek węglowych jest tworzenie pęczków i skupisk. Dlatego można wyróżnić trzy sposoby lokowania leków, jak i innych cząsteczek (np. protein lub DNA) na lub w nanorurkach [24]. Pierwszą możliwością to adsorpcja w przestrzeniach utworzonych pomiędzy nanorurkami. Drugą możliwością jest przyłączenie cząsteczki do zewnętrznej powierzchni pojedynczej

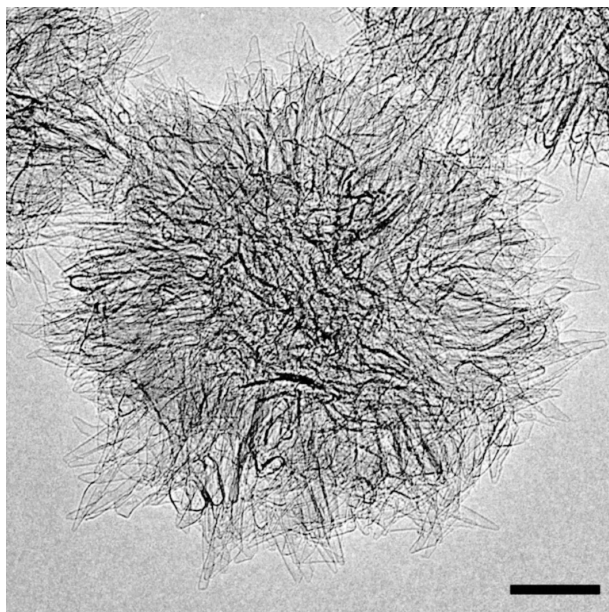
nanorurki. Trzecią, zamknięcie molekuly wewnątrz pojedynczej rurki – jest to możliwe jedynie, gdy mamy do czynienia z rurkami otwartymi [25–27]. Ostatnio nanorurki wzbudziły zainteresowanie również wśród biologów jako materiał do transportu szczepionek i protein. Jedyną wadą czystych, handlowych nanorurek jest ich słaba rozpuszczalność w większości rozpuszczalników. W celu jej eliminacji powierzchnię nanorurek poddaje się modyfikacji. Stosowane są głównie dwie metody, z których pierwsza to utlenianie za pomocą stężonych kwasów – prowadzące do powstania grup np. karboksylowych ulokowanych na końcach rurki i w miejscach występowania defektów [28–30]. Druga metoda to przyłączenie różnorodnych grup funkcyjnych do ścianek i końców nanorurek za pomocą odpowiednich reakcji, np. cykloaddycji. Do funkcjonalizowanych nanorurek (f-CNT) można przyłączyć różnego rodzaju aktywne cząsteczki takie jak: peptydy, białka czy kwasy nukleinowe. Bianco i in. [31] zastosowali CNT z grupami aminowymi na powierzchni jako nośnik bioaktywnych peptydów oraz do uwalniania amfoterycyny B. Zastosowanie CNT jako nośnika wzmogło działanie układu immunologicznego, a w przypadku badanego antybiotyku wyeliminowało efekty uboczne występujące podczas stosowania czystego leku [31]. Odpowiedni wybór reagentów do modyfikacji powierzchni CNT umożliwia sterowanie rozpuszczalnością nanorurek w zależności od potrzeby (w środowisku organicznym lub wodnym).

Klumpp i in. wspominają o metodzie rozpraszania CNT w roztworze za pomocą surfaktantów, kwasów nukleinowych, peptydów i polimerów [32]. Podejście takie umożliwia zachowanie elektronowej struktury aromatycznej rurki, a oddziaływanie hydrofobowe i π - π stabilizują rozproszone CNT w roztworze. Surfaktanty, polimery i biopolimery są najczęściej stosowanymi czynnikami rozpraszającymi [32]. Zdolność nanorurek węglowych z grupami funkcyjnymi (f-CNT) do przenikania przez błony biologiczne sprawia, że umożliwiają one transport małych cząsteczek leków do wnętrza komórek. Pozwala to na bardziej efektywne działanie leku, jego wolne i kontrolowane uwalnianie, co w efekcie prowadzi do znacznego polepszenia jego właściwości leczniczych. Analizując wyniki badań nad kumulacją i uwalnianiem związków z nanorurek węglowych opisywanych przez wiele ośrodków badawczych, można dojść do wniosku, że znacznemu przyspieszeniu uległy badania nad opracowaniem nowej grupy nośników leków antynowotworowych. Otrzymanie takich nośników powinno spowodować wzrost efektywności w walce z tymi chorobami, oraz zminimalizować liczne efekty uboczne, jakie występują w przypadku tradycyjnej terapii. Nowatorskie układy kontrolowanego uwalniania umożliwiają użycie takich leków, które nie mogły być wcześniej stosowane ze względu na ich toksyczność, czy problemy związane ze sposobem ich podania (przykładem są chemoterapeutyki przeciwnowotworowe). W organizmie człowieka istnienie wiele obszarów stanowiących barierę dla leków. Dlatego ciągłym problemem jest dostarczenie leku do mózgu, płuc czy też jego przenikanie przez szczelny nabłonek. Rozmiary nanonośników umożliwiają pokonanie tych barier. Szeroka gama możliwości funkcjonalizowania powierzchni CNT ułatwia sorbowanie na niej różnorodnych typów

cząstek. Liu i in. [33] badali adsorpcję dokсорubicyny na powierzchni f-SWNT. Zaproponowany układ kumulował o 50–60% więcej leku niż np. liposomy. Zastosowanie SWNT jako nośnika dla dokсорubicyny zwiększa efektywność jej działania, redukując przy tym do minimum efekty uboczne. Stabilność układu i możliwość kontrolowanego uwalniania leku bezpośrednio w komórkach nowotworowych sprawia, że istnieją szanse na stosowanie go w medycynie [33].

Zastosowanie nanotechnologii w terapii genowej omawia Hughes [2]. Odpowiednie rozmiary nanoukładów transportujących, umożliwiają selektywne przeniesienie DNA lub RNA tam, gdzie nastąpić ma reperacja lub wymiana niewłaściwego genu [2]. Zastosowanie nanotechnologii jako nieinwazyjnej metody w terapii genowej, terapii chorób serca czy ortopedii umożliwia również szybką diagnozę i obserwację stanów chorobowych. Materiały są wprowadzane do organizmu człowieka, muszą zatem spełniać najważniejszy i podstawowy warunek: muszą być bezpieczne, a więc nie mogą stanowić zagrożenia dla zdrowia i życia [34].

Nanorogi (nanohorny) to nowy rodzaj jednościennych grafenowych rurkopodobnych materiałów o średnicy 2–5 nm i długości 40–50 nm (Rys. 1 [41]).



Rysunek 1. Obraz nanorogów węglowych uzyskany za pomocą mikroskopu TEM (długość kreski odpowiada 20 nm). Rysunek opublikowany za zgodą ACS z pracy [41]

Figure 1. TEM images of dahlia-type SWNH, scale bar represents 20 nm [41]. Reprinted with permission from J. Miyawaki, M. Yudasaka, T. Azami, Y. Kubo, S. Iijima, *ACS Nano*, 2008, 2, 213. Copyright 2008 American Chemical Society

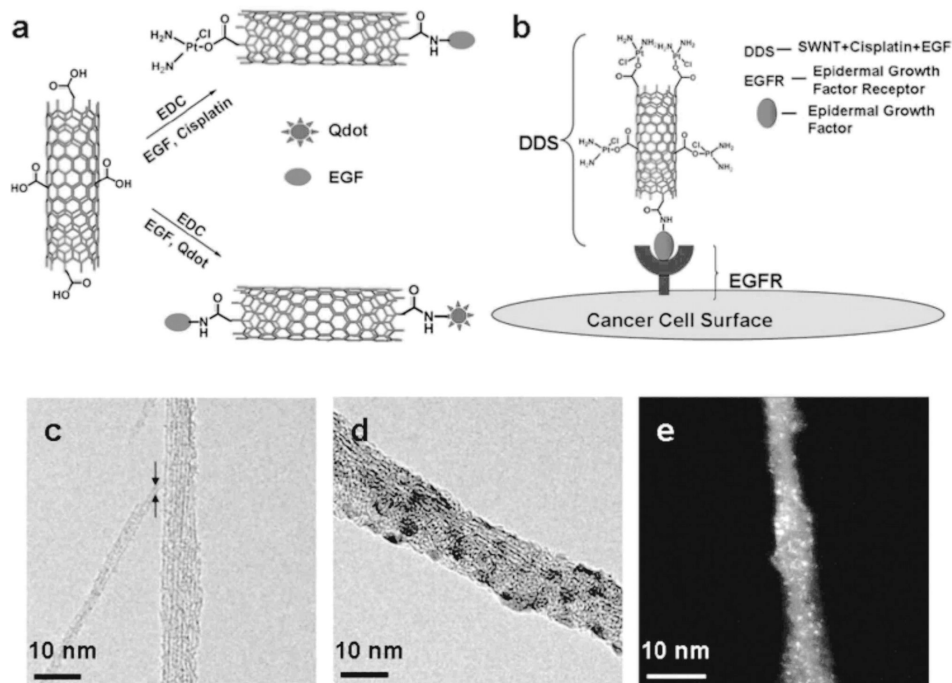
Cechą charakterystyczną nanorogów jest ich zdolność do agregacji i tworzenia sferycznych konglomeratów (np. 2000 SWNH tworzy takie agregaty o średnicy 80–100 nm).

Synteza nanorogów jest stosunkowo łatwa, nawet na większą skalę. Produkt uzyskuje się z dużą wydajnością i o wysokiej czystości. Nie wymagają oczyszczania ponieważ w syntezie nie wykorzystuje się katalizatorów – jak to ma miejsce w przypadku np. nanorurek.

SWNH są stabilne i odporne na działanie środowiska fizjologicznego, nawet silnie kwaśnego, występującego w żołądku. Przestrzeniami dostępnymi dla leków są wnętrza i miejsca między rurkami. Xu i in. [1] zaproponowali zastosowanie utlenionych nanorogów jako nośników do kumulacji i uwalniania wankomycyny (VCM), związku często nazywanego antybiotykiem „ostatniego ratunku” i stosowanego w ostrych infekcjach bakteryjnych. W literaturze można spotkać prace gdzie stosowano do tego celu polimery, jednak nie sprawdzały się one w tej roli z powodu hydrofilowości cząsteczki leku, jak i braku homogenicznego rozproszenia związku w polimerze, co miało znaczący wpływ na nieciągłość jego uwalniania. W celu podniesienia skuteczności działania i wyeliminowania skutków ubocznych zastosowano nanorogi impregnowane tym antybiotykiem. Stosując prostą metodę odparowania rozpuszczalnika z sukcesem umieszczono cząsteczki VCM wewnątrz nanoagregatów utlenionych SWNH. Modyfikacja powierzchniowa przy użyciu DSPE-PEG poprawiła dyspersję kompleksu VCM-SWNHox w roztworze. Szybkość uwalniania leku w ciągły i stabilny sposób zależała wyłącznie od energii oddziaływań VCM z SWNHox. Utlenione nanorogi okazały się w tym przypadku bardzo dobrym i obiecującym nośnikiem [1]. Istnieje także szereg prac, w których bada się uwalnianie fulerenów z nanorogów. Badania te są stymulowane zastosowaniem pochodnych fulerenów (metanofulerenów) w leczeniu AIDS. Yude i in. [35] stosując nową metodę, nazywaną nanostrącaniem, umieścili cząsteczki fulerenu C_{60} wewnątrz utlenionych nanorogów i badali szybkość uwalniania C_{60} w różnych rozpuszczalnikach. Proces desorpcji najszybciej przebiegał w toluenie, a jego szybkość malała gdy zwiększono stężenie etanolu w roztworze [35]. Miyako i in. [36] również badali utlenione nanorogi jako nośniki do uwalniania fulerenu C_{60} . Uwalnianie fulerenu z wnętrza SWNHox do mieszaniny woda/toluen tym razem było przyspieszane za pomocą promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni. Molekuły fulerenu wydostawały się przez otwory wytworzone w wyniku utleniania. Zastosowanie NIR miało istotne znaczenie, ponieważ w temperaturze pokojowej następowała znikoma desorpcja C_{60} . Przedstawione podejście pozwala zrozumieć mechanizm procesu kontrolowanej desorpcji leku [36].

Możliwość łatwej funkcjonalizacji nanorogów oraz duża powierzchnia wewnętrzna sprawia, że zainteresowanie adsorpcją leków na tych materiałach wzrasta. Dodatkowo, defekty ich struktury, na przykład wprowadzane w tych procesach grupy tlenowe na krawędziach, umożliwiają kowalencyjne przyłączenie leku. Istnieje też możliwość chemicznego zablokowania tych defektów, co umożliwia bardzo precy-

zyjne uwolnienie leku tylko w określonym miejscu. Zademonstrowano to na przykładzie utlenionych nanorogów, których zdefektowane miejsca deaktywowano poprzez adsorpcję octanu gadolinu, co pozwoliło na lepsze kontrolowanie uwalniania C_{60} z wnętrza SWNHox [37].



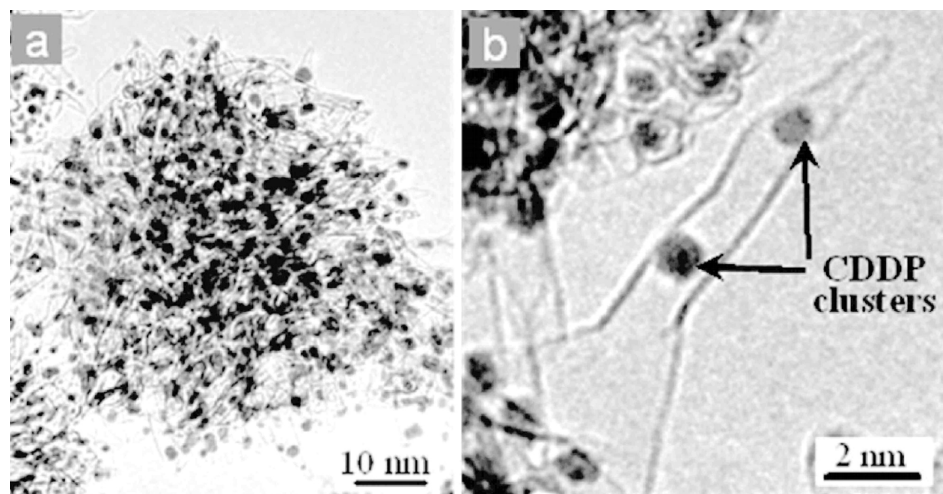
Rysunek 2. Nośnik na bazie nanorurki węglowej: (a) schemat reakcji wiązania, *cis*-platyny (Cisplatin), czynnika wzrostu naskórka (EGF) oraz kropki kwantowej (Qdot) na jednościennej nanorurkach węglowych w obecności 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) jako czynnika sprzęgającego; (b) schemat wiązania układu z komórkami nowotworowymi; (c) zdjęcie wykonane techniką TEM typowego pęczka utlenionych nanorurek z zaznaczoną rurką pojedynczą; (d) elektronowy obraz uzyskany techniką TEM dla zmodyfikowanych pęczków nanorurek węglowych otrzymanych w reakcji, SWNT, Qdot i EGF, zob. schemat na Rys. 2(a); (e) zdjęcie wykonane techniką STEM, pokazujące wiązkę nanorurek z naniesioną *cis*-platyną (białe obszary). Rysunek opublikowany za zgodą ACS z pracy [38]

Figure 2. Nanotube based delivery system [38]: (a) illustration of chemical reactions used to attach EGF, Cisplatin, and Qdots onto carboxylated SWNTs using EDC as the coupling; (b) schematic representation of bonding between system and cancer cell surface; (c) oxidised SWNT bundles with arrows showing a single SWNT; (d) SWNT-Qdot-EGF bioconjugate bundle; (e) STEM image of SWNT bundle showing *cis*-platin as the bright spots. Reprinted with permission from A.A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A.A. Sousa, A. Masedunskas, R.D. Leapman, R. Weigert, J.S. Gutkind, J.F. Rusling, *ACS Nano*, 2009, 32, 307. Copyright 2009 American Chemical Society

Pomimo ciągłego rozwoju medycyny, nowotwory stanowią jedną z najgroźniejszych grup chorób trapiących ludzkość. Stworzenie odpowiedniego układu nośnikowego zawierającego lek antynowotworowy, a tym samym zwiększenie skutecz-

ności walki z rakiem jest jednym z głównych zadań naukowców i inżynierów. Bhirde i in. [38] opisali ostatnio niezwykle interesujący układ złożony z SWNT, *cis*-platyny (związanej kowalencyjnie z jednym z końców nanorurki) i czynnikiem wzrostu naskórka z drugiej. Układ taki wrastając w komórki nowotworowe powodował zahamowanie ich rozwoju (Rys. 2).

Oprócz prac nad nanorurkami równolegle prowadzone są badania z zastosowaniem nanorogów. Badania *in vivo* i *in vitro* wykonane przez Ajima i in. [20] potwierdziły poprawę działania *cis*-platyny zaimpregnowanej na utlenionych nanorogach (Rys. 3 [20]).



Rysunek 3. Zdjęcia nanorogów, wykonane za pomocą mikroskopu TEM, strzałki wskazują klastery *cis*-platyny (CDDP). Rysunek opublikowany za zgodą ACS z pracy [20]

Figure 3. TEM images of carbon nanohorns with *cis*-platin complexes inside (arrows). Reprinted with permission from [20] K. Ajima, T. Murakami, Y. Mizoguchi, K. Tsuchida, T. Ichihashi, S. Iijima, M. Yudasaka, *ACS Nano*, 2008, 2, 2057. Copyright 2008 American Chemical Society

Zmiana rozpuszczalnika z DMF na wodę spowodowała wzrost adsorpcji leku na SWNHox z 15 do 46%. Wykazano większą skuteczność takiego układu w niszczeniu komórek rakowych płuc, co wynika ze wzrostu stężenia leku wokół komórek spowodowanego, zastosowaniem SWNHox jako nośnika *cis*-platyny. Lek był obecny w organizmie nawet przez 25 dni od chwili podania, a powolne uwalnianie *cis*-platyny zwiększyło jej skuteczność. Zaskakujące okazały się wyniki działania czystego SWNHox na komórki nowotworowe, gdyż jak wcześniej udowodniono, nanorogi nie wykazują właściwości toksycznych w stosunku do niezainfekowanych organizmów. W tym przypadku utlenione nanorogi ujawniły swoje antykancerogenne właściwości, co mogło poprawić działanie układu SWNHox.

Inną nową grupę nośników stanowią liposomy fulerenowe (*buckysomes*) [39, 40], stosowane głównie do uwalniania leków hydrofobowych. Wykazują one dużą efektywność w przypadku antynowotworowego paklitakselu. W przyszłości planuje

się dalszą funkcjonalizację tych liposomów poprzez nanoszenie na ich powierzchnię łańcuchów lipidowych o różnych długościach, które powinny zwiększyć ilość kumulowanego leku – w celu uzyskania kontrolowanych zmian hydrofobowości.

3. ZAGROŻENIA DLA ZDROWIA CZŁOWIEKA

Obserwowany w przeciągu ostatnich dwóch dekad rozwój nanotechnologii i wzrost komercyjnego zainteresowania jej produktami, prowadzi do wytwarzania materiałów o wymiarach w granicach 1–100 nm. W konsekwencji, zwiększa to możliwości kontaktu tych materiałów z człowiekiem i środowiskiem – wiadomo, że im mniejsza cząstka tym bardziej toksyczne efekty może powodować [41].

Tworzenie nowych materiałów powinno być poparte równoczesnymi badaniami nad ich potencjalnie niekorzystnym wpływem na człowieka i środowisko. Nanomateriały węglowe mogą przenikać do organizmu poprzez drogi oddechowe, skórę, spożycie czy też podanie w formie iniekcji. Na przykład, wiadomo, że inhalacja pyłu CNT powoduje u myszy przewlekłe stany zapalne i tworzenie ziarniaków płucnych [42]. Nanomateriały mogą też oddziaływać na mikroorganizmy, rośliny lub zwierzęta, jeśli znajdują się w środowisku, w znacznej ilości. Złożoność ich natury oraz potencjalne oddziaływania na człowieka i środowisko sprawiają, że tematyka nanotechnologii jest dość rozległa, wymaga współpracy chemików z toksykologami, biologami i inżynierami biomedycznymi [43].

Badania nad toksycznością nośników węglowych dostarczają sprzecznych wyników i powodują bardziej stawianie nowych pytań niż udzielanie konkretnych odpowiedzi. Ponad wszelką wątpliwość wykazano, że nanorogi węglowe nie są toksyczne [41].

Znajomość toksyczności nanorurek, bo to głównie na nich są obecnie prowadzone najbardziej zaawansowane badania *in vivo*, oraz ich wpływu na środowisko jest kluczową sprawą w ich potencjalnym zastosowaniu w nanomedycynie. Małe rozmiary i duża powierzchnia właściwa wpływa na ich aktywność chemiczną, przenikalność i przewodnictwo przez membrany biologiczne, przenikanie do płuc i wchłanianie do komórek, co może w efekcie skutkować cytotoksycznością tych układów. Badania wstępne pokazały, że wpływ na właściwości toksykologiczne nanorurek mają ich rozmiar i powierzchnia właściwa. Im mniejszy rozmiar CNT, tym ich powierzchnia właściwa jest większa (jest to znany fakt, wynikający z prostych rozważań geometrycznych [44]) – to również zwiększa możliwość oddziaływania na żywe komórki. Udowodniano, że jednościenne nanorurki węglowe (SWNT) wykazują znaczącą toksyczność w stosunku do komórek ludzkich i zwierzęcych, zaś nanorurki wielościenne umiarkowaną.

Doniesienia naukowe na temat cytotoksyczności nanorurek węglowych i innych nanomateriałów są często sprzeczne. Sayes i in. [45] donoszą o toksyczności fulerenów i podejmują próbę jej zmniejszenia tak, aby można było zastosować C_{60} do uwalniania leków. Fuleren C_{60} jest toksyczny, gdyż powoduje utlenianie lipidów,

wynikające z tworzenia jonorodników tlenowych – chociaż, jak wspominają autorzy dokładny mechanizm tworzenia jonorodników z udziałem fulerenu nie jest znany. Autorzy donoszą, że im bardziej funkcjonalizowany jest C_{60} tym mniejsza jest jego toksyczność. Odwrotnych wniosków dostarczają wyniki badań Gharbi i in. [46] pokazujące, że C_{60} nie jest toksyczny, a nawet chroni przed wolnymi rodnikami. Najnowsze badania w tej dziedzinie rzucają jeszcze inne światło na omawiany problem. Lyon i in. [47] podkreślają, że C_{60} rzeczywiście jest toksyczny dla wielu bakterii, lecz mechanizm toksycznego działania nie jest do końca znany. Wcześniej sugerowano pośredni udział C_{60} w produkcji reaktywnych form tlenu – jednak badania wspomnianych autorów pokazały, że C_{60} nie produkuje tych form będąc samemu utleniaczem.

Magrez i in. [48] zwracają uwagę na niedogodność badań nad toksycznością, szczególnie w przypadkach, gdy choroba rozwija się dłużej niż wynosi czas życia badanego zwierzęcia. Autorzy udowadniają, że nanorurki są mniej trujące niż włókna węglowe czy grafit, a toksyczność rośnie dopiero po ich funkcjonalizacji i wytworzeniu grup karbonylowych lub karboksylowych na powierzchni materiału. Badania Knirscha i in. [49] pokazują, że oczyszczone rurki nie są trujące, lecz powodem toksyczności jest amorficzny węgiel i pozostałości katalizatora. Dumortier i in. [50], udowadniają, że funkcjonalizowane w reakcjach cykloaddycji CNT nie są toksyczne, natomiast toksyczne są rurki utlenione lub amidowane, a następnie funkcjonalizowane glikolem polietylenowym (co autorzy tłumaczą wpływem tych rurek na makrofagi i modyfikację ich odpowiedzi na stymulację).

Można wnioskować, że sprzeczność rezultatów wynika głównie z zastosowania w testach, materiałów węglowych o różnej czystości, z różnorodnymi grupami funkcyjnymi na powierzchni, jak również z przeprowadzania badań na różnorodnych typach komórek hodowanych, i w odmiennych warunkach. Problem komplikuje fakt, że właściwości chemiczne grup funkcyjnych, nawet tego samego typu (np. kwasowość), związanych z rurką zależą od długości jak i szerokości funkcjonalizowanej nanorurki (tzn. kwasowość wzrasta ze wzrostem długości i szerokości) [51]. Dodatkowym problemem jest brak ścisłej procedury preparatywnej prowadzącej do syntezy CNT o wąskim rozkładzie średnic, co komplikuje możliwość porównywania wyników. Dlatego wielu badaczy podkreśla, że przed wykonaniem badań toksyczności nanorurek, ważne jest bliższe poznanie ich właściwości fizykochemicznych oraz używanych wcześniej metod oczyszczania [52]. Pomimo ogólnej opinii o potencjalnej toksyczności CNT, mechanizm wyjaśniający to zjawisko nie jest dotąd poznany. Wśród hipotez pojawiają się i te dotyczące zakłóceń metabolizmu wewnątrzkomórkowego, promowania stresu oksydacyjnego, czy niszczenia fizycznego błon komórkowych. W jeszcze większym stopniu możliwości wyjaśnienia mechanizmu toksyczności nanorurek komplikuje fakt, stosowania nieoczyszczonych nanorurek zawierających krystalizację metali [53, 54].

Alternatywne prace na temat cytotoxyczności nanorurek węglowych prowadzone były również na mikroorganizmach jednokomórkowych, np. bakteriach.

Wyniki badań wykazały, większą toksyczność SWNT w porównaniu z MWNT. Toksyczność ta wynikała głównie z małych rozmiarów rurek jednościennej (co umożliwiało ich przenikanie przez ścianki błon komórkowych), dużej powierzchni właściwej (powodującej większy kontakt i oddziaływanie z powierzchnią komórek), czy też z powodu większej reaktywności rurek o małej średnicy [53].

Istnieje też duże prawdopodobieństwo, że powodami toksyczności nanorurek są zanieczyszczenia metaliczne pochodzące z procesu ich wytwarzania, oraz małe rozproszenie nanorurek w roztworach wodnych. Nanomateriały węglowe są mieszaniną zawierającą węgiel wielopostaciowy jak i metale (Co, Fe, Ni lub Mo) występujące w różnych formach (czyste metale, tlenki metali, węgliki metali). Ponieważ, często zanieczyszczenia i pozostałości są głównym czynnikiem wpływającym na toksyczności materiału, dlatego bardzo ważna jest jego fizykochemiczna charakterystyka: rozmiar, kształt, właściwości chemiczne powierzchni (hydrofobowość/filowość), skład (postać i lokalizacja metalu) [55]. Wnikliwe poznanie właściwości badanego materiału pozwala na opracowanie nowych sposobów syntezy lub modyfikację znanych już metod. Zatem możliwym staje się tworzenie nowych (np. nanorogi), czy też modelowych nośników o wysokiej czystości i homogenicznej strukturze [55]. Testy dotyczące toksyczności nanorurek prowadzone przez liczne grupy badawcze wielokrotnie dawały sprzeczne wyniki badań, może to wskazywać na zależność stopnia toksyczności od czystości materiału, ilości materiału zastosowanego do badań, czasu ekspozycji, sposobu aplikacji itd. Nie posiadając ściśle określonych norm, standardowych testów weryfikujących toksyczność CNT, trudno jest określić wpływ nanorurek na organizmy żywe. Sposobność przeprowadzenia testów i interpretacji ich wyników jest dowolna, co prowadzi do braku jednoznaczności w ich rzetelnej ocenie [22].

PODSUMOWANIE

System kontrolowanego uwalniania leków został stworzony w celu przenoszenia i dostarczania leków do wybranego miejsca w organizmie. Pozwala to na bardziej efektywne działanie leku, jego kontrolowane uwalnianie, a to z kolei prowadzi do znacznego polepszenia właściwości leczniczych. Wczesne badania w głównej mierze skupione były na zastosowaniu materiałów krzemionkowych i polimerowych jako nośników leków. Rozwój nanotechnologii sprawił, iż do tego celu zaczęto stosować także różnego rodzaju materiały węglowe. Są to materiały biokompatybilne, dające się modyfikować chemicznie, co pozwala na stosowanie wielu odmiennych strategii transportowania i uwalniania leków – w tym np. do kontrolowanego wrastania nośnika w mięjsku, w którym powinien być uwalniany lek [20].

Predyspozycje materiałów węglowych do magazynowania i uwalniania leków, oraz zrozumienie mechanizmów rządzących takimi zachowaniami pozwalają na optymalizację w projektowaniu coraz to doskonalszych nośników leków. Nanotechnologia jest dziedziną, która posiada olbrzymi potencjał do wykorzystania na polu

nanomedycyny, a przedstawione w tej pracy badania pokazują, że to dopiero początek realizacji tychże możliwości. Wymagany jest wysiłek interdyscyplinarnych zespołów naukowców reprezentujących różne dyscypliny nauki [3].

Niemniej ważnym jest, ustalenie standardów w badaniach toksyczności tych nowych potencjalnych nośników leków.

Podziękowania: Autorzy składają podziękowania Recenzentowi pracy za wnikliwe uwagi krytyczne, pozwalające na znaczną poprawę zawartości merytorycznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Xu, M. Yudasaka, S. Kouraba, M. Sekido, Y. Yamamoto, S. Iijima, *Chem. Phys. Lett.* 2008, **461**, 189.
- [2] G.A. Hughes, *Nanomedicine: Nanotechn. Biol. Med.* 2005, **1**, 22.
- [3] K. Park, *J. Control. Release*, 2007, **120**, 1.
- [4] O.C. Farokhzad, R. Langer, *ASC Nano*, 2009, **3**, 16.
- [5] J. Salonen, L. Latinen, A.M. Kaukonen, J. Tuura, M. Bjorkqvist, T. Heikkilä, K. Vaha-Herikkilä, J. Hirvonen, V.P. Lehto, *J. Control. Release*, 2005, **108**, 362.
- [6] Z. Wu, Y. Jiang, T. Kim, K. Lee, *J. Control. Release*, 2007, **119**, 215.
- [7] I. Izquierdo-Barba, A. Martinaz, A.L. Doadrio, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Eur. J. Parma. Sci.*, 2005, **26**, 365.
- [8] A.S. Mestre, J. Pires, J.M.F. Noueira, A.P. Carvalho, *Carbon*, 2007, **45**, 1979.
- [9] S. Wang, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2009, **117**, 1.
- [10] P. Horcajada, A. Ramila, G. Ferey, M. Vallet-Regi, *Solid State Sci.*, 2006, **8**, 1243.
- [11] J. Choma, M. Jaroniec, *Ochrona Środowiska*, 2005, **26**, 3.
- [12] P. Horcajada, A. Ramila, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regi, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2004, **68**, 105.
- [13] F. Qu, G. Zhu, S. Huang, S. Li, J. Sun, D. Zhang, S. Qiu, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2006, **92**, 1.
- [14] A.L. Doadrio, E. M. Sousa, J.C. Doadrio, J. Perez-Pariente, *J. Control. Release*, 2004, **97**, 125.
- [15] M. Manzano, V. Aina, C.O. Arean, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regi, *Chem. Eng. J.*, 2008, **137**, 30.
- [16] C.D. Nunes, P.D. Vaz, A.C. Fernandes, P. Ferreira, C.C. Romao, M.J. Calhorda, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, **66**, 357.
- [17] Q. Tang, Y. Xu, D. Wu, Y. Sun, J. Wang, J. Xu, F. Deng, *J. Control. Release*, 2006, **114**, 41.
- [18] S. Bhuniya, Y.J. Seo, B. H. Kim, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 7153.
- [19] Z. Li, L.-X. Wen, L. Shao, J.-F. Chen, *J. Control. Release*, 2004, **98**, 245.
- [20] K. Ajima, T. Murakami, Y. Mizoguchi, K. Tsuchida, T. Ichihashi, S. Iijima, M. Yudasaka, *ASC Nano*, 2008, **2**, 2057.
- [21] M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechn. Biol. Med.*, 2008, **4**, 173.
- [22] L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, K. Kostarelos, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1460.
- [23] W.E. Ford, A. Yasuda, J.M. Wessels, *Langmuir*, 2009, **24**, 3479.
- [24] H. Gao, Y. Kong, D. Cui, C.S. Ozkan, *Nano Lett.*, 2003, **3**, 471.
- [25] X.M. Yan, B.Y. Shi, J.J. Lu, C.H. Feng, D.S. Wang, H.X. Tang, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2008, **321**, 30.

- [26] M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechn. Biol. Med.*, 2008, **4**, 183.
- [27] R. Marega, G. Accorsi, M. Meneghetti, A. Parisini, M. Prato, D. Bonifazi, *Carbon*, 2009, **47**, 675.
- [28] H. Hu, B. Zhao, M.E. Itkis, R.C. Haddon, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 13838.
- [29] J. Zang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 3712.
- [30] V. Datsyuk, M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis, C. Galiotis, *Carbon*, 2008, **46**, 833.
- [31] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 674.
- [32] C. Klumpp, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 404.
- [33] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano*, 2007, **1**, 50.
- [34] S.K. Sahoo, S. Parveen, J.J. Panda, *Nanomedicine: Nanotechn. Biol. Med.*, 2007, **3**, 20.
- [35] R. Yuge, M. Yudasaka, J. Miyawaki, Y. Kubo, T. Ichihashi, H. Imai, E. Nakamura, H. Isobe, H. Yorimitsu, S. Iijima, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 17861.
- [36] E. Miyako, H. Nagata, K. Hirano, Y. Makita, T. Hirotsu, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **456**, 220.
- [37] R. Yuge, M. Yudasaka, J. Miyawaki, Y. Kubo, H. Isobe, H. Yorimitsu, E. Nakamura, S. Iijima, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 7348.
- [38] A.A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A.A. Sousa, A. Masedunskas, R.D. Leapman, R. Weigert, J. Silvio Gutkind, J.F. Rusling, *ACS Nano*, 2009, **3**, 307.
- [39] R. Partha, L.R. Mitchell, J.L. Lyon, P.P. Joshi, J.L. Conyers, *ACS Nano*, 2008, **2**, 1950.
- [40] R. Partha, M. Lackey, A. Hirsch, S.W. Casscells, J.L. Conyers, *J. Nanotechnol.*, 2007, **5**, 6.
- [41] J. Miyawaki, M. Yudasaka, T. Azami, Y. Kubo, S. Iijima, *ACS Nano*, 2008, **2**, 213.
- [42] Ch.Ch. Chou, H.Y. Hsiao, Q.S. Hong, Ch.H. Chen, Y.W. Peng, H.W. Chen, P.Ch. Yang, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 437.
- [43] R.H. Hurt, M. Monthieux, A. Kane, *Carbon*, 2006, **44**, 1028.
- [44] A. Peigney, Ch. Laurent, E. Flahaut, R.R. Bacsá, A. Rousset, *Carbon*, 2001, **39**, 507.
- [45] Ch.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, Y.J. Tao, B. Sitharaman, L.J. Wilson, J.B. Hughes, J.L. West, V.L. Colvin, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1881.
- [46] N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S.R. Wilson, F. Moussa, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 2578.
- [47] D.Y. Lyon, L. Brunet, G.W. Hinkal, M.R. Wiesner, P.J.J. Alvarez, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 1539.
- [48] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forro, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 1121.
- [49] J.M. Wöhrle-Knirsch, K. Pulskamp, H.F. Krug, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 1261.
- [50] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J.P. Briand, M. Prato, S. Müller, A. Bianco, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 1522.
- [51] T. Kar, S. Scheiner, A.K. Roy, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **460**, 225.
- [52] P.X. Hou, Ch. Liu, H.M. Cheng, *Carbon* 2008, **46**, 2003.
- [53] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, *Langmuir* 2008, **24**, 6409.
- [54] S. Kang, M. Pinault, L.D. Pfefferle, M. Elimelech, *Langmuir*, 2007, **23**, 8670.
- [55] A.W. Musumeci, E.R. Waclawik, R.L. Frost, *Spectrochim. Acta Part A*, 2008, **71**, 140.

Praca wpłynęła do Redakcji 25 kwietnia 2009

**PERSPEKTYWY ROZWOJU BIOTECHNOLOGII
PRZEMYSŁOWEJ W UNII EUROPEJSKIEJ**

**PROSPECTS OF THE INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY
DEVELOPMENT IN EU**

Krzysztof W. Szewczyk

*Wydział Inżynierii Chemicznej Procesowej, Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa
e-mail: K.Szewczyk@ichip.pw.edu.pl*

Abstract

Wstęp

1. Biokatalizatory w syntezach organicznych
2. Produkcja biopaliw
3. Biorafinerie
4. Programy rozwoju biotechnologii przemysłowej w UE
5. Biogospodarka oparta na wiedzy

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. inż. Krzysztof W. Szewczyk. Kierownik Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Zajmuje się problematyką inżynierii bioreaktorów, fermentacji metanowej i wodorowej oraz mikrobiologicznych ogniw paliwowych. Autor wielu publikacji naukowych, monografii, podręczników. Wiceprezes Zarządu Polskiej Federacji Biotechnologii, Członek Komitetu Biotechnologii przy Prezydium PAN, Członek Rady Programowej kwartalnika PAN „Biotechnologia”.

ABSTRACT

White, or industrial, biotechnology is the application of biotechnology for the processing and production of chemicals, materials, and energy. White biotechnology uses enzymes and microorganisms to generate products in industrial sectors as diverse as pharmaceuticals and chemistry, food and feed, pulp and paper, textiles or detergents. This review gives an overview of the possible developments in the transition to bio-based production with a focus on the production of chemicals.

Implementation of industrial biotechnology offers significant ecological advantages. Renewable agricultural crops are the preferential starting materials, instead of dwindling fossil resources such as crude oil and natural gas. This technology consequently has a beneficial effect on greenhouse gas emissions and at the same time supports the agricultural sector, delivering these raw materials. Moreover, industrial biotechnology frequently shows significant performance benefits compared to conventional chemical technology, such as a higher reaction rate, increased conversion efficiency, improved product purity, lowered energy consumption and significant decrease in chemical waste generation. The combination of these factors has led to the recent strong penetration of industrial biotechnology in all sectors of the chemical industry, particularly in fine chemicals but equally so for bulk chemicals such as plastics and fuels.

The chemical industry in Europe, which contributes about 28% of the world demand for chemicals, has identified industrial biotechnology as a key emerging technology area. The biorefinery concept offers numerous possibilities to integrate the production of bio-energy and chemicals. This will also provide substantially higher value-added economic activities, besides promoting production in agriculture and forestry. Shifting the resource base for chemical production from fossil feedstocks to renewable raw materials provides exciting possibilities for the use of industrial biotechnology-based process tools.

In a bio-based production, industrial biotechnology also interfaces with plant biotechnology (green biotechnology), where gene technology is applied to accelerate the process of plant breeding for crop improvement or for altering the composition of the feedstock for a desired product.

The concept of Knowledge-Based Bio-Economy and the vision of bio-economy in Europe to 2030 presented in so called “Cologne Paper” [82] are also briefly outlined.

Keywords: industrial biotechnology, biorafineries, biofuels, biotransformations

Słowa kluczowe: biotechnologia przemysłowa, biopaliwa, biorafinerie, biotransformacje

WSTĘP

Biotechnologia, zgodnie z definicją Europejskiej Federacji Biotechnologii, to „*zintegrowane zastosowanie biochemii, mikrobiologii i inżynierii procesowej w celu technicznego wykorzystania zdolności drobnoustrojów, kultur tkankowych oraz ich części*”. Z uwagi na zastosowania wyróżnia się trzy główne obszary: biotechnologię medyczną (tzw. „czerwona biotechnologia”), biotechnologię rolniczą („zielona biotechnologia”) i biotechnologię przemysłową („biała biotechnologia”). Ta ostatnia dziedzina obejmuje wykorzystanie mikroorganizmów i enzymów w produkcji przemysłowej oraz zastosowanie metod biologicznych do oczyszczania ścieków, zagospodarowania odpadów stałych i oczyszczania gazów. Najwięcej technologii biochemicznych znajduje zastosowanie w przemyśle: farmaceutycznym, spożywczym i chemicznym. W tym ostatnim obejmuje takie obszary jak: produkcja enzymów, biopaliw, kwasów organicznych oraz wykorzystanie biokatalizatorów w syntezach organicznych.

Biotechnologia przemysłowa wykorzystuje surowce odnawialne, oferując nie tylko znaczące korzyści ekologiczne, ale także, dzięki specyficznym cechom drobnoustrojów i biokatalizatorów, umożliwia często bardziej efektywne prowadzenie procesów przetwórczych, niż technologie chemiczne. Z tego względu, uważana jest za bardzo ważny element restrukturyzacji przemysłu chemicznego, zgodny z zasadami zrównoważonego rozwoju.

Niniejszy artykuł poświęcony jest wskazaniu tych cech technologii biochemicznych, które czynią je bardzo atrakcyjnymi dla przemysłu chemicznego oraz omówieniu wizji rozwoju biotechnologii przemysłowej w Europie.

1. BIOKATALIZATORY W SYNTEZACH CHEMICZNYCH

Obserwuje się rosnące zainteresowanie wykorzystaniem w technologiach chemicznych możliwości jakie dają biokatalizatory [1, 2]. Głównymi przyczynami tego zainteresowania są specyficzne cechy procesów biochemicznych. Najważniejszą, jest wysoka selektywność przemian z udziałem enzymów lub drobnoustrojów, często nieosiągalna tradycyjnymi technikami. Przemiany biologiczne zachodzą w umiarkowanych warunkach, nie wymagają wysokich ciśnień i wysokich temperatur. W efekcie, z roku na rok, zwiększa się liczba technologii chemicznych wykorzystujących, chociaż na jednym etapie, biotransformacje [3, 4].

Dzięki wykorzystaniu przemian mikrobiologicznych, można znacząco zmniejszyć ilość powstających odpadów. Przykładem może być wytwarzanie przez koncern DSM cefaleksyny – półsyntetycznego antybiotyku z grupy β -laktamowych [5]. W tradycyjnej technologii, otrzymywana mikrobiologicznie penicylina G była przetwarzana w dziesięciu przemianach chemicznych. W chwili uruchomienia przemysłowej produkcji cefaleksyny w 1975 roku, na 1 kg produktu wytwarzano 50 kg odpadów. Prace nad usprawnieniem technologii chemicznej doprowadziły do zmniejszenia

szenia ilości odpadów do 15 kg/kg w roku 1995. W tym też roku, wprowadzono nową technologię, w której liczbę etapów zmniejszono do sześciu, z czego trzy przemiany katalizowane były przez enzymy. W tej technologii wytwarzano 10 kg odpadów na 1 kg produktu. Dalsze doskonalenie procesu technologicznego doprowadziło do obniżenia ilości odpadów do 5 kg/kg. W 2000 roku wprowadzono nową technologię, w której kluczowy składnik kwas 7-aminodezacetoksycefalosporanowy (7-ADCA) jest otrzymywany w wyniku jednostopniowego procesu mikrobiologicznego. W efekcie liczbę etapów zmniejszono do czterech, zaś ilość wytwarzanych odpadów do 2 kg/kg [5].

W wielu innych technologiach uzyskano podobne efekty. Zastąpienie chemicznej syntezy ryboflawiny (witaminy B2), składającej się z ośmiu etapów, przez jednoetapową fermentację pozwoliło na obniżenie kosztów wytwarzania i zmniejszenie uciążliwości dla środowiska. W przypadku koncernu BASF, stosującego drożdże *Ashbya gossypii* uzyskano około 40% redukcję kosztów produkcji, zaś w koncernie Hoffman-LaRoche, który wykorzystuje bakterie *Bacillus subtilis*, obniżka kosztów w stosunku do procesu chemicznego wyniosła 50% [6, 7]. W tradycyjnej chemicznej technologii wytwarzania akryloamidu z akrylonitrylu stosuje się dwustopniową hydrolizę: początkowo wobec kwasu siarkowego, a następnie z udziałem katalizatora miedziowego. Proces enzymatyczny opracowany przez Mitsubishi Rayon Co. Ltd przebiega jednoetapowo [5]. Wykorzystując hydrolazę nitrylową z unieruchomionych komórek bakterii *Brevibacterium imperialis*, uzyskuje się 100% wydajność biotransformacji i wysokie stężenia akryloamidu w cieczy – dzięki czemu proces zateżnienia nie jest konieczny. Skutkiem tego, zużycie energii na wytworzenie 1 kg produktu, w technologii enzymatycznej wynosi 0,4 MJ/kg, wobec 1,9 MJ/kg w tradycyjnej technologii. W konsekwencji emisja CO₂ na jeden kg produktu, w technologii enzymatycznej wynosi 0,3 kg/kg, zaś w technologii tradycyjnej 1,5 kg CO₂/kg produktu.

Podane przykłady wyraźnie ilustrują korzyści jakie możliwe są do uzyskania w przemyśle chemicznym i pokrewnych, dzięki zastosowaniu przemian katalizowanych przez enzymy i drobnoustroje.

2. PRODUKCJA BIOPALIW

Szczególą rolę odgrywają technologie biochemiczne w wytwarzaniu paliw z surowców odnawialnych [7–10]. Przyczyny skłaniające do wykorzystania odnawialnych źródeł energii są powszechnie znane. Biotechnologia umożliwia wykorzystanie do produkcji paliw surowców roślinnych, a także odpadów z przemysłu rolno-spożywczego. Biotechnologicznie można wytwarzać zarówno paliwa ciekłe takie jak: etanol, butanol, biodiesel; jak i paliwa gazowe: metan, wodór [11]. Obecnie metody biochemiczne stosowane są do produkcji etanolu i metanu.

Zainteresowanie Unii Europejskiej paliwami pozyskanymi z surowców odnawialnych datuje się na koniec lat 90. XX wieku. W roku 1998, Parlament Europejski

wezwał do zwiększenia, do 2% udziału biopaliw w przeciągu 5-ciu lat. Wydana w roku 2003 Dyrektywa Rady Unii Europejskiej (2003/30/EC) określiła docelowe wskaźniki udziału biopaliw w zużyciu paliw ciekłych na: 2% w roku 2005 oraz 5,75% w 2010 roku. Tego planu nie udało się zrealizować – w 2005 roku udział biopaliw wyniósł około 1% [11]. Mimo to polityka Unii Europejskiej zmierza do zwiększenia wysiłków na rzecz produkcji energii odnawialnej. Przyjęta w marcu 2007 roku przez Komisję Europejską strategia, zakłada, iż w roku 2020 udział energii ze źródeł odnawialnych wyniesie 20%; w czym udział biopaliw w zużyciu paliw płynnych wyniesie 10%, zaś redukcja emisji CO₂ w stosunku do 1999 roku wyniesie 20%.

Główną wadą obecnie stosowanych technologii produkcji biopaliw jest wykorzystanie surowców, które służą również do produkcji żywności (zboża, oleje jadalne) [10, 12]. Często biopaliwa wytwarzane z surowców skrobiowych określane są mianem paliw pierwszej generacji. Zwiększone zużycie zbóż do produkcji biopaliw może powodować wzrost cen żywności. Obecnie zużycie surowców skrobiowych w krajach Unii Europejskiej nie przekracza 1% i nie stanowi zagrożenia dla rynku żywnościowego. Wzrost cen żywności w 2008 roku był efektem podwyżki cen ropy naftowej i spekulacji na rynkach surowcowych, a nie produkcji biopaliw [13]. W USA, gdzie w 2006 roku, około 14% kukurydzy było zużywane do produkcji etanolu; zwiększone zużycie spowodowało wzrost cen tego zboża [10, 14]. Rozwiązaniem konfliktu pomiędzy zużyciem surowców dla potrzeb produkcji energii, a zużyciem do produkcji żywności są tzw. biopaliwa drugiej generacji, czyli etanol i estry kwasów tłuszczowych wytwarzane z surowców lignino-celulozowych i odpadów przemysłowych oraz rolnych [15, 16]. Określenie „paliwa drugiej generacji” ma na celu ich odróżnienie od paliw wytwarzanych ze zbóż.

Korzyści z wykorzystania surowców lignino-celulozowych są wielorakie [8, 16–19]. Przede wszystkim, prowadzą do zmniejszenia zapotrzebowania na zboża konsumpcyjne wykorzystywane w produkcji paliw pierwszej generacji oraz do powiązanego z tym zmniejszenia zapotrzebowania na ziemię uprawne. Istotne znaczenie ma możliwość wytwarzania obok paliw także innych wartościowych produktów, co zostało omówione w dalszej części artykułu poświęconej biorafineriom. Na podkreślenie zasługuje także udział produkcji biopaliw w rozwoju ekonomicznym terenów wiejskich [20]. Analizy całkowitej emisji CO₂ związanej z wytwarzaniem paliw (na wszystkich etapach produkcji), wykazują wyraźną przewagę surowców lignino-celulozowych nad surowcami skrobiowymi [8, 21]. Główna trudność w pełnym wykorzystaniu surowców lignino-celulozowych związana jest z kosztową hydrolizą w celu otrzymania cukrów prostych, stanowiących surowiec dla procesów mikrobiologicznych [22, 23].

Opublikowana w tym roku Dyrektywa UE (2009/28/EC) dotycząca promowania energii ze źródeł odnawialnych, kładzie nacisk na zwiększenie produkcji biopaliw II generacji i zapewnienie zrównoważonej produkcji nośników energii. Stanowi to dodatkowy bodziec do rozwoju technologii biochemicznych w Europie.

Butanol, z uwagi na większą zawartość energii, mniejszą lotność i mniejszą higroskopijność, jest bardziej atrakcyjnym paliwem do silników spalinyowych niż etanol, zwłaszcza, że może być używany zarówno czysty jak i w dowolnych mieszankach z węglowodorami [24, 25]. Głównym czynnikiem hamującym wykorzystanie butanolu otrzymywanego na drodze fermentacji surowców odnawialnych są wysokie koszty produkcji wynikające z małej wydajności tego procesu [26]. Butanol wytwarzany jest przez klostridia, grupę bezwzględnie beztlenowych bakterii tworzących spory. W wyniku przemian metabolicznych klostridia wydzielają na zewnątrz komórek rozpuszczalniki organiczne: butanol, etanol i aceton. Rozpuszczalniki te działają toksycznie, hamując wzrost bakterii. Z kolei tworzenie form przetrwalnikowych (spor) hamuje wytwarzanie rozpuszczalników. Obniżenie kosztów produkcji butanolu będzie możliwe, jeżeli w wyniku zastosowania technik inżynierii metabolicznej uzyska się szczepy bakterii o zwiększonej produktywności oraz wykorzystane zaawansowane techniki fermentacji, pozwalające na wydzielanie produktów metabolizmu podczas fermentacji [26–28].

Produkcja biopaliw płynnych, etanolu i biodiesla, budzi pewne kontrowersje związane zarówno z niedostatkami stosowanych technologii jak i niepewnością co do skuteczności technologii znajdujących się obecnie w stadium badań [8, 29, 30]. Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku produkcji biopaliw gazowych. Wykorzystanie procesów mikrobiologicznych do produkcji metanu ma długą tradycję [31]. Jest to technologia dojrzała, wykorzystująca przede wszystkim surowce odpadowe z produkcji rolnej takie jak: gnojowica, a także osady ściekowe i odpady komunalne [32–34]. Coraz większym zainteresowaniem cieszy się wykorzystanie upraw celowych do produkcji biogazu, stosowanego w wytwarzaniu energii elektrycznej i ciepłej [35, 36]. Szczególnie dużo instalacji biogazowych budowanych jest w Niemczech, czemu sprzyjają odpowiednie regulacje prawne i preferencyjne ceny energii, wytwarzanej ze źródeł odnawialnych [37].

O ile fermentacja metanowa jest stosowana na dużą skalę, to wykorzystanie metod biologicznych do wytwarzania wodoru znajduje się ciągle na etapie badań laboratoryjnych i instalacji pilotowych [38–40]. Wodór uznawany jest za bardzo perspektywiczny nośnik energii [41–43]. Obecne technologie produkcji wodoru, z gazu ziemnego, węgla lub w procesach elektrolitycznych, są uciążliwe dla środowiska i wykorzystują surowce nieodnawialne. Metody biologiczne umożliwiają produkcję wodoru z surowców odnawialnych [44, 45]. Spośród kilku sposobów biologicznej produkcji wodoru, obecnie najbardziej obiecującą jest tzw. ciemna fermentacja wodorowa [44]. W warunkach beztlenowych niektóre bakterie wytwarzają wodór i lotne kwasy tłuszczowe, głównie: octowy, propionowy, masłowy. Możliwe jest tu wykorzystanie różnorodnych surowców odpadowych jak i upraw celowych. Wadą tej technologii jest ograniczona wydajność wodoru oraz konieczność zagospodarowania kwasów organicznych pozostających w cieczy pofermentacyjnej [46]. Jedną z możliwości rozwiązania problemu, jest wykorzystanie takiego płynu jako surowca do fermentacji metanowej [45, 47].

Innym ciekawym rozwiązaniem, będącym przedmiotem badań laboratoryjnych są mikrobiologiczne ogniwa paliwowe [48–51]. Podobnie jak w ogniwach chemicznych, zamieniają one energię zawartą w związkach chemicznych na energię elektryczną. Tu w odróżnieniu od ogniw chemicznych, nie stosuje się kosztownych katalizatorów wykonanych z metali szlachetnych do katalizowania reakcji przebiegających na anodzie, lecz procesy mikrobiologiczne. Niektóre drobnoustroje potrafią pośrednio lub bezpośrednio przekazywać na elektrodę elektrony pochodzące z utleniania związków organicznych. Uzyskiwana obecnie moc mikrobiologicznych ogniw paliwowych jest znacznie mniejsza niż ogniw chemicznych, ale szybki postęp w tej dziedzinie wskazuje, iż w ciągu kilku lat ogniwa mikrobiologiczne mogą stać się interesującym sposobem wytwarzania energii i utylizacji ścieków [50, 52].

Atrakcyjną alternatywą wykorzystania roślin łądowych w produkcji biopaliw jest zastosowanie organizmów fototroficznych, takich jak algi i sinice [53–57]. Organizmy te potrafią przekształcać energię słoneczną ze znacznie większą sprawnością niż rośliny łądowe. Ich hodowla może być znacznie bardziej intensywna i zajmować mniejsze powierzchnie w porównaniu do obecnie wykorzystywanych upraw celowych. Duża różnorodność metaboliczna oraz ekologiczna alg, sprzyja selekcji szczepów dostosowanych do lokalnych warunków. Niektóre algi zawierają do 70% olejów w suchej masie i stanowią bardzo dobry surowiec do produkcji biodiesla [58, 59]. Oprócz tłuszczów z biomasy fotoautotrofów, można uzyskiwać białka stanowiące wartościową paszę dla zwierząt [60]. Równie interesujące jest wykorzystanie alg do pochłaniania ditlenku węgla z gazów spalinowych [61]. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż nie tylko mikroorganizmy fototroficzne mogą być wykorzystywane do produkcji biodiesla, ale również grzyby strzępkowe i drożdże [62].

3. BIORAFINERIE

Wykorzystanie surowców roślinnych nie ogranicza się wyłącznie do produkcji biopaliw. Mogą one służyć także do wytwarzania różnego rodzaju chemikaliów, dodatków do żywności, czy polimerów. Prowadzi to do koncepcji tzw. biorafinerii czyli zakładów przetwórczych podobnych do rafinerii petrochemicznych, ale wykorzystujących surowce roślinne [63–65]. Stąd mowa o przejściu od gospodarki opartej na węglowodorach do gospodarki opartej na węglowodanach [13, 66–68]. Koncepcja ta ma istotne znaczenie dla przemysłu chemicznego, który wobec wyczerpujących się zasobów surowców kopalnych (ropa naftowa, gaz ziemny, węgiel) i wzrostu ich cen, musi rozwiązać kwestie przyszłych źródeł surowców. Wykorzystanie metod biotechnologicznych, otwiera nowe możliwości produkcji różnych związków chemicznych z surowców odnawialnych [69]. W raporcie opracowanym dla Departamentu Energii USA [70] wytypowano 12 związków, otrzymywanych w wyniku procesów mikrobiologicznych, które mogą stanowić platformy do wytwarzania różnych chemikaliów. Związkami tymi są: 1,4-dihydroksykwas (bursztynowy, fumarowy), kwas 3-hydroksypropionowy, kwas 2,5-furanodikarboksylový, kwas

asparaginowy, kwas glukarowy, kwas glutaminowy, kwas itakonowy, kwas lewulinowy, 3-hydroksybutyrolakton, glicerol, sorbitol i ksylitol. Dla przykładu w wyniku różnych transformacji kwasu bursztynowego można otrzymać m.in. 1,4-butanediol, tetrahydrofuran, 2-pirolidon, 1,4-diaminobutan, nityl kwasu bursztynowego [71]. Oczywiście obok wymienionych dwunastu związków, należy pod uwagę brać także te związki, które obecnie są wytwarzane metodami mikrobiologicznymi: etanol, butanol, kwas mlekowy, 1,3-propanodiol. Dla przykładu, z kwasu mlekowego można otrzymać w wyniku polimeryzacji biodegradowalne polimery, a także przekształcić go do kwasu akrylowego, 1,2-propanodiolu, kwasu propionowego, kwasu pirogrogowego lub kwasu szczawiowego [72].

Rozwój technologii biorafinerii wymaga rozwiązania wielu zagadnień technicznych i technologicznych. Najważniejsze z nich to [73]:

- opracowanie efektywnych technik wydzielenia składników z surowców lignino-celulozowych;
- opracowanie efektywnych metod wstępnej obróbki biomasy roślinnej dla procesów fermentacyjnych i chemicznych;
- opracowanie efektywnych procesów rozkładu celulozy, hemicelulozy oraz lignin;
- opracowanie procesów fermentacyjnych do mikrobiologicznego przetwarzania produktów hydrolizy surowców lignino-celulozowych;
- opracowanie prostych metod przekształcania surowców w bazowe chemikalia;
- opracowanie nowych dróg integracji procesów mikrobiologicznych i chemicznych;
- opracowanie procesów dostosowanych do dużej zmienności składu surowców roślinnych;
- przekształcenia obecnie działających instalacji, takich jak celulozownie, cukrownie, w biorafinerie nowej generacji;
- rozwój elastycznych instalacji produkcyjnych zdolnych do szybkiego dostosowywania się do zmiennej sytuacji na rynkach surowców i produktów.

Produkcja biopaliw z surowców lignino-celulozowych jak i wytwarzanie chemikaliów w biorafineriach stawiają poważne wyzwania dla współczesnej biotechnologii [74–77]. Potrzebne są nowe preparaty enzymatyczne służące do efektywnej hydrolizy surowców, nowe mikroorganizmy sprawnie przetwarzające produkty hydrolizy celulozy i hemicelulozy, a także nowe odmiany roślin uprawnych o lepszych właściwościach np. mniejszej zawartości lignin [74, 78, 79].

4. PROGRAMY ROZWOJU BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁOWEJ W UNII EUROPEJSKIEJ

W Europie już od ponad 10 lat podejmowano wiele działań mających na celu stymulowanie rozwoju biotechnologii przemysłowej i promowanie przedsiębiorczości w tym sektorze. W 1997 roku z inicjatywy Komisji Europejskiej powstało Biotechnology and Finance Forum (BFF) służące tym celom. Rok później, BFF zorganizowało w Brukseli konferencję pt. „Promoting entrepreneurial initiatives in biotechnology”. W 2002 roku Komisja Europejska publikuje raport „Innovation and competitiveness in European biotechnology”, w którym wzywa do zwiększenia konkurencyjności europejskiego przemysłu biotechnologicznego w stosunku do USA. W tym samym roku Komisja prezentuje strategię rozwoju nauk biologicznych i biotechnologii [80]. W 2004 roku z inicjatywy Komisji Europejskiej, Europejskiej Rady Przemysłu Chemicznego (ang. *European Chemical Industry Council*, CEFIC) oraz Europejskiego Stowarzyszenia Bioprzemysłu (ang. *European Association for Bioindustries*, *EuropaBio*), powołano Europejską Platformę Technologiczną Zrównoważonej Chemii (ang. *European Technology Platform for Sustainable Chemistry*, SusChem - zob. www.suschem.org). Celem Platformy jest m.in. zwiększenie konkurencyjności europejskiego przemysłu chemicznego oraz wspieranie długofalowych strategii rozwoju tego przemysłu. Uczestnicy Platformy wyznaczyli trzy główne obszary badań i rozwoju, które uznali za kluczowe, a mianowicie, biotechnologię przemysłową, technologie materiałowe oraz inżynierię procesową. W opracowanej w roku 2005 przez SusChem, perspektywie rozwoju biotechnologii przemysłowej (do roku 2025), za zasadnicze elementy uznano [81]:

- wzrost liczby i ilości chemikaliów oraz biomateriałów produkowanych metodami biotechnologicznymi;
- zwiększenie wykorzystania surowców odnawialnych przez przemysł;
- rozwój technologii przyjaznych dla środowiska i efektywnych ekonomicznie;
- zwiększenie udziału energii otrzymywanej z biomasy;
- wzrost udziału biorafinerii rolniczych w produkcji biotechnologicznej;
- wzrost innowacyjności i konkurencyjności przemysłu europejskiego w wyniku zastosowania technik biotechnologicznych;
- zwiększenie produkcji biomasy roślinnej w wyniku zastosowania technik zielonej biotechnologii.

W opracowanym przez SusChem w 2005 roku Strategicznym Programie Badań [82], w zakresie biotechnologii przemysłowej, wskazano na silne i słabe strony, tej gałęzi przemysłu w Europie. Za czynniki ważne dla rozwoju biotechnologii przemysłowej uznano duży potencjał badawczy oraz znaczącą rolę przemysłu chemicznego. W Europie znajdują się najwięksi producenci preparatów enzymatycznych i jest dobrze rozwinięty przemysł fermentacyjny. Rozszerzenie Unii o kraje Europy Środkowo-Wschodniej, zwiększyło ilość dostępnych surowców dla przemysłu biotechnologicznego. Nie bez znaczenia dla rozwoju biotechnologii przemysłowej ma

też społeczna akceptacja. Idea zrównoważonego rozwoju najwcześniej została podjęta w Europie, w tej dziedzinie kraje Unii są bardziej zaawansowane niż USA i kraje azjatyckie.

Obok czynników sprzyjających rozwojowi biotechnologii przemysłowej, w gospodarce europejskiej występują czynniki, które stanowią o pewnej słabości tego sektora gospodarki [82]. Należy do nich zaliczyć: regulowany rynek surowców odnawialnych i ich stosunkowo wysokie ceny, niedostatecznie efektywny system finansowania badań rozwojowych, niedostateczną integrację różnych dyscyplin naukowych w rozwiązywaniu problemów interdyscyplinarnych, trudności w pozyskiwaniu kapitału inwestycyjnego [82].

Zagrożeń dla rozwoju biotechnologii przemysłowej w Unii Europejskiej upatruje się w przenoszeniu produkcji chemicznej poza Europę, komercjalizacji wyników badań rozwojowych poza Unią, zanikaniu badań podstawowych oraz małej społecznej akceptacji dla wykorzystania organizmów modyfikowanych genetycznie (ang. *genetically modified organisms*, GMO) [82]. Unia Europejska musi stawić czoła wzrastającej konkurencji ze strony USA oraz krajów azjatyckich (Japonia, Chiny, Korea Południowa, Indie), w których rozwój biotechnologii przemysłowej jest silnie wspierany.

5. BIOGOSPODARKA OPARTA NA WIEDZY

W maju 2007 roku w Kolonii zorganizowano, w ramach niemieckiej prezydencji, w Unii Europejskiej, konferencję pt. „En Route to the Knowledge-Based Bio-Economy” na której podsumowano prace sześciu grup roboczych zajmujących się różnymi aspektami oddziaływania biotechnologii na gospodarkę i społeczeństwo. Końcowy dokument konferencji, określany często mianem Dokumentu Kolońskiego, kreśli perspektywę rozwoju biogospodarki opartej na wiedzy (ang. *the Knowledge Based Bio-Economy*, KBBE) [83]. Dokument Koloński nie jest oficjalnym dokumentem Rady Unii Europejskiej, jednak jest ważny, gdyż prezentuje akceptowaną wśród ekspertów wizję rozwoju biotechnologii w Europie do roku 2030. W wizji tej biotechnologia stanowi ważny filar gospodarki europejskiej, niezbędny dla zrównoważonego rozwoju, zapewnienia odpowiedniego poziomu zatrudnienia, zaopatrzenia w energię oraz odpowiedniego poziomu życia mieszkańców Unii. Przewiduje się, że w roku 2030 wartość produkcji biotechnologii przemysłowej wyniesie 300 mld euro. Postęp w zakresie hodowli roślin oraz biotechnologicznych metod przetwarzania surowców roślinnych stanowić ma podstawę biogospodarki opartej na wiedzy. Przewiduje się, że w roku 2030 około jednej trzeciej chemikaliów i materiałów będzie wytwarzana z surowców pochodzenia biologicznego z zastosowaniem zaawansowanych procesów biotechnologicznych.

Biotechnologia może pomóc stawić czoła najważniejszym globalnym wyzwaniom takim jak: starzenie się społeczeństw europejskich; wzrost populacji na Ziemi; ograniczone zasoby surowców, energii i wody; zmiany klimatu. Ważnym narzędziem

ma być rozwój zrównoważonej gospodarki wykorzystującej procesy biologiczne. Kluczowe dla urzeczywistnienia tej wizji jest połączenie zaawansowanej inżynierii bioprocessowej z wysokowydajnymi uprawami roślinnymi. Zielona biotechnologia jest niezbędna dla zapewnienia właściwego zaopatrzenia w surowce, gdyż konwencjonalne metody upraw, wykorzystujące intensywne nawożenie i środki ochrony roślin, nie są w stanie zapewnić w warunkach zrównoważonego rozwoju dostatecznej podaży surowców. Surowce roślinne mogą być źródłem enzymów, aminokwasów, farmaceutyków, włókien, a także stanowić surowiec do produkcji biopolimerów, biopaliw i innych chemikaliów [84]. Przewiduje się, że już w 2020 roku, obok obecnie stosowanej technologii gazyfikacji, enzymatyczna konwersja surowców lignino-celulozowych stanie się standardową techniką otwierającą dostęp do olbrzymich zasobów surowcowych dla bioprocessów i produkcji paliw wykorzystywanych w transporcie.

Rozwój zielonej biotechnologii oznacza także, nadejście ery zindywidualizowanej żywności, wytwarzania produktów spożywczych o lepszych walorach zdrowotnych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb konsumentów. Personalizacja obejmie również medycynę. Dzięki nowym biofarmaceutynom i rozwojowi medycyny regeneracyjnej zwiększy się zarówno skuteczność leczenia jak i liczba leczonych chorób [85].

Realizacja ambitnych wizji wymaga rozwoju badań podstawowych, zwłaszcza w zakresie nauk biologicznych i technicznych. Z kolei rozwój nowych technologii i technologicznych innowacji powinien przyspieszyć postęp w badaniach podstawowych. Spodziewane jest przekształcenie biotechnologii z dziedziny skupiającej się na odkrywaniu zjawisk i mechanizmów procesów biologicznych (*discovery science*) w dziedzinę o charakterze inżynierskim, ukierunkowaną na praktyczne wykorzystanie wiedzy (*engineering science*). Dla przykładu, spodziewane jest stworzenie w najbliższych latach syntetycznych komórek, zdolnych do wysokowydajnego wytwarzania wybranych produktów [86]. Z kolei biologia systemów, badania nad mózgiem oraz modelowanie zjawisk neuralnych mogą stanowić zarówno inspirację dla różnych innowacji technologicznych takich jak protezy inteligencji czy neuropodobne procesory w komputerach, jak również przyczynić się do konsolidacji wiedzy o mózgu, od poziomu molekularnego po psychofizyczny.

Innowacje technologiczne, mogą pomóc rozwiązać konflikty związane z wykorzystaniem ograniczonego arealu ziemi uprawnej do produkcji żywności i surowców nieżywnościowych. Postęp technologiczny może również przyczynić się do realizacji innej ambitnej wizji, by do roku 2030 uzyskać funkcjonowanie europejskiego rolnictwa bez dotacji. Proponuje się, aby środki przeznaczane obecnie w ramach Wspólnej Polityki Rolnej (CAP – Common Agricultural Policy) na subsydiowanie rolnictwa, poświęcić na wspomaganie innowacji technologicznych i badań naukowych. Dzięki zintegrowanej produkcji żywności, materiałów i energii, możliwe jest uzyskanie opłacalnej produkcji rolnej i zapewnienie zrównoważonego rozwoju gospodarczego [84]. Biotechnologia przemysłowa odgrywa w realizacji tej wizji kluczową rolę.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Woodley, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 321.
- [2] D.J. Pollard, J.M. Woodley, *Trends Biotechnol.*, 2007, **25**, 66.
- [3] A. Schmid, F. Hollmann, J.B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 359.
- [4] A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 548.
- [5] M. Griffiths (Ed), *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*, 2001, OECD Publication Service.
- [6] K.-P. Stahmann, J.L. Revuelta, H. Seulberger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **53**, 509.
- [7] A. Demirbas, *Appl. Energy*, 2009, **86**, S108.
- [8] E.C. Petrou, C.P. Pappis, *Energy & Fuels*, 2009, **23**, 1055.
- [9] R. Luque, L. Herrero-Davila, J.M. Campelo, J.H. Clark, J.M. Hidalgo, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 542.
- [10] J.C. Escobar, E.S. Lora, O.J. Venturini, E.E. Yáñez, E.F. Castillo, O. Almazan, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2009, **13**, 1275.
- [11] D. Antoni, V. Zverlov, W.H. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **77**, 23.
- [12] K.G. Cassman, A.J. Liska, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2007, **1**, 18.
- [13] J.A. Mathews, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2009, **3**, 613.
- [14] S.K. Hoekman, *Renew. Energ.*, 2009, **34**, 14.
- [15] R.C. Saxena, D.K. Adhikari, H.B. Goyal, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2009, **13**, 167.
- [16] B. Antizar-Ladislao, J.L. Turrion-Gomez, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 455.
- [17] L. da Costa Sousa, S.P. Chundawat, V. Balan, B.E. Dale, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, **20**, 339.
- [18] Ó.J. Sánchez, C.A. Cardona, *Bioresource Technol.*, 2008, **99**, 5270.
- [19] B. Brehmer, J. Sanders, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, **102**, 767.
- [20] F.L. Leistritz, N.M. Hodur, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 501.
- [21] J.J. Sheehan, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, **20**, 318.
- [22] H. J rgensen, J.B. Kristensen, C. Felby, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2007, **1**, 119.
- [23] B. Yang, C.E. Wyman, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 26.
- [24] P. Dürre, *Biotechnol. J.*, 2007, **2**, 1525.
- [25] N. Qureshi, T.C. Ezeji, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 319.
- [26] Y.-N. Zheng, L.-Z. Li, M. Xian, Y.-J. Ma, J.-M. Yang, X. Xu, D.-Z. He, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 1127.
- [27] T.C. Ezeji, N. Qureshi, H.P. Blaschek, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 220.
- [28] T.C. Ezeji, P.M. Karcher, N. Qureshi, H.P. Blaschek, *Bioproc. Biosys. Eng.*, 2005, **27**, 207.
- [29] S. Cockerill, C. Martin, *Biotechnol. Biofuels*, 2008, **1**:9.
- [30] A. Moore, *Biotechnol. J.*, 2009, **4**, 578.
- [31] H.J. Gijzen, *Water Sci. Technol.*, 2002, **45**, 321.
- [32] B.K. Ahring, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2003, **81**, 1.
- [33] C. Tricase, M. Lombardi, *Renew. Energ.*, 2009, **34**, 477.
- [34] L. Appels, J. Baeyens, J. Degr ve, R. Dewil, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2008, **34**, 755.
- [35] K.W. Szewczyk, *Przem. Chem.*, 2006, **85**, 1321.
- [36] T. Amon, B. Amon, V. Kryvoruchko, A. Machmüller, K. Hopfner-Sixt, V. Bodiroza, R. Hrbek, J. Friedel, E. Pötsch, H. Wagentristl, M. Schreiner, W. Zollitsch, *Bioresource Technol.*, 2007, **98**, 3204.
- [37] P. Weiland, *Eng. Life Sci.*, 2006, **6**, 302.
- [38] Y. Kalinci, A. Hepbasli, I. Dincer, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 8799.
- [39] P.C. Hallenbeck, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 7379.
- [40] P.C. Hallenbeck, D. Ghosh, *Trends Biotechnol.*, 2009, **27**, 287.

- [41] G. Marbán, T. Valdés-Solis, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, **32**, 1625.
- [42] S. Meher Kotay, D. Das, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2008, **33**, 258.
- [43] I.P. Jain, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 7368.
- [44] G. Davila-Vazquez, S. Arriaga, F. Alatríste-Mondragón, A. León-Rodríguez, L.M. Rosales-Colunga, E. Razo-Flores, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 2008, **7**, 27.
- [45] K.W. Szewczyk, *Post. Mikrobiol.*, 2008, **47**, 241.
- [46] D. Das, T.N. Veziroglu, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2008, **33**, 6046.
- [47] M. Cooney, N. Maynard, C. Cannizzaro, J. Benemann, *Bioresource Technol.*, 2007, **98**, 2641.
- [48] K.W. Szewczyk, *Biologiczne ogniwa paliwowe*, [w:] *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom XV, Wydawnictwa Naukowe UAM Poznań, 2006.
- [49] D.R. Lovley, *Curr. Opin. Biotech.*, 2008, **19**, 564.
- [50] K. Watanabe, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **106**, 528.
- [51] Z. Du, H. Li, T. Gu., *Biotechnol. Adv.*, 2007, **25**, 464.
- [52] A. Rinaldi, B. Mecheri, V. Garavaglia, S. Licoccia, P. Di Nardo, E. Traversa, *Energy Environ. Sci.*, 2009, **2**, 417.
- [53] G.C. Dismukes, D. Carrieri, N. Bennette, G.M. Ananyev, M.C. Posewitz, *Curr. Opin. Biotech.*, 2008, **19**, 235.
- [54] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C.Q. Lan, N. Dubois-Calero, *Biotechnol. Prog.*, 2008, **24**, 815.
- [55] Y. Chisti, *Biotechnol. Adv.*, 2007, **25**, 294.
- [56] L. Gouveia, A.C. Oliveira, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 269.
- [57] C. Posten, G. Schaub, *J. Biotechnol.*, 2009, **142**, 64.
- [58] Q. Li, W. Du, D. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **80**, 749.
- [59] X. Meng, J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, M. Xian, *Renew. Energ.*, 2009, **34**, 1.
- [60] E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F.G. Ación Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, *Biotechnol. Adv.*, 2003, **20**, 491.
- [61] E. Ono, J.L. Cuello, *Biosystems Engineering*, 2006, **95**, 597.
- [62] G. Vicente, L.F. Bautista, R. Rodríguez, F.J. Gutiérrez, I. Sádaba, R.M. Ruiz-Vázquez, S. Torres-Martínez, V. Garre, *Biochem. Eng. J.*, 2009, **48**, 22.
- [63] B. Burczyk, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 739.
- [64] M.L. Albertson, A. Pruden, R.T. Oliver, *Int. Congress Ser.*, 2006, **1293**, 221.
- [65] S. Octave, D. Thomas, *Biochimie*, 2009, **91**, 659.
- [66] J. Sanders, E. Scott, R. Weusthuis, H. Mooibroek, *Macromol. Biosci.*, 2007, **7**, 105.
- [67] T. Jenkins, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 133-143
- [68] W. Soetaert, E. Vandamme, *Biotechnol. J.*, 2006, **1**, 756.
- [69] B.G. Hermann, M. Patel, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2007, **136**, 361.
- [70] T. Werpy, G. Petersen (Eds), *Top Value Added Chemicals from Biomass*, Vol. I, DEO, 2004.
- [71] A. Cukalovic, C.V. Stevens, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2008, **2**, 505.
- [72] R. Datta, M. Henry, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2006, **81**, 1119.
- [73] M. Black, R. Miller, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2006, **81**, 1725.
- [74] M.E. Himmel, E.A. Bayer, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, **20**, 316.
- [75] G. Stephanopoulos, *Science*, 2007, **315**, 801.
- [76] Y. Yan, J.C. Liao, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 471.
- [77] S.K. Lee, H. Chou, T.S. Ham, T.S. Lee, J.D. Keasling, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008, **19**, 556.
- [78] M.B. Sticklen, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, **17**, 315.
- [79] M.B. Sticklen, *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2009, **3**, 448.
- [80] Life sciences and biotechnology – a strategy for Europe, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2002, ISBN: 9289433884

- [81] SusChem, The vision for 2025 and beyond, [online]. Ostatnia aktualizacja 17 września 2009 [dostęp: 20 września 2009]. Dostępny w Internecie: <http://www.suschem.org/media.php?mId=2170>
- [82] SusChem, Sustainable Chemistry Strategic Research Agenda 2005, [online]. Ostatnia aktualizacja 9 stycznia 2006 [dostęp: 20 września 2009]. Dostępny w Internecie: <http://www.suschem.org/media.php?mId=3670>
- [83] En route to the Knowledge-Base Bio-Economy (KBBE), [online] [dostęp: 20 września 2009]. Dostępny w Internecie: http://www.bio-economy.net/reports/files/koln_paper.pdf
- [84] H. Lyko, G. Deerberg, E. Weidner, J. Biotechnol., 2009, **142**, 78.
- [85] P.A. Guertin, Biotechnol. J., 2009, **4**, 1124.
- [86] S. Picataggio, Curr. Opin. Biotechnol., 2009, **20**, 325.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 listopada 2009

ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA W UKŁADZIE ZAMKNIĘTYM

PLANAR ELECTROCHROMATOGRAPHY IN CLOSED SYSTEM

**Paweł W. Płocharz, Piotr Ślązak,
Aneta Hałka-Grysińska, Adam Chomicki,
Tadeusz H. Dzido***

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie,
ul. Staszica 6, 20-081 Lublin
e-mail: tadeusz.dzido@umlub.pl

Abstract

Stosowane skróty

Wstęp

1. Zarys rozwoju metody elektrochromatografii planarnej (PEC)
2. Przepływ fazy ruchomej w elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC)
3. Aparatura do PPEC
4. Efektywność procesu elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej
 - 4.1. Czas separacji w metodzie PPEC
 - 4.2. PPEC jako wysokosprawna metoda separacji
 - 4.3. Zmiana selektywności rozdzielania układów PPEC w porównaniu do układów chromatografii cienkowarstwowej (TLC)
 - 4.4. Wielowymiarowe rozwijanie chromatografów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Adam Chomicki jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2007 roku rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Obecnie zajmuje się tematyką z zakresu rozdzielania mieszanin substancji biologicznie czynnych metodą ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej (PPEC).

Piotr Ślązak ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Od 2005 r. jest asystentem naukowo-technicznym w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Tematyka jego pracy naukowej obejmuje badania nad warunkami rozdzielania mieszanin substancji metodami chromatografii cieczonej i elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC) oraz konstrukcję komór do PPEC.

Tadeusz H. Dzido, prof. nadzw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, urodzony w 1950 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1973 r. Doktorat nauk chemicznych na UMCS w Lublinie – 1980 r. Doktor habilitowany nauk chemicznych (UMCS) – 2003 r. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii UM w Lublinie. Własne zainteresowania badawcze: mechanizm retencji i selektywności rozdzielania substancji, głównie biologicznie aktywnych, w chromatografii cieczonej (HPLC, TLC/HPTLC), mechanizm migracji i selektywności rozdzielania stref substancji w elektrochromatografii planarnej, optymalizacja warunków rozdzielania wspomnianymi metodami, konstrukcje komór do chromatografii cienkowarstwowej, elektrochromatografii planarnej i elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC). Autor/współautor 80 prac naukowych, 25 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

Aneta Hałka-Grysińska w 2006 roku ukończyła studia magisterskie na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie (obecny Uniwersytet Medyczny w Lublinie). Aktualnie kontynuuje naukę na studiach doktoranckich. Tematyka jej pracy obejmuje badania nad potencjalnym wykorzystaniem elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym w analizie farmaceutycznej.

Paweł Płocharz – absolwent Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie. Od 2004 r. asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Jego główne kierunki pracy badawczej są związane z optymalizacją rozdzielania mieszanin substancji metodami chromatografii cieczonej kolumnowej i planarnej, mechanizmem retencji, badaniem układów elektrochromatografii planarnej oraz konstrukcją komór do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej.

ABSTRACT

Planar electrochromatography in closed system (pressurized planar electrochromatography, PPEC) is the separation mode in which mobile phase is driven into movement by electroosmotic effect relative to adsorbent layer of the chromatographic plate. Solute band migration in the PPEC mode is governed by two effects: solute partition in a mobile phase - stationary phase system and electrophoresis when solutes undergo dissociation.

Development of the methodology and equipment for PPEC are described in the paper. Attributes of the mode such as high separation efficiency and selectivity changes relative to liquid chromatography, especially thin-layer chromatography, are discussed. The mode is characterized by relatively short separation time and high performance of the separating system. Plate height approaches the value equal to two particle diameter of the stationary phase (adsorbent layer). Different separation selectivity mentioned is especially advantageous for application in two dimensional separation. The example of such separation of a test dye mixture, applying high performance thin layer chromatography in the first dimension and pressurized planar electrochromatography in the second one, is also presented and discussed in the paper.

The mentioned advantages are very promising for development of the mode and its future application in laboratory practice. However, few main challenges concerned with production of chromatographic plates dedicated to the mode and construction of the equipment convenient for the operator are primary concern of future development of the mode.

Keywords: planar electrochromatography in closed system, pressurized planar electrochromatography, PPEC, development of PPEC, advantages and challenges of PPEC

Słowa kluczowe: elektrochromatografia w układzie zamkniętym, elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, PPEC, rozwój PPEC, zalety i wyzwania PPEC

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 2D – dwuwymiarowy proces chromatograficzny (ang. *two dimensional chromatographic process*)
- 2D HPTLC/PPEC – dwuwymiarowy proces złożony z wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej i elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (ang. *two dimensional process comprised High Performance Thin Layer Chromatography and Pressurized Planar Electrochromatography*)
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)
- OPLC – chromatografia planarna (cienkowsarstwowa) ciśnieniowa (ang. *Overpressured Layer Chromatography*)
- PEC – elektrochromatografia planarna (ang. *Planar Electrochromatography*)
- PPEC – elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, elektrochromatografia planarna w układzie zamkniętym (ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*)
- RPC – chromatografia planarna rotacyjna (ang. *Rotation Planar Chromatography*)
- TLC/HPTLC – chromatografia cienkowsarstwowa (planarna)/wysokosprawna chromatografia cienkowsarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography/High Performance Thin Layer Chromatography*)

WSTĘP

Metody chromatograficzne służą nie tylko do rozdzielania mieszanin substancji oraz ich oceny jakościowej i ilościowej, ale stały się narzędziem badań nad mechanizmami wielu zjawisk. Spośród metod chromatograficznych dużą popularnością cieszy się chromatografia cienkowarstwowa (TLC/HPTLC), którą najczęściej wykorzystuje się w analizie: farmaceutycznej, biomedycznej, ochrony środowiska, klinicznej, artykułów spożywczych, toksykologicznej itp. Duże zainteresowanie metodą TLC wynika m.in. z możliwości prowadzenia procesu rozdzielania zarówno przy zastosowaniu zaawansowanej technicznie aparatury, a także prostych i tanich urządzeń. Jednakże TLC charakteryzuje się kilkoma wadami, które ograniczają efektywność procesu separacji, takimi jak: prędkość przepływu fazy ruchomej zmniejszająca się w trakcie chromatografowania (nie można jej regulować podczas procesu separacji), ograniczony dystans rozwijania chromatogramu (nie pozwala na całkowite rozdzielenie składników analizowanej próbki). Aby zmniejszyć lub wyeliminować te niekorzystne cechy, wykorzystuje się techniki z wymuszonym przepływem fazy ruchomej w zamkniętym układzie chromatograficznym, tj. chromatografię cienkowarstwową ciśnieniową (ang. *Overpressured Layer Chromatography*, OPLC), rotacyjną chromatografię planarną (ang. *Rotation Planar Chromatography*, RPC) oraz ostatnio elektrochromatografię planarną ciśnieniową (PPEC – ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*). W OPLC przepływ fazy ruchomej jest wymuszany ciśnieniem tłoczenia pompy, w RPC jest wywołany siłą odśrodkową (wirującej płytki chromatograficznej), zaś w PPEC jest generowany przez pole elektryczne (elektroosmozę). Ostatnia metoda została wprowadzona do literatury w 2004 roku [11], trzydzieści lat po opublikowaniu pierwszej pracy na temat elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym [3]. Metoda PPEC stanowi nowe podejście wykorzystania zjawisk elektrokinetycznych do rozdzielania mieszanin substancji. W ciągu ostatnich pięciu lat opublikowano szereg prac na temat tej metody. Niniejsze opracowanie stanowi podsumowanie osiągnięć w tym zakresie z uwzględnieniem prac naszego zespołu, który to pierwsze doniesienia na ten temat opublikował w 2004 roku [12].

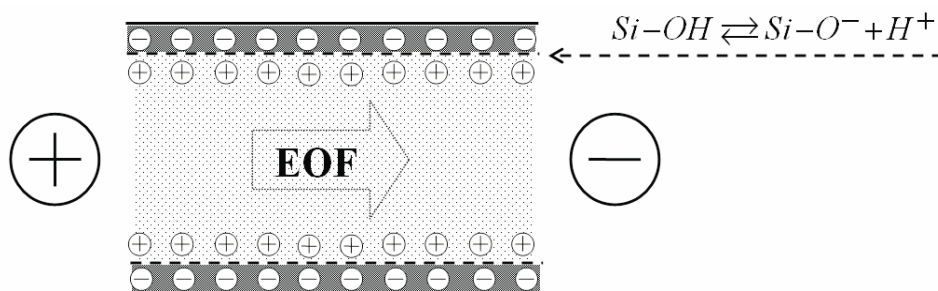
1. ZARYS ROZWOJU METODY ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ

Pomysł wykorzystania efektu elektroosmotycznego w chromatografii planarnej był zaprezentowany ponad 60 lat temu [1, 2]. Zaś pierwsza publikacja przedstawiająca eksperymentalne wyniki separacji, jak wspomniano powyżej, ukazała się w roku 1974 [3]. W latach 90. XX wieku przeprowadzono serie prób rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych z odkrytą warstwą adsorbentu w polu elektrycznym (PEC) [4–6]. Stwierdzono, że podczas chromatografowania faza ruchoma ulegała wzmożonemu odparowaniu na skutek generowania ciepła Joule’a. Pomimo

tego niekorzystnego efektu zaobserwowano w układach PEC wzrost sprawności, skrócenie czasu rozdzielania oraz zmianę selektywności rozdzielania w porównaniu do klasycznej chromatografii cienkowarstwowej. W kolejnych latach rozwoju metody PEC zastosowano odwrócony układ faz, w którym płytka chromatograficzna była umieszczona w urządzeniu do rozwijania chromatogramów w pozycji pionowej [7] lub poziomej [8–10]. Stwierdzono znaczący wzrost efektywności rozdzielania w stosunku do klasycznej TLC. Jednakże niekorzystne efekty były wciąż obecne, np. odparowanie roztworu fazy ruchomej i gromadzenie się kropeł fazy ruchomej na powierzchni warstwy adsorbentu. Prowadziło to do niepowtarzalnych wartości dystansu migracji rozdzielanych substancji i do zwiększonego rozmywania ich stref.

Pierwsza praca o metodzie elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym (PPEC) została opublikowana w 2004 roku [11]. Proces rozdzielania prowadzono w specjalnej komorze, w której płytka chromatograficzna była przykryta folią teflonową i ceramiczną podkładką. Wszystkie te elementy były dociskane do siebie pomiędzy metalowymi blokami za pomocą siłownika hydraulicznego. Otrzymany układ separacyjny nie zawierał fazy gazowej, co odróżniało go od układów zwykłej chromatografii cienkowarstwowej. Przedstawione rezultaty separacji próbki testowej substancji były obiecujące, ponieważ stwierdzono wyższą powtarzalność migracji rozdzielanych substancji, dużo krótszy czas separacji w porównaniu do PEC i TLC. Również w roku 2004 nasz zespół opublikował pracę na temat PPEC. W naszej pracy został również przedstawiony podobny wzrost efektywności rozdzielania przy wykorzystaniu zmodyfikowanej poziomej komory chromatograficznej DS, która została zaopatrzona w specjalną przykrywą płytki chromatograficznej [12]. W tym wariantcie płytkę chromatograficzną zwilżano roztworem, który był stosowany jako faza ruchoma do rozwijania elektrochromatogramu. Zatem proces elektrochromatograficzny mógł być prowadzony w warunkach równowagowych od samego początku. Dzięki temu uzyskano lepszą powtarzalność wartości dystansu migracji rozdzielanych substancji w porównaniu do elektrochromatografii planarnej ze złożem otwartym. Innym urządzeniem do rozwijania elektrochromatogramów była konstrukcja, w której na warstwie adsorbentu umieszczano specjalną folię dociskaną mosiężnym klockiem lub hydraulicznym siłownikiem pod ciśnieniem $p = 69$ bar [13, 14]. Wszystkie wymienione urządzenia (komory) nie pozwalały w pełni kontrolować procesu separacji. W 2006 roku została opublikowana praca, w której opisano konstrukcję komory z kontrolowanym przepływem fazy ruchomej [15]. Płytkę chromatograficzną była całkowicie odizolowana od fazy gazowej, a dostarczany roztwór fazy ruchomej, od samego początku procesu, znajdował się w stanie równowagi z warstwą adsorbentu. Taki układ elektrochromatograficzny pozwalał na dobranie optymalnej prędkości przepływu fazy ruchomej tak, by efektywność rozdzielania badanej mieszaniny była optymalna. Ponadto stwierdzono, że na szerokość strefy rozdzielanych substancji wpływają różne czynniki, m.in. sposób dozowania substancji na płytkę chromatograficzną, wielkość strefy startowej plamki substancji, dystans migracji substancji.

Największe zastosowanie w elektrochromatografii planarnej znalazły układy z fazami odwróconymi. Przepływ elektroosmotyczny w układzie z fazą stacjonarną typu C18 jest możliwy dzięki obecności resztkowych grup silanolowych na powierzchni ziaren adsorbentu, które zaczynają dysocjować przy pH równym 1,5, a przy pH 3 i większym są już praktycznie całkowicie zdysocjowane. Pozwalają one na powstanie podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz adsorbent–roztwór. Powierzchnia cząstek adsorbentu uzyskuje ładunek ujemny, zaś faza ruchoma dodatni i w konsekwencji w polu elektrycznym przepływa ona w kierunku katody (Rys. 1).



Rysunek 1. Elektroosmotyczny przepływ fazy ciekłej w kapilarach utworzonych przez ziarna adsorbentu – schemat

Figure 1. Schematic view of electroosmotic flow generation in capillaries formed by particles of adsorbent

Profil przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej jest płaski, w odróżnieniu od laminarnego przepływu eluentu, wymuszonego przez pompę, tak jak np. w HPLC. Taki płaski profil przepływu fazy ruchomej przyczynia się do zmniejszenia poszerzania stref stężeniowych rozdzielanych substancji na płycie chromatograficznej, dzięki temu można spodziewać się większej sprawności układów PPEC w porównaniu do układów TLC.

Prędkość elektroosmotycznej migracji roztworu, v_{EOF} jest opisywana równaniem Smoluchowskiego (1):

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (1)$$

gdzie ϵ_0 jest przenikalnością dielektryczną próżni, ϵ_r jest stałą dielektryczną ośrodka, η jest lepkością fazy ruchomej, ζ jest potencjałem elektrokinetycznym (dzeta), E jest natężeniem pola elektrycznego. Wielkość potencjału dzeta jest uzależniona od grubości podwójnej warstwy elektrycznej, δ , i gęstości ładunku, σ , zgodnie z równaniem (2):

$$\zeta = \frac{\sigma \cdot \delta}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \quad (2)$$

Zaś grubość podwójnej warstwy elektrycznej zależy od stężenia elektrolitu, c , w fazie ruchomej:

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot RT}{2cF^2}} \quad (3)$$

gdzie F jest stałą Faraday'a. W trakcie migracji fazy ruchomej wydzielą się porcja energii na sposób ciepła (ciepło Joule'a), co powoduje wzrost temperatury w układzie. Ilość tego ciepła zwiększa się ze wzrostem stężenia elektrolitu i napięciem polaryzującym płytkę chromatograficzną. Lepkość ośrodka ciekłego jest wrażliwa na zmianę temperatury, T , w układzie zgodnie z zależnością (4):

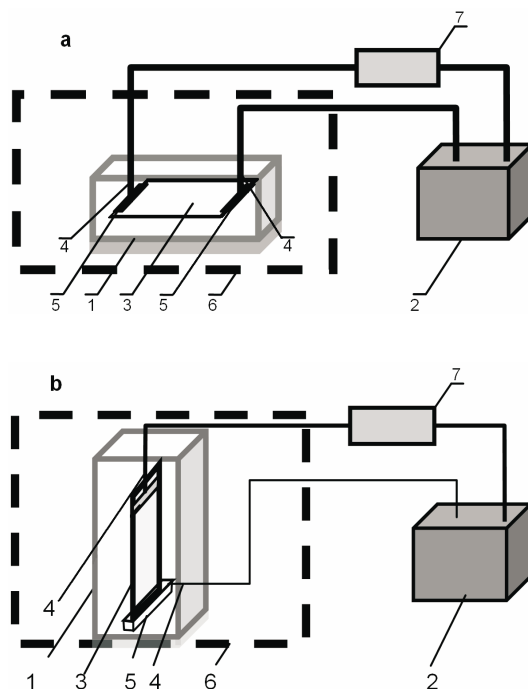
$$\eta \propto \exp(\text{const} / RT) \quad (4)$$

Z powyższych rozważań wynika, że układ elektrochromatograficzny jest dość skomplikowany i wiele czynników wpływa na przebieg procesu PPEC, a w związku z tym również na jakość uzyskiwanego rozdzielania mieszanin substancji.

3. APARATURA DO PPEC

W elektrochromatografii planarnej proces separacji badanej próbki substancji prowadzi się w komorach zaopatrzonych w parę elektrod, do których podłączony jest zasilacz wysokonapięciowy, wytwarzający pole elektryczne w obszarze płytki chromatograficznej. W literaturze znane są dwa warianty komór, w których położenie płytki chromatograficznej w komorze jest w pozycji poziomej lub pionowej (Rys. 2).

Obecnie rozwój metody PPEC jest ściśle związany z udoskonalaniem i usprawnianiem rozwiązań konstrukcyjnych komór. Pierwsze konstrukcje komór dotyczyły elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym. Warstwa adsorbentu w tych komorach była w kontakcie z fazą gazową. Zatem układ taki posiadał cechy układu zwykłej chromatografii cienkowarstwowej. Pierwsza komora do elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym została opracowana przez Nuroka i in. [11]. Autorzy przedstawili urządzenie, w którym, w trakcie separacji, płytka chromatograficzna była umieszczona w komorze w pozycji pionowej. Warstwa adsorbentu była przykryta przez folię z tworzywa sztucznego i ceramiczną podkładkę, które dociskano metalowym blokiem za pomocą siłownika hydraulicznego. Druga wersja tej komory została zaopatrzona w wężownicę służącą do dostarczania cieczy chłodzącej, w celu minimalizowania efektu wzrostu temperatury płytki chromatograficznej [16]. W obu wersjach przedstawianych komór dolny i górny fragment płytki chromatograficznej nie były przykryte folią plastikową.

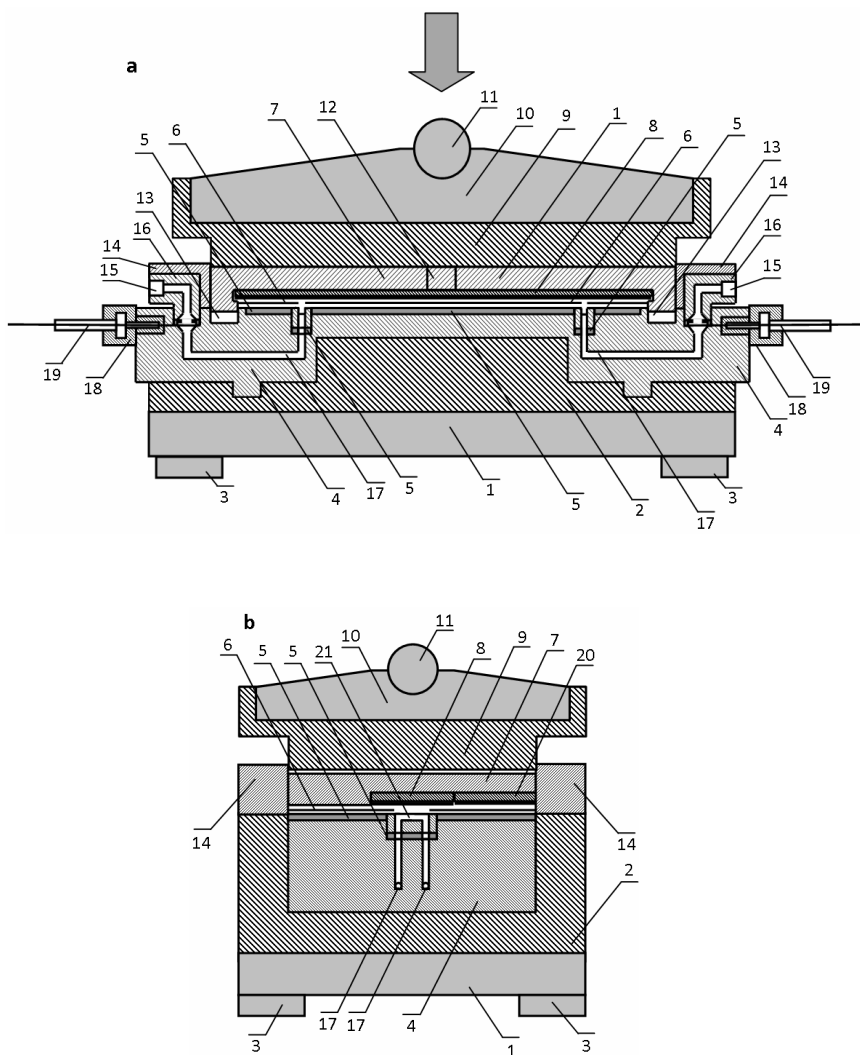


Rysunek 2. Uproszczony schemat zestawu do rozwijania elektrochromatogramów planarnych w układzie zamkniętym na płytce chromatograficznej ustawionej w pozycji poziomej (a) i pionowej (b); komora do PPEC (1), zasilacz wysokonapięciowy (2), płytka chromatograficzna (3), elektroda (4), zbiornik fazy ruchomej (5), kabina zabezpieczająca (6), amperomierz (7)

Figure 2. Conceptual view of the device for pressurized planar electrochromatography with the chromatographic plate horizontally (a) and vertically (b) positioned in a chamber for PPEC: chamber for PPEC (1), high voltage power supply (2), chromatographic plate (3), electrodes (4), reservoir of the mobile phase (5), cabinet for PPEC chamber (6), ammeter (7)

W pierwszej konstrukcji komory w układzie zamkniętym, zaproponowanej przez nasz zespół, została zaadaptowana komora do chromatografii cienkowarstwowej, model DS-II-10x10 (Chromdes, Lublin) [12]. Warstwa adsorbentu na płytce była odizolowana od fazy gazowej specjalną przykrywą. Jedynie końce płytki chromatograficznej nieznacznie wystawały poza przykrywę w pobliżu miejsca kontaktowania się ze szklanymi dystrybutorami fazy ruchomej. Takie rozwiązania techniczne, powyżej omawianych komór, pozwalały na prawie całkowite wyeliminowanie parowania fazy ruchomej z płytki chromatograficznej [12].

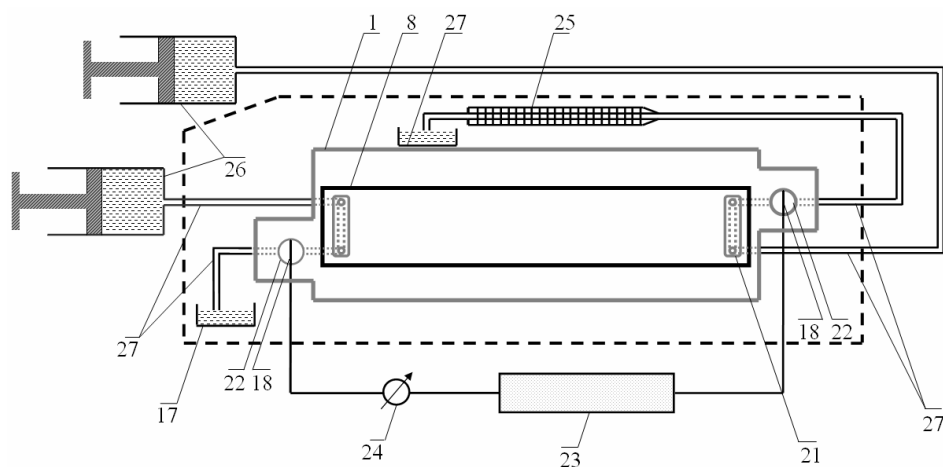
Dopiero w następnej wersji naszej komory możliwość parowania fazy ruchomej została kompletnie wyeliminowana, ponieważ płytka chromatograficzna była całkowicie przykryta przez pokrywą. Była to zupełnie nowa konstrukcja komory, w której zastosowano dodatkowe układy dostarczania i odbierania fazy ruchomej odpowiednio do i z płytki chromatograficznej [15]. Wersja ta została nieznacznie zmodyfikowana, co zostało opisane w ostatniej naszej pracy (Rys. 3) [17].



Rysunek 3. Komora do elektrochromatografii planarnej, przekrój wzdłużny (a) i przekrój poprzeczny (b); metalowa podstawa (1), korpus z Tarnoformu® (2), nóżki (3), blok teflonowy (4), podkładka silikonowa (5), folia teflonowa (6), ramka na płytkę chromatograficzną (7), płytkę chromatograficzną (8), korpus pokrywy z poliacetalu (9) korpus pokrywy ze stali (10), kulka stalowa (11), otwór na termoparę (12), prowadnica ramki płytki chromatograficznej (13), korek komory elektrodowej (14), wejście/wyjście fazy ruchomej (15), łącznik kanału przepływowego (16), kanał fazy ruchomej (17), trzon elektrodowy (18), elektroda (19), płytkę szklaną uzupełniającą (20), korytka (21); zaadaptowane z [17]

Figure 3. Schematic view of the chamber for PPEC: (a) longitudinal section and (b) cross section: steel base plate (1), Tarnoform body of the chamber (2), wheel legs (3), Teflon block (4), silicone gasket (5), Teflon foil (6), chromatographic plate adaptor (7), chromatographic plate (8), polyacetal body of the lid (9), steel body of the lid (10), steel ball (11), thermocouple hole (12) recess for chromatographic plate adaptor (13), electrode cell plug (14), mobile phase in/out (15), channel union (16), tube for the mobile phase solution (17), electrode body (18), electrode (19), supplement glass plate (20), trough (21); adapted from [17]

Płytkę chromatograficzną (8) została umieszczona w komorze w pozycji poziomej na folii teflonowej (6) z warstwą adsorbentu skierowaną ku dołowi. Korpus komory został wykonany z poliacetalu (Tarnoform®) (2) odpornego na odkształcenia i wzmocniony warstwą stali hartowanej (1). Wewnątrz korpusu znajdował się blok teflonowy (4) zaopatrzony w kanały (17) dostarczające i odbierające roztwór fazy ruchomej z płytki chromatograficznej. W korpusie komory umieszczono bloki elektrodowe z elektrodami (19). Nowe rozwiązanie konstrukcji komory pozwoliło na pomiar prędkości przepływu fazy ruchomej w trakcie trwania procesu. Było to bardzo korzystne rozwiązanie, ponieważ umożliwiało prowadzenie procesu separacji w optymalnych warunkach szybkości migracji fazy ruchomej. Kompletnie urządzenie do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej z opisaną komorą jest schematycznie przedstawione na Rysunku 4. W naszym zakładzie zostały zaprojektowane wersje komór na płytce chromatograficznej o długości 5, 10 i 20 cm.



Rysunek 4. Schemat urządzenia do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej: komora elektrodowa (22), zasilacz wysokonapięciowy (23), amperomierz (24), mikropipeta (25), pompy do przemywania komór elektrodowych (26), zbiornik ścieków (27); kreskowana linia oznacza obudowę z pleksiglasu; zaadaptowane z [17]

Figure 4. Schematic view of the device for PPEC: electrode cell (22), high-voltage power supply DC (23), ammeter (24), micro-pipette (25), reservoir (26), waste (27); dashed rectangle represents Plexiglas cabinet; adapted from [17]

4. EFEKTYWNOŚĆ PROCESU ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ

4.1. CZAS SEPARACJI W METODZIE PPEC

W klasycznej chromatografii cienkowarstwowej prędkość przepływu czoła fazy ruchomej nie jest stała. Poniższe równanie opisuje jak zmienia się dystans migracji, Z_f , frontu eluentu w chromatografii cienkowarstwowej w funkcji czasu:

$$Z_f = \kappa \cdot t^{0,5} \quad (5)$$

gdzie κ jest wartością stałą, zaś t oznacza czas migracji czoła fazy ruchomej.

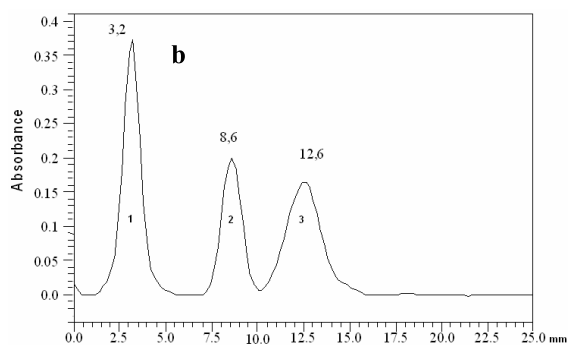
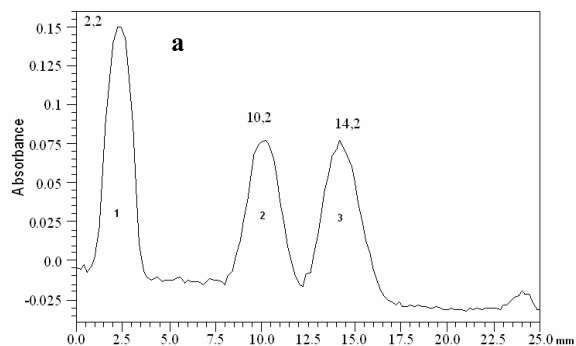
Front fazy ruchomej pokonuje kolejne odcinki płytki chromatograficznej w coraz dłuższym czasie. Rozwijanie klasycznych chromatogramów cienkowarstwowych na dystansie dłuższym niż kilkanaście centymetrów jest procesem długotrwałym, zwłaszcza gdy faza ruchoma wykazuje wysoką lepkość. Dodatkowo rozwijanie chromatogramu na długim dystansie powoduje, że strefy rozdzielanych substancji stają się coraz szersze i w konsekwencji obserwuje się duży spadek sprawności układu [18]. Prędkości migracji fazy ruchomej w TLC nie można regulować, a przynajmniej możliwość ta jest bardzo ograniczona [19]. Natomiast w PPEC prędkość przepływu fazy ruchomej można bardzo łatwo zmieniać w dość szerokim zakresie. Na przykład, jeżeli napięcie polaryzujące wynosiło do 3,5 kV, w przypadku płytki o długości 10 cm, stwierdzono, że prędkość przepływu fazy ruchomej w trakcie procesu PPEC była stała oraz wprost proporcjonalna do natężenia pola elektrycznego przyłożonego do płytki chromatograficznej.

Dla większych wartości napięcia polaryzującego przyrosty prędkości fazy ruchomej były większe, z powodu zmniejszenia lepkości roztworu fazy ruchomej, na skutek wzrostu temperatury [15]. Szybkość migracji fazy ruchomej, wywołana efektem elektroosmotycznym, jest znacznie większa od wywołanej działaniem sił kapilarnych, co bezpośrednio przekłada się na czas separacji próbki. Porównanie tych wartości przedstawiono w Tabeli 1.

Ponadto na Rysunku 5 są przedstawione przykładowe chromatogramy otrzymane metodami TLC i PPEC. Chromatogram TLC został otrzymany w ciągu 7,5 min. Natomiast w tych samych warunkach składu jakościowego i ilościowego fazy ruchomej oraz stacjonarnej, rozdzielanie tej samej mieszaniny testowej metodą PPEC zostało osiągnięte w ciągu 0,5 min. Podobnych przykładów w literaturze jest więcej [11]. Na podstawie tych danych widać, że proces separacji metodą ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej może być kilkanaście razy, krótszy od procesu metodą klasycznej chromatografii cienkowarstwowej, przy zachowaniu większej jakości rozdzielania.

Tabela 1. Wartości czasu migracji fazy ruchomej w układach TLC i PPEC na płytce chromatograficznej HPTLC RP-18W (Merck); faza ruchoma 80% acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0
 Table 1. Migration time of the mobile phase in TLC and PPEC systems with HPTLC RP-18W plate (Merck), mobile phase 80% acetonitrile in citric acid buffer (pH 5.0)

Dystans migracji fazy ruchomej [mm]	Czas [min]			
	TLC	PPEC (1,5 kV)	PPEC (3 kV)	PPEC (4,5 kV)
15	1,08	0,94	0,42	0,20
30	2,67	1,87	0,84	0,39
45	5,25	2,81	1,26	0,59
60	9,00	3,75	1,68	0,78
75	14,00	4,68	2,10	0,98
90	19,00	5,62	2,53	1,17

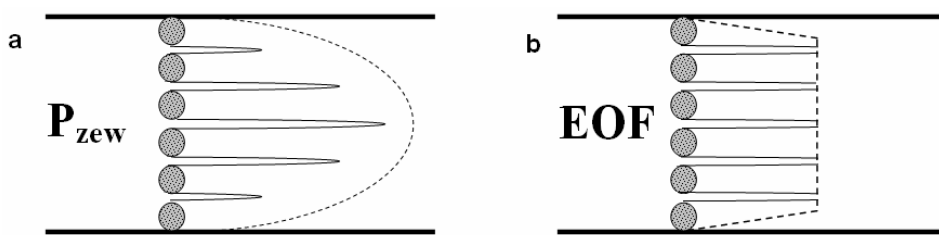


Rysunek 5. Chromatogramy mieszaniny złożonej z propyfenazonu (1), kofeiny (2), paracetamolu (3), metoda TLC – 7,5 min (a) i PPEC – 0,5 min (b); płytka HPTLC RP-18 W (Merck), faza ruchoma 20% acetonitrylu w buforze (pH = 4,1), napięcie polaryzujące – 3,5 kV (PPEC)

Figure 5. Separation of test mixture by conventional planar chromatography (a) and electrochromatography (PPEC) (b) with RP18 W HPTLC plate; mobile phase: 20% acetonitrile in buffer (pH 4.1); polarization voltage 3.5 kV. Test mixture: propyphenazone (1), caffeine (2), paracetamol (3)

4.2. PPEC JAKO WYSOKOSPRAWNA METODA SEPARACJI

Sprawność układów ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej charakteryzuje się niską wysokością półki teoretycznej, porównywalną do wysokości półki w analogicznych układach HPLC. Czynniki wpływające na wysokość półki teoretycznej w PPEC są te same jak w innych technikach chromatograficznych. Wysoką sprawność układy PPEC niewątpliwie zawdzięczają elektroosmotycznemu przepływowi fazy ruchomej. Cechą charakterystyczną tego przepływu jest, wspomniany powyżej, płaski profil. Wektory prędkości przepływu fazy ruchomej w przekroju kapilar utworzonych przez przestrzenie międzyziarnowe warstwy adsorbentu są praktycznie jednakowe, w przeciwieństwie do wektorów przepływu wymuszonego ciśnieniem np. w chromatografii kolumnowej ciekłej (HPLC) (Rys. 6). W konsekwencji rozmycie pasm stężeniowych nie jest tak duże jak w innych metodach chromatograficznych, w których przepływ fazy ruchomej jest laminarny, np. HPLC.



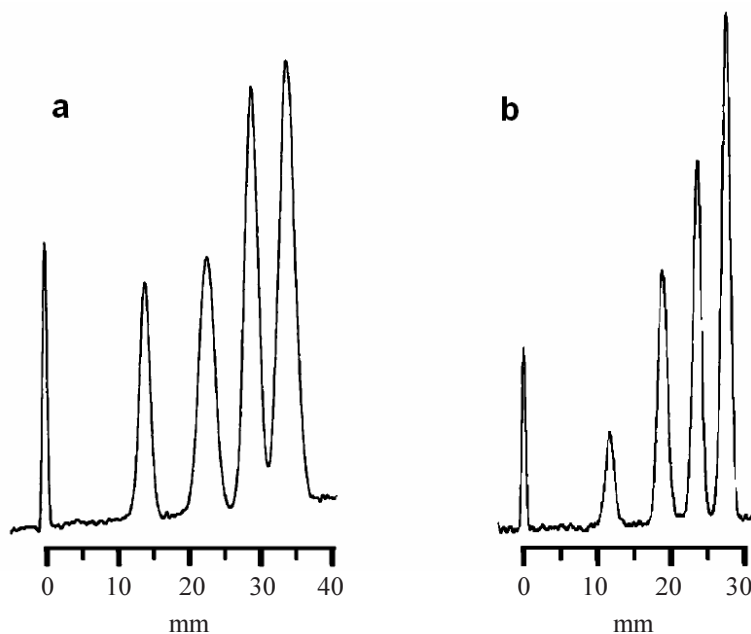
Rysunek 6. Profile przepływu fazy ruchomej w kapilarach złoża układów chromatografii ciekłej (a) i elektrochromatografii (b)

Figure 6. Flow profiles of mobile phase in a packed bed of liquid chromatography (a) and electrochromatography (b) systems

W chromatograficznych technikach cienkowarstwowych całkowita szerokość pasma substancji zależy m.in. od szerokości plamki startowej badanej substancji. W klasycznej chromatografii cienkowarstwowej do nanoszenia substancji na płytkę wykorzystuje się automatyczne dozowniki, za pomocą których próbkę mieszaniny substancji nanosi się w postaci aerozolu. Takie postępowanie pozwala na otrzymanie bardzo wąskiej strefy startowej substancji, ok. 1 mm. Szerokość plamki startowej jest bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na końcową sprawność układu separacyjnego, zwłaszcza gdy dystans migracji jest stosunkowo krótki. Na przykład dla dziesięciomilimetrowego dystansu migracji w układzie PPEC, udział szerokości plamki startowej w końcowej wariancji piku stanowił 20–25%. Jednakże im dystans migracji substancji był dłuższy, ten udział stawał się coraz mniejszy i wynosił mniej niż 5% dla dystansu migracji ok. 30 mm [20].

W klasycznej wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej najniższą wartość wysokości półki uzyskuje się, jeżeli dystans migracji czoła fazy ruchomej wynosi ok. 40 mm [18]. W elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej wydłużenie dystansu migracji nie powoduje zmian wysokości półki. Sprawność w dużej

mierze zależy od prędkości przepływu fazy ruchomej [20], podobnie jak w chromatografii HPLC. Najniższa wysokość półki teoretycznej uzyskana podczas separacji w optymalnych warunkach przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej wynosiła ok. 10 μm . Wartość ta odpowiada dwukrotnie większej wartości średnicy ziarna adsorbentu, która wynosi 5–6 μm na płytkach do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC). Zależność pomiędzy wysokością półki teoretycznej, a średnicą ziarna adsorbentu jest podobna jak w technikach kolumnowych. Należy jednak zaznaczyć, że na płytkach chromatograficznych znajduje się składnik wiążący ziarna adsorbentu. Składnik ten jest zazwyczaj polimerem organicznym i z pewnością bierze udział w procesie chromatograficznym, przyczyniając się w pewnym stopniu do zmniejszenia sprawności układu. Zestawione chromatogramy separacji tej samej próbki w tym samym układzie chromatograficznym metodą TLC i PPEC jednoznacznie wskazują, że sprawność układów elektrochromatograficznych jest wysoka w odniesieniu do klasycznej chromatografii cienkowarstwowej (Rys 7).



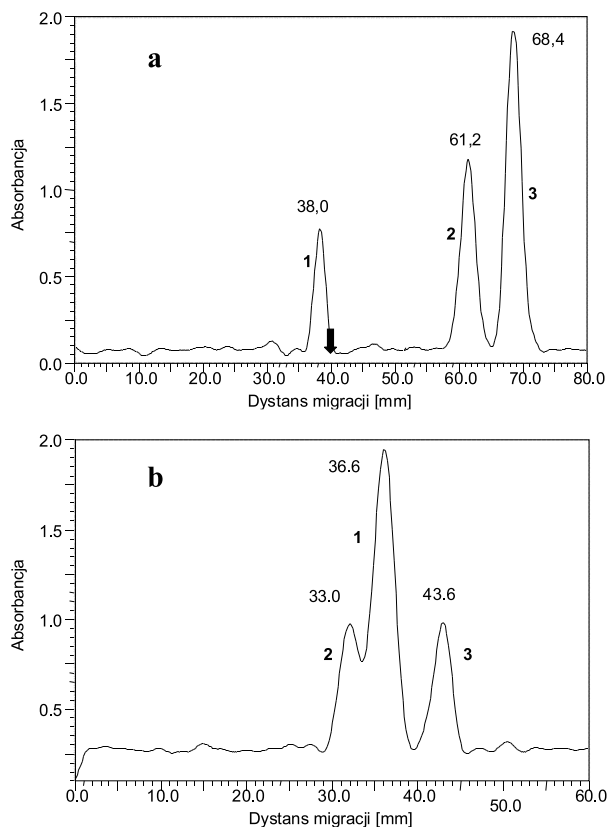
Rysunek 7. Separacja testowej mieszaniny na płytkach LiChrospher RP-18; TLC, czas procesu 24 min (a), PPEC, czas procesu 1 min, napięcie polaryzujące 9 kV (b); faza ruchoma: 55% acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 4,7 (powielone za pozwoleniem wydawnictwa) [11].

Figure 7. Separation of test mixture by TLC, 24 min separation time (a), and PPEC, 1 min separation time, polarization voltage 3.5 kV (b); chromatographic plate LiChrospher RP-18, mobile phase: 55% acetonitrile in buffer (pH 4.7); (reproduced with permission from ref. 11)

4.3. ZMIANA SELEKTYWNOŚCI ROZDZIELENIA UKŁADÓW PPEC W PORÓWNANIU DO UKŁADÓW CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Migracja substancji w układzie PPEC jest wynikiem oddziaływań międzycząsteczkowych substancji ze składnikami fazy ruchomej i stacjonarnej oraz migracji cząsteczek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym (elektroforeza). Migracja substancji, których cząsteczki nie posiadają ładunku lub ich wypadkowy ładunek wynosi zero, zależy jedynie od elektroosmotycznej prędkości fazy ruchomej oraz ich podziału pomiędzy dwie fazy. Dystans migracji substancji, których cząsteczki są obdarzone ładunkiem (jony), może być dłuższy jeżeli kierunek elektroforetycznej migracji jest zgodny z elektroosmotycznym kierunkiem przepływu fazy ruchomej. Natomiast jeżeli elektroforetyczny kierunek migracji substancji jest przeciwny, wtedy jej dystans migracji jest krótszy lub odwrócony w stosunku do kierunku przepływu fazy ruchomej. Rozdzielanie substancji jonowych metodą PPEC prowadzi zatem do zmiany selektywności rozdzielania w stosunku do metod TLC lub HPLC. Taka cecha układów PPEC jest pożądana, ponieważ pozwala na uzyskanie dodatkowych zmiany selektywności rozdzielania substancji, których strefy są położone blisko siebie lub nakładają się w układach chromatografii cieczowej.

Rysunek 8 przedstawia chromatogram substancji czynnych preparatu Neopyrin Asa: kwasu acetylosalicylowego, paracetamolu oraz kofeiny rozdzielanych metodą TLC. Jak widać, w tym układzie chromatograficznym nie udało się uzyskać pełnej separacji. Dzięki zastosowaniu elektrochromatografii planarnej uzyskano zmianę selektywności i całkowite rozdzielanie badanej mieszaniny (zob. Rys. 8) [21]. Należy zaznaczyć, że pik kwasu acetylosalicylowego znajduje się po lewej stronie punktu startowego, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych pików. Oznacza to, że składniki badanej mieszaniny mogą znajdować się po obydwu stronach punktu startowego, co jest niewątpliwą zaletą elektrochromatografii planarnej w porównaniu do elektrochromatografii kapilarnej, gdzie składniki badanej mieszaniny mogą być rejestrowane, tylko gdy wędrują w kierunku jednej elektrody [22].



Rysunek 8. Chromatogramy uzyskane metodami PPEC (a) i TLC (b); kwas acetylosalicylowy(1), kofeina (2) i paracetamol (3); płytka TLC RP-18 (Merck), faza ruchoma 60% acetonitrylu w buforze, pH = 3,8, napięcie polaryzujące 2,0 kV (czarna strzałka wskazuje punkt dozowania) [21]

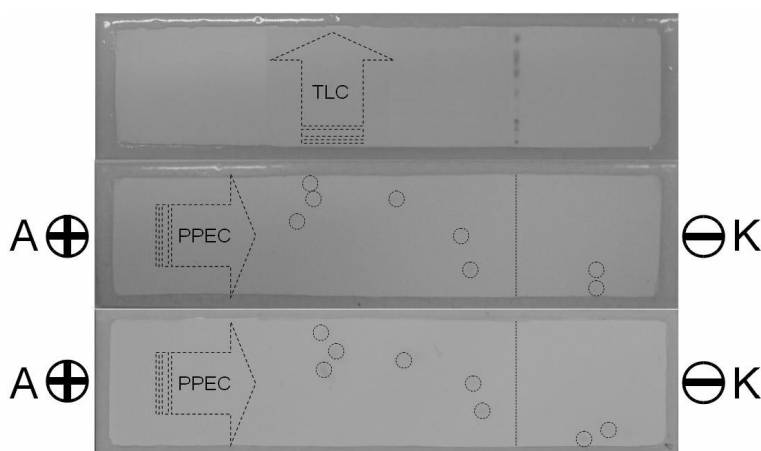
Figure 8. Electrochromatogram (a) and thin-layer chromatogram (b) of a test mixture acetylsalicylic acid (1), caffeine (2), paracetamol (3); TLC RP-18 plate (Merck); mobile phase: 60% acetonitrile in buffer (pH 3.8); polarization voltage 2.0 kV; black arrow indicates the starting position of the sample mixture.

4.4. WIELOWYMIAROWE ROZWIJANIE CHROMATOGRAMU

Wielowymiarowe rozwijanie chromatogramów jest atrakcyjną metodą prowadzenia procesu separacji techniką TLC i także innymi technikami chromatograficznymi (np. HPLC, GC). W praktyce laboratoryjnej można znaleźć przykłady łączenia dwóch różnych metod chromatograficznych np. HPLC i TLC. Takie zestawienie pozwala na zwiększenie efektywności rozdzielania badanej próbki. Najczęściej wykorzystuje się tę metodę w przypadku uzyskania niepełnego rozdzielania mieszanin bardzo skomplikowanych w procesie jednowymiarowej separacji. W wielowymiarowym rozwijaniu chromatogramów TLC, kierunek migracji czoła fazy ruchomej po każdym jednostkowym etapie ulega zmianie. Ponadto w każdym etapie do rozwija-

nia można wykorzystać inny roztwór fazy ruchomej, o zmienionym składzie jakościowym i/lub ilościowym.

Jak wcześniej wspomniano metoda PPEC oferuje nową jakość prowadzenia separacji w stosunku do metody TLC, a mianowicie charakteryzuje się wysoką sprawnością, krótkim czasem prowadzenia procesu, ale przede wszystkim oferuje zmianę selektywności rozdzielania substancji. Te zalety ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej powodują, że połączenie jej z metodą TLC w jeden dwuwymiarowy proces separacji może zwiększyć efektywność rozdzielania skomplikowanej mieszaniny [23]. Po raz pierwszy zastosowanie elektrochromatografii planarnej i zwykłej chromatografii planarnej do dwukierunkowego rozdzielania przedstawił Panchagnula i in., którzy zastosowali tę metodę do rozdzielania fosfopeptydów [24].



Rysunek 9. Fotografia chromatogramów mieszaniny barwników testowych uzyskanych metodami: HPTLC, faza ruchoma 45% metanolu w buforze, pH = 3,0 (a); 2D HPTLC/PPEC, faza ruchoma 75% acetonitrylu w buforze, pH = 3,0, napięcie polaryzujące 2,5 kV (b); 2D HPTLC/PPEC, faza ruchoma 75% acetonitrylu w buforze, pH = 9,2, napięcie polaryzujące 2,5 kV (c); składniki mieszaniny: rodamina 6G (1), PAR (2), błękit patentowy (3), zieleń brylantowa (4), azorubina (5), błękit brylantowy (6), czerwień allura (7), czerń brylantowa (8); [17]

Figure 9. Digital picture of chromatograms of test dye mixture: HPTLC, mobile phase 45% methanol in buffer pH = 3.0 (a); 2D HPTLC/PPEC, mobile phase: 75% acetonitrile in buffer pH = 3.0, polarization voltage 2.5 kV (b); 2D HPTLC/PPEC, mobile phase: 75% acetonitrile in buffer pH = 9.2, polarization voltage 2.5 kV (c); HPTLC RP-18 W plate (Merck), test mixture: (1) rhodamine 6G, (2) PAR, (3) patent blue, (4) green S, (5) azorubine, (6) brilliant blue, (7) allura red, (8) brilliant black; [17]

Dwuwymiarowe rozwijanie chromatogramów planarnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej i ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej (2D HPTLC/PPEC) nasz zespół ostatnio zaprezentował na przykładzie rozdzielania mieszaniny barwników testowych (Rys. 9) [17]. Pierwszy etap separacji próbki był przeprowadzony metodą HPTLC, zaś drugi metodą PPEC. Proces dwuwymiarowy został przeprowadzony przy wykorzystaniu płytki chromato-

graficznej HPTLC RP18W (Merck) o wymiarach 5×20 cm. Przy czym rozwijanie chromatogramu cienkowarstwowego zostało wykonane w poprzek płytki chromatograficznej (5 cm), a rozwijanie elektrochromatogramu planarnego wzdłuż płytki (20 cm). Przeprowadzenie procesu separacji metodą chromatografii cienkowarstwowej, wykorzystując długość, 20 cm, płytki chromatograficznej, nie jest realizowane w praktyce laboratoryjnej – wymagałoby wielogodzinnego rozwijania chromatogramu, a to skutkowałoby pogorszeniem rozdzielania, szczególnie przy wykorzystaniu płytek HPTLC. Z zaprezentowanego chromatogramu wynika, że dwuwymiarowa separacja metodami HPTLC i PPEC pozwala na znaczny wzrost efektywności rozdzielania badanej próbki. Efekt ten można było uzyskać dzięki bardzo zróżnicowanej selektywności rozdzielania substancji w obu pojedynczych procesach. Metoda 2D może w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie w praktyce laboratoryjnej do rozdzielania skomplikowanych mieszanin substancji, szczególnie pochodzenia biologicznego.

PODSUMOWANIE

Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa jest bardzo obiecującą metodą separacji mieszanin substancji, charakteryzującą się krótkim czasem procesu rozdzielania, wysoką sprawnością, możliwością prowadzenia separacji na długim dystansie oraz odmienną, w porównaniu do klasycznych metod chromatograficznych, selektywnością rozdzielania. Te zalety PPEC, świadczą o korzystnych możliwościach zastosowania tej techniki szczególnie w analizie farmaceutycznej i biomedycznej. Jednakże na obecnym etapie rozwoju tej metody nie można jej jeszcze zastosować w praktyce laboratoryjnej z uwagi na wymagania, związane z wytwarzaniem przeznaczonych do niej płytek chromatograficznych oraz skonstruowaniem aparatury w pełni przyjaznej dla wykonawcy eksperymentu PPEC.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.J.P. Martin, R. Consden, A.H.J. Gordon, *Biochem.*, 1946, **40**, 33.
- [2] R.L.M. Syngé, D.L. Mould, *Analyst*, 1952, **77**, 964.
- [3] V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D.J. Scheieke, *Chromatogr.*, 1974, **99**, 23.
- [4] M. Pukl, M. Prosek, R.M. Kaiser, *Chomatographia*, 1994, **38**, 83.
- [5] I. Malinowska, *J. Planar Chromatogr.*, 2000, **13**, 307.
- [6] I. Malinowska, J.K. Różyło, A. Karson, *J. Planar Chromatogr.*, 2002, **15**, 418.
- [7] D. Nurok, M.C. Frost, D.M.J. Chenoweth, *Chromatogr. A*, 2000, **903**, 211.
- [8] T.H. Dzido, R. Majewski, B. Polak, W. Gołkiewicz, E. Soczewiński, *J. Planar Chromatogr.*, 2003, **16**, 176.
- [9] D. Nurok, J.M. Koers, M.A. Carmichael, *J. Chromatogr. A*, 2003, **983**, 247.
- [10] D. Nurok, J.M. Koers, M.A. Carmichael, W. Liao, T.H. Dzido, *J. Planar Chromatogr.*, 2002, **15**, 320.

- [11] D. Nurok, J.M. Koers, A.L. Novotny, M.A. Carmichael, J.J. Kosiba, R.E. Santini, G.L. Hawkins, R.W. Replogle, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1690.
- [12] T.H. Dzido, J. Mróz, G.W. Józwiak, *J. Planar Chromatogr.*, 2004, **17**, 404.
- [13] P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1079**, 317.
- [14] P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1103**, 150.
- [15] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślązak, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 4713.
- [16] A.L. Novotny, D. Nurok, R.W. Replogle, G.L. Hawkins, R.E. Santini, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2823.
- [17] A. Chomicki, P. Ślązak, T.H. Dzido, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3718.
- [18] S. Nyiredy, *TrAC*, 2001, **20**, 91.
- [19] C.F. Pool, Sz. Nyiredy (Ed.), *Planar Chromatography – Retrospective For The Third Millenium*, Springer, Budapest, 2001, 332.
- [20] P.W. Płocharz, T.H. Dzido, P. Ślązak, G.W. Józwiak, A. Torbicz, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1170**, 91.
- [21] A. Hałka, P.W. Płocharz, A. Torbicz, T.H. Dzido, *J. Planar Chromatogr.*, w druku.
- [22] V. Pucci, R. Mandrioli, M.A. Raggi, S. Fanali, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 615.
- [23] T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślązak, A. Hałka, *Anal Bioanal Chem*, 2008, **391**, 2111.
- [24] V. Panchagnula, A. Mikulskis, L. Songa, Y. Wang, M. Wang, T. Knubovets, E. Scrivener, E. Golenko, I.S. Krull, M. Schulz, E.H. Heinz, W.F. Patton, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1155**, 112.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 grudnia 2009

**ROLA ALBUMINY W DIAGNOSTYCE.
WIĄZANIE JONÓW I KOMPLEKSÓW METALI**
THE ROLE OF ALBUMIN IN THE DIAGNOSTICS.
BINDING OF IONS AND METAL COMPLEXES

**Lilianna Trynda-Lemiesz^{1,2}, Katarzyna Wiglusz¹,
Igor Mucha^{*,1}**

¹ *Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
ul. Szewska 38, 50-139 Wrocław*

² *Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii,
ul. Joliot - Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: igor@cheman.am.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Właściwości i funkcje albuminy ludzkiej
2. Struktura albuminy - miejsca wiązania ligandów
3. Wiązanie jonów metali i kompleksów metali – znaczenie w diagnostyce i terapii
 - 3.1. N-koniec
 - 3.2. Cysteina 34
 - 3.3. Miejsce A i B
 - 3.4. Wiązanie osoczowej albuminy ludzkiej (HSA) z jonami kobaltu(II)
 - 3.5. Oksydatywnie zmodyfikowana albumina (IMA) jako wskaźnik niedotlenienia mięśnia sercowego
 - 3.6. Wiązanie kompleksów metali

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz jest absolwentką chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie uzyskała również doktorat i habilitację. Obecnie kieruje Katedrą Chemii Analitycznej na Wydziale Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu, pracując jednocześnie w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej i Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Badania naukowe, które prowadzi dotyczą przede wszystkim przenoszenia leków przez biologiczne układy transportujące ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów metali o właściwościach przeciwnowotworowych.



Mgr Katarzyna Wigłusz ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim w 1999 r. Pracuje jako asystent w Zakładzie i Katedrze Chemii Analitycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Obecnie zajmuje się różnymi aspektami oddziaływania leków na albuminę ludzką.



Dr Igor Mucha – adiunkt w w Zakładzie i Katedrze Chemii Analitycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim w 2000 r. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2006 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

ABSTRACT

Human serum albumin (HSA), the most prominent protein in plasma, binds different classes of ligands at multiple sites. HSA provides a depot for many compounds, affects pharmacokinetics of many drugs, holds some ligands in a strained orientation providing their metabolic modification, renders potential toxins harmless transporting them to disposal sites, accounts for most of the antioxidant capacity of human serum, and acts as a NO-carrier. Transport of metal ions is another prominent function of HSA. Metal ions carried by HSA include physiological Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} , toxic Cd^{2+} and Ni^{2+} , and drug-derived Au^+ and Pt^{2+} . This broad specificity is due to the presence of distinct binding sites on HSA surface. The N-terminal binding site (in brief NTS, alternatively labeled as ATCUN motif) was the earliest to be identified. It is composed of the first three amino-acid residues of the HSA sequence, Asp-Ala-His. Another specific binding site for metal ions in HSA is located at the interface of domains I and II of the protein molecule. This site, labeled multimetal binding site (MBS), the coordination of metal ions at MBS is provided by His67, His247, Asn99 and Asp249. Cys34 provides the sole thiol group of HSA which is not engaged in intramolecular disulfide bridges. The Cys34 side chain is located at the bottom of a crevice, what results in a limited accessibility and elevated specificity in metal ion interactions. Cys34 was proposed to be the major site of Pt^{2+} and Au^+ complexes interaction. HSA had been indicated to be a physiological carrier of Co^{2+} ions a long time ago. The interest in the binding of Co(II) ions to HSA has surged recently due to a proposal by Bar-Or et al. [1] of a new rapid clinical assay for myocardial ischemia. This assay (ACB test) is based on an interaction of Co(II) ions with HSA derived from blood serum, followed by DTT treatment. This test is based on an assumption that the clipping of two first residues of HSA is related to ischemia. The proposed molecular mechanism for this test is based on a further assumption of NTS is the primary binding site for Co^{2+} ions. However, several questions regarding the ACB test are still open, and the molecular mechanism is not clear. Recent studies strongly suggest that the primary binding sites of Co(II) are sites A and B and not the N-terminus.

In the field of MR imaging, there is a considerable interest in contrast agents that target serum albumin because they are retained in the vascular space for longer periods of time than low molecular weight MR agents and also have an enhanced water relaxivity due to slower rotation when bound to the large protein. Albumin in this case serves two purposes, to enhance the sensitivity of the contrast agent by slowing its rotation and to slow diffusion of the agent from blood vessels into the spaces between cells. Both features are useful for imaging of blood vessels (MR angiography). Simple aliphatic chains are sufficient to facilitate binding to HSA. A derivative of Gd-DOTMP bearing an 11-carbon chain, was found to bind at a minimum of five fatty acid binding sites on HSA molecule.

Keywords: human albumin, albumin metal binding, biochemical markers, ischemia modified albumin

Słowa kluczowe: albumina ludzka, wiązanie metali przez albuminę, markery biochemiczne, albumina modyfikowana niedokrwieniem

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACB test	– test wiązania jonów kobaltu (ang. <i>albumin cobalt binding test</i>)
Ala	– alanina
Arg	– arginina
Asn	– asparagina
Asp	– kwas asparaginowy
CK-MB	– izoenzym MB kinazy kreatynowej
cTn	– sercowe izoformy troponiny
Cys	– cysteina
DOTMP	– kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetrakis(metyleno-fosfonowy)
DTT	– ditiotreitol
FA	– kwasy tłuszczowe (ang. <i>fatty acids</i>)
Gd-DOTMP	– kompleks jonu gadolinu z kwasem 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetrakis(metyleno-fosfonowym)
Gd-DTPA	– kompleks jonu gadolinu z kwasem dietylenotriaminopentaocowym
Glu	– kwas glutaminowy
Gly	– glicyna
His	– histydyna
HSA	– albumina ludzka (ang. <i>human serum albumin</i>)
IMA	– albumina modyfikowana niedokrwieniem (ang. <i>ischemia modified albumin</i>)
Leu	– leucyna
Lys	– lizyna
MBS	– wielometaliczne miejsce wiązania (ang. <i>multimetal binding site</i>)
MRI	– obrazowanie rezonansu magnetycznego (ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
Myo	– mioglobina
NAMI-A	– [ImH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (dms _o -S)Im] (Im = imidazol)
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NTS	– <i>N</i> -końcowe miejsce wiązania (ang. <i>N-terminal binding site</i>)
OZW	– ostry zespół wieńcowy
Pro	– prolina
Phe	– fenyloalanina
RFT	– reaktywne formy tlenu
Ser	– seryna
<i>trans</i> -HInd(RuInd ₂ Cl ₄)	– <i>trans</i> -Indazol (bisindazol) tetrachlororutenu(III)
Tyr	– tyrozyna
Val	– walina

WSTĘP

Albumina, jako główne białko osocza krwi pełni w organizmie człowieka wiele ważnych funkcji, jedną z nich jest zdolność przyłączania i transportu do tkanek docelowych wielu endogennych i egzogennych ligandów.

Albumina może być markerem prognostycznym w wielu stanach chorobowych, w których obserwowany jest przede wszystkim spadek jej stężenia związany z zaburzoną syntezą, ze zwiększonym zapotrzebowaniem lub utratą z organizmu. Oprócz zmian ilościowych, albumina może pod wpływem różnych czynników również ulegać modyfikacjom strukturalnym. Dochodzi wówczas do różnorodnych zmian fizykochemicznych w strukturze białka prowadzących do zaburzeń jej aktywności biologicznej i właściwości farmakokinetycznych, w tym do obniżenia zdolności wiązania jonów metali przejściowych. Tego typu zaburzenia obserwuje się między innymi w przebiegu niedokrwienia mięśnia sercowego, a albumina, której cząsteczka pod wpływem stresu oksydacyjnego uległa zmianom strukturalnym, nazywana jest albuminą modyfikowaną niedokrwieniem (ang. *ischemia modified albumin*, IMA). Obniżona zdolność IMA do wiązania jonów kobaltu posłużyła do opracowania wczesnego markera niedokrwienia mięśnia sercowego [1].

Ze względu na zdolność wiązania jonów metali albumina może być stosowana jako chipy biosensorowe do wykrywania i ilościowego oznaczania takich jonów jak Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} [2]. W optymalnych warunkach chipy umożliwiają oznaczenie stężenia Cd^{2+} na poziomie 1 ppb.

Zdolność albuminy do odwracalnego wiązania ligandów wykorzystywana jest w medycynie w wielu innych przypadkach. Jak wykazują najnowsze badania [3, 4], u pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów często występuje hipalbuminemia, która jest głównie powodowana przez zwiększone zużycie albuminy w ogniskach zapalnych. Ze względu na specyficzny metabolizm komórek maziowych, zwiększony pobór albuminy staje się prawdopodobnie istotnym źródłem pokrywającym zapotrzebowanie na azot oraz energię. Wyraźnie wzrasta przepuszczalność bariery pomiędzy krwią a stawami, w których rozwija się proces zapalny. W badaniach przedklinicznych [4] z zastosowaniem metod scyntygraficznych i laseroptycznych wykazano intensywną akumulację albuminy w ogniskach reumatycznych, co powoduje, że albumina staje się atrakcyjnym przenośnikiem leków przeciw reumatoidalnemu zapaleniu stawów. Badania z Metotreksatem przyłączonym do albuminy wskazują na znacznie większą aktywność tego leku [3]. Albumina znajduje również zastosowanie w scyntyigrafii perfuzyjnej płuc, czyli badaniu polegającym na ocenie ukrwienia płuc. Albuminę w postaci mikrosfer znakuje się technetem (^{99m}Tc) i podaje dożylnie. U osób zdrowych występuje równomierne rozmieszczenie znacznika, natomiast w stanach patologicznych obserwuje się obszary, do których znacznik, a więc i krew nie dociera [5]. Białko to może być również markerem prognostycznym w różnych stanach chorobowych, gdzie obserwuje się spadek jego stężenia. Hipalbuminemia jest charakterystyczna dla wielu procesów patologicznych, m.in. chorób wątroby, nowotworów i ostrej sepsy. Jedną z powszechnie stosowa-

wanych w medycynie metod diagnostycznych jest obrazowanie rezonansu magnetycznego (MRI). W 40–50% badań MRI stosowane są środki kontrastowe, które oddziałują z cząsteczkami wody i skracają czasy relaksacji T1 i/lub T2. Szczególnie interesujące wydają się być środki kontrastowe wiążące się z albuminą, ponieważ po związaniu związku te przebywają dłużej w łożysku naczyniowym i wykazują zwiększoną relaksacyjność na skutek spowolnionej rotacji, dzięki czemu znajdują zastosowanie w angiografii [6]. W praktyce medycznej stosowana jest pochodna gadolinu z grupą difenylocykloheksylową pełniącą rolę wektora wiążącego się z albuminą (Vasovist). Po wprowadzeniu do krwioobiegu związek ten wiąże się z albuminą w ponad 70% [7].

Badania dotyczące poszukiwania nowych metod diagnostycznych oraz związków kontrastowych obejmują między innymi transport oraz metabolizm tych związków wewnątrz organizmu. Albumina jest białkiem, które odgrywa istotną rolę w transporcie licznych endo- i egzogennych ligandów, dlatego też znajomość miejsca i sposobów koordynacji metali w cząsteczce albuminy może być wykorzystana zarówno do projektowania nowych metod diagnostycznych, jak również środków kontrastowych oraz leków.

1. WŁAŚCIWOŚCI I FUNKCJE ALBUMINY LUDZKIEJ

Ludzka albumina (ang. *human serum albumin*, HSA) jest głównym białkiem osocza, syntetyzowanym w wątrobie w ilości 200–400 mg/kg m.c./dobę. U zdrowego dorosłego człowieka stężenie albuminy w osoczu utrzymuje się na poziomie 3,5–5,0 g/dl (ok. 0,6 mmol/l) [8]. Naruszenie poziomu albumin w osoczu zakłóca wszystkie procesy związane z filtracją i przenikaniem wody przez ściany naczyń krwionośnych. Spadek stężenia albumin w osoczu poniżej 0,14 mmol/l powoduje nadmierną ucieczkę płynu z łożyska naczyniowego i powstawanie obrzęków. Biologiczny okres półtrwania tego białka wynosi wg różnych źródeł 19–21 dni [8, 9]. Niewielka ilość albuminy (~ 2 g) jest przechowywana w wątrobie, większość uwalniana jest do krwioobiegu. W przybliżeniu 30–40% albuminy pozostaje w kompartmentie osoczym, a reszta zlokalizowana jest w tkankach mięśni i skóry. Albumina przenika do przestrzeni okołonaczyniowej z prędkością 5%/h i wraca do naczyń krwionośnych w równoważnej ilości drogą limfatyczną [10]. Albumina należy do tych białek, których funkcje zostały stosunkowo dobrze poznane. Jest to białko wielofunkcyjne, jedną z jego podstawowych funkcji jest utrzymanie prawidłowego ciśnienia osmotycznego krwi oraz zapewnienie optymalnego pH osocza. Odpowiada również za transport licznych związków endo- i egzogennych. Do najważniejszych związków endogennych transportowanych przez albuminę należą: niezestryfikowane kwasy tłuszczowe, hem (uwalniany w trakcie hemolizy), bilirubina (żółty barwnik powstający w procesie rozpadu hemoglobiny), tyroksyna (hormon tarczycy), jony metali. Białko to umożliwia przenoszenie związków słabo rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie, chroni ligandy przed nadmiernym kata-

bolizmem, stanowi rezerwar wielu substancji, które z chwilą odłączenia się od białka stają się aktywne [8].

Albumina jest również czynnikiem antyoksydacyjnym [11, 12]. Może działać bezpośrednio jako zmiatacz RFT (*reaktywne formy tlenu*) w organizmie lub w sposób pośredni przez wiązanie i transportowanie tzw. zmiataczy wolnych rodników, bądź przez izolację jonów metali przejściowych wykazujących właściwości prooksydacyjne.

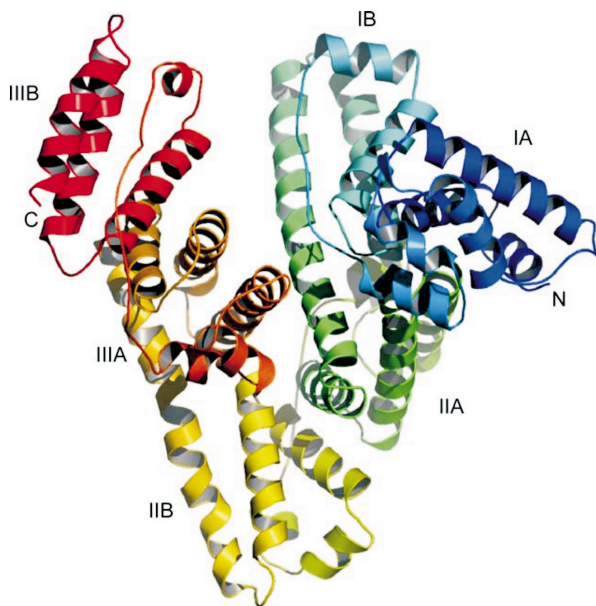
Pośrednia aktywność antyoksydacyjna albuminy wynika między innymi z jej zdolności do transportowania wiążącej się z dużym powinowactwem bilirubiny. Taka związana z albuminą bilirubina staje się inhibitorem peroksydacji lipidów. *In vitro* albumina wykazuje ochronę antyoksydacyjną przeciwko utleniającemu działaniu tetrachlorku węgla i toksyn mocznicowych [13], co może mieć znaczenie w leczeniu niewydolności wątroby i nerek. *In vivo* albumina pełni dodatkowo rolę wspomagającą dla innych substancji będących przeciwutleniaczami, takich jak wspomniana wcześniej bilirubina czy tlenku azotu [14].

Badania ostatnich lat wskazują na właściwości przeciwzapalne albuminy. Grupy tiolowe albuminy mogą sygnalizować komórkom zapalnym zmiany regulatorowe zależne od ich stanu redoks [15]. Ponadto albumina powoduje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu [16], a tworzenie reszt kwasu sulfonowego przez Cys-34 może również być kluczowym czynnikiem decydującym o odpowiedzi komórkowej, na co wskazują badania wpływu tych grup na funkcje sygnalizacji komórkowej [17].

2. STRUKTURA ALBUMINY – MIEJSCA WIĄZANIA LIGANDÓW

Cząsteczka HSA składa się z trzech, układających się na kształt serca, α -heli-kalnych domen (I–III), z których każda dzieli się na dwie subdomeny A i B (Rys. 1). Pierwsze sześć helis w każdej domenie należy do subdomeny A, podczas gdy pozostałe cztery helisy odpowiadają subdomenom B. Subdomeny poruszają się względem siebie za pośrednictwem elastycznych pętli zbudowanych z reszt proliny, co umożliwia dostosowanie budowy cząsteczki albuminy do wiązania dużej ilości różnorodnych ligandów [9].

W skład cząsteczki białka wchodzi wiele aminokwasów zawierających atomy donorowe, które mogą być miejscami koordynacji. Najczęściej spotykanymi ligandami w białkach są: grupa tiolowa cysteiny, azot imidazolowy histydyny, grupy karboksylowe kwasów glutaminowego i asparaginowego oraz fenolanowa grupa tyrozyny.



Rysunek 1. Struktura cząsteczki ludzkiej albuminy osoczowej [18], PDB 1ao6

Figure 1. Crystal structure of human serum albumin [18], PDB 1ao6

W obrębie cząsteczki HSA wyszczególniono sześć głównych miejsc wiązających, które dla niskich lub terapeutycznych stężeń ligandów wykazują wysoką specyficzność. Miejsca te różnią się między sobą wielkością i polarnością, dzięki czemu cząsteczki o różnych strukturach i o różnych rozmiarach mogą jednocześnie wiązać się z cząsteczką albuminy. Najlepiej scharakteryzowanymi miejscami wiązania są znajdujące się w subdomenie IIA i IIIA dwa miejsca o wysokim powinowactwie zarówno do leków, jak również ligandów endogennych. Nazwane są one miejscami Sudlowa I i II. Miejsce I obejmuje wszystkie sześć helis subdomeny IIA oraz pętlę należącą do subdomeny IB (aminokwasy 148–154). Wnętrze kieszeni ma zasadniczo charakter niepolarny, choć zlokalizowane są w nim również dwa niewielkie obszary polarne: pierwszy tworzą Tyr150, His242 i Arg257, a drugi – Lys195, Lys199, Arg218 i Arg222. Leki wiążą się z regionem hydrofobowym, a ponadto oddziałują z aminokwasami należącymi do obszarów polarnych (wiązania wodorowe). Związki przyłączające się selektywnie do miejsca I posiadają zwykle centralnie umiejscowiony element anionowy lub elektronegatywny. Należą do nich m.in.: warfaryna, fenylobutazon i oksyfenbutazon [19]. Miejsce II obejmuje sześć helis subdomeny IIIA i przypomina swą budową miejsce I, mimo że jest od niego znacznie mniejsze. Zawiera tylko jeden obszar o charakterze polarnym. Leki, takie jak: diazepam, ibuprofen czy diflunizal, przyłączają się do środkowej części kieszeni i zwracają się w stronę obszaru polarnego przynajmniej jednym ze swoich atomów tlenu. Miejsce II jest selektywne dla związków z peryferyjnie zlokalizowaną grupą elektronegatywną [19].

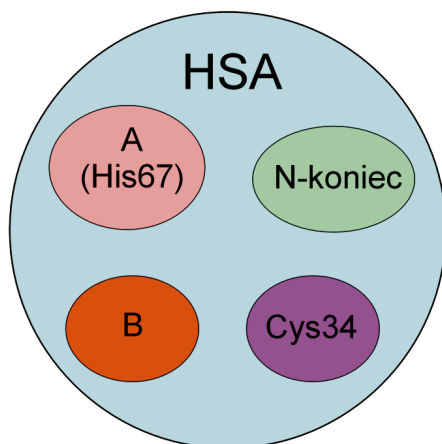
Do ważnych endogennych ligandów transportowanych przez albuminę należą kwasy tłuszczowe. W cząsteczce albuminy można wyróżnić siedem miejsc wiążących długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acids*, FA). Miejsca wiązania oznaczone są odpowiednio jako FA1-FA7. Obszary FA1-FA5 wchodzą w elektrostatyczne/polarne oddziaływania z grupą karboksylową kwasu. Z kolei miejsca FA6 i FA7 nie wykazują tego typu interakcji i charakteryzują się mniejszą siłą wiązania. Stwierdzono, że region FA7 umiejscowiony jest w obrębie miejsca I wiązania, a obszary FA3 i FA4 – w obrębie miejsca II [20].

Przy wysokim stężeniu jeden związek może zajmować więcej miejsc w cząsteczce albuminy, wiążąc się w głównym położeniu z dużym powinowactwem jak i również w położeniu drugorzędym i trzeciorzędym jednak już z odpowiednio mniejszym powinowactwem. Położeniom innym niż pierwszorzędne poświęca się jednak zdecydowanie mniej uwagi, ponieważ ilości danego związku nie są praktycznie nigdy na tyle wysokie by ich cząsteczki zajmowały te położenia [21, 22].

Oddziaływania między albuminą a ligandem mogą mieć bardzo różny charakter, np. sił Van der Waalsa, sił elektrostatycznych, wiązań wodorowych czy oddziaływań hydrofobowych. W niektórych przypadkach, między białkiem a ligandem tworzą się nieodwracalne wiązania kowalencyjne [23, 24].

3. WIĄZANIE JONÓW METALI I KOMPLEKSÓW METALI – ZNACZENIE W DIAGNOSTYCE I TERAPII

Albumina posiada zdolność swoistego wiązania wielu metali, zarówno tych niezbędnych dla funkcjonowania organizmu jak również tych, które wykazują działanie toksyczne.



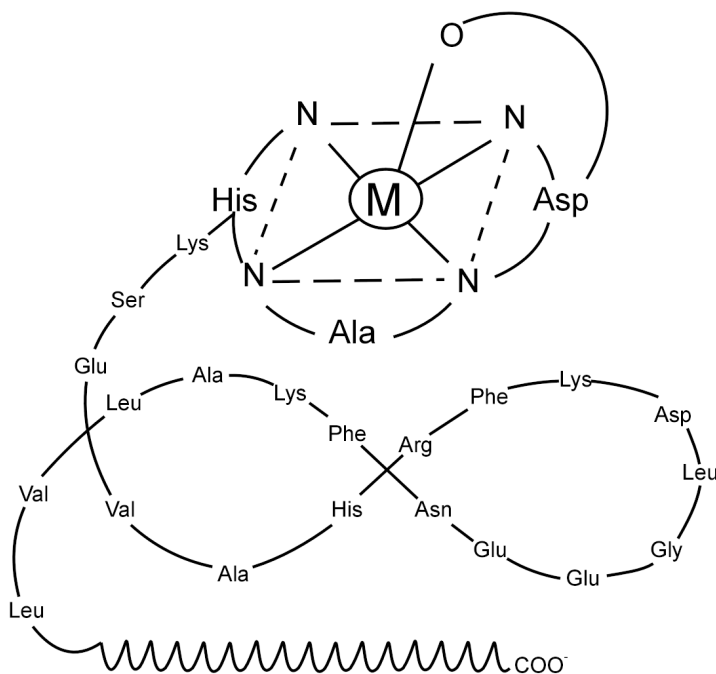
Rysunek 2. Schemat miejsc wiązania jonów metali w obrębie cząsteczki HSA [26]

Figure 2. Scheme of the metal binding sites in HSA [26]

Na szczególną uwagę zasługuje wiązanie jonów: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} oraz Au^+ . Z dotychczasowych badań wynika, że istnieją cztery różne miejsca wiązania jonów metali w obrębie cząsteczki HSA: *N*-koniec, Cys34 oraz tzw. miejsca A i B [25, 26] (Rys. 2).

3.1. *N*-KONIEC

Najlepiej scharakteryzowanym miejscem wiązania jonów metali w obrębie cząsteczki albuminy jest *N*-końcowy fragment tego białka, składający się z sekwencji trzech aminokwasów Asp1-Ala2-His3 (tzw. motyw ATCUN). Uważa się, że kluczową rolę w wiązaniu metali przejściowych odgrywa reszta aminokwasowa His3, mniej jasny jest natomiast udział Asp1 i Ala2. Albuminy gatunków nie posiadających His w pozycji 3 (np. albumina psia i świńska gdzie His została zastąpiona Tyr) w warunkach fizjologicznych nie wiążą jonów metali na *N*-końcu [27]. *N*-końcowy fragment albuminy umożliwia koordynację metalu poprzez cztery ligandy azotowe pochodzące z imidazolowego pierścienia His3, *N*-terminalnej grupy aminowej Asp1 i dwóch zdeprotonowanych grup amidowych Ala2 i His3. Utworzony w ten sposób kompleks HSA-metal może przyjmować koordynację tetraedryczną bądź płaską kwadratową [1, 28].



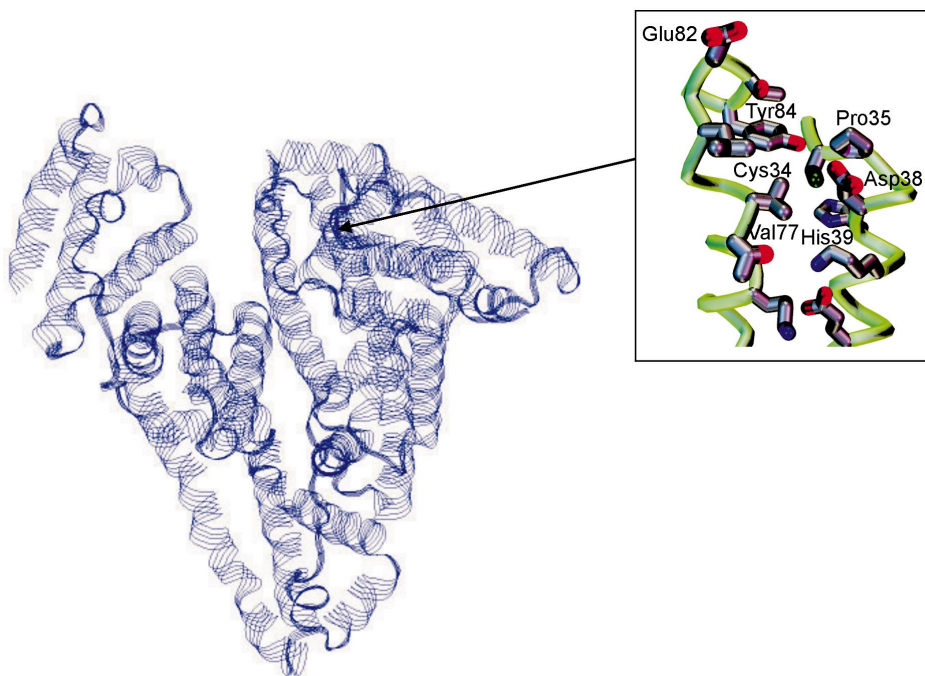
Rysunek 3. Propozycja sposobu wiązania jonów metali do *N*-końca cząsteczki HSA [28]

Figure 3. Proposed structure of the metal binding site to *N*-terminal of HSA [28]

Spośród jonów metali wiążących się do *N*-końca na szczególną uwagę zasługują endogenny jon Cu(II) i toksyczny Ni(II), ponieważ cząsteczka albuminy wiąże je mocniej i bardziej specyficznie niż inne metale [27, 29].

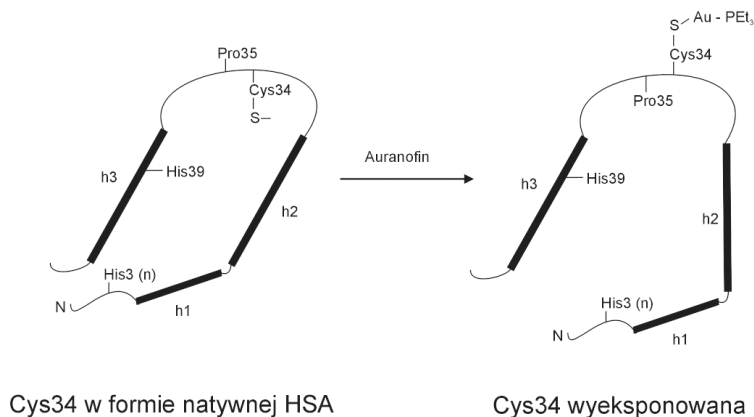
3.2. CYSTEINA 34

Kolejnym ważnym miejscem wiązania jonów metali przez albuminę jest obszar zawierający cysteinę znajdującą się w położeniu 34. Badania krystalograficzne wskazują, że Cys34 znajduje się na powierzchni cząsteczki białka w płytkiej szczelinie pomiędzy helisami h2 i h3 subdomeny IA i jest otoczona przez łańcuchy boczne Pro35, Asp38, His39, Glu82, Val77 i Tyr84 (Rys. 4). Cys34 jest jedyną cysteiną w obrębie tego białka posiadającą wolną grupę tiolową, podczas gdy pozostałe 34 reszty cysteinowe uczestniczą w tworzeniu siedemnastu mostków disulfidowych. Wolnej grupie sulfhydrylowej albumina zawdzięcza właściwości antyoksydacyjne. Wolna Cys34 może wiązać jony srebra, platyny, rtęci, kadmu, miedzi i złota, na różnych stopniach utlenienia (Rys. 5).



Rysunek 4. Struktura kieszeni wiążącej w HSA zawierająca Cys34, PDB 1bm0 [30]

Figure 4. The structure of binding pocket of HSA including Cys34, PDB 1bm0 [30]

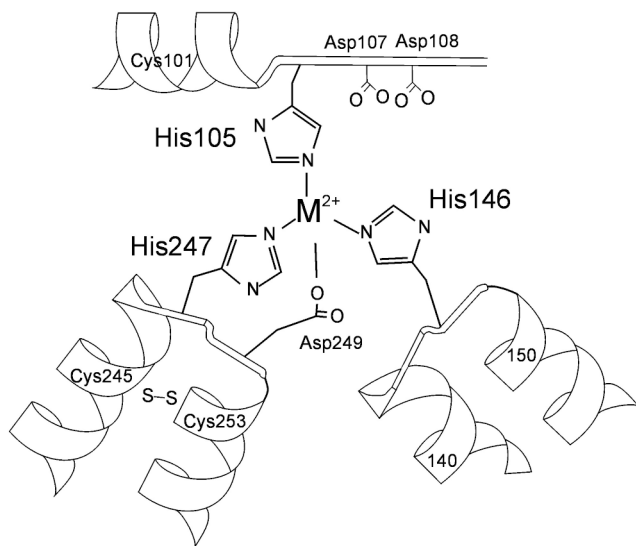


Rysunek 5. Zmiany strukturalne w obrębie domeny IA. Propozycja wiązania złota przez Cys34 w HSA [31]
 Figure 5. Model for structural changes in domain IA of albumin. Proposed binding of gold by Cys34 in HSA [31]

Oprócz jonów metali Cys34 przyłącza również ponad 80% całkowitej ilości tlenu azotu(II) z osocza, leki tiolowe oraz obecną we krwi cysteinę i glutation (poprzez tworzenie mostków disiarczkowych). Struktury krystaliczne albuminy wolnej od kwasów tłuszczowych i albuminy fizjologicznej związanej z kwasami tłuszczowymi wskazują na wyraźną zmianę konformacji pod wpływem wiązania kwasów tłuszczowych. Uważa się, że ta zmiana konformacji ma wpływ na reaktywność Cys34, gdyż na skutek zmian reszta sulfhydrylowa staje się bardziej dostępna. Zgodnie z przewidywaniami wzrost reaktywności Cys34 obserwuje się wraz ze wzrostem wysycenia cząsteczki białka kwasami tłuszczowymi [32, 33].

3.3. MIEJSCE A I B

W obrębie cząsteczki HSA znajduje się szesnaście reszt histydynowych, jednak na podstawie dostępnych obrazów struktury krystalicznej albuminy wydaje się, że istnieje tylko jeden region, gdzie reszty histydyn leżą wystarczająco blisko siebie aby mógł być stworzony określony model koordynacyjny. Miejsce to zlokalizowane jest w przestrzeni pomiędzy domenami I i II. Pierwszą zaproponowaną możliwością koordynacji jonu metalu w przestrzeni pomiędzy domenami I i II jest wykorzystanie jako ligandów azotowych His105 i His146 z domeny I oraz His247 pochodzącej z domeny II [34] (Rys. 6). Obszar HSA w pobliżu tych reszt histydynowych obfituje w karboksylowe reszty kwasów asparaginowego i glutaminowego (Asp107, Asp108, Asp240, Asp249, Glu252, Asp255, Asp256, Asp259), które są potencjalnymi ligandami niezbędnymi do związania jonów metali w tym miejscu. Otaczające jon metalu ligandy przyjmują koordynację tetraedryczną, jednakże jest również prawdopodobna wyższa liczba koordynacyjna z dodatkowymi ligandami tlenowymi [35].



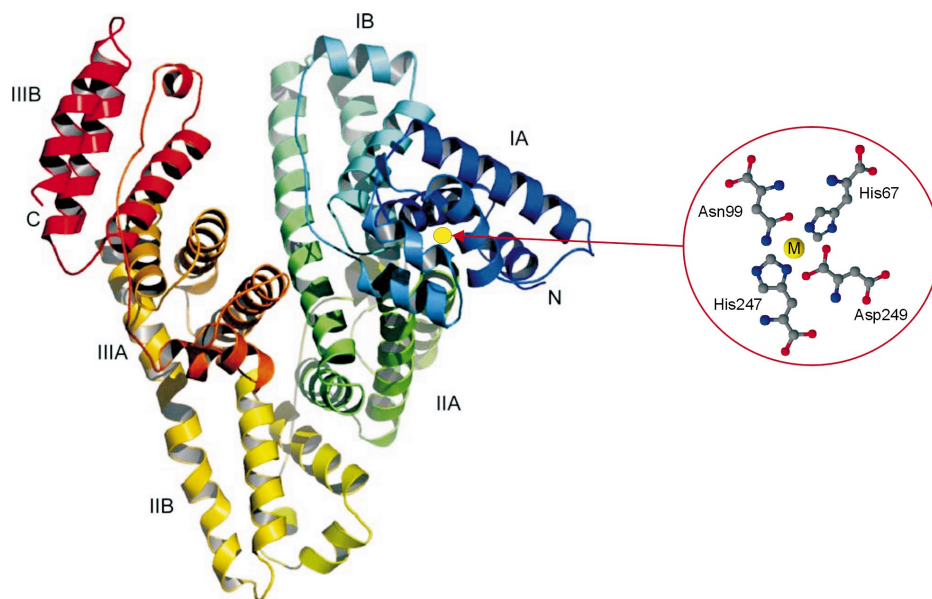
Rysunek 6. Propozycja sposobu wiązania jonów Cd(II) i Zn(II) do HSA (miejsce A) [34]
 Figure 6. Proposal for the shared Cd(II) and Zn(II) binding site in HSA (site A) [34]

Dalsze badania tego miejsca przedstawione w pracy Sadlera i Vilesa wskazują na to, że jon metalu skoordynowany jest za pośrednictwem azotowych ligandów His67, His247 oraz ligandów karboksylowych Asn99 i Asp249, które tworzą koordynację zniekształconej bipiramidy trygonalnej z pustym wiązaniem ekwatorialnym, zajmowanym przez cząsteczkę wody lub jon Cl^- z osocza [34].

Obecność kwasów tłuszczowych (miejsce FA2) na granicy subdomeny I A i II A, zaburza wiązanie jonów metali. Grupa karboksylowa kwasu oddziałuje z Arg257 i Ser287 (subdomena II A) oraz z Tyr150 (subdomena I B) i grupą metylową z subdomeny I A, powodując przesunięcie His247 i Asp249 i oddzielenie reszty His67 i Asn99. Prowadzi to do obniżonej zdolności wiązania Cd^{2+} lub Zn^{2+} [25, 36].

Miejsce A jest miejscem o wysokim powinowactwie do jonów metali znajdujących się na drugim stopniu utlenienia takich jak Zn(II), Cd(II), Ca(II), Cu(II), Ni(II) (Rys. 7). Badania wykazały, że dla jonów Zn(II) i Cd(II) stanowi ono pierwszorzędne miejsce wiązania, a dla jonów Cu(II) i Ni(II) jest to miejsce drugorzędne [25, 37].

Najnowsze badania wskazują na istnienie dodatkowego obszaru w obrębie cząsteczki HSA wiążącego jony metali (tzw. miejsca B). Obszar ten wykazuje również powinowactwo do jonów Cd(II), jednak stanowi on drugorzędne miejsce ich wiązania. Pojawiły się sugestie wskazujące na przyłączania w tym obszarze białka jonów Ca(II). Dokładna lokalizacja miejsca B nie jest jednak jeszcze znana. Przewidywania dotyczące usytuowania tego miejsca w cząsteczce albuminy sugerują, że miejsce to jest bogate w ligandy karboksylowe (Glu i Asp) [25, 34].



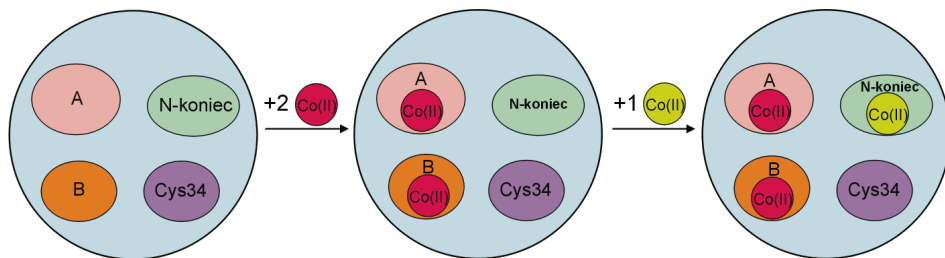
Rysunek 7. Lokalizacja jonu metalu i modelowa struktura albuminy z jonami cynku [PDB 1ao6] [25]

Figure 7. Location and modelled structure of the high-affinity zinc-binding site on albumin [PDB 1ao6] [25]

3.4. WIĄZANIE OSOCZOWEJ ALBUMINY LUDZKIEJ (HSA) Z JONAMI KOBALTU(II)

W związku z opracowaniem, istotnego dla diagnostyki niedokrwienia mięśnia sercowego, testu ACB (ang. *Albumin Cobalt Binding*) wykorzystującego zdolność albuminy osocza do wiązania jonów Co(II), niezwykle ważną stała się molekularna identyfikacja głównych miejsc wiązania tych jonów w obrębie cząsteczki albuminy oraz wiedza dotycząca wpływu zarówno ligandów endogennych jak i leków na to wiązanie.

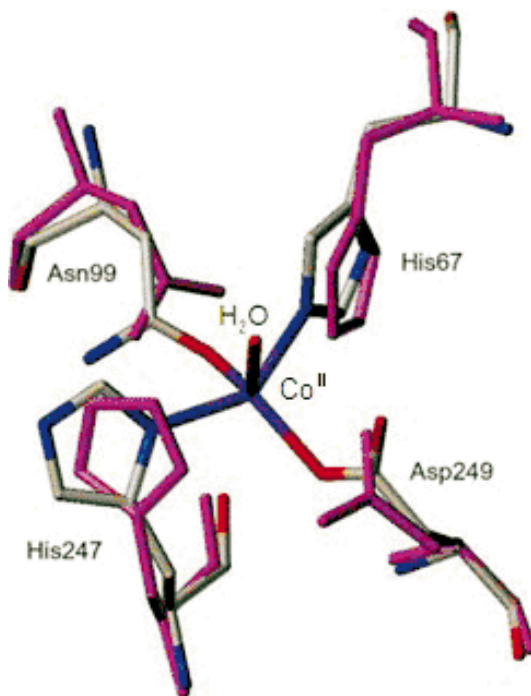
Najnowsze wyniki badań E. Mothersa i P. Fallera [26] wskazują na to, że co najmniej trzy mole Co(II) mogą wiązać się specyficznie do trzech różnych miejsc wiązania metali znajdujących się w obrębie cząsteczki albuminy (Rys. 8). Pierwsze dwa mole Co^{2+} wiążą prawdopodobnie do miejsca A i B. Dopiero trzeci mol przyłącza się do *N*-terminalnego miejsca wiązania jonów metali. Spośród czterech poznanych dotychczas miejsc wiązania całkowicie wykluczono jedynie możliwość kowalencyjnego wiązania się jonów Co(II) do Cys34 [26]. Ponieważ jeszcze do niedawna uważano, że jedynym miejscem wiązania jonów Co(II) jest *N*-końcowy fragment łańcucha albuminy, te najnowsze doniesienia, jakoby jony Co(II) nie wiązały się preferencyjnie do *N*-końca cząsteczki HSA, lecz pierwszorzędnie przyłączały się do miejsc A i B, mają istotne znaczenie dla dalszych badań nad testem ACB.



Rysunek 8. Trzy możliwe miejsca wiązania jonów Co(II) w cząsteczce HSA [26]

Figure 8. Three possibilities of the cobalt-binding sites in HSA [26]

Zaproponowano wcześniej, że jony Cd(II) i Zn(II) skoordynowane do miejsca A, najprawdopodobniej za pomocą czterech reszt aminokwasowych (His67, His247, Asn99, Asp249) i cząsteczki wody, tworzą kompleksy o geometrii zniekształconej bipiramidy trygonalnej z dwoma resztami histydynowymi w pozycjach aksjalnych. Przypuszcza się, że podobna może być koordynacja jonów Co(II). Proponowane ligandy otaczające jon Co(II) tworzą zniekształconą konfigurację oktaedryczną (Rys. 9). Wciąż jednak nie ma dokładnego potwierdzenia, czy Co(II) wiąże się do miejsca A w taki sam sposób jak jony Cd(II) i Zn(II).



Rysunek 9. Proponowany model wiązania jonów Co(II) do miejsca A cząsteczki HSA [PDB 1a06] na podstawie pracy Stewarta [36]

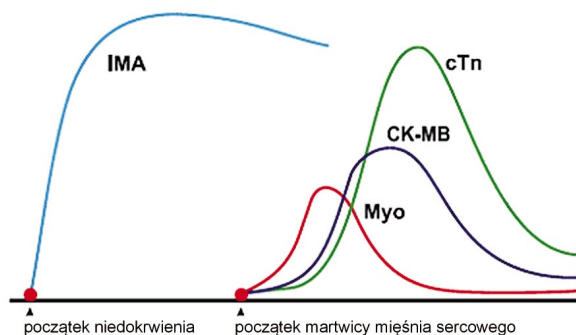
Figure 9. Proposed model of Co(II) binding site of HSA (site A) [PDB 1a06] according to Stewart [36]

Jak wynika z badań, wiązanie jonów Co(II) do albuminy jest procesem szczególnie złożonym, ze względu na możliwość wiązania przynajmniej w trzech miejscach struktury cząsteczki albuminy. Miejsca te są również dostępne dla innych jonów, których wiązanie może jakościowo zmieniać sposób wiązania Co(II) [26, 36].

3.5. OKSYDATYWNIE ZMODYFIKOWANA ALBUMINA (IMA) JAKO WSKAŹNIK NIEDOTLENIEŃ MIĘŚNIA SERCEWEGO

Albuminy modyfikowane niedokrwieniem (ang. *ischemia modified albumin*, IMA) są nowym markerem cieszącym się dużym zainteresowaniem w nowoczesnej diagnostyce kardiologicznej [38–40]. Przypuszcza się, że niedokrwienie mięśnia sercowego powoduje zmiany konformacyjne albuminy objawiające się obniżeniem zdolności do wiązania i transportowania metali przejściowych. Czynniki powodującymi te zmiany są prawdopodobnie związane z niedokrwieniem i następującą po nim reperfuzją, kwasicą, zmniejszoną prężnością tlenu oraz zaburzeniami funkcjonowania pompy sodowej i wapniowej, a przede wszystkim nasilony stres oksydacyjny. Cząsteczki albuminy, które uległy modyfikacji konformacyjnej w wyniku kontaktu z reaktywnymi formami tlenu określono jako albumina modyfikowana niedokrwieniem – IMA.

Markery wykorzystywane obecnie w diagnostyce biochemicznej zawału mięśnia sercowego nie mogą być wykorzystane w diagnostyce przejściowego, odwracalnego niedokrwienia mięśnia sercowego przebiegającego bez martwicy miocardium, ponieważ pojawiają się one w późnej fazie niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia serca, kiedy deficyt tlenowy prowadzi do powstania ognisk martwicy, w wyniku której obumierające komórki stają się źródłem tych markerów (Rys. 10).



Rysunek 10. Dynamika zmian stężenia IMA w porównaniu z innymi wskaźnikami martwicy mięśnia serca [41]
Figure 10. The dynamics of changes in the concentration of IMA in comparison with other indicators of cardiac muscle necrosis [41]

Dlatego uwaga kardiologów skierowana jest obecnie na poszukiwanie markerów niedokrwienia mięśnia sercowego wyraźnie wyprzedzających powstawanie ognisk martwiczych w niedokrwionym mięśniu sercowym. Wyniki przeprowadzonych do-

tychczas badań wskazują, że rolę wczesnego markera niedokrwienia mięśnia sercowego przebiegającego bez martwicy komórek miocardium może spełnić oznaczenie w osoczu obecności frakcji „albuminy zmodyfikowanej w ognisku niedokrwienia”, czyli IMA.

W celu oceny stopnia modyfikacji niedokrwiennej cząsteczek albuminy został opracowany test ACB pozwalający na ilościową ocenę tych zmian. Test wykorzystuje zdolność albuminy do wiązania jonów Co(II). Zmiany konformacyjne albuminy znajdującej się w ognisku niedokrwienia powodują obniżenie zdolności wiązania tych jonów. Im większe niedokrwienie, tym większe zmiany strukturalne i tym mniejsza ilość związanego kobaltu. Niewątpliwą zaletą oznaczania IMA jest to, że zmiana właściwości albuminy następuje w krótkim czasie, tzn. wystarczy krótkotrwałe niedokrwienie, by nastąpiła zmiana powinowactwa do jonów Co(II).

Podstawą testu jest ocena reakcji barwnej znacznika DTT (ditiotreitol) z egzogennym kobaltem (dodanym w nadmiarze jako CoCl_2), który nie uległ wiązaniu przez cząsteczki albuminy. Na rynku dostępny jest test komercyjny – (IMA[®] ACB[®] Test). W teście ACB[®] wartości IMA, po standaryzacji, wyrażane są w jednostkach albuminy modyfikowanej niedokrwieniem na jednostkę objętości osocza lub surowicy (U/mL) [39, 40].

Precyzyjny mechanizm zmian konformacyjnych w cząsteczce albuminy nie jest poznany. Sporne jest również miejsce wiązania jonów kobaltu(II). Dotychczas uważano, że głównym miejscem wiązania Co(II) jest *N*-końcowy fragment łańcucha albuminy i to właśnie w obrębie tego fragmentu dochodzi do zmian konformacyjnych powodujących zanik zdolności wiązania i transportowania jonów kobaltu(II) [1]. Dopiero badania Mothesa i Fallera [26] wykazały, że cząsteczka albuminy może związać 3 mole jonów Co(II). Jony te w pierwszej kolejności mogą zostać wbudowane w miejsca A i B albuminy, a dopiero później związać się na *N*-końcu. Taki sposób wiązania jonów kobaltu został potwierdzony w badaniach innych autorów [42, 43].

Pewne wątpliwości może budzić swoistość testu dla niedokrwienia mięśnia sercowego, gdyż wzrost stężenia zmodyfikowanej albuminy (IMA) mógłby przynajmniej teoretycznie być obserwowany w przypadku niedokrwienia w obrębie jakiegokolwiek łożyska naczyniowego lub równie dobrze mógłby być przypisany procesom oksydacyjnym związanym z uszkodzeniem innych tkanek. Fakt, iż stres oksydacyjny towarzyszy w różnym stopniu większości chorób przewlekłych, może nasręczać trudności z interpretacją wyników testu ACB. Istotnym problemem w interpretacji testu może być również wzrost stężenia kwasów tłuszczowych we krwi, do którego dochodzi w przypadku licznych schorzeń, jak również obecność niektórych leków w krwiobiegu, które mogą w istotny sposób wpływać na wiązanie jonów kobaltu(II), a tym samym mieć wpływ na wynik testu ACB.

Dlatego ważna jest molekularna identyfikacja głównych miejsc wiązania jonów Co(II) w obrębie struktury albuminy, jak również wiedza dotycząca wpływu substancji endogennych oraz leków na to wiązanie. Najnowsze badania wskazują, że

wiązanie z *N*-końcem jest prawdopodobnie drugorzędym miejscem wiązania. Główne miejsca są zlokalizowane w przestrzeni pomiędzy domenami I i II miejsca A i B zidentyfikowane również jako miejsca wiązania kadmu(II) [44, 45].

3.6. WIĄZANIE KOMPLEKSÓW METALI

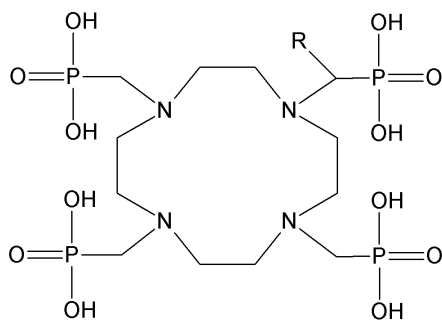
Wiązanie leków z białkami krwi, a w szczególności z albuminą ma istotne znaczenie dla ich działania farmakologicznego, ponieważ tylko niezwiązana z białkami część leku może być czynna farmakologicznie. Prawie wszystkie kompleksy metali wykorzystywane klinicznie dostarczane są do organizmu dożylnie. Wiązanie z albuminą stanowiącą główny składnik osocza może mieć istotny wpływ na skuteczność leku poprzez regulację wolnej frakcji odpowiedzialnej za aktywność oraz na szeroko rozumianą toksyczność. Aspekt ten jest istotny zarówno podczas ustalania dawek (kompleksy metali wiążą się w znacznym stopniu nieodwracalnie), jak również podczas sposobu podawania, co jest szczególnie istotne w kuracjach wielolekowych [46].

Jak wykazują badania wolnej frakcji leków platynowych około 70–80% cisplatyny wiąże się z białkami osocza, podczas gdy drugiej generacji lek platynowy – karboplatyna wiąże się już tylko w ok. 30% [47]. Znaczna część tych kompleksów związana jest nieodwracalnie (65% cisplatyny i 25% karboplatyny) i staje się nieaktywna terapeutycznie. Jest to istotny problem, który musi być uwzględniony między innymi przy dawkowaniu tych leków.

Odkrycie cisplatyny jako leku przeciwnowotworowego oraz zrozumienie mechanizmów działania tej grupy związków, poprzez badanie oddziaływania cisplatyny z HSA [48, 49], pociągnęło za sobą intensywne poszukiwania innych kompleksów metali [50–52] o lepszych właściwościach przeciwnowotworowych i mniejszej toksyczności. Szczególnie dobrą aktywność przeciwnowotworową (również względem nowotworów niewrażliwych na cisplatynę), a także niższą toksyczność wykazują kompleksy rutenu(III) [53]. Kompleksy rutenu(III) z ligandem imidazolowym (NAMI-A), oraz kompleks indazolowy [*trans*-HInd(RuInd₂Cl₄)] (KP1019) znajdują się obecnie w I i II fazie badań klinicznych [54]. Testowane są one głównie jako leki antymetastatyczne [55, 56]. Istotną cechą tych kompleksów jest zdolność koordynacji do apotransferyny, co staje się naturalną drogą dla selektywnej dostawy tej grupy związków do komórek nowotworowych. Natomiast istotnym problemem dotyczącym między innymi dawkowania tych potencjalnych leków, jest ich nieodwracalne wiązanie z albuminą, z którą wiążą się w ok. 80% [57]. Ze względu na możliwość silnego nieodwracalnego wiązania z albuminą, kompleksy metali stosowanych w chemioterapii jako leki lub znajdujące się w badaniach przedklinicznych i klinicznych, są obecnie przedmiotem intensywnych badań.

Oddzielną grupę związków stanowią kompleksy lantanowców stosowane w medycynie głównie jako środki kontrastowe w obrazowaniu tkanek przy pomocy rezonansu magnetycznego (MRI) jednej z bardziej skutecznych metod w medycynie.

Dostarcza ona wysokiej rozdzielczości obrazy anatomiczne i dane pozwalające oszacować funkcjonowanie organizmu [58]. Technika ta opiera się na zasadach magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), przy czym wzbudzone są atomy wodoru cząsteczek wody zawartej w tkankach miękkich ludzkiego organizmu. Różna zawartość wody w poszczególnych tkankach powoduje zmiany sygnału, co na obrazie widoczne jest w postaci zmiany barwy. Jeżeli pomiędzy tkankami zdrowymi i chorymi występuje zbyt mały kontrast, używa się środka kontrastowego, który może znacząco zmieniać czasy relaksacji protonów wody w regionach gdzie jest rozmieszczony. W dziedzinie MRI pracuje się obecnie nad środkami kontrastowymi wiążącymi się z albuminą ludzką. Związki takie przebywają dłużej w łożysku naczyniowym i wykazują zwiększoną relaksacyjność na skutek spowolnionej rotacji, dzięki czemu znalazły zastosowanie w angiografii. Istnieje wiele sposobów na uzyskanie kompleksów tego typu. Przyłączenie prostego łańcucha alifatycznego do cząsteczki środka cieniującego jest często wystarczające do zwiększenia jej powinowactwa względem albuminy. Dobrym tego przykładem jest pochodna gadolinu (Gd-DO-TMP) z dodatkowym jedenastowęglowym łańcuchem (Rys. 11), która oddziałuje z białkiem w co najmniej pięciu różnych miejscach odpowiedzialnych w normalnych warunkach za wiązanie kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, że pochodna tego typu przyłącza się do białka tym łatwiej, im dłuższy jest wprowadzony do niej łańcuch węglowy [7, 59].

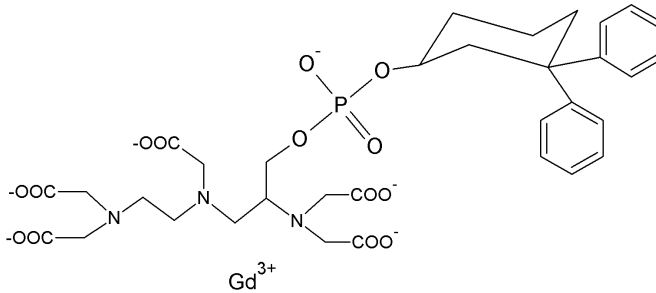


Rysunek 11. Struktura Gd-C₁₁-DOTMP. R: (CH₂)₁₀CH₃ [59]
 Figure 11. Structure of Gd-C₁₁-DOTMP. R: (CH₂)₁₀CH₃ [59]

Jak wykazują badania, kompleksy lantanowców mogą wiązać się w domenie IIA i IIIA albuminy. Ten rodzaj oddziaływania mogą zapewnić m.in. podstawniki benzyloksymetylowe, gdzie siła wiązania z albuminą wzrasta wraz z każdą wprowadzoną grupą. Otrzymane w ten sposób pochodne wykazują silne powinowactwo do miejsca II wiązania (wg Sudlowa), a dużo słabiej oddziałują z miejscem I [7, 58].

W praktyce medycznej stosowana jest pochodna gadolinu (MS-325) [60] o nazwie Vasovist. Jest to pochodna Gd-DTPA z grupą difenylocykloheksylową pełniącą rolę wektora wiążącego się z HSA (Rys. 12). Łącznikiem między kompleksem a wektorem jest kwas fosforowy, który zmniejsza swobodę rotacji związku i którego

ładunek wzmacnia połączenie z białkiem. Po wprowadzeniu do krwioobiegu MS-325 wiąże się z albuminą w ponad 70% [7]. Obszarem przyłączenia jest prawdopodobnie miejsce II wg Sudlowa [20].



Rysunek 12. Budowa MS-325 [20]

Figure 12. Structure of MS-325 [20]

Doniesienia literaturowe opisują nowy związek o właściwościach zbliżonych do Vasovistu. Jest to pochodna Gd-DTPA podstawiona przy węglu C₄ sulfafenazolem. Kompleks ten wiąże się silnie z albuminą ludzką i prawdopodobnie będzie mógł być wykorzystany w angiografii MRI [61]. Kolejnym interesującym z punktu widzenia diagnostyki związkiem jest (MP-2269), który stanowi połączenie kompleksu Gd-DTPA z niearomatyczną lipofilną grupą: 4-pentylbicyclo[2,2,2]oktano-1-karboksylo-di-L-aspartylo-lizyną. Wspomniany środek cieniujący łączy się z HSA niekowalencyjnie za pomocą oddziaływań hydrofobowych, które tworzą się między niearomatycznym cyklicznym łańcuchem bocznym i białkiem. MP-2269 charakteryzuje się najmniejszą szybkością wymiany między formą wolną a związaną spośród wszystkich środków kontrastowych wiążących się z albuminą [62].

W praktyce medycznej stosowanych jest obecnie dziewięć preparatów zawierających jon Gd³⁺: Magnevist, Omniscan, Dotarem, ProHance, Gadovist, Multihance, OptiMARK, Primovist/Eovist oraz Vasovist. Po podaniu donaczyniowym kompleksy gadolinu są szybko rozprowadzane do przestrzeni śródmiąższowej. Ich dystrybucja jest niespecyficzna. Nie przekraczają one bariery krew–mózg. W zdecydowanej większości są wydalane w formie niezmienionej przez nerki [63].

Badania fluorescencyjne miejsc wiązania kompleksu gadolinu MS-325 z zastosowaniem dansylo-L-asparaginy i dansylosarkozyny, czyli znaczników I i II miejsca wiązania leków w cząsteczce albuminy, wykazały że silniejszym miejscem wiązania jest miejsce II wg Sudlowa znajdujące się w subdomenie IIIA. Stwierdzono jednak, że przy dużym nadmiarze kompleksu zachodzi wiązanie w miejscu I, co potwierdzałoby koncepcję o istnieniu dwóch miejsc wiązania o różnym powinowactwie. Preferencyjne wiązanie się kompleksów gadolinu zawierających hydrofobowe fragmenty do miejsca II zostało potwierdzone także dla kompleksów z innymi ligandami [20, 64].

Znaczenie badań dotyczących zdolności wiązania paramagnetycznych kompleksów Gd(III) przez albuminę wynika między innymi z tego, że związki kontrastowe są podawane dożylnie i oddziaływanie z albuminą może wpływać na ich właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Po związaniu może zwiększyć się czas półtrwania środka kontrastowego we krwi i co za tym idzie będzie on dłużej przebywał w naczyniach. Dlatego pierwotnie związki te były przewidziane do wizualizacji struktur naczyniowych oraz wykrywania regionów z nieprawidłową przenikalnością tkankową. Wiązanie z albuminą może też poprawić skuteczność podawanych środków, ponieważ czasy relaksacji protonów wody są silnie zależne od ruchów wirowych kompleksu metalu [20].

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat wskazują na istotną rolę albuminy w nowoczesnych metodach diagnostycznych. Rozwój diagnostyki laboratoryjnej ostrych zespołów wieńcowych (OZW) wskazuje na dwa kierunki – poszukiwanie nowych markerów biochemicznych oraz strategii wielomarkerowych. Spośród proponowanych metod diagnostycznych najwyższą czułością rozpoznania OZW i/lub zawału serca na wstępnym etapie diagnostyki charakteryzowała się IMA (82%). Dla porównania dla troponiny oraz EKG było to odpowiednio 20% i 45%, a ich łączna ocena podwyższała czułość do 53%. Najwyższą czułość – 95% osiągnęło połączenie EKG + troponina + IMA [38, 65].

Albumina zmodyfikowana w „ognisku niedokrwienia” czyli IMA, która stała się wczesnym markerem niedokrwienia mięśnia sercowego, przebiegającego bez martwicy komórek miocardium, wydaje się spełniać wszystkie warunki dobrego markera, takie jak wczesne rozpoznanie zawału mięśnia sercowego, wysoka czułość i swoistość w stosunku do ostrego zespołu wieńcowego, IMA pozostaje w surowicy krwi przez taki okres, aby możliwe było ilościowe ich oznaczenie.

Ważnym aspektem przy stosowaniu tego typu testów jest uwzględnienie czynników, które mogą mieć wpływ na prawidłową ocenę stanu chorego, tj. równoczesne stosowanie różnych leków oraz współistniejące schorzenia przebiegające z hipalbuminemią czy hipercholesterolemią i hipertrójglicydemią.

Kompleksy lantanowców stosowane są w medycynie głównie jako środki kontrastowe w obrazowaniu tkanek przy pomocy rezonansu magnetycznego (MRI), ale znajdują również zastosowanie jako leki (Quadramet).

W technikach diagnostycznych wykorzystujących rezonans magnetyczny bada się obecnie środki kontrastowe ze zwiększonym powinowactwem do albuminy. Związki takie przebywają dłużej w łożysku naczyniowym i wykazują zwiększoną relaksacyjność na skutek spowolnionej rotacji, dzięki czemu znalazły zastosowanie w angiografii. Istnieje wiele sposobów na uzyskanie kompleksów tego typu, jednym z nich jest przyłączenie prostego łańcucha alifatycznego do cząsteczki środka cieniującego co znacznie zwiększa powinowactwo względem albuminy.

Jak wykazują badania silniejszym miejscem wiązania kompleksów lantanowców w cząsteczce albuminy jest miejsce II wg Sudlowa znajdujące się w subdomenie IIIA, jednak przy dużym nadmiarze kompleksy te zajmują również miejsce I w subdomenie IIA. Znaczenie badań dotyczących zdolności wiązania paramagnetycznych kompleksów Gd(III) przez albuminę wynika między innymi z tego, że związki kontrastowe są podawane dożylnie i oddziaływanie z albuminą może wpływać na ich właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Bar-Or, G. Curtis, N. Rao, N. Bampos, E. Lau, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 42.
- [2] Ch.M. Wu, L.Y. Lin, *Sensors and Actuators B*, 2005, **110**, 231.
- [3] F. Kratz, *Journal of Controlled Release*, 2008, **132**, 171.
- [4] A. Wunder, U. Muller-Ladner, E.H. Stelzer, J. Funk, E. Neumann, G. Stehle, T. Pap, H. Sinn, S. Gay, C. Fiehn, *J. Immunol. Methods*, 2003, **170**, 4793.
- [5] I. Bedrosian, A.M. Scheff, R. Mick, L.S. Callans, L.P. Bucky, F.R. Spitz, C. Helsabeck, D.E. Elder, A. Alavi, D.F. Fraker, B.J. Czerniecki, *J. Nucl. Med.* 1999, **40**, 1143.
- [6] H. Weinmann, W. Ebert, B. Misselwitz, H. Schmitt-Willich, *Eur. J. Radiol.*, 2003, **46**, 33.
- [7] L. Thunus, R. Lejeune, *Coord. Chem. Reviews*, 1999, **184**, 125.
- [8] P. Lefvre, C. Badetti, *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 1996, **15**, 464.
- [9] D.C. Carter, J.X. Ho, *Adv. Protein Chem.*, 1994, **45**, 153.
- [10] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T. Evans, *Hepatology*, 2005, **41** (6), 1211.
- [11] K.J. Davies, M.E. Delsignore, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9908.
- [12] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, *FEBS Letters*, 2008, **582**, 1783.
- [13] M.L. Wratten, L. Sereni, C. Tetta, *Ren Fail*, 2001, **23**, 563.
- [14] R. Stocker, A.N. Glazer, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1987, **84**, 5918.
- [15] J.J. Haddad, *Cell Signal*, 2002, **14**, 799.
- [16] A.M. Cantin, B. Paquette, M. Richter, P. Larivee, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, **162**, 1539.
- [17] L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004, **44**, 325.
- [18] S. Curry, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1441**, 131.
- [19] J. Ghuman, P.A. Zunsain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *J. Mol. Biol.*, 2005, **353**, 38.
- [20] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life*, 2005, **57**, 787.
- [21] Y.S. N Day, D.G. Myszk, *J. Pharm. Sci.*, 2003, **92** (2), 333.
- [22] G. Ascoli, E. Domenici, C. Bertucci, *Chirality*, 2006, **18** (9), 667.
- [23] C. Bertucci, E. Domenici, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 1463.
- [24] Y. Ozier, *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 1996, **15**, 532.
- [25] J. Lu., A.J. Stewart, P. Sadler, T.J.T. Pinheiro, C.A. Blindauer, *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, **36** (6), 1317.
- [26] E. Mothes, P. Faller, *Biochemistry*, 2007, **46** (8), 2267.
- [27] K. Oetli, R.E. Stauber, *British Journal of Pharmacology*, 2007, **151**, 580.
- [28] J.P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry*, 1984, **23**(12), 2832.
- [29] M. Guo, L. Kong, X. Mao, X. Li, H. Zou, *Science in China*, 2002, **45** (2), 151.
- [30] S. Sugio, A. Kashima, A.S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Eng.*, 1999, **12**: 439.
- [31] J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, *FEBS Letters*, 1995, **376**, 1.

- [32] U. Kragh-Hansen, V.T. Chuang, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, **25** (6), 695.
- [33] Y.A. Gryzunov, A. Arroyo, J.-L. Vigne, Q. Zhao, V.A. Tyurin, C.A. Hubel, R.E. Gandleya, Y.A. Vladimirov, R.N. Taylor, V.E. Kagana, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, **413** 53.
- [34] P.J. Sadler, J.H. Viles, *Inorg. Chem.*, 1996, **35** (15), 4490.
- [35] P.J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles, *Eur. J. Biochem.* 1994, **220** (1):193.
- [36] A.J. Stewart, C.A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, P.J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100** (7), 3701.
- [37] W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70** (1), 33.
- [38] M.K. Sinha, D. Roy, D.C. Gaze, P.O. Collinson, J.-C. Kaski, *Emerg Med. J.*, 2004, **21**, 29.
- [39] M. Knapik-Kordecka, A.E. Żurawska-Płaksej, M. Warwas, *Wiad. Lek.*, 2008, **61** (10–12), 263.
- [40] W. Myszkka, J. Dudziak, L. Torlinski, *Nowiny lekarskie*, 2006, **75** (2), 174.
- [41] W. Piechota, W. Piechota, *Albumina zmodyfikowana niedokrwieniem – nowy biochemiczny marker niedokrwienia mięśnia serca*, 2005, **12** (25), 4–8.
- [42] D. Bar-Or, L.T. Rael, R. Bar-Or, D.S. Slone, C.W. Mains, N.K.R. Rao, C.G. Curtis, *Clin. Chim. Acta*, 2008, **387**, 120.
- [43] M. Sokołowska, M. Wszelaka-Rylik, J. Poznański, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 1005.
- [44] E. Zapico-Muniz, M. Santalo-Bel, J. Merce-Muntanola, J.A. Montiel, A. Martinez-Rubio, J. Ordonez-Llanos, *Clin Chem.*, 2004, **50**, 1063.
- [45] G.J. Fagan, H. Wayment, D.L. Morris, P.A. Crosby, *J. Clin. Lig. Assay*, 2002, **25**, 178.
- [46] L. Trynda-Lemiesz, *Wiad. Chem.*, 2007, 1–50, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, ISBN 83-2292084-9.
- [47] W.J. Van der Vijgh, I. Klein, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1986, **18** (2), 129.
- [48] J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1384**, 153.
- [49] A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721.
- [50] L. Trynda-Lemiesz, J. Kuduk-Jaworska, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **58**, 69.
- [51] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozłowski, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 141.
- [52] S.V. Pizzo, M.W. Swaim, P.A. Rocho, S.L. Gonias, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **33**, 67.
- [53] M.J. Clarke, *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, editor, Springer-Verlag, Heidelberg, 1989, **10**, 25.
- [54] L. Trynda-Lemiesz, B.K. Keppler, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **73**, 123.
- [55] L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Alessio, E. Iengo, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 1206.
- [56] E. Gallori, C. Vettori, E. Alessio, F. Vilchez, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **376**, 156.
- [57] F. Kratz, N. Mulinacci, L. Messori, I. Bertini, B.K. Keppler, *Metal Ion in Biology and Medicine*, eds. J. Anastassopoulou, Ph. Collery, J. C. Etienne, Th. Theophanides, John Libbey Eurotext, Paris, 1992, **2**, 69.
- [58] M.M. Ali, M. Woods, E.H. Suh, Z. Kovacs, G. Tircsó, P. Zhao, V.D. Kodibagkar, A.D. Sherry, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, **12**, 855.
- [59] P. Caravan, M. Greenfield, X. Li, A. Sherry, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 6580.
- [60] D. Bluemke, A. Stillman, K. Bis, T. Grist, R. Baum, R. D'Agostino, E. Malden, J. Pierro, E. Yucel, *Carotid MR Angiography: Phase II Study of Safety and Efficacy for MS-325*, *Radiology*, 2001, **219**, 114.
- [61] C. Henoumont, V. Henrotte, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 721.
- [62] K. Adzamlı, L. Vander Elst, S. Laurent, R. Muller, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 2001, **12**, 92.
- [63] M.-F. Bellin, A.J. Van Der Molen, *Eur. J. Radiol.*, 2008, **66**, 160.

- [64] X. Li, C. Wang, J. Li, Z. Wang, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2007, **89**, 899.
- [65] E. Stepień, M. Śnieżek-Maciejewska, M. Szajan-Zych, J. Sadowski, *Forum Kardiologów*, 2002, **7** (4), 135, ISSN 1425-3674.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 grudnia 2009

**DIALIZA RÓWNOWAGOWA.
METODA BADANIA SELEKTYWNOŚCI
ODDZIAŁYWAŃ LIGAND–DNA**

**EQUILIBRIUM DIALYSIS.
A METHOD FOR THE STUDY OF LIGAND–DNA
BINDING SELECTIVITY**

**Izabella Czerwińska, Agata Głuszyńska,
Bernard Juskowiak**

*Wydział Chemii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań
juskowia@amu.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Dializa równowagowa

1.1. Podstawy metody

1.2. Ewolucja eksperymentalnej części metody

2. Metody detekcji liganda

3. Zastosowanie dializy równowagowej do poszukiwania leków antynowotworowych

3.1. Różne formy przestrzenne kwasów nukleinowych

3.2. Ligandy stabilizujące czteroniciowe struktury DNA

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Izabella Czerwińska w 2006 r. ukończyła studia na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Obecnie jest słuchaczem Studium Doktoranckiego Wydziału Chemii UAM. W swojej działalności badawczej, związanej z przygotowywaną rozprawą doktorską, koncentruje się na problematyce dotyczącej izomeryzujących ligandów selektywnie oddziałujących z poczworną helisą DNA, wykorzystując także technikę dializy równowagowej. Jest współautorem trzech artykułów naukowych i kilku komunikatów konferencyjnych.

Dr Agata Głuszyńska jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Obecnie jest adiunktem w Pracowni Chemii Bioanalitycznej Wydziału Chemii UAM. Tematyka jej pracy doktorskiej obejmowała syntezę stereospecyficzną pochodnych oksazolininy. Obszar jej aktualnych zainteresowań naukowych dotyczy syntezy i charakteryzacji nowych ligandów oddziałujących z DNA, w aspekcie zastosowań bioanalitycznych i biomedycznych. Jest współautorem szesciu artykułów naukowych i kilkunastu komunikatów konferencyjnych.

Prof. dr hab. Bernard Juskowiak zatrudniony jest na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii UAM (1975). Stopień naukowy doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1984 i 1995, natomiast tytuł profesora chemii w roku 2007. Początkowo zajmował się barwnymi układami analitycznymi zawierającymi ligandy makrocycliczne i kryptandy. Jego obecne zainteresowania naukowe dotyczą zastosowania układów zorganizowanych w analizie chemicznej (liposomy, monowarstwy, biopolimery), a w szczególności syntezy i badania oddziaływań nowych ligandów fluorescencyjnych z dwu- i cztero-niciową helisą DNA oraz wykorzystania procesów fotofizycznych (fluorescencja, wygaszanie fluorescencji, FRET), fotoizomeryzacja liganda w zastosowaniach sensorowych. Dwukrotnie przebywał na długoterminowych stażach naukowych w Japonii w Kyushu University, Fukuoka. W latach 1987–1988 jako stypendysta JSPS, oraz ponownie w latach 1996–1999, tym razem zatrudniony w charakterze profesora kontraktowego. Jest autorem i współautorem ok. 80 artykułów naukowych i ponad 100 komunikatów i referatów na konferencjach naukowych, oraz kilku obszernych artykułów monograficznych.

ABSTRACT

Equilibrium or competition dialysis is a powerful tool for binding study of ligands that are expected to bind to nucleic acids with selectivity related to their structure or sequence. In the equilibrium dialysis experiment, a set of nucleic acid samples that differ in structure and sequence is dialyzed against a test ligand solution. After equilibration, the concentration of ligand bound to each structure or sequence is determined by UV-Vis absorption or fluorescence spectroscopy in each dialysis unit. Since all nucleic acid samples are in equilibrium with the same free ligand concentration, the amount of bound ligand is directly related to the ligand binding affinity. Thus, equilibrium provides a direct measure of selectivity and identifies the nucleic acid sample, which is preferred by a particular ligand. We describe here the principles and practice of the method. Examples of an application of the method are limited to the discovery of small molecules that selectively recognize the unique structural features of G-quadruplexes.

There are proofs for important functional roles of G-quadruplex structures in biology (maintenance of telomeres, transcriptional regulation, and modulation of mRNA translation). G-quadruplex DNA can exist in a variety of structural forms that may possess numerous potential binding sites for small molecules. Therefore equilibrium dialysis provides a useful tool for discovery of new small-molecule therapeutic agents targeting G-quadruplexes.

Keywords: drug discovery; duplex; equilibrium dialysis; G-quadruplex; ligand binding; nucleic acids; structural selectivity; triplex

Słowa kluczowe: poszukiwania leków, dupleks, dializa równowagowa, G-kwadrupleksy, wiązanie liganda, kwasy nukleinowe, selektywność wiązania liganda, trypleks

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
mRNA	– matrycowy kwas rybonukleinowy
C_z	– stężenie liganda związanego
C_w	– stężenie liganda niezwiązanego
C_t	– całkowite stężenie liganda
C_{dna}	– stężenie DNA
ssDNA	– jednoniciowy DNA
dsDNA	– dwuniciowy DNA
c-MYC, VEGF, RET, KRAS, Bcl-2 c-KIT, PDGF-A, HIF-1 α	– oznaczenia protoonkogenów – kodujących białka o odpowiadających im nazwach
d(TTAGGG)	– fragment telomerowego DNA (T-tymina, A-adenina, G-guanina)
poli[dA]	– kwas poli(deoksyadenylowy)
poli[dT]	– kwas poli(deoksytymidylowy)
poli[dG]	– kwas poli(deoksyguanylowy)
poli[dC]	– kwas poli(deoksytydylowy)
poli[dA-dT]	– kwas poli(deoksyadenylodeoksytymidylowy)
poli[dG-dC]	– kwas poli(deoksyguanyludeoksytydylowy)

WSTĘP

Chemioterapia to skuteczna metoda leczenia nowotworów. Obecnie jest jedną z najbardziej rozwijających się dziedzin medycyny. Szereg leków stosowanych w chemioterapii to organiczne związki o małej masie cząsteczkowej (tzw. ligandy), które oddziałują z biopolimerami (białkami, kwasami nukleinowymi) hamując rozwój choroby. Ligandy mogą w różny sposób wiązać się z biopolimerem (proces ten zależy od sekwencji i struktury białka lub kwasu nukleinowego), a w konsekwencji słabiej lub mocniej hamować proliferację komórek nowotworowych.

Działanie i transport leku związany jest często z powstawaniem wiązania pomiędzy chemioterapeutyką a białkami osocza krwi. W zależności od powinowactwa do tych białek lek może być sukcesywnie uwalniany do organizmu. Zatem zarówno w transporcie leków jak i w ich działaniu ważną rolę odgrywają właściwości wiążące specyfiku. Selektywność wiązania leku do kwasów nukleinowych, jak również selektywne tworzenie się kompleksu lek/białko, można badać za pomocą tej samej metody nazywanej dializą. Początkowo metoda dializy wykorzystywana była do oczyszczania jednego rodzaju białka [1]. W późniejszym okresie zastosowano dializę w celu oczyszczania małej ilości kilku białek jednocześnie, takie eksperymenty nazwano mikrodializą. Z czasem zastosowanie dializy zostało poszerzone o badanie wiązania pomiędzy ligandem a biopolimerem (białkiem, kwasem nukleinowym) [2, 3]. Eksperyment, w trakcie którego badana jest selektywność oddziaływań ligand–biopolimer, nazwano dializą równowagową [4]. Bezdiskusyjnym atutem tej metody jest możliwość badania oddziaływań pomiędzy ligandem a kilkudziesięcioma próbkami biopolimerów jednocześnie. Podstawowym celem dializy równowagowej jest zatem jednoczesne zbadanie powinowactwa potencjalnego leku do wielu próbek biopolimerów, różniących się na przykład budową przestrzenną, w celu określenia selektywności oddziaływań.

Głównym celem tego artykułu jest przedstawienie dializy równowagowej jako metody stosowanej do badania selektywności oddziaływań ligand–DNA. Zastosowanie dializy równowagowej w tego typu badaniach pozwala na identyfikację selektywnych ligandów, np. w stosunku do czteroniciowego DNA (G-kwadrupleks), które mogą okazać się skutecznymi chemioterapeutykami.

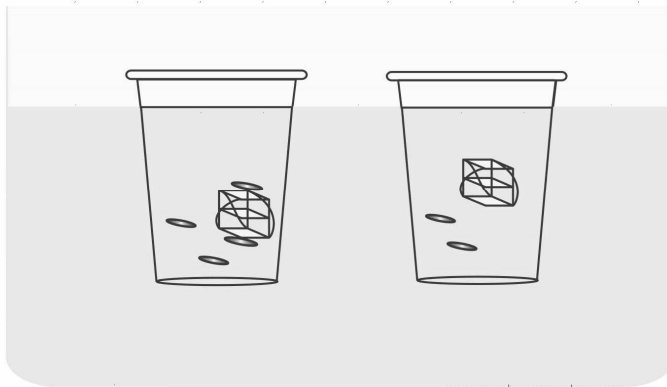
1. DIALIZA RÓWNOWAGOWA

1.1. PODSTAWY METODY

Istnieje wiele sposobów badania oddziaływań pomiędzy cząsteczkami związków organicznych a cząsteczkami kwasów nukleinowych. Do najczęściej stosowanych należą metody spektroskopowe, w tym spektrofotometryczne i spektrofluorometryczne, czy też spektrometria mas. Za pomocą standardowych pomiarów absorp-

cyjnych można zaobserwować zmiany w widmie liganda spowodowane dodawaniem kwasu nukleinowego. Często wynikiem oddziaływań jest efekt hipochromowy lub przesunięcie batochromowe dostrzegalne w widmie [5–8]. Natomiast w przypadku spektrometrii mas, możliwe jest zaobserwowanie selektywności wiązania liganda do DNA poprzez detekcję kompleksów o różnej stechiometrii ligand/DNA [9, 10]. Także w widmach dichroizmu kołowego można zaobserwować zdecydowany efekt oddziaływań ligand–DNA [11, 12]. Równie często do badań takich połączeń stosuje się metody chromatograficzne, które jednocześnie dostarczają informacji o czystości badanych związków [13].

Sz szczególnie przydatną techniką umożliwiającą zbadanie powinowactwa liganda do kilkudziesięciu próbek kwasów nukleinowych w jednym pomiarze, a w konsekwencji oszacowanie selektywności wiązania potencjalnego chemioterapeutyku z różnymi formami strukturalnymi DNA, jest dializa równowagowa. W eksperymencie dializy równowagowej stosuje się próbki oligonukleotydów różniące się sekwencją lub formą strukturalną, mające jednakowe stężenie w przeliczeniu na podstawowy element strukturalny danej formy kwasu nukleinowego (zasadę, parę zasad, tryplet zasad, kwartet zasad). Próbki badanych kwasów nukleinowych umieszczane są w osobnych gilzach dializacyjnych (w bardziej zaawansowanym eksperymencie w osobnych komorach mikrodializera) zaopatrzonych w błonę dializacyjną. Gilzy z próbkami DNA umieszczane są w roztworze dializacyjnym liganda. Przez membranę dializacyjną zachodzi proces dyfuzji cząsteczek liganda, aż do osiągnięcia stanu równowagi, czyli do momentu wyrównania się stężenia niezwiązanego liganda w komorach dializacyjnych i w roztworze zewnętrznym oddzielonym błoną dializacyjną.



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie równowag w procesie dializy w dwóch komorach dializacyjnych. W pierwszej komorze nastąpiło kompleksowanie liganda przez DNA, natomiast kwas nukleinowy z drugiej komory nie wykazuje powinowactwa do cząsteczek liganda

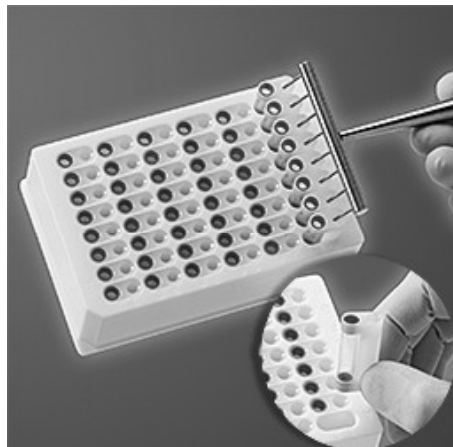
Figure 1. Schematic representation of a competition dialysis equilibrium. In a first dialysis unit DNA–ligand interaction is strong, whereas in a second dialysis unit binding of the ligand to a nucleic acid did not occur

Błona w komorze dializacyjnej jest membrana półprzepuszczalna, która stanowi przeszkodę dla cząsteczek DNA, natomiast składniki niskocząsteczkowe (ligand, bufor, jony soli) dyfundują przez nią swobodnie. W wyniku oddziaływań ligand–DNA następuje nagromadzenie się cząsteczek liganda w gilzach, a całkowite stężenie liganda wewnątrz gilzy uzależnione jest od stałej trwałości kompleksu ligand/DNA [14]. Rysunek 1 przedstawia efekt procesu dyfuzji cząsteczek liganda przez membranę. Kwas nukleinowy w komorze pierwszej wykazuje duże powinowactwo do cząsteczek liganda, stąd jego stężenie jest większe niż w komorze drugiej. Stężenie liganda związanego mierzone jest głównie za pomocą technik spektroskopowych.

1.2. EWOLUOWANIE EKSPERYMENTALNEJ CZĘŚCI METODY

Pierwsze próby wykorzystania procesu dializy do badań oddziaływań pomiędzy ligandami a kwasami nukleinowymi sięgają lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia. Wtedy proces dializy równowagowej przeprowadzany był w specjalnej komorze z trzema przegrodami, która umożliwiała jednoczesne sprawdzenie kompleksowania cząsteczek liganda przez dwa kwasy nukleinowe umieszczone w dwóch zewnętrznych przegrodach, różniące się na przykład sekwencją zasad. W trzeciej (centralnej) przegrodzie znajdował się roztwór liganda [15, 16]. W późniejszym okresie zastosowano inne rozwiązanie umożliwiające badanie powinowactwa liganda do ponad dziesięciu różnych kwasów nukleinowych umieszczonych w oddzielnych gilzach dializacyjnych. Eksperyment z udziałem właśnie takiej ilości biopolimerów nazywany jest dializą równowagową pierwszej generacji [17]. W późniejszym czasie ilość badanych struktur DNA zwiększyła się do około dwudziestu, a rozwiązanie to zostało nazwane dializą równowagową drugiej generacji [18, 19]. Procedury pierwszej oraz drugiej generacji są bardzo podobne. Do przeprowadzenia eksperymentu używa się tradycyjnych gilz dializacyjnych o określonej wielkości porów w błonie. Gilzy umieszcza się w zlewce, w której znajduje się roztwór dializacyjny liganda (roztwór liganda w buforze), w taki sposób, aby gilzy pływały na powierzchni roztworu. Stężenie liganda wynosi przeważnie 1 μM lub 2 μM . Proces dializy prowadzi się do momentu uzyskania równowagi w roztworach, czyli zwykle około 24 godzin, mieszając zawartość zlewki.

Procedura dializy równowagowej ewoluowała następnie w kierunku kolejnego zwiększenia ilości badanych próbek kwasów oraz automatyzacji, by w eksperymencie dializy trzeciej generacji osiągnąć liczbę dziewięćdziesięciu sześciu jednocześnie dializowanych próbek, co zdecydowanie powiększa wachlarz badanych kwasów nukleinowych. Poza tym, tradycyjne gilzy zostały zastąpione komorami w mikrodializerze [20, 21] (Rys. 2).



Rysunek 2. Mikrodializator (ang. *Rapid Equilibrium Dialysis (RED) Device*) firmy Pierce [22]
Figure 2. Microdialyzer for 96 samples (*Rapid Equilibrium Dialysis (RED) Device*)

Komory mikrodializera posiadają większą powierzchnię membranową, w wyniku czego dyfuzja i osiągnięcie równowagi zachodzi szybciej. Dodatkowym atutem jest fakt, że przenoszenie roztworów z komór może odbywać się za pomocą multipipety, czyli kilka próbek jest przenoszonych do/z komór jednocześnie. Warto wspomnieć, że błony dializacyjne produkowane są obecnie głównie z politetrafluoroetyleny (PTFE), czyli materiału, do którego nie przywierają żadne zanieczyszczenia, stąd niespecyficzna adsorpcja cząsteczek liganda na membranie jest zminimalizowana. Po zakończeniu dializy równowagowej, niezależnie od generacji metody, do próbek dodawany jest odczynnik powodujący dysocjację kompleksu ligand/DNA (np. dodecylosiarczan(VI) sodu), a następnie przeprowadzany jest pomiar zawartości liganda w każdej próbce. Stężenie liganda w danej komorze określone jest za pomocą różnych metod analitycznych (zob. Rozdz. 1.3). Stężenie liganda związanego (C_z) obliczane jest z różnicy całkowitego stężenia liganda (C_t) oraz stężenia liganda niezwiązanego (C_w) ($C_z = C_t - C_w$). Natomiast stała wiązania ligand–DNA może być oszacowana według następującego wzoru [20]:

$$K = C_z / \{C_w \times (C_{dna} - C_z)\}$$

gdzie C_{dna} jest stężeniem DNA w przeliczeniu na jego podstawowy element strukturalny (zasada, para zasad, tryplet, kwartet).

Mimo że procedura eksperymentalna dializy równowagowej została bardzo usprawniona i ulepszona, to podstawy teoretyczne procesu dyfuzji, jaki zachodzi podczas eksperymentu, pozostały niezmiennie. Rozwinęła się jedynie technika, której ewolucja spowodowała, że dializa równowagowa jest narzędziem bardzo przydatnym i często używanym w badaniu oddziaływań ligand–DNA.

2. METODY DETEKCJI LIGANDA

Dializa równowagowa jest metodą dostarczającą informacji na temat tego, który z kwasów nukleinowych wykazuje największe powinowactwo do badanego liganda. Wynika to z pomiarów przeprowadzanych po zakończeniu eksperymentu dializy. Pomiar stężenia związanego liganda mogą być wykonane kilkoma metodami. Najczęściej stosowanymi technikami badawczymi są metody spektroskopowe, w szczególności pomiar widm absorpcji w zakresie UV-Vis oraz fluorescencyjnych widm wzbudzenia i emisji [18, 21, 23–27]. Metody spektrofotometryczne i spektrofluorometryczne wydają się być najłatwiejszymi w zastosowaniu, szczególnie w przypadku wykorzystania czynnika mikroplętek. Udogodnienie to polega przede wszystkim na możliwości zastosowania multipipety automatycznej w celu przeniesienia próbek z mikrodializera na mikroplętkę oraz jednoczesnej rejestracji widm dla wszystkich próbek znajdujących się w 96 celkach mikroplętki. Poza tym, przeprowadzając pomiary absorpcyjne w całym zakresie widma, możliwa jest kontrola zawartości DNA. Dodatkowo możliwe jest monitorowanie ewentualnych zmian spektralnych w widmie liganda. Rzadziej używanymi metodami, służącymi do oznaczania liganda w próbkach po eksperymencie dializy równowagowej, są pomiary dichroizmu kołowego. Dichroizm kołowy wykorzystywany jest często w badaniu oddziaływań pomiędzy optycznie czynnym ligandem a DNA. W widmie możliwe jest zaobserwowanie enancjoselektywności wiązania liganda [28–30]. Nietypową metodą, aczkolwiek także stosowaną, jest pomiar aktywności promieniotwórczej, który również umożliwia wyznaczenie stężenia liganda w roztworach po dializie [19].

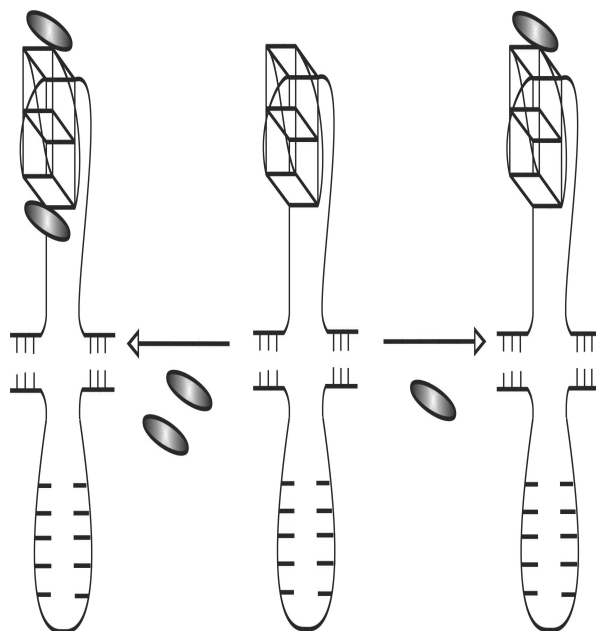
3. ZASTOSOWANIE DIALIZY RÓWNOWAGOWEJ DO POSZUKIWANIA LEKÓW ANTYNOWOTWOROWYCH

3.1. RÓŻNE FORMY PRZESTRZENNE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Kwasy nukleinowe, w zależności od rodzaju (DNA, RNA), sekwencji zasad azotowych i warunków zewnętrznych (temperatura, pH, obecność innych substancji) mogą przyjmować różne struktury przestrzenne. Jeżeli obiektem badanym jest jednoniciowe DNA (ssDNA), to jego podstawowym elementem strukturalnym jest zasada azotowa. Większość enzymów obecnych w jądrze komórkowym działa na jednoniciowej strukturze DNA, dlatego też forma ta ma znaczenie choćby w procesie replikacji. W genomie jednak DNA występuje głównie w formie dwuniciowej (dsDNA), z reguły w postaci helisy typu B, której podstawowym elementem strukturalnym jest para zasad [31]. Duże znaczenie ma także trójniciowa konformacja DNA (struktura trypleksu). Płaskie ułożenie trzech zasad połączonych wiązaniami Hoogsteena może dawać trwałe formy strukturalne, co ma potencjalne możliwości zastosowania w terapii genowej. W strukturach tych krótkie oligonukleotydy mogą

selektywnie oddziaływać z określonymi odcinkami dsDNA, w wyniku czego następuje zahamowanie ekspresji wybranych genów [32, 33]. W terapii genowej zastosowanie znalazły również formy czteroniciowe DNA, które nazywane są G-kwadrupleksami (tetrapleksami, strukturami G4). Tetrapleksy to struktury utworzone przez pojedynczą nić lub kilka nici oligonukleotydów bogatych w guaninę. Cztery cząsteczki guaniny, oddziałując ze sobą za pomocą wiązań wodorowych, tworzą kwartet guaninowy, a kilka takich kwartetów asocjuje warstwowo i powstaje struktura czteroniciowa nazywana G-kwadrupleksem [34–36]. G-kwadrupleksy formuje wiele promotorów protoonkogenów. Regiony bogate w guaninę i tworzące tetrapleksy zostały znalezione m.in. w promotorach następujących protoonkogenów: c-MYC, VEGF, RET, KRAS, Bcl-2 c-KIT, PDGF-A, HIF-1 α . Stabilizacja tetrapleksowej formy protoonkogeny hamuje jego ekspresję [34, 37–43].

G-kwadrupleksy mogą występować także w jednoniciowym odcinku ludzkiego telomerowego DNA, który składa się z powtórzeń sekwencji d(TTAGGG) [44–47]. Stabilizacja czteroniciowej struktury telomerowego DNA inhibuje działanie telomerazy, enzymu aktywnego głównie w komórkach nowotworowych, który pracuje na jednoniciowym odcinku telomerowego DNA [48, 49].



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie stabilizacji struktury G-kwadrupleksu przez cząsteczki liganda. Stabilizacja zachodzi w wyniku tzw. oddziaływań typu „*end-stacking*”. Jedna lub dwie cząsteczki liganda ulegają asocjacji na powierzchni zewnętrznych kwartetów guaninowych w kwadrupleksie (on the right) and with two ligand molecules (on the left). Ligand molecule stacks externally on the terminal G-tetrads causing stabilization of the G-quadruplex DNA structure

Stabilizacja czteroniciowej konformacji DNA może odbywać się w wyniku związania organicznych związków o małej masie cząsteczkowej (za pomocą ligandów). Ponieważ interkalacja cząsteczki liganda do cząsteczki tetrapleksu jest z reguły niekorzystna energetycznie, najczęstszym oddziaływaniem, jakie występuje w kompleksie ligand/G-kwadrupleks, jest terminalna asocjacja warstwowa (*ang. end-stacking* lub *π - π stacking interactions*). Terminalna asocjacja warstwowa polega na oddziaływaniu pomiędzy płaszczyzną zewnętrznego kwartetu guaninowego czteroniciowego DNA a cząsteczką liganda (Rys. 3). Wyżej wymienione przykłady występowania G-kwadrupleksów w genomie udowadniają, że bardzo ważne jest badanie selektywnego powinowactwa ligandów do czteroniciowych struktur DNA.

Jak już wcześniej wspomniano, selektywność oddziaływań ligand-DNA można badać za pomocą dializy równowagowej. Wówczas oligonukleotydy tworzące struktury tetrapleksowe zestawia się w eksperymencie dializy z innymi formami strukturalnymi DNA, sprawdzając selektywność wiązania do badanych próbek DNA. Sekwencje oligonukleotydów najczęściej wykorzystywanych w eksperymencie dializy równowagowej przedstawiono w Tabeli 1. Wśród wymienionych struktur są formy czteroniciowe o sekwencji promotora protoonkogeny c-MYC (Tab. 1, sekwencja Nr 10), czy też telomerowego odcinka DNA (Tab. 1, sekwencja Nr 11). Jeżeli badany

ligand wykaże w eksperymencie dializy równowagowej selektywne powinowactwo do czteroniciowych struktur stanowiących cel terapii genowej, można wnioskować o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej takiego związku.

Tabela 1. Przykłady kwasów nukleinowych najczęściej wykorzystywanych w eksperymencie dializy równowagowej

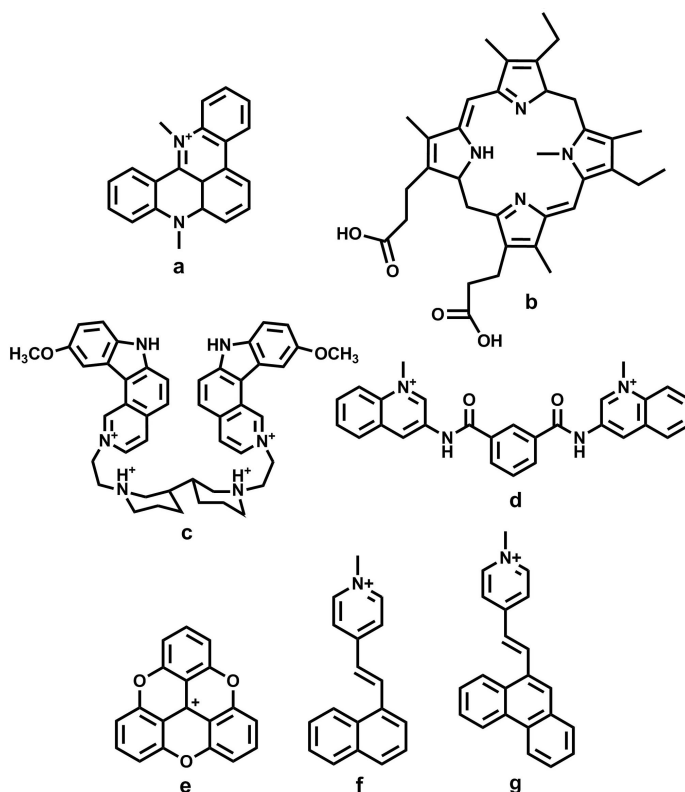
Table 1. Examples of nucleic acids used in equilibrium dialysis experiment

Forma strukturalna	Numer	Polinukleotyd lub oligonukleotyd	Podstawowy element strukturalny
jednoniciowa	1	Poli[dA]	zasada azotowa
	2	Poli[dT]	
dwuniciowa	3	Poli[dA]*Poli[dT]	para zasad
	4	Poli[dG]*Poli[dC]	
	5	Poli[dA-dT]*Poli[dA-dT]	
	6	Poli[dG-dC]*Poli[dG-dC]	
	7	5'-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-3'	
trójniciowa	8	T—T-CTTCTCTCCTCC-3' 5'- GAAAGAGAGGAGG-3' C—CTTCTCTCCTCC-5'	tryplet zasad
	9	Poli[dT]*Poli[dA]*Poli[dT]	
czteroniciowa	10	5'-AGGGTGGGGAGGGTGGGG-3'	kwartet zasad
	11	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	
	12	5'-TTGGGGGGGGGGGGGGGGGGTT-3'	

3.2. LIGANDY STABILIZUJĄCE CZTERONICIOWE STRUKTURY DNA

W wielu ośrodkach naukowych na świecie trwają intensywne badania mające na celu projektowanie i syntezywanie nowych związków chemicznych stabilizujących struktury kwasów nukleinowych, w szczególności G-kwadrupeksy. Powszechnie wiadomo, że selektywność powinowactwa liganda do DNA zależy od wielu parametrów i jest głównie pochodną czynników strukturalnych, a nawet niewielkie różnice w budowie prostych ligandów organicznych zdolnych do tworzenia kompleksów z DNA, mogą w zasadniczym stopniu wpływać na trwałość tych połączeń. Potencjalne chemioterapeutyki powinny zatem posiadać strukturalne powinowactwo wiązania do DNA, które jest głównie rezultatem obecności płaskich pierścieni aromatycznych oraz kationowego ugrupowania heteroaromatycznego.

Pomocnym narzędziem w projektowaniu związków mogących stabilizować czteroniciowe struktury DNA jest modelowanie molekularne [50–53]. Różnorodność topologiczna kwadrupleksów zależy od ilości nici budujących strukturę (kwadrupleksy: mono-, bi-, tetra-molekularne) oraz od ułożenia pętli łączących guaniny z kwartetu. Poznanie dokładnego ułożenia pętli możliwe jest głównie dzięki pomiarom jądrowego rezonansu magnetycznego oraz metodom krystalograficznym. Informacje o strukturze wykorzystywane są w metodach symulacyjnych stosowanych w modelowaniu molekularnym. Ilość efektów, jakie mogą wpływać na stereochemię i preferencje projektowanych i syntezowanych ligandów powoduje, że konieczna jest eksperymentalna weryfikacja wyników symulacji komputerowych. Możliwość weryfikacji oraz selekcji teoretycznie przewidywanych połączeń ligand–DNA daje właśnie metoda dializy równowagowej.



Rysunek 4. Ligandy wykazujące właściwości stabilizacji G-kwadrupleksów oraz inhibicję telomerazy: (a) pochodna akrydynowa, (b) pochodna N-metylomezoporfirynowa, (c) pochodna karbazolowa, (d) pochodna chinoliniowa, (e), pochodna trioksatriangulenowa, (f) pochodna naftalenowa, (g) pochodna fenantrenowa.

Figure 4. Compounds with G-quadruplexes' stabilization properties and inhibition of telomerase activity: (a) acridine derivative, (b) N-methylmesoporphyrin derivative, (c) 7H-pyridocarbazole dimer, (d) quinolinium derivative, (e) trioxatriangulenium cation, (f) naphthalene derivative, (g) phenanthrene derivative

W literaturze przedmiotu jest wiele doniesień dotyczących eksperymentów dializy równowagowej, które umożliwiły wskazanie ligandów najsilniej wiążących cząsteczki badanych oligonukleotydów. Aktywne ligandy przebadane za pomocą dializy to między innymi pochodne: akrydynowe, porfiryne, chinoliniowe, karbazolowe i inne [54–56] (Rys. 4).

W strukturach pochodnych akrydynowych występują trzy lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych. Zwiększająca się liczba pierścieni z reguły procentuje wzrostem powinowactwa do DNA formującego wyższe struktury przestrzenne. Trójpierścieniowe związki należące do tej grupy wykazują selektywność w stosunku do wybranych struktur dwuniciowych, selektywność ta zależy od sekwencji zasad azotowych w strukturze dupleksu, jak również od budowy łańcucha bocznego liganda [57, 58]. Natomiast akrydynowe pochodne o zwiększonej liczbie skondensowanych pierścieni aromatycznych (Rys. 4(a)) silniej oddziałują z G-kwartetami czteroniciowego DNA. W konsekwencji, związki pięciopierścieniowe wykazują często większe powinowactwo do tetrapleksowych struktur niż do dsDNA, preferencyjnie wiążąc się z oligonukleotydami o sekwencji telomerowego DNA [59–61]. Natomiast akrydynowa pochodna makrocykliczna zawierająca dziesięć pierścieni (pięciopierścieniowy dimer), chociaż oddziałuje z wewnątrzcząsteczkowym kwadruplexem telomerowego DNA, to silniejsze powinowactwo wykazuje w stosunku do struktury tetra molekularnej G-kwadrupleksu [62, 63].

Silne wiązanie z czteroniciowymi strukturami wykazuje także N-metylomezoporfirynowa pochodna (Rys. 4(b)). Związek ten został przebadany względem czterdziestu sześciu próbek kwasów nukleinowych, wśród których najsilniej wiąże G-kwadrupleksy, wykazując wyraźną selektywność do tych struktur [21]. Eksperymenty dializy z wykorzystaniem pochodnych karbazolowych (Rys. 4(c)) również wskazują na powinowactwo tych związków do wyższych struktur przestrzennych DNA [64, 65].

Wśród ligandów preferowanych przez kwasy nukleinowe o wyższych formach strukturalnych są też pochodne chinoliny. Eksperymenty dializy dla dikarboksyamidu 2,6-N,N'-dimetylocholinio-3-yl-pirydyny (Rys. 4(d)) wykazały, że związek ten silnie wiąże się z tetrapleksami [19]. Powinowactwo do struktur czteroniciowych wykazuje również inny związek chinoliny, pochodna benzoindolochinolinowa [66], natomiast pochodna 2-(2-naftylo)chinolinowa najsilniej oddziałuje z trypleksem bogatym w adeninę i tyminę, (poli[dA])*(poli[dT])₂, wykazując selektywność do tej struktury [67].

Interesujące wyniki z pomiarów dializacyjnych otrzymano dla organicznego kationu, który w swojej budowie posiada sześć skondensowanych pierścieni aromatycznych (Rys. 4(e)). Mimo rozbudowanej struktury, ligand ten wykazuje największe powinowactwo do dwuniciowej helisy, a jego preferencyjną interkalację do dupleksów potwierdziły także inne metody pomiarowe [68]. Jest to dowód na to, że potencjalnie zwiększona powierzchnia oddziaływań, uzyskana w wyniku zwiększenia liczby pierścieni, jest tylko jednym z wielu czynników wpływających na oddziaływanie pomiędzy ligandem a czteroniciowym DNA.

Interesującą grupą ligandów, potencjalnie aktywnych w inhibicji telomerazy, są pochodne zawierające w swojej budowie grupy policykliczne i wiązanie podwójne ulegające fotoizomeryzacji. Wstępne badania z zastosowaniem dializy równowagowej wykazały, że pochodna *trans*-naftalenowa (Rys. 4(f)) oddziałuje z kwasami nukleinowymi selektywniej niż pochodna *trans*-fenantrenowa (Rys. 4(g)) [69]. Oddziaływania pomiędzy przebadanymi G-kwadrupeksami a w/w pochodnymi są na tyle silne, że obydwa związki można zakwalifikować do grupy potencjalnych chemioterapeutyków. Parametrem mogącym wpływać na powinowactwo wiązania do DNA jest fotoizomeryzacja liganda. Czynnikiem ten można wykorzystać do manipulowania selektywnością wiązania do DNA.

Z przedstawionych przykładów wynika, że dializa jest metodą uniwersalną, za pomocą której można badać oddziaływania pomiędzy ligandami będącymi różnymi pochodnymi a kwasami nukleinowymi o wszystkich formach strukturalnych.

PODSUMOWANIE

Metoda dializy równowagowej stwarza możliwość badania oddziaływań liganda z kilkudziesięcioma biopolimerami jednocześnie, co sprawia, że czas badania dużej liczby kompleksów DNA/ligand zredukowany jest do minimum. Poza tym, jeden eksperyment dostarcza informacji na temat relatywnej siły wiązania ligand–biopolimer dla każdego utworzonego kompleksu, a nawet pozwala oszacować stałą trwałości kompleksu. W eksperymencie bada się zatem selektywność oddziaływań ligand–biopolimer. Zaletą metody jest też fakt, że eksperyment dializacyjny nie jest skomplikowany i opiera się głównie na umiejętności obsługiwanego zestawu do dializy a do analizy próbek po dializie (wyznaczanie stężenia liganda) można użyć ogólnie dostępnych metod spektroskopowych. Dializa równowagowa jest metodą wszechstronną. Może być stosowana do badania dużego wachlarza próbek kwasów nukleinowych względem różnorodnych ligandów.

W przyszłości, eksperymentalna część dializy ewoluować będzie z pewnością w stronę zwiększenia powierzchni membrany dializacyjnej, co w konsekwencji skróci czas zachodzenia dyfuzji. Poza tym, najprawdopodobniej postępować będzie automatyzacja, co pozwoli na dalsze zwiększenie liczby badanych próbek DNA i umożliwi ilościową interpretację wyników dializy.

Głównie dzięki swojej szybkości i łatwości eksperymentalnej dializa jest bardzo przydatnym narzędziem w szukaniu potencjalnych leków antynowotworowych, tak bardzo pożądanym w dzisiejszych czasach.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana częściowo w ramach Grantu MNiSzW nr N204 004 32/0254.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V.A. Gault and N.H. McClenaghan Eds, *Understanding Bioanalytical Chemistry*, Wiley, 2009.
- [2] Y. Gu, G. Wang, J. Sun, Y. Jia, M. Xu, W. Wang, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, **29**, 951.
- [3] N.J. Waters, R. Jones, G. Williams, B. Sohal, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 4586.
- [4] D. Sheehan, *Physical Biochemistry: Principles and Applications*, Wiley, 2000.
- [5] B. Juskowiak, E. Gałęzowska, S. Takenaka, *Spectrochim. Acta Part A*, 2003, **59**, 1083.
- [6] B. Juskowiak, E. Gałęzowska, N. Koczorowska, T.W. Hermann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 3627.
- [7] L. Madry, E. Gałęzowska, A. Głuszyńska, T.W. Hermann, M. Zabel, B. Juskowiak, *Polish J. Chem.*, 2006, **80**, 921.
- [8] A. Tarushi, G. Psomas, C. P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 898.
- [9] B. Juskowiak, M. Chudak, S. Takenaka, *Int. J. Mass. Spectrom.*, 2003, **229**, 225.
- [10] B. Chu, G. Yuan, J. Zhou, Y. Ou, P. Zhu, *Drug. Dev. Res.*, 2008, **69**, 235.
- [11] M. Gay, A.M. Montana, V. Moreno, M.-J. Prieto, R. Llorens, L. Ferrer, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 2387.
- [12] K. Triantafillidi, K. Karidi, J. Malina, A. Garoufis, *Dalton Trans.*, 2009, **32**, 6403.
- [13] M. del Toro, R. Gargallo, R. Eritja, J. Jaumot, *Anal. Biochem.*, 2008, **379**, 8.
- [14] M.J. Waring, J.B. Chaires, *DNA Binders and Related Subjects*, Springer-Verlag New York, LLC Publisher, 2005.
- [15] W. Muller, D.M. Crothers, M.J. Waring, *Eur. J. Biochem.*, 1973, **39**, 223.
- [16] M. McClellan Becker, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 3664.
- [17] J. Ren, J.B. Chaires, *Biochemistry*, 1999, **38**, 16067.
- [18] F. Rosu, E. De Pauw, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochemistry*, 2003, **42**, 10361.
- [19] C. Granotier, G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L.R. Gauthier, A. De Cian, D. Gomez, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux, F.D. Boussin, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 4182.
- [20] P.A. Ragazzon, N.C. Garbett, J.B. Chaires, *Methods*, 2007, **42**, 173.
- [21] P. Ragazzon, J.B. Chaires, *Methods*, 2007, **43**, 313.
- [22] Product Catalog [online] Thermo Fisher Scientific – Pierce Protein Research Products 2009 [dostęp 22-12-2009]. Dostępny w internecie <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=8C6CA217-75C3-4019-AE9C-D48FF4C00EC6>.
- [23] J. Markovits, B. Gaugain, J. Barbet, B.P. Rogues, J.B. Le Pecq, *Biochemistry*, 1981, **20**, 3042.
- [24] K.C. Bible, R.H. Bible, Jr., T.J. Kottke, P.A. Svingen, K. Xu, Y.-P. Pang, E. Hajdu, S.H. Kaufmann, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 2419.
- [25] M.-J. Fernandez, B. Wilson, M. Palacios, M.-M. Rodrigo, K.B. Grant, A. Lorente, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 121.
- [26] J. Hooda, D. Bednarski, L. Irish, S.M. Firestine, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **1**, 1902.
- [27] X. Shi, J.B. Chaires, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 1.

- [28] H. Xu, Y. Liang, P. Zhang, F. Du, B.-R. Zhou, J. Wu, J.-H. Liu, Z.-G. Liu, L.-N. Ji, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, **10**, 529.
- [29] C.-W. Jiang, *Inorg. Chim. Acta*, 2005, **358**, 1231.
- [30] C.B. Spillane, J.A. Smith, J.L. Morgan, F.R. Keene, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 819.
- [31] G.M. Blackburn, M.J. Gait, D. Loakes and D.M. Williams Eds, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, RSC Publishing, Cambridge 2006.
- [32] M. Faria, C. Giovannangeli, *J. Gene Med.*, 2001, **3**, 299.
- [33] P. Simon, F. Cannata, J.-P. Concordet, C. Giovannangeli, *Biochimie*, 2008, **90**, 1109.
- [34] J. Seenisamy, S. Bashyam, V. Gokhale, H. Vankayalapati, D. Sun, A. Siddiqui-Jain, N. Streiner, K. Shin-ya, E. White, W.D. Wilson, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2944.
- [35] S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5402.
- [36] T.-M. Ou, Y.-J. Lu, J.-H. Tan, Z.-S. Huang, K.-Y. Wong, L.-Q. Gu, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 690.
- [37] S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny, *Cell & Chromosome*, 2004, **3**, 1.
- [38] S. Rankin, A.P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G.N. Parkinson, A.K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10584.
- [39] D. Sun, K. Guo, J.J. Rusche, L.H. Hurley, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 6070.
- [40] J. Dai, T.S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R.A. Jones, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 1096.
- [41] D. Yang, L.H. Hurley, *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, 2006, **25**, 951.
- [42] J. Eddy, N. Maizels, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 3887.
- [43] Y. Qin, L.H. Hurley, *Biochimie*, 2008, **90**, 1149.
- [44] A.T. Phan, K.N. Luu, D.J. Patel, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5715.
- [45] K.N. Luu, A.T. Phan, V. Kuryavyyi, L. Lacroix, D.J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9963.
- [46] S. Haider, G.N. Parkinson, S. Neidle, *Biophys. Journal*, 2008, **95**, 296.
- [47] J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie*, 2008, **90**, 1172.
- [48] F. Lavelle, J.-F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, *Crit. Rev. Oncol. Hem.*, 2000, **34**, 111.
- [49] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, *Nature* 1991, **350**, 718.
- [50] M.A. Read, S. Neidle, *Biochemistry*, 2000, **39**, 13422.
- [51] Y. Ma, T.-M. Ou, J.-Q. Hou, Y.-J. Lu, J.-H. Tan, L.-Q. Gu, Z.-S. Huang, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 7582.
- [52] V.P. Zambre, P.R. Murumkar, R. Giridhar, M.R. Yadav, *J. Chem. Inf. Model.* 2009, **49**, 1298.
- [53] S.M. Haider, S. Neidle, *Biochem. Soc. Trans.*, 2009, **37**, 583.
- [54] S. Neidle, G. Parkinson, *Drug Discov.*, 2002, **1**, 383
- [55] A.D. Moorhouse, S. Haider, M. Gunaratnam, D. Munnur, S. Neidle, J.E. Moses, *Mol. BioSyst.*, 2008, **4**, 629.
- [56] M. Franceschin, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 2225.
- [57] B.G. Siim, K.O. Hicks, S.M. Pullen, P.L. van Zijl, W.A. Denny, W.R. Wilson, *Biochem. Pharm.*, 2000, **60**, 969.
- [58] M.J. Fernandez, B. Wilson, M. Palacios, M.-M. Rodrigo, K.B. Grant, A. Lorente, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 121.
- [59] R.A. Heald, C. Modi, J.C. Cookson, I. Hutchinson, C.A. Laughton, S.M. Gowan, L.R. Kelland, M.F.G. Stevens, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 590.
- [60] H. Baruah, U. Bierbach, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 4138.
- [61] M.-K. Cheng, C. Modi, J.C. Cookson, I. Hutchinson, R.A. Heald, A.J. McCarroll, S. Missailidis, F. Tanious, W.D. Wilson, J.-L. Mergny, C.A. Laughton, M.F.G. Stevens, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 963.
- [62] M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, J.-L. Mergny, P. Alberti, C. Carrasco, C. Bailly, J.-M. Lehn, W.D. Wilson, *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*, 2003, **22**, 1483.

- [63] M.-P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.-L. Mergny, A. David, J.-M. Lehn, W.D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4732.
- [64] J. Ren, C. Bailly, J.B. Chaires, *FEBS Letters*, 2000, **470**, 355.
- [65] C. Carrasco, F. Rosu, V. Gabelica, C. Houssier, E. De Pauw, C. Garbay-Jaureguiberry, B. Roques, W.D. Wilson, J.B. Chaires, M.J. Waring, C. Bailly, *ChemBioChem*, 2002, **3**, 1235.
- [66] P. Alberti, P. Schmitt, C.-H. Nguyen, C. Rivalle, M. Hoarau, D.S. Grierson, J.-L. Mergny, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 1071.
- [67] J.B. Chaires, J. Ren, M. Henary, O. Zegrocka, G.R. Bishop, L. Strekowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7272.
- [68] J. Reynisson, G.B. Schuster, S.B. Howerton, L.D. Williams, R.N. Barnett, C.L. Cleveland, U. Landman, N. Harrit, J.B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2072.
- [69] I. Czerwińska, B. Juskowiak, *Polish J. Chem.*, 2009, **83**, 1227.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 grudnia 2009

**MODELOWANIE MATEMATYCZNE
I BADANIA FIZYKOCHEMICZNE
RÓWNOWAG KWASOWO-ZASADOWYCH
W UKŁADACH BINARNYCH
ROZPUSZCZALNIKÓW**

MATHEMATICAL MODELLING
AND PHYSICOCHEMICAL STUDIES
ON ACID-BASE EQUILIBRIA IN BINARY-SOLVENT
SYSTEMS

**Tadeusz Michałowski^{1*}, Bogusław Pilarski²,
Agnieszka Dobkowska², Janusz Młodzianowski²**

¹ *Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska,
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków,*

² *P.P.H.U. Cerko s.c.*

ul. Afrodyty 9, 80-299 Gdańsk

**e-mail: michalot@o2.pl*

Abstract

Wstęp

1. Przegląd metod wyznaczania pK
2. Charakterystyka układów
3. Funkcje $x = x(V)$
4. Formułowanie funkcji typu Hendersona-Hasselbalcha - przykłady
 - 4.1. Wyznaczanie pK_i dla kwasów triprotonowych
 - 4.2. Wyznaczanie pK_i dla kwasów diprotonowych
5. Modelowanie funkcji $pK_i = pK_i(x)$
6. Wyznaczanie przewodności molowych
7. Wyniki doświadczalne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Tadeusz Michałowski – chemik, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej



Dr farm. Bogusław Pilarski – prezes Firmy „Cerko”, Gdańsk



Mgr inż. Agnieszka Dobkowska – technolog w Firmie „Cerko”



Dr inż. Janusz Młodzianowski – fizyk, Wydział Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Gdańskiego, pracownik Firmy „Cerko”

ABSTRACT

Conductometric titration (CT) is used as a complementary, non-specific technique against potentiometric (pH) titration (PT). The CT + PT procedure is applied to binary-solvent systems: $H_mL + Z/A + B$ (or $H_mL + Z/W + B$) formed of a weak acid H_mL and a pH-modifying agent Z (e.g. NaOH, NH_3 or HCl), and totally miscible organic solvents A and B (or $W = H_2O$ and B) chosen as co-solvents, where acid-base equilibria are considered. The solvent composition in such systems is expressed by the mole fraction x of B . Concentrations of solutes: H_mL and Z are the same in the solution titrated (titrand, D) and in titrant (T) and changes in pH value resulted only from differences in acid-base properties of solvents applied in D and T . On the basis of results obtained from PT and CT, the functional relationships related to the solutions of weak acids H_mL ($m = 1, 2, \dots$) were formulated, namely: (1) $pK_1 = pK_1(x)$ for acidity parameters; (2) $\Lambda_p = \Lambda_p(x)$ for molar conductivities, related to the species formed by di- and triprotic acids. For this purpose, the Kohlrausch law on the independence of migrating ions has been applied. The $pK_1 = pK_1(x)$ relationships were formulated for diprotic and triprotic acids on the basis of Henderson–Hasselbalch functions and modeled with use of polynomial functions. The $pK_1(1)$ and $\Lambda_p(1)$ values were obtained by extrapolation. The approach suggested is the essential novelty in contemporary literature related to the subject in question. This way, the paper provides a new methodology, a new dimension (x -scale) to the problems known hitherto.

In the experimental part, the $pK_1 = pK_1(x)$ relationships were formulated for results of mutual pH titrations: $H_mL/B - H_mL/W$ or $H_mL/B - H_mL/A$, obtained for the systems not involving Z . The systems were modeled with the use of Redlich–Kister (R–K) and orthogonal (normal, shifted) Legendre polynomials. Asymmetric functions by Myers–Scott (M–S) and by Michałowski were also suggested for this purpose. It was stated that all approximating functions fit the experimental data very well. The asymmetric functions are applicable for modeling of more bended relationships $pK_1 = pK_1(x)$, particularly when referred to the limiting x -values in the interval $< 0, 1 >$. A software that enables to formulate the relationships $pK_1 = pK_1(x)$ according to different approximating functions after introducing the experimental data $\{(V_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$ obtained from PT, was also prepared, together with statistical evaluation of $pK_1(0)$ and $pK_1(1)$ values, obtained by extrapolation. The results thus obtained are presented in tables and figures.

Some criteria of validity of the results obtained according to PT for $pK_1(0)$ and $pK_1(1)$ are also presented. The first criterion testifying about reversibility of indications of the measuring system is a position of the point of intersection of the plots obtained in the mutual titrations. The second criterion stems from comparison of results obtained from three pH titrations: (1) $H_mL/B \leftrightarrow H_mL/W$, (2) $H_mL/B \leftrightarrow H_mL/A$ and (3) $H_mL/A \leftrightarrow H_mL/W$. The convergence of the related plots at $x = 0$ and $x = 1$, where $x = x_B$ in (1) and (2) and $x = x_A$ in (3) testifies on account of the calibration procedure applied for glass electrode.

Keywords: binary-solvent systems, pH titration, conductometric titration, acidity parameters, molar conductivity, curve-fitting

Słowa kluczowe: układy binarne rozpuszczalników, miareczkowanie pH-metryczne, miareczkowanie konduktometryczne, parametry kwasowości, przewodność molowa, dopasowywanie krzywych

WSTĘP

Znajomość parametrów fizykochemicznych, dotyczących dysocjacji, współczynnika aktywności jonów wodorowych i przewodnictwa składników w roztworach elektrolitów, w których przebiegają reakcje kwasowo-zasadowe, jest ważna tak z poznawczego, jak i z analitycznego punktu widzenia [1].

Dysocjację kwasów H_mL ($m = 1, 2, \dots$) w roztworach określają ich wartości $pK_i = -\log K_i$. Obecność protonodonorowych grup funkcyjnych decyduje o aktywności biologicznej i farmakologicznej badanych molekuł. I tak, przezłonowy transport leków zależy od wartości pK_i badanego leku oraz pH środowiska [2, 3]. Tak więc wartości pK_i mają kluczowe znaczenie w zrozumieniu aktywności biologicznej. Znajomość wartości pK_i pomaga w wyjaśnianiu reaktywności i szybkości reakcji chemicznych, aktywności enzymów, równowag tautomerycznych, a także w opisie metod rozdzielania [4, 5]. Wartości pK_i decydują o absorpcji, podziale międzyfazowym, metabolizmie i wydalaniu leków [6]. Zależność funkcyjna między pK_i i strukturą cząsteczek jest użyteczna w racjonalnym badaniu leków oraz w ocenie biologicznych i farmaceutycznych właściwości molekuł. W chemii środowiskowej i geologii, wartości pK_i decydują o rozpuszczalności/lipofilności związków, a zatem o ich dystrybucji w środowisku naturalnym.

Od dysocjacji kwasów oraz pH roztworów w układach binarnych rozpuszczalników zależy stopień rozdzielenia analitów technikami chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz [7–10], chromatografii jonowej [11, 12], czy strefowej elektroforezy kapilarnej [13, 14]. Wartości pH i pK_i kwasów wpływają także na kształt widm UV-VIS i 1H NMR tych kwasów. Odpowiednie efekty są uśrednionymi wartościami takich wielkości jak absorbancja (A) [15–18], przesunięcie chemiczne (δ) [19, 20], czas retencji (t_R) lub zredukowany czas retencji (t'_R) [21–24], jak również efektywna ruchliwość (μ_e) [25, 26], wyrażone wzorem

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^q x_i \cdot 10^{\log K_i^H - i \cdot \text{pH}}}{1 + \sum_{i=1}^q 10^{\log K_i^H - i \cdot \text{pH}}} \quad (1)$$

$\bar{x} = A, \delta, t_R, t'_R, \mu_e$; $q \leq m$, oraz $K_{q+1-k} = \frac{[H^+][H_{k-1}L^{+k-1-n}]}{[H_kL^{+k-n}]}$

Dane literaturowe dotyczące pK_i kwasów odnoszą się głównie do roztworów wodnych, rzadziej roztworów w rozpuszczalnikach organicznych lub wodno-organicznych. Z kolei wiedza dotycząca zmian pK , wynikających ze zmiany składu w układach binarnych rozpuszczalników, jest niewielka, a przy tym często niepewna/błędna. Dlatego ważnym zagadnieniem jest opracowanie relatywnie prostej i dostępnej w każdym laboratorium metodologii badania i matematycznego modelowania układów elektrolitycznych z rozpuszczalnikami binarnymi.

W niniejszym opracowaniu sformułowano zależności parametrów kwasowości $pK_i = pK_i(x)$ dla kolejnych stopni dysocjacji słabego kwasu H_mL (1°) od ułamka molowego x składnika B w mieszaninie rozpuszczalników A + B lub W + B, lub (2°)

od ułamka molowego A w mieszaninie W + A, gdzie: W = H₂O, A, B – rozpuszczalniki organiczne. Zależności te otrzymano z wyników miareczkowania pH-metrycznego w układzie D + T utworzonym z titranda (roztworu miareczkowanego, D) i titranta (roztworu miareczkującego T) (Tab. 1). Początkowe wartości pH roztworów H_mL w D i T ustalano dodatkiem zasady (NaOH, KOH, NH₃) lub kwasu (HCl) jako modyfikatora pH. Skład i stężenia H_mL oraz modyfikatora w D i T są jednakowe, a zmiany pH w trakcie miareczkowania wynikają tylko z różnicy właściwości kwasowo-zasadowych rozpuszczalników użytych do sporządzania D i T. Zależności $pK_i = pK_i(x)$ modelowano przy użyciu różnych funkcji, co pozwoliło obliczyć wartości $pK_i(0)$ i $pK_i(1)$ w roztworach H_mL zawierających pojedynczy rozpuszczalnik: W lub A i B. Rozszerzenie tej metody pozwoliło na wprowadzenie wewnętrznego kryterium walidacyjnego dla wartości $pK_i(0)$ i $pK_i(1)$, opartego na użyciu par D + T utworzonych z rozpuszczalników W, A i B. Przedstawiono też algorytmy, mające na celu wyznaczanie zależności $A_i = A_i(x)$ dla przewodnictw molowych jonów utworzonych przez H_mL w układach binarnych rozpuszczalników A + B lub W + B przy użyciu technik miareczkowania konduktometrycznego i pH-metrycznego.

Tabela 1. Skład titranda (D) i titranta (T) tworzących układ D + T; stężenie H_mL w D i T wynosi C mol/l (układy 1–5), stężenie modyfikatora pH (Z) w D i T wynosi C_{bi} mol/l (układy 4, 5)

Table 1. The composition of titrand (D) and titrant (T) forming the D+T system; concentration of H_mL in D and T equals C mol/l (systems 1–5), concentration of pH-modifier (Z) in D and T equals C_{bi} mol/l (systems 4, 5)

Układ nr System no.		D (V ₀)	T (V)	Wzór Formuła
1	a	H _m L/W	H _m L/B	8b
	b	H _m L/B	H _m L/W	10b
2	a	H _m L/A	H _m L/B	8a
	b	H _m L/B	H _m L/A	10a
3	a	H _m L/W	H _m L/w + B	8c
	b	H _m L/w + B	H _m L/W	10c
4	a	H _m L + Z/W	H _m L + Z/w + B	8c
	b	H _m L + Z/w+B	H _m L + Z/W	10c
5	a	H _m L + Z/w+A	H _m L + Z/w + B	8
	b	H _m L + Z/w+B	H _m L + Z/w + A	10

W przyjętych modelach zakłada się, że układy D + T są homogeniczne w całym zakresie zmienności ułamka molowego x składnika B w mieszaninie, co oznacza nieograniczoną rozpuszczalność wzajemną składników tworzących dany układ binarnych rozpuszczalników i całkowitą rozpuszczalność soli jako produktów reakcji.

1. PRZEGLĄD METOD WYZNACZANIA PK

Metoda miareczkowania pH-metrycznego jest najczęstszą, referencyjną [27–30] metodą wyznaczania pK_1 kwasów w zakresie wartości od 2 do 12. Dla kwasów absorbujących promieniowanie w zakresie UV-VIS, stosuje się również łączone techniki miareczkowania pH-metrycznego i spektrofotometrycznego [31–33]. Dla składników barwnych stosuje się także funkcję kwasowości Hammetta [34, 35].

Podczas miareczkowania techniką pH ^1H NMR bada się zależność przesunięcia chemicznego δ od pH [36, 37]. Technika ta jest szczególnie przydatna do wyznaczania pK w zakresie 0–2 [38], gdzie metoda miareczkowania potencjometrycznego nie znajduje zastosowania ze względu na nieliniowość charakterystyki elektrody szklanej. Użycie ww. metod jest na ogół limitowane stężeniem analizowanego kwasu, bowiem dla zapewnienia wysokiej dokładności oznaczeń jest pożądane, by stężenie to było większe od 10^{-3} mol/l, najlepiej rzędu 10^{-2} mol/l, czyli by masa kwasu w pojedynczym miareczkowaniu stanowiła w przybliżeniu od 10^{-6} do 10^{-5} masy jednego mola użytego kwasu H_mL , co przy objętości roztworu miareczkowanego rzędu mililitrów i M_{HmL} rzędu 10^2 g/mol daje masę H_mL rzędu miligramów, a więc dużą w przypadkach, gdy dysponuje się niewielkimi ilościami składników rozdzielonych technikami chromatograficznymi. Możliwości te oferuje w szczególności strefowa elektroforeza kapilarna [39, 42], gdzie stosuje się objętości analizowanej próbki rzędu mikrolitrów lub mniejsze [39] oraz wykorzystuje zależność ich ruchliwości elektroforetycznej od pH roztworu w kolumnie kapilarnej [43, 44], co jest podstawą doświadczalnego wyznaczania pK_1 tą metodą [4, 43–48].

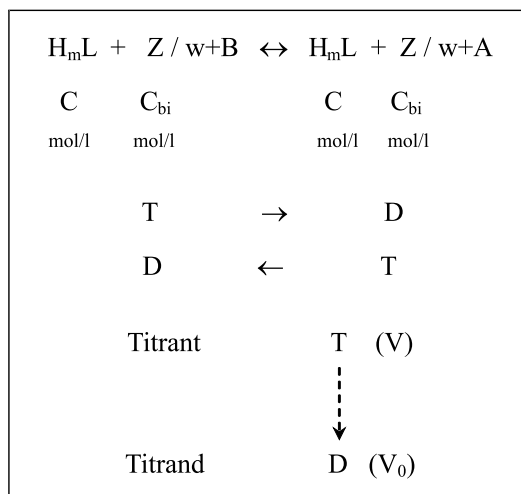
Wzór (1) jest także podstawą obliczeń wartości pK_1 wymienionymi wcześniej metodami. Wartości te muszą być zwalidowane przez porównanie z wartościami otrzymanymi metodą miareczkowania potencjometrycznego [27–29]. Metodą woltametrii cyklicznej [49] wyznacza się pK_1 dla kwasów monoprotonowych i poliprotonowych, charakteryzujących się znaczną wartością $\Delta pK = pK_2 - pK_1$; kwasy wieloprotonowe tego typu określa się jako pseudo-monoprotonowe.

Do oszacowania pK kwasów stosuje się także kwantowo-chemiczne metody obliczeniowe. Większość tych metod opiera się na addytywności parametrów związanych z entalpią swobodną (ang. *Linear Free Energy Relationship*, LFER) [50, 51], określanej jako postulat Hammetta–Tafta [50, 52–54]. W szczególności, model opracowany w ramach programu komputerowego (ang. *Scalable Processor Architecture*, SPARC) [55] zawiera algorytmy obliczeniowe dla pK_1 , oparte na strukturze związków, wynikające z LFER oraz rachunku zaburzeń dla orbitali molekularnych [56]. Wartości pK_1 są także skorelowane z parametrami solwatochromowymi Kamleta–Tafta [57].

Różne metody analizy w rozpuszczalnikach organicznych B dają wartości pK_1 niekiedy znacznie różniące się pomiędzy sobą. Spektakularnym przykładem jest tu kwas benzoesowy w acetonitrylu, dla którego znajdujemy w literaturze wartości pK_1 równe 21,51 [58, 59] i 6,5 [60].

2. CHARAKTERYSTYKA UKŁADÓW

Wyniki pomiarowe wyznaczania zależności $pK_i = pK_i(x)$ i $A_p = A_p(x)$ przedstawiane w niniejszej pracy uzyskuje się metodami miareczkowania pH-metrycznego i konduktometrycznego. W metodach tych, odpowiednie roztwory pełnią wzajemnie rolę titranda (D) lub titranta (T) (Rys. 1) o składzie przedstawionym w Tabeli 1.



Rysunek 1. Schemat wzajemnych miareczkowań w układach D + T; C_{bi} – stężenie modyfikatora pH w układzie dla i-tej pary roztworów zastosowanych do wyznaczania zależności $pK_i = pK_i(x)$ dla i-tego parametru kwasowości

Figure 1. Scheme of reciprocal titrations in the systems D + T; C_{bi} – concentration of pH-modifier in i-th D + T system applied for determination of $pK_i = pK_i(x)$ for i-th acidity parameter

Układy nr 1 i 2 (Tab. 1) dotyczą roztworów kwasu H_mL w czystych rozpuszczalnikach: W i B (układ nr 1) lub A i B (układ nr 2). Przy tym zakłada się, że kwas H_mL użyty przy sporządzaniu D i T nie jest hydratami, np. kwas ftalowy H_2L ($m = 2$). Układ nr 3 dotyczy m.in. przypadku kwasu cytrynowego $H_3L \cdot H_2O$ ($m = 3$); hydrat ten wprowadza wodę jako składnik mniejszościowy względem B, co zaznaczamy tu symbolem $w + B$; przy tym stężenie H_mL w D i T jest niewielkie, np. 0.01 mol/l. W tych warunkach, ilość H_2O wprowadzona do układu z $H_3L \cdot H_2O$ jest porównywalna z zawartością (ok. 0,05% w MeOH lub 0,1% w Me_2SO) domieszek (m.in. H_2O) wchodzących w skład odpowiednich rozpuszczalników A i B użytych do analizy, które również zaniedbujemy w rozważaniach. W układzie nr 4, zawartość $W = H_2O$ pochodząca z roztworu Z (modyfikator pH) jest znacznie większa niż w układzie nr 3. Układ nr 5 stanowi najogólniejszą (w tym kontekście) postać układu *quasi*-binarnego, w którym W jest składnikiem mniejszościowym, dla którego nie przewiduje się szerokich zmian wartości ułamka molowego; przyjmuje się więc, że $V_W \ll V_B$, $V_{0W} \ll V_{0A}$ oraz $V_{0W} \ll V_{0B}$, $V_W \ll V_A$. Założenia te nie mają miejsca w układach 1 i 3.

W układach nr 4 i nr 5, skład D i T jest zmodyfikowany obecnością zasady ($Z = \text{NaOH}$, KOH , NH_3) lub mocnego kwasu ($Z = \text{HCl}$). Obecność Z pozwala uzyskać warunki, w których jest możliwe wyznaczenie określonych parametrów układu. W szczególności, użycie $Z = \text{NH}_3$ zaleca się zwłaszcza tam, gdzie sole sodowe odpowiednich kwasów wytrącają się z roztworu A, B lub A + B, a sole amonowe odpowiednich kwasów są rozpuszczalne w warunkach analizy. Przy tym, $Z = \text{NH}_3$ można stosować jako modyfikator pH w zakresie kwaśnych i obojętnych roztworów wodnych, gdzie $[\text{NH}_3]/[\text{NH}_4^+] \ll 1$. Mocny kwas dodaje się jako modyfikator wówczas, gdy (a) zamiast H_mL stosuje się sól typu $\text{M}_k\text{H}_{m-k}\text{L} \cdot \omega\text{H}_2\text{O}$ lub/i (b) H_mL tworzy formy $\text{H}_i\text{L}^{+i-m}$ ($i = 0, 1, \dots, q; q > m$). Przy sporządzaniu D i T, modyfikator Z wprowadza się – z konieczności – w postaci roztworów wodnych. Ogólnie zaleca się zminimalizowanie ilości $\text{W} = \text{H}_2\text{O}$ w wyjściowych roztworach z A i B w D i T. Dlatego, przy sporządzaniu roztworów wyjściowych, H_mL wprowadza się do rozpuszczalnika organicznego jako ciało stałe, a nie jako roztwór wodny, a modyfikator Z wprowadza się w postaci roztworu wodnego o stężeniu wynoszącym około 1 mol/l.

Wyznaczone doświadczalnie funkcje $\text{pK}_i = \text{pK}_i(x)$ są m.in. podstawą obliczania $\text{pK}_i(0)$ i $\text{pK}_i(1)$ dla parametrów kwasowości $\text{pK}_i(x)$ kwasów organicznych H_mL w czystych rozpuszczalnikach, tworzących układ binarnych rozpuszczalników [61, 62]. Warunkiem otrzymania tych zależności w całym zakresie zmienności x jest całkowita wzajemna rozpuszczalność A, B i W.

3. FUNKCJE $x = x(V)$

Rozważając układ nr 5 a (Tab. 1),

- $\text{H}_m\text{L} (C) + Z (C_{bi}) / W + A$ (jako D, objętość V_0 ml)
- $\text{H}_m\text{L} (C) + Z (C_{bi}) / W + B$ (jako T, objętość V ml),

oraz stosując oznaczenia: Z – zasada (jako modyfikator pH), $X = A, B, W$, w (rozpuszczalniki organiczne i woda), n_x – liczba moli wyrażona w milimolach, ρ_x – gęstość wyrażona w g/ml, M_x – masa molowa wyrażona w g/mol, V_{0X} i V_X – objętości substancji X zawarta w D i T wyrażona w mililitrach; możemy sformułować zależności:

$$x = x_B = \frac{n_B}{n_B + n_A + n_W} \quad (2)$$

$$\chi_{AB} = \frac{\rho_A \cdot M_B}{\rho_B \cdot M_A} \quad (3)$$

$$\chi_{WB} = \frac{\rho_W \cdot M_B}{\rho_B \cdot M_W} \quad (4)$$

$$V_{0A} + V_{0W} = V_0, V_B + V_W = V, V_A + V_W = V, V_{0B} + V_{0W} = V_0, \quad (5)$$

$$r_{AB} = V_A/V_B = V_{0A}/V_{0B}, r_{WA} = V_W/V_A = V_{0W}/V_{0A}. \quad (6)$$

Zależności (5) wyrażają upraszczające założenie addytywności objętości odpowiednich składników tworzących D i T. Dla ww. miareczkowania (5a w Tab. 1) otrzymujemy kolejno:

$$\frac{1}{x} = 1 + \chi_{AB} \cdot \frac{V_{0A}}{V_B} + \chi_{WB} \cdot \frac{V_{0W} + V_W}{V_B} \quad (7)$$

$$x = \frac{(1 + r_{WA}) \cdot V}{(1 + r_{WA}) \cdot (1 + \chi_{WB} \cdot r_{WB}) \cdot V + (1 + r_{WB}) \cdot (\chi_{AB} + \chi_{WB} \cdot r_{WA}) \cdot V_0} \quad (8)$$

Dla odwrotnego miareczkowania (patrz nr 5 b, Tab. 1) w układzie

- $H_m L(C) + Z(C_{bi}) / W + B$ jako D (objętość V_0 ml)
- $H_m L(C) + Z(C_{bi}) / W + A$ jako T (objętość V ml)

mamy kolejno:

$$\frac{1}{x} = 1 + \chi_{AB} \cdot \frac{V_A}{V_{0B}} + \chi_{WB} \cdot \frac{V_{0W} + V_W}{V_{0B}} \quad (9)$$

$$x = \frac{(1 + r_{WA}) \cdot V_0}{(1 + r_{WA}) \cdot (1 + \chi_{WB} \cdot r_{WB}) \cdot V_0 + (1 + r_{WB}) \cdot (\chi_{AB} + \chi_{WB} \cdot r_{WA}) \cdot V} \quad (10)$$

Dla $V_{0W} = V_W = 0$ otrzymujemy: $V_{0A} = V_0$ i $V_B = V$ w (7) oraz $V_{0B} = V_0$ i $V_A = V$ w (9); stąd $r_{WA} = r_{WB} = 0$. Wzory (8) i (10) upraszczają się wówczas do postaci

$$x = \frac{V}{V + \chi_{AB} \cdot V_0} \quad (8a)$$

$$x = \frac{V_0}{V_0 + \chi_{AB} \cdot V} \quad (10a)$$

odnoszącej się do układu 2 w Tabelicy 1.

Po podstawieniach: $V_{0A} = 0$, $V_{0W} = V_0$, $V_W = 0$, $V_B = V$ we wzorze (5) otrzymujemy:

$$x = \frac{V}{V + \chi_{WB} \cdot V_0} \quad (8b)$$

dla $V_{0W} = 0$, $V_{0B} = V_0$, $V_A = 0$, $V_W = V$,

$$x = \frac{V_0}{V_0 + \chi_{WB} \cdot V} \quad (10b)$$

(Tab. 1, układ 1). Dla $V_{0A} = 0$, $V_{0W} = V_0$, $V_B + V_W = V$, mamy: $V_B = V/(1 + r_{WB})$, $V_W = r_{WB} V/(1 + r_{WB})$; stąd

$$x = \frac{V}{(1 + \chi_{WB} \cdot r_{WB}) \cdot V + \chi_{WB} \cdot (1 + r_{WB}) \cdot V_0} \quad (8c)$$

Podobnie, po podstawieniu w równaniu (5): $V_{0B} + V_{0W} = V_0$, $V_A = 0$, $V_W = V$ mamy: $V_{0B} = V_0/(1 + r_{WB})$, $V_{0W} = r_{WB} V_0/(1 + r_{WB})$, a stąd

$$x = \frac{V_0}{(1 + \chi_{WB} \cdot r_{WB}) \cdot V_0 + \chi_{WB} \cdot (1 + r_{WB}) \cdot V} \quad (10c)$$

(Tab. 1, układ nr 3).

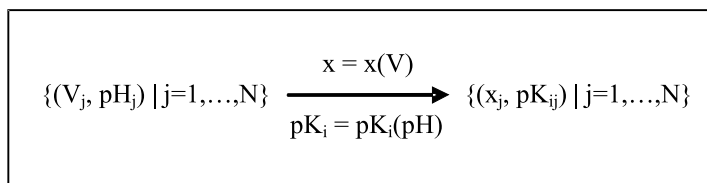
Wzory dla x w układzie nr 4 (Tab. 1) są identyczne jak dla układu nr 3, z tym, że wodny roztwór Z w układzie nr 4 jest dodatkowym źródłem W .

Warto zauważyć, że wzory dla miareczkowań odwrotnych w obrębie danego układu (Tab. 1) otrzymuje się przez zastąpienie V przez V_0 i *vice versa*. Przy tym zależności $x = x(V)$, sformułowane dla zasady jako modyfikatora pH, zachowują swój kształt w przypadku, gdy modyfikatorem pH jest mocny kwas nieutleniający, typu HCl.

Należy podkreślić (Tab. 1), że stężenia solwatów: $H_m L$ oraz Z w D i T są jednakowe i równe odpowiednio C i C_{bi} (gdy Z jest zasadą). Ponieważ przy mieszanii D i T , jak i przy mieszanii składników tworzących D i T , mamy z reguły do czynienia z kontrakcją objętości, oznacza to, że stężenia C i C_{bi} odpowiednich składników rosną w wyniku zmieszania ich roztworów w różnych rozpuszczalnikach. Efekty kontrakcji przy wyprowadzeniu powyższych zależności $x = x(V)$ można jednak zaniedbać na gruncie ograniczonej dokładności pomiarów pH. Z prostych obliczeń [61] wynika bowiem, że niepewność $\Delta pH = 0,02$ w określeniu pH wiąże się z niepewnością stężenia jonów H^+ równą ok. 5%. Efekty kontrakcji roztworu i wynikający stąd wzrost stężeń ww. solwatów w mieszaninie są podobnej wielkości, dlatego też założenia upraszczające: $C = C(x) = \text{const}$ i $C_{bi} = C_{bi}(x) = \text{const}$ są uzasadnione.

Wyznaczenie zależności $pK_i = pK_i(x)$ wymaga odpowiedniej konwersji zmiennych, w wyniku której punkty doświadczalne $\{(V_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$, otrzymane z miareczkowań pH-metrycznych, są przekształcone w punkty $\{(x_j, pK_{ij}) | j = 1, \dots, N\}$, gdzie $pK_{ij} = pK_i(pH_j)$, (Rys. 2). W dalszym ciągu, punkty $\{(x_j, pK_{ij}) | j = 1, \dots, N\}$ są modelowane za pomocą odpowiednich zależności funkcyjnych $pK_i = pK_i(x)$. Przekształcenie V do x za pomocą zależności funkcyjnych $x = x(V)$, określonych dla układów podanych w Tabeli 1, wymaga m.in. obliczenia wartości r_{WA} i r_{WB}

(por. wzory 6). W tym celu należy uwzględnić: (a) wodę wprowadzoną w roztworze Z, użytym jako modyfikator pH w D i T; (b) wodę związaną np. w $\text{Na}_k\text{H}_{m-k}\text{L} \cdot \omega\text{H}_2\text{O}$ ($\omega \geq 0$); (c) wodę utworzoną/z użytą w reakcjach neutralizacji/hydrolyzy.



Rysunek 2. Konwersja $(V, \text{pH}) \rightarrow (x, \text{pK}_i)$

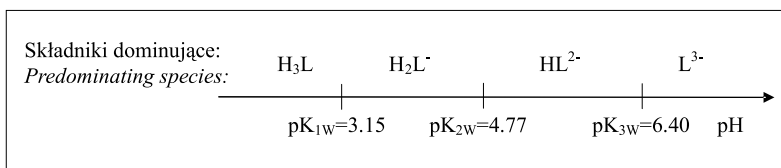
Figure 2. Conversion $(V, \text{pH}) \rightarrow (x, \text{pK}_i)$

W celu przetransformowania wartości pH do wartości $\text{pK}_i = -\log K_i$, stosuje się zależności wyrażone funkcjami Hendersona–Hasselbalcha (H–H) [63]. Na tej podstawie oblicza się $\text{pK}_i(0)$ i $\text{pK}_i(1)$, odniesione do roztworów H_mL w czystych roztuczalnikach A i B lub W i B.

4. FORMUŁOWANIE FUNKCJI TYPU HENDERSONA–HASSELBALCHA – PRZYKŁADY

4.1. WYZNACZANIE pK_i DLA KWASÓW TRIPROTONOWYCH

Jako przykład sformułujemy funkcje H–H dla kwasu cytrynowego H_3L ($q = n = 3$) i określimy granice pH ich stosowalności na podstawie danych literaturowych, $\text{pK}_{iW} = \text{pK}_i(0)$ określonych dla tego kwasu w roztworze wodnym (W) oraz informacji wyszczególnionych na Rysunku 3.



Rysunek 3. Charakterystyka kwasowo-zasadowych właściwości kwasu cytrynowego (H_3L) w roztworze wodnym

Figure 3. Characteristics of acid-base properties of citric acid in aqueous solution

Dla roztworu zawierającego H_3L (C mol/l) i Z (C_{bi} mol/l) mamy bilanse: ładunkowy i stężeniowy;

$$[\text{H}^+] + [\text{M}^+] = [\text{H}_2\text{L}^-] + 2[\text{HL}^{2-}] + 3[\text{L}^{3-}] + [\text{OH}^-] \quad (11)$$

$$[\text{H}_3\text{L}] + [\text{H}_2\text{L}^-] + [\text{HL}^{2-}] + [\text{L}^{3-}] = C \quad (12)$$

$$[M^+] = C_{bi} \quad (13)$$

oraz zależności;

$$K_1 = [H^+][H_2L^-]/[H_3L], K_2 = [H^+][HL^{2-}]/[H_2L^-], K_3 = [H^+][L^{3-}]/[HL^{2-}] \quad (14)$$

Stosując uproszczone wyrażenia otrzymane z (11) i (12), na podstawie zależności (14) otrzymujemy wyrażenia dla pK_i ($i = 1, 2, 3$). I tak, w zakresie pH bliskim pK_1 i dostatecznie odległym od pK_2 otrzymujemy

$$pK_1 = pH + \log \frac{C - C_{b1} - 10^{-pH}}{C_{b1} + 10^{-pH}} \quad (15)$$

Dla wartości pH zbliżonych do pK_2 i dostatecznie odległych od pK_1 i pK_3 mamy

$$pK_2 = pH + \log \frac{2C - C_{b2}}{C_{b2} - C} \quad (16)$$

a dla pH bliskich pK_3 w środowisku kwaśnym o pH dostatecznie odległym od pK_2 otrzymujemy

$$pK_3 = pH + \log \frac{3C - C_{b3}}{C_{b3} - 2C} \quad (17)$$

4.2. WYZNACZANIE pK_i DLA KWASÓW DIPROTONOWYCH

Można wyróżnić 3 typy kwasów diprotonowych, a mianowicie:

- kwasy H_2L 1-go typu, ze składnikami H_2L , HL^- , L^{2-} ($q = m = 2$);
- kwasy HL 2-go typu, ze składnikami H_2L^+ , HL , L^- ($q = 2, m = 1$);
- kwasy H_2L 3-go typu, ze składnikami HL^- , L^{2-} ($q = 1, m = 2$).

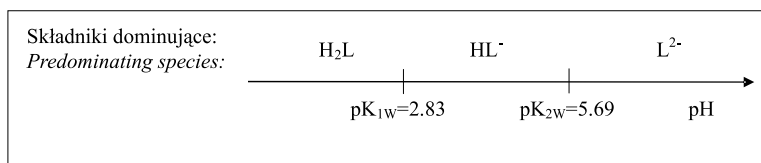
Kwas diprotonowy 1-go typu

Na przykład, bilanse: ładunkowy i stężeniowe dla roztworu zawierającego kwas malonowy H_2L (o stężeniu C mol/l oraz wartościach: $pK_1 = pK_{1w} = 2,83$ i $pK_2 = pK_{2w} = 5,69$) (Rys. 4) i Z (C_{bi} mol/l) mają postać:

$$[M^+] + [H^+] = [HL^-] + 2[L^{2-}] + [OH^-]$$

$$[H_2L] + [HL^-] + [L^{2-}] = C$$

$$[M^+] = C_{bi} \quad (i = 1, 2)$$



Rysunek 4. Charakterystyka kwasowo-zasadowych właściwości kwasu malonowego (H_2L) w roztworze wodnym

Figure 4. Characteristics of acid-base properties of malonic acid (H_2L) in aqueous solution

Wyrażenia dla K_1 i K_2 są następujące:

$$K_1 = \frac{[H^+][HL^-]}{[H_2L]} \quad \text{oraz} \quad K_2 = \frac{[H^+][L^{2-}]}{[HL^-]} \quad (18)$$

Z przybliżonych równań, sformułowanych dla pH z otoczenia pK_1 , otrzymujemy

$$pK_1 = pH + \log \frac{C - C_{b1} - 10^{-pH}}{C_{b1} + 10^{-pH}} \quad (19)$$

natomiast dla pH z otoczenia pK_2 otrzymujemy

$$pK_2 = pH + \log \frac{2C - C_{b2}}{C_{b2} - C} \quad (20)$$

Kwas diprotonowy 2-go typu

W tym przypadku stosujemy: (1°) mocny kwas (HCl) do osiągnięcia pH bliskiego pK_1 oraz (2°) zasadę (NaOH, NH_3) do osiągnięcia pH bliskiego pK_2 . Niech HL = kwas pirydyno-3-karboksylowy (PY-3CA, $pK_1 = 2,03$, $pK_2 = 4,90$), cyt. w [61] (Rys. 5). Bilanse: ładunkowy i stężeniowe dla roztworu zawierającego HL (C mol/l) i HCl ($C_a = \text{mol/l}$) mają tu postać:

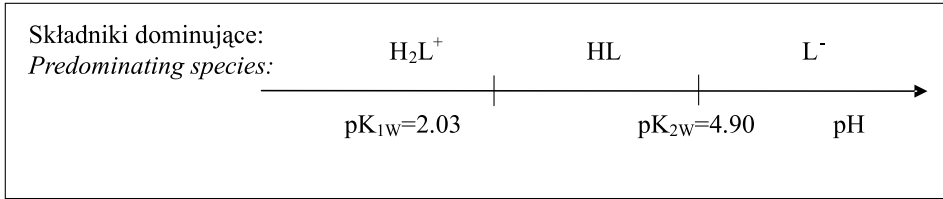
$$[H_2L^+] + [H^+] = [L^-] + [Cl^-] + [OH^-]$$

$$[H_2L^+] + [HL] + [L^-] = C$$

$$[Cl^-] = C_a$$

a wyrażenia dla K_1 i K_2

$$K_1 = \frac{[H^+][HL]}{[H_2L^+]} \quad \text{i} \quad K_2 = \frac{[H^+][L^-]}{[HL]} \quad (21)$$



Rysunek 5. Charakterystyka kwasowo-zasadowych właściwości PY-3CA (HL) w roztworze wodnym
Figure 5. Characteristics of acid-base properties of PY-3CA (HL) in aqueous solution

Dla pH z otoczenia pK_1 otrzymujemy

$$pK_1 = pH + \log \frac{C_a - 10^{-pH}}{C - C_a + 10^{-pH}} \quad (22)$$

Bilanse: ładunkowy (dla $[H^+] \gg [OH^-]$) i stężeniowe dla roztworu zawierającego HL (C mol/l) i NaOH (C_b mol/l) są następujące:

$$[H_2L^+] + [Na^+] + [H^+] = [L^-]$$

$$[H_2L^+] + [HL] + [L^-] = C$$

$$[Na^+] = C_b$$

Dla pH bliskiego pK_2 mamy

$$pK_2 = pH + \log \frac{C - C_b}{C_b} \quad (23)$$

C_a (wzór 22) i C_b (wzór 23) są stężeniami HCl i NaOH w D i T niezbędnymi do osiągnięcia pH bliskiego pK_1 i pK_2 , odpowiednio.

Kwas diprotonowy 3-go typu

Jest to kwas H_2L typu H_2SO_4 , w którym $[H_2L] = 0$, $[HL^-] > 0$, $[L^{2-}] > 0$. Bilanse: ładunkowy i stężeniowe dla roztworu zawierającego H_2L (C mol/l) i NaOH (C_b mol/l) są następujące:

$$[Na^+] + [H^+] = [HL^-] + 2[L^{2-}] \quad (\text{w środowisku kwaśnym}) \quad (24)$$

$$[HL^-] + [L^{2-}] = C$$

$$[Na^+] = C_b$$

Stosując K_2 jak w (18), mamy

$$pK_2 = pH + \log \frac{2C - C_b - 10^{-pH}}{C_b - C + 10^{-pH}} \quad (25)$$

Przy $C_b = 0$ (tj. w nieobecności NaOH), z (25) otrzymujemy

$$pK_2 = pH + \log \frac{2C - 10^{-pH}}{10^{-pH} - C} \quad (26)$$

5. MODELOWANIE FUNKCJI $pK_i = pK_i(x)$

Do wyznaczenia zależności $pK_i = pK_i(x)$ w układzie binarnych rozpuszczalników można posłużyć się pojęciem nadmiarowej standardowej entalpii swobodnej [61] wyrażonej wzorem

$$\Delta G_i^{0E} = \Delta G_i^0 - \Delta G_{id,i}^0 \quad (27)$$

gdzie:

$$\Delta G_i^0 = b \cdot pK_i \quad (28)$$

$$\Delta G_{id,i}^0 = (1-x) \cdot \Delta G_{iA}^0 + x \cdot \Delta G_{iB}^0 \quad (29)$$

$$\Delta G_{iA}^0 = b \cdot pK_{iA}, \quad \Delta G_{iB}^0 = b \cdot pK_{iB} \quad (30)$$

$$b = RT \cdot \ln 10 \quad (31)$$

Z zestawienia wzorów (27)–(31) otrzymujemy zależność

$$pK_i = (1-x) \cdot pK_{iA} + x \cdot pK_{iB} + \frac{\Delta G_i^{0E}}{b} \quad (32)$$

Ułamek, którego wartość zależy od x , można przybliżyć za pomocą funkcji wielomianowych, np. wielomianem Redlicha–Kistera (R–K) [64, 65].

Wprowadzając nową zmienną

$$z = 1 - 2x \quad (33)$$

otrzymujemy zależność [61]

$$pK_i = \varphi_{0i} + \varphi_{1i} \cdot z + (1-z^2) \cdot \sum_{k=0}^n \alpha_{ik} \cdot z^k \quad (34)$$

Obok relacji (34) można zastosować [61] rozwinięcie w postaci wielomianów ortogonalnych Legendre'a (normalne, przesunięte), a także asymetryczne postacie funkcji: Myersa-Scotta [66]

$$pK_i = \varphi_{0i} + \varphi_{1i} \cdot z + \frac{1-z^2}{1-d \cdot z} \cdot \sum_{k=0}^n \alpha_{ik} \cdot z^k \quad (35)$$

i zależność zaproponowaną przez Michałowskiego [61]

$$pK_i = \varphi_{0i} + \varphi_{1i} \cdot z + (1-z^2) \cdot \sum_{k=0}^n \alpha_{ik} \cdot \left(\frac{z}{1-d \cdot z} \right)^k \quad (36)$$

gdzie $z \in (-1, 1)$ jest tzw. parametrem skośności. Wzór (34) jest szczególnym przypadkiem rozwinięcia w funkcję wielomianową

$$pK_i = \sum_{k=0}^{n+2} b_{ik} \cdot x^k \quad (37)$$

Dla $n = 4$, współczynniki: $\varphi_0, \varphi_1, \alpha_0, \dots, \alpha_4$ równania (34) i b_0, \dots, b_6 w równaniu (37) są związane zależnościami:

$$\varphi_{0i} = b_{0i} + \frac{1}{2} \cdot \sum_{k=0}^6 b_{ik}; \quad \varphi_{1i} = -\frac{1}{2} \cdot \sum_{k=0}^6 b_{ik}; \quad (38)$$

$$\alpha_{0i} = -\frac{1}{64} \cdot (16b_{2i} + 24b_{3i} + 28b_{4i} + 30b_{5i} + 31b_{6i}); \quad \alpha_{1i} = \frac{1}{32} \cdot (4b_{3i} + 8b_{4i} + 11b_{5i} + 13b_{6i}); \quad (39)$$

$$\alpha_{2i} = -\frac{1}{32} \cdot (2b_{4i} + 5b_{5i} + 8b_{6i}); \quad \alpha_{3i} = \frac{1}{32} \cdot (b_{5i} + 3b_{6i}); \quad \alpha_{4i} = -\frac{1}{64} \cdot b_{6i}$$

Skąd otrzymujemy:

$$pK_i(0) = b_{i0} \quad \text{i} \quad pK_i(1) = \sum_{k=0}^6 b_{ik} \quad (40)$$

Wykazano, że funkcje aproksymacyjne (34)–(36) charakteryzują się zadowalającym, a często doskonałym dopasowaniem do punktów doświadczalnych dla $n = 3$ i 4. Funkcja (37) odpowiada wielomianowi z $n = 4$ we wzorze (34). Funkcje asymetryczne (35) i (36) okazują się przydatne w przypadku wyraźnie zakrzywionego przebiegu zależności $pK_i = pK_i(x)$ w pobliżu końców przedziału zmiennej x [61].

Do obliczeń numerycznych przygotowano oprogramowanie pozwalające otrzymać odpowiednie dane fizykochemiczne wraz z ich oceną statystyczną po wprowadzeniu do komputera danych $\{(V_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$ otrzymanych z miareczkowań pH-metrycznych.

6. WYZNACZANIE PRZEWODNOŚCI MOLOWYCH

Prawo niezależnego ruchu jonów jest wyrażone wzorem Kohlrauscha

$$L/k_c = \kappa = \sum_p \kappa_i = \sum_p \Lambda_p \cdot [X_p^{z_p}] \quad (41)$$

gdzie L jest przewodnością molową, k_c – stałą naczynka konduktometrycznego, Λ_p – przewodnictwem molowym jonu p -tego rodzaju, $X_p^{z_p}$ z liczbą ładunkową z_p . Wzór (41) jest podobny w swej formie do wzoru wyrażającego 2-gie prawo Beera

$$A/l = \sum_p \varepsilon_p \cdot [X_p^{z_p}] \quad (42)$$

gdzie A jest absorbancją, l – długością drogi optycznej, ε_p – molowym współczynnikiem absorpcji dla $X_p^{z_p}$.

Procedurę wyznaczania zależności $\Lambda_p = \Lambda_p(x)$ prześledzimy na przykładzie badania roztworów kwasu cytrynowego, H_3L ($q = m = 3$), dla którego podano uprzednio sposób wyznaczenia zależności $pK_i = pK_i(x)$ z wyników miareczkowań pH-metrycznych, wykonanych w układzie $H_3L(C) + Z(C_{bki}) / w + B - H_3L(C) + Z(C_{bki}) / W$ (Tab. 1, układ nr 4), gdzie C_{bki} jest i -tym stężeniem $Z = NH_3$ w k -tym zakresie pomiarowym ($k = 1, 2, 3; i = 1, 2, \dots, n_k$); pH_{kij} jest wartością pH w j -tym punkcie odpowiadającym stężeniu C_{bki} dla Z w $D+T$.

Przewodność właściwą tego roztworu wyraża wzór

$$\kappa = \Lambda_1 \cdot [H^+] + \Lambda_2 \cdot [NH_4^+] + \Lambda_3 \cdot [H_2L^-] + \Lambda_4 \cdot [HL^{2-}] + \Lambda_5 \cdot [L^{3-}] \quad (43)$$

Nie wszystkie zależności $\Lambda_i = \Lambda_i(x)$ ($i = 1, \dots, 5$) będą wyznaczane równocześnie.

W węższych zakresach pH, wzór (43) można przedstawić w prostszych postaciach. I tak, w zakresie 1 (Rys. 6) mamy:

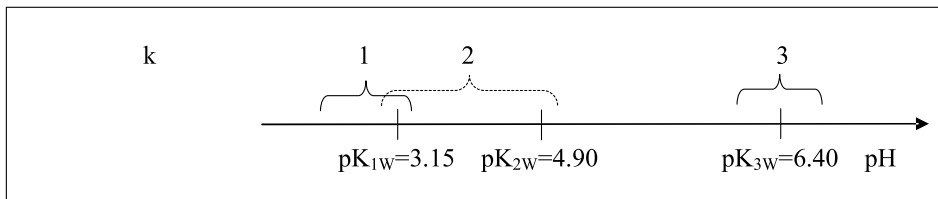
$$\kappa = \Lambda_1 \cdot [H^+] + \Lambda_2 \cdot [NH_4^+] + \Lambda_3 \cdot [H_2L^-] \quad (44)$$

W zakresie 2

$$\kappa = \Lambda_2 \cdot [NH_4^+] + \Lambda_3 \cdot [H_2L^-] + \Lambda_4 \cdot [HL^{2-}] \quad (45)$$

a w zakresie 3

$$\kappa = \Lambda_2 \cdot [NH_4^+] + \Lambda_4 \cdot [HL^{2-}] + \Lambda_5 \cdot [L^{3-}] \quad (46)$$



Rysunek 6. Zakresy pomiarowe do wyznaczenia zależności $A_p = A_p(x)$; k – numer zakresu
Figure 6. The measuring ranges for determination of the relationship; k – the range number

Zakładamy przy tym, że zależności $pK_i = pK_i(x)$ są uprzednio znane na podstawie wyników miareczkowań pH-metrycznych. Oznaczając

$$\psi = [H^+] = 10^{-pH} \quad (47)$$

oraz

$$\theta_1 = 10^{pK_3} \cdot \psi^3, \theta_2 = 10^{pK_2 + pK_3} \cdot \psi^2, \theta_3 = 10^{pK_1 + pK_2 + pK_3} \cdot \psi^3 \quad (48)$$

obliczamy:

$$\Phi_2 = [H_2L^-] = \theta_2 \cdot C / (\theta_3 + \theta_2 + \theta_1 + 1), \Phi_1 = [HL^{2-}] = \theta_1 \cdot C / (\theta_3 + \theta_2 + \theta_1 + 1), \quad (49)$$

$$\Phi_0 = [HL^{2-}] = C / (\theta_3 + \theta_2 + \theta_1 + 1)$$

Niech pH_{kij} oznacza j-tą wartość pH otrzymaną przy stężeniu Z równym C_{bki} w k-tym zakresie pomiarowym (Rys. 2); $k = 1, 2, 3$; $i = 1, \dots, n_k$; $j = 1, \dots, N_{ki}$. Stosując powyższe oznaczenia, można wzory (44)–(46) przepisać w postaci równań regresji:

$$\kappa_{1ij} = \Lambda_{1j} \cdot \psi_{1ij} + \Lambda_{2j} \cdot C_{bli} + \Lambda_{3j} \cdot \Phi_{21ij} + \varepsilon_{1ij} \quad (44a)$$

$$\kappa_{2ij} = \Lambda_{2j} \cdot C_{b2i} + \Lambda_{3j} \cdot \Phi_{21ij} + \Lambda_{4j} \cdot \Phi_{12ij} + \varepsilon_{2ij} \quad (45a)$$

$$\kappa_{3ij} = \Lambda_{2j} \cdot C_{b3i} + \Lambda_{4j} \cdot \Phi_{13ij} + \Lambda_{5j} \cdot \Phi_{03ij} + \varepsilon_{3ij} \quad (46a)$$

gdzie:

$$\psi_{kij} = 10^{-pH_{kij}}, \theta_{1kij} = 10^{pK_3(x_j)} \cdot \psi_{kij}, \theta_{2kij} = 10^{pK_2(x_j) + pK_3(x_j)} \cdot \psi_{kij}^2,$$

$$\theta_{3kij} = 10^{pK_1(x_j) + pK_2(x_j) + pK_3(x_j)} \cdot \psi_{kij}^3 \quad (50)$$

Ze zmianą wartości j, której odpowiada objętość V_j dodanego titranta T, zmienia się wartość $x = x_j$. Zakłada się *a priori*, że wartości A_p są niezależne od k oraz i. Zakłada się również, że porcje dozowanego titranta T, a więc i objętości V_j są takie same we wszystkich miareczkowaniach, czyli $N_{ki} = N$; nie stanowi to problemu w miareczkowaniach automatycznych.

Wartości A_p są wyznaczane w obrębie poszczególnych zakresów pomiarowych. Oznacza to, że np. zależności $A_2 = A_2(x)$ są wyznaczane w każdym z zakresów, natomiast $A_3 = A_3(x)$ i $A_4 = A_4(x)$ w dwóch zakresach pH. Z jednej strony wprowadza to niejednoznaczność otrzymanych wyników, z drugiej jednak strony stanowi rodzaj kryterium walidacyjnego proponowanej metody. Zakładając, że w każdym zakresie wykonuje się miareczkowania przy $n_k = n = 8$ wartościach C_b , oznacza to konieczność wykonania minimum $3 \cdot 8 = 24$ miareczkowań konduktometrycznych; do oceny statystycznej pozostaje wówczas, w każdym przypadku, $f = 8 - 3 = 5$ stopni swobody. Zakłada się przy tym, że różnice w mocy jonowej roztworów, wynikające z dodania różnych ilości Z do poszczególnych par roztworów tworzących układy $(D + T)_{ki}$, są do zaniedbania przy miareczkowaniach w układzie rozcieńczonych roztworów D i T. Zachowanie (w przybliżeniu) stałej mocy jonowej roztworów przez dodanie znacznie większych ilości elektrolitu podstawowego (np. KCl) nie wchodzi tu w grę, a to ze względu na niewielką rozpuszczalność soli jonowych w rozpuszczalnikach niewodnych. Z tych to względów zastąpiono tu wodorotlenek sodu amoniakiem, gdyż cytryniany sodu wytrącają się z tych roztworów przy stężeniach rzędu 10^{-2} mol/l. Wykonywanie miareczkowań przy wartościach C rzędu 10^{-3} mol/l i niższych nie zaleca się, a to ze względu na niską precyzję miareczkowań i inne czynniki towarzyszące pomiarom w tych warunkach analizy.

Schemat obliczeń prześledzimy na bazie wzoru (44a). Wartości A_{1j} , A_{2j} i A_{3j} wyznaczamy metodą najmniejszych kwadratów, przez minimalizację sumy kwadratów

$$SS(j) = \sum_{i=1}^{n_k} (\Lambda_{1j} \cdot \Psi_{1ij} + \Lambda_{2j} \cdot C_{bli} + \Lambda_{3j} \cdot \Phi_{21ij} - \kappa_{1ij})^2 \quad (51)$$

Obliczenia te wykonujemy dla $j = 1, \dots, N$. Podstawiając wartości $V = V_j$ z punktów $\{(V_j, pH_{kij}) | j = 1, \dots, N\}$ do wzorów 8c i 10c, odnoszących się do układu 4, otrzymujemy stąd punkty $\{(x_j, A_{pj}) | j = 1, \dots, N\}$, które przybliżamy wielomianem analogicznym do (38), przedstawionym w postaci

$$\Lambda_p = \sum_{r=0}^6 b_{pr} \cdot x^r \quad (52)$$

Wartości b_{pr} ($r = 1, \dots, 6$) wyznacza się więc metodą najmniejszych kwadratów, z warunku minimalizacji funkcji

$$SS(p) = \sum_{j=1}^N \left(\sum_{r=0}^6 b_{pr} \cdot x_j^r - \Lambda_{pj} \right)^2 \quad (53)$$

Wybór funkcji aproksymującej (52) jest podyktowany następującymi względami:

1° – formalnym podobieństwem wzorów (52) i (37), gdyż równanie wielomianowe szóstego stopnia względem z jest, na bazie wzoru (33), równaniem wielomianowym szóstego stopnia względem x;

2° – wzór (52) (podobnie jak wzór 37) ma charakter autonomiczny – tzn. nie ma konotacji z nadmiarową funkcją standardową Gibbsa (wzór 27);

3° – wielomian szóstego stopnia okazał się adekwatny w dotychczasowych obliczeniach [61, 62], wykonanych na bazie wzoru (34).

Po otrzymaniu zależności $A_p = A_p(x)$ można uzyskać – na drodze ekstrapolacji – wartości $A_p(0)$ i $A_p(1)$. Wyniki otrzymane z ekstrapolacji są tu bardziej miarodajne, gdy wartości brzegowe dla x objęte pomiarami – czyli x_1 i x_N – są bliskie 0 i 1, odpowiednio. Narzuca to (wspomnianą wyżej) konieczność stosowania umiarkowanie stężonych roztworów modyfikatora Z (tu: NH_3). Użycie zbyt stężonych roztworów modyfikatora Z nie jest jednak wskazane ze względu na trudności i błędy precyzji związane z odmierzaniem małych porcji (lepkich) roztworów.

7. WYNIKI DOŚWIADCZALNE

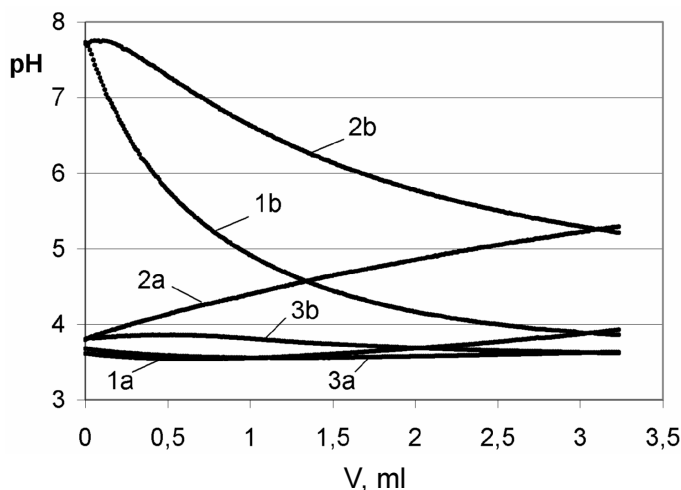
Celem badań przedstawionych w [61, 62] było znalezienie zależności funkcyjnych $\text{pK} = \text{pK}(x)$ dla wybranych kwasów mono- i diprotonowych w układach typu 1 i 2 (Tab. 1). Kwas diprotonowy H_2L traktowano tu jak pseudo-monoprotonowe, co jest uzasadnione wówczas, gdy różnica $\Delta\text{pK} = \text{pK}_2 - \text{pK}_1$ dla H_2L jest dostatecznie duża. Parametry kwasowości tak traktowanych kwasów oznaczono symbolem pK (bez indeksu).

Zakres zmian pH w trakcie miareczkowania w układach typu 1 (Tab. 1) zależy od rodzaju użytego rozpuszczalnika B; na przykład, dla $\text{B} = \text{Me}_2\text{SO}$ i $\text{H}_m\text{L} = \text{PY-3CA}$ (kwas pirydyno-3-karboksylowy) zakres ten wynosi kilka jednostek pH; np. krzywa 1b na Rysunku 7 obejmuje ok. 4 jednostki pH. Punkt przecięcia krzywych wzajemnego miareczkowania przypada dla V bliskich 3 ml, co jest jednym z dowodów na to, że układ elektrod zachowuje się w sposób odwracalny przy rosnących i malejących wartościach x .

Dane z Rysunek 7 można przedstawić we współrzędnych (x, pH) (Rys. 8) lub (x, pK) (Rys. 9). W tym celu zastosowano wzory (8b) i (10b) oraz zależność [61]

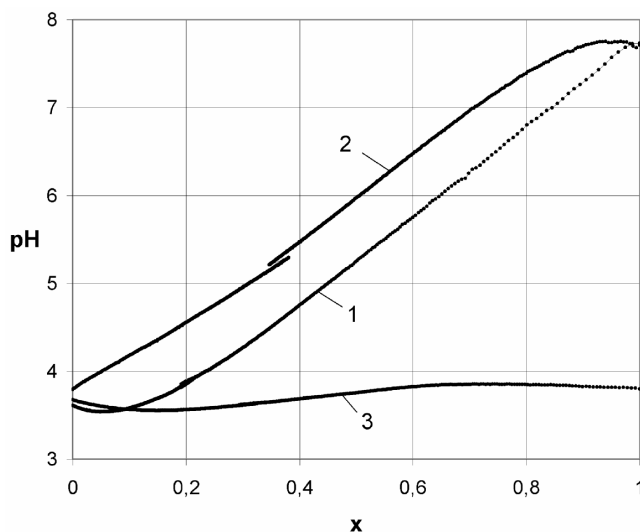
$$\text{pK} = 2\text{pH} + \log(C - 10^{-\text{pH}}). \quad (54)$$

Przebieg krzywych na Rysunku 7 obejmuje także wartości $V > 3$ ml, a więc we współrzędnych (x, pH) i $(x, \text{pK}(x))$ odpowiednie punkty pokrywają pewien wspólny zakres x . Stopień nałożenia się tych fragmentów stanowi inne kryterium oceny odwracalności wskazań układu pomiarowego. Z Rysunków 8 i 9 wynika, że fragmenty krzywych 3 nakładają się niemal doskonale, a dla krzywych 2 i 1 w zadowalającym stopniu



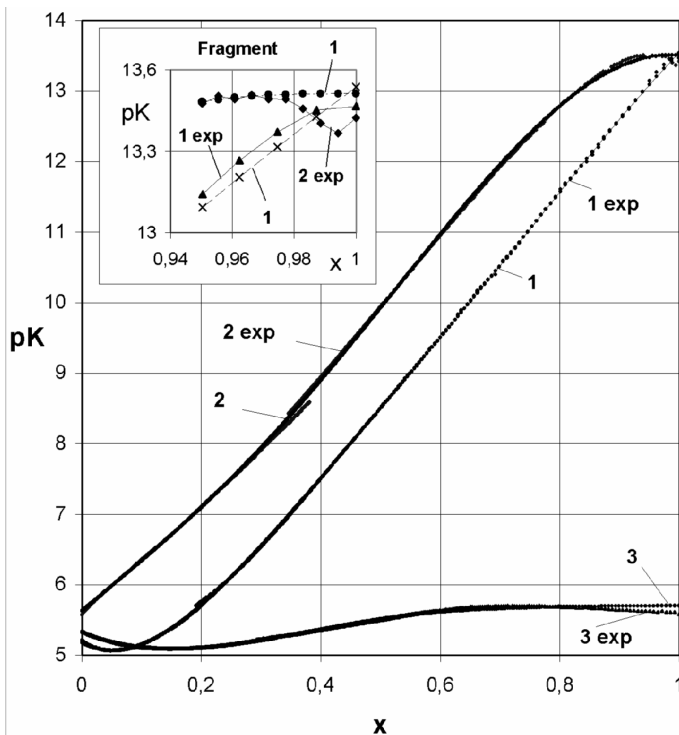
Rysunek 7. Punkty doświadczalne $\{(V_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$, $N = 635$, zestawione z miareczkowań pH-metrycznych: 1a – PY-3CA/Me₂SO → PY-3CA/W; 1b – PY-3CA/W → PY-3CA/Me₂SO; 2a – PY-3CA/Me₂SO → PY-3CA/MeOH; 2b – PY-3CA/MeOH → PY-3CA/Me₂SO; 3a – PY-3CA/MeOH → PY-3CA/W; 3b – PY-3CA/W → PY-3CA/MeOH; $V_0 = 3$ mL dla D, $C = 0.01$ mol/l dla PY-3CA; W = H₂O; MeOH = alkohol metylowy; Me₂SO = dimetylosulfolenenek (DMSO)

Figure 7. Experimental points $\{(V_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$, $N = 635$, collated from pH titrations: 1a – PY-3CA/Me₂SO → PY-3CA/W; 1b – PY-3CA/W → PY-3CA/Me₂SO; 2a – PY-3CA/Me₂SO → PY-3CA/MeOH; 2b – PY-3CA/MeOH → PY-3CA/Me₂SO; 3a – PY-3CA/MeOH → PY-3CA/W; 3b – PY-3CA/W → PY-3CA/MeOH; $V_0 = 3$ mL for D, $C = 0.01$ mol/l for PY-3CA; W = H₂O; MeOH = methyl alcohol; Me₂SO = dimethylsulphoxide (DMSO)



Rysunek 8. Punkty $\{(x_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$ dla miareczkowań: 1 – PY-3CA/Me₂SO ↔ PY-3CA/W; 2 – PY-3CA/Me₂SO ↔ PY-3CA/MeOH; 3 – PY-3CA/MeOH ↔ PY-3CA/W

Figure 8. Points $\{(x_j, pH_j) | j = 1, \dots, N\}$ for titrations: 1 – PY-3CA/Me₂SO ↔ PY-3CA/W; 2 – PY-3CA/Me₂SO ↔ PY-3CA/MeOH; 3 – PY-3CA/MeOH ↔ PY-3CA/W



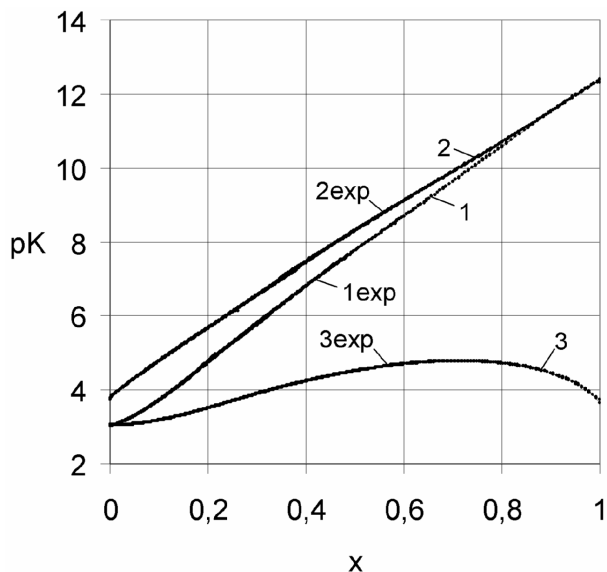
Rysunek 9. Układy skonwertowanych punktów (1exp, 2exp, 3exp) oraz odpowiednie krzywe aproksymujące (1, 2, 3) typu R-K (wz. 34) dla miareczkowań: (1) PY-3CA/W \leftrightarrow Me₂SO; (2) PY-3CA/MeOH \leftrightarrow PY-3CA/Me₂SO; (3) PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeOH

Figure 9. The sets of converted points (1exp, 2exp, 3exp) and the related approximating functions (1, 2, 3) of R-K type (Eq. 34) for titrations: (1) PY-3CA/W \leftrightarrow Me₂SO; (2) PY-3CA/MeOH \leftrightarrow PY-3CA/Me₂SO; (3) PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeOH

Układ punktów doświadczalnych $\{(x_j, pK_{ij}) | j = 1, \dots, N\}$ na Rysunku 8 aproksymowano, dla każdego z powyższych układów, za pomocą funkcji R-K (wzór 34).

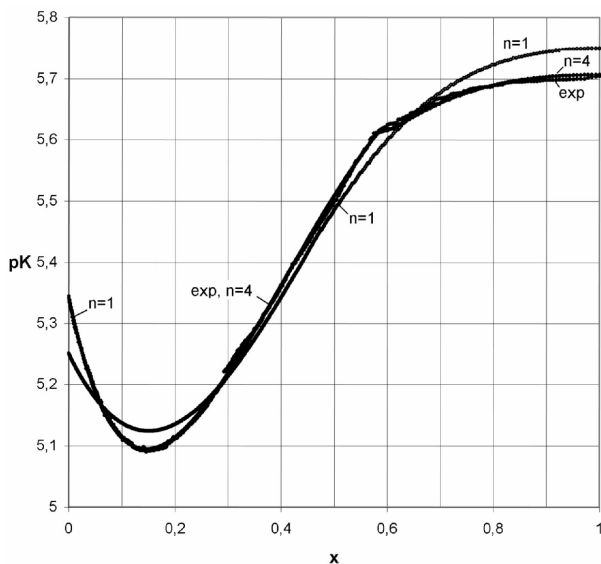
Dopasowanie funkcji R-K do punktów doświadczalnych jest zadowalające, a w niektórych przypadkach doskonale, np. dla układów z kwasem fumarowym (FA), przedstawionych na Rysunku 10. Stopień dopasowania krzywych zależy od wartości n we wzorze (34) i jest wystarczający dla $n = 3$ i 4 (Rys. 11).

Krzywe na Rysunkach 8–10 wykreślono przy założeniu, że $B = \text{Me}_2\text{SO}$ w układach rozpuszczalników (W, Me₂SO) i (MeOH, Me₂SO) oraz $B = \text{MeOH}$ w układzie rozpuszczalników (W, MeOH). Wynika stąd, że $x = 0$ odpowiada roztworom odpowiednich kwasów w czystej W, a więc początkowi krzywych 1 i 3, natomiast $x = 1$ odpowiada roztworom tych kwasów w czystym Me₂SO, czyli końcowi krzywych 1 i 2. Zbieżność punktów we współrzędnych (x, pK) , jest zadowalająca na Rysunku 9 i doskonała na Rysunku 10.



Rysunek 10. Układy skonwertowanych punktów (1exp, 2exp, 3exp) oraz odpowiednie krzywe aproksymujące (1, 2, 3) typu R-K (wzór 34) dla miareczkowań: (1) FA/W \leftrightarrow FA/Me₂SO; (2) FA/MeOH \leftrightarrow FA/Me₂SO; (3) FA/W \leftrightarrow FA/MeOH; N = 635

Figure 10. Sets of converted points (1exp, 2exp, 3exp) and the related approximating curves (1, 2, 3) of R-K type (Eq. 34) for titrations: (1) FA/W \leftrightarrow FA/Me₂SO; (2) FA/MeOH \leftrightarrow FA/Me₂SO; (3) FA/W \leftrightarrow FA/MeOH; N = 635



Rysunek 11. Dopasowanie funkcji R-K do wyników miareczkowania PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeOH przy $n = 1$ i $n = 4$

Figure 11. The fit of R-K function to the results of the titration PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeOH at $n = 1$ and $n = 4$

Tabela 2. Wartości parametrów we wzorze (34) oraz pK(0) i pK(1) otrzymane z miareczkowań z $H_m L = PY-3CA$ we wskazanych układach rozpuszczalników dla $n = 1, 2, 3$ i $N = 635$

Table 2. The values of parameters in Eq. 34, and pK(0), pK(1) values obtained from titrations with $H_m L = PY-3CA$ in indicated solvent systems for $n = 1, 2, 3$ and $N = 635$

Układ/System	χ_{WB}	n	φ_0	φ_1	α_0	α_1	α_2	α_3	pK(0) \pm s	pK(1) \pm s
PY-3CA/H ₂ O+Me ₂ SO	3.9293	3	9.3582	-4.1782	-0.8596	-0.8111	-0.7435	-0.7901	5.18 \pm 0.02	13.54 \pm 0.02
			9.5355	-4.3488	-0.9541	-0.9277	-0.6205	-0.8208	5.19 \pm 0.02	13.88 \pm 0.02
		2	9.4180	-4.2954	-0.8909	-0.8456	-1.0394		5.12 \pm 0.03	13.71 \pm 0.03
			9.5976	-4.4705	-0.9866	-0.9635	-0.9290		5.12 \pm 0.03	14.07 \pm 0.03
		1	9.1315	-4.1402	-0.6666	-1.2884		4.99 \pm 0.07	13.27 \pm 0.07	
			9.3416	-0.3318	-0.7861	-1.3414		5.01 \pm 0.06	13.67 \pm 0.06	
PY-3CA/MeOH+Me ₂ SO	1.7517	3	9.5688	-3.9386	0.3510	-1.3024	0.6247	0.1278	5.63 \pm 0.04	13.51 \pm 0.04
			9.5854	-3.9384	0.3293	-1.3715	0.5544	0.2357	5.65 \pm 0.06	13.52 \pm 0.06
		2	9.5640	-3.9192	0.3531	-1.2977	0.6483		5.64 \pm 0.04	13.48 \pm 0.04
			9.5767	-3.9025	0.3332	-1.3630	0.5978		5.67 \pm 0.06	13.48 \pm 0.06
		1	9.7396	-3.9588	0.2141	-1.1960		5.78 \pm 0.06	13.70 \pm 0.06	
			9.7385	-3.9390	0.2050	-1.2692		5.79 \pm 0.07	13.68 \pm 0.07	

Tabela 2. Ciąg dalszy
Table 2. Continuation

PY-3CA/H ₂ O+MeOH	2.2431	3	5.5019	-0.1762	0.0274	-0.5271	-0.3148	-0.0718	5.33 ± 0.01	5.68 ± 0.01
			5.4571	-0.1286	0.0570	-0.5424	-0.3875	-0.0544	5.33 ± 0.01	5.59 ± 0.01
		2	5.5055	-0.1872	0.0257	-0.5295	-0.3323		5.32 ± 0.01	5.69 ± 0.01
			5.4598	-0.1369	0.0557	-0.5443	-0.4007		5.32 ± 0.01	5.60 ± 0.01
		1	5.4158	-0.1574	0.0955	-0.6078			5.25 ± 0.02	5.57 ± 0.02
			5.3517	-0.1010	0.1399	-0.6387			5.24 ± 0.02	5.45 ± 0.02

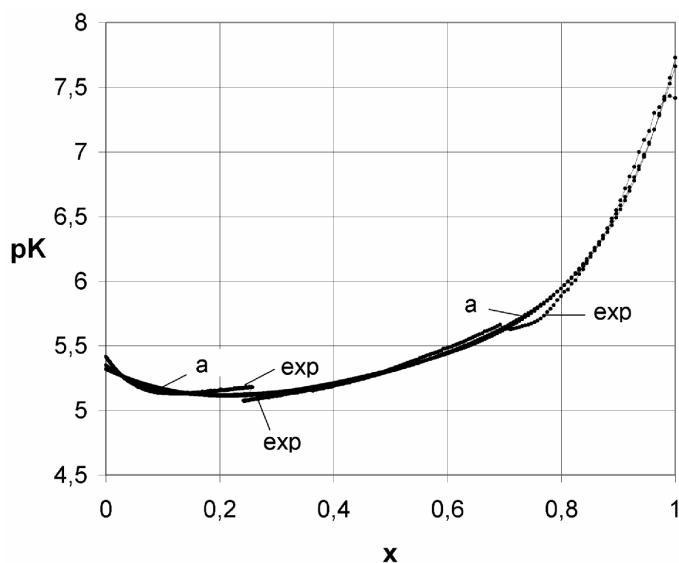
Tabela 3. Wartości parametrów we wzorze (34) oraz pK(0) i pK(1) otrzymane z miareczkowań z $H_m L = FA$ we wskazanych układach rozpuszczalników dla $n = 4$ i $N = 635$
 Table 3. The values of parameters in Eq. 34, and pK(0), pK(1) values obtained from titrations with $H_m L = FA$ in indicated solvent systems for $n = 4$ and $N = 635$

Układ/ System	φ_0	φ_1	α_0	α_1	α_2	α_3	α_4	pK(0) \pm s	pK(1) \pm s
FA/H ₂ O + Me ₂ SO	7.7080	-4.6837	0.0525	-0.0282	-0.1085	-0.7516	-0.5544	3.02 \pm 0.02	12.39 \pm 0.02
	7.6775	-4.6889	0.0921	-0.0068	-0.2565	-0.8616	-0.2517	2.99 \pm 0.02	12.37 \pm 0.02
FA/MeOH + Me ₂ SO	8.0856	-4.2907	0.2268	0.1152	-0.4180	0.1440	0.6150	3.79 \pm 0.02	12.38 \pm 0.02
	8.0679	-4.2934	0.2949	0.0991	-0.7263	0.1516	1.1302	3.77 \pm 0.02	12.36 \pm 0.02
FA/H ₂ O + MeOH	3.4045	-0.3370	1.1150	-0.8004	-0.0275	-0.7408	0.1483	3.07 \pm 0.007	3.74 \pm 0.007
	3.3939	-0.3421	1.1270	-0.8051	-0.0619	-0.6898	0.2863	3.05 \pm 0.007	3.74 \pm 0.007

Możliwość porównania wyników otrzymanych dla $pK(0)$ i $pK(1)$ w układach różnych rozpuszczalników dostarcza – łącznie z doskonałym dopasowaniem funkcji aproksymujących – kryterium wiarygodności otrzymanych wyników, a więc świadczy na rzecz (wewnętrznej) walidacji proponowanej metody. Powtarzalność otrzymanych wyników potwierdzają dane liczbowe zawarte w Tabelach 2 i 3. Wartości odchylenia standardowego s obliczono ze wzoru $s = (s^2(n))^{1/2}$, gdzie $s^2(n)$ jest wariancją, wyrażoną wzorem

$$s^2(n) = \frac{\sum_{j=1}^N (pK_j - pK(x_j, n))^2}{N - n - 3} \quad (55)$$

Niektóre rozpuszczalniki organiczne oddziałują specyficznie z układem elektrod, co powoduje nieregularny przebieg krzywych zależności $pH = pH(x)$ oraz $pK = pK(x)$; zjawisko to stwierdzono m.in. w układzie $BA/MeCN \leftrightarrow BA/W$ ($MeCN =$ acetonitryl) (Rys. 12). Jednak nawet i w tych przypadkach wartości $pK_1(0)$ i $pK_1(1)$ są powtarzalne w serii miareczkowań w tym układzie, mimo stosunkowo dużej wartości funkcji dopasowującej; świadczy to o solidności/odporności (*robustness*) metody.



Rysunek 12. Zależności $pK = pK(x)$ wykreślone dla wyników miareczkowania $PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeCN$; exp – punkty skonwertowane, a – krzywa aproksymująca R-K (wzór 34)

Figure 12. The $pK = pK(x)$ relationships plotted for results of titration $PY-3CA/W \leftrightarrow PY-3CA/MeCN$; exp – converted points, a – approximating function R-K (Eq. 34)

Tabela 4. Wartości parametrów we wzorze (34) oraz pK(0) i pK(1) otrzymane z miareczkowań BA/W \leftrightarrow BA/MeCN przy N = 330 i różnych n
 Table 4. The values of parameters in Eq. 34, and pK(0), pK(1) values obtained from titrations BA/W \leftrightarrow BA/MeCN for N = 635 and different n values

n	φ_0	φ_1	α_0	α_1	α_2	α_3	α_4	pK(0) \pm s	pK(1) \pm s
4	6.3926	-2.1989	-0.4172	1.5739	0.1052	-0.3477	-0.0955	4.19 \pm 0.03	8.59 \pm 0.03
3	6.3856	-2.1964	-0.4086	1.5797	0.0076	-0.3769		4.19 \pm 0.03	8.58 \pm 0.03
2	6.4053	-2.2499	-0.4168	1.5606	-0.0319			4.16 \pm 0.04	8.66 \pm 0.04
1	6.3970	-2.2464	-0.4104	1.5508				4.15 \pm 0.04	8.64 \pm 0.04

Przedstawione w Tabelach 2–4 wartości $pK(0)$, odniesione do wodnych roztworów odpowiednich kwasów, są zgodne z danymi literaturowymi. Wartości dla $pK(1)$, odniesione do roztworów tych kwasów w odpowiednich rozpuszczalnikach organicznych są nieznane w literaturze.

Z powyższych danych wynika, że równanie R-K jest wystarczające dla modelowania zależności $pK = pK(x)$ w przypadku regularnego układu punktów w tym układzie współrzędnych. W wielu przypadkach krzywych o nieregularnym kształcie stwierdzono przydatność wzoru (36).

Wartość $pK_{1W} = 2,03$ dla uprotonowanej formy (H_2L^+) PY-3CA [61] jest stosunkowo mała. Tak więc dla roztworu PY-3CA mamy $[H_2L^+] \ll [HL]$, a więc HL można tu traktować jako słaby kwas pseudomonoprotonowy, przy czym wyznaczona wartość $pK(0) = pK_{2W}$. Z kolei, dla FA wartość $\Delta pK = pK_{2W} - pK_{1W} = 4,44 - 3,03 = 1,41$ [67] przewyższa wartość $-\log(0,05) = 1,3$, odnoszącą się do błędu związanego z precyzją pomiarów pH.

UWAGI KOŃCOWE

W pracy przedstawiono algorytmy, umożliwiające wyznaczenie zależności $pK_i = pK_i(x)$ parametrów kwasowości (pK_i) kwasów mono- i poliprotonowych (H_mL) w funkcji ułamka molowego (x) jednego z rozpuszczalników (ozn. B) tworzącego z A lub/i B układ binarnych/mieszanych rozpuszczalników. W tym celu zastosowano funkcje typu Hendersona-Hasselbalcha, pozwalające na oddzielne traktowanie poszczególnych pK_i kwasu poliprotonowego w celu wyznaczenia zależności $pK_i = pK_i(x)$ oraz zaproponowano nową, oryginalną metodę wzajemnego miareczkowania pH-metrycznego w układzie par roztworów: titranda (D) i titranta (T), różniących się tylko rozpuszczalnikiem. W skład roztworów tworzących i-tą parę D + T wchodzi: H_mL i zasada (NaOH, KOH lub NH_3) lub kwas (HCl), użyte jako modyfikator pH; stężenia H_mL i modyfikatora pH są jednakowe w D i T. Punkty pomiarowe otrzymane z miareczkowań pH pokrywają niemal cały przedział zmienności x , a wartości $pK_i(0)$ i $pK_i(1)$ otrzymuje się przez ekstrapolację. Do modelowania układów tego typu stosuje się odpowiednio zmodyfikowane i przedstawione w pracach [61, 62] oryginalne zależności funkcyjne, wykorzystujące m.in. równania Redlicha-Kistera (R-K) i ich zmodyfikowane formy z parametrem asymetryczności. Do aproksymacji można użyć także funkcje z (zwykłymi, przesuniętymi) wielomianami ortogonalnymi Legendre'a (LOP) lub proste funkcje wielomianowe.

Zaproponowano także modelowanie zależności funkcyjnych $A_p = A_p(x)$ dla przewodnictw molowych jonów, na podstawie wyników miareczkowań: konduktometrycznego i potencjometrycznego. Miareczkowanie potencjometryczne dostarcza zależności $pK_i = pK_i(x)$, które są następnie wykorzystane w modelach, sformułowanych na bazie wzoru Kohlrauscha.

W obliczeniach przyjęto, że $pH = -\log[H^+]$, tj. założono, że współczynnik aktywności jonów H^+ wynosi $\gamma = 1$. To założenie upraszczające, stosowane także –

z konieczności – we wcześniejszej literaturze przedmiotowej, np. [68], wynika z praktycznej niemożliwości jednoczesnego wyznaczenia zależności: $pK_i = pK_i(x)$ i $\gamma = \gamma(x)$.

W części eksperymentalnej przedstawiono wyniki dotychczasowych badań, w których zastosowano ww. modele do wyznaczania stałych równowagi kwasów diprotonowych, traktowanych jako kwasy pseudo-monoprotonowe. To rozwiązanie wynikało z faktu, że w odpowiednich parach roztworów, tj. D i T, nie stosowano modyfikatora pH. Przedstawiono tu m.in. propozycję wewnętrznej walidacji metody pomiarowej i otrzymanych stąd wyników, polegającą na zastosowaniu trzech par roztworów w układach binarnych rozpuszczalników: W + B, W + A i A + B, gdzie W = H₂O, a A i B są rozpuszczalnikami organicznymi, o nieograniczonej rozpuszczalności wzajemnej.

Proponowane rozwiązania dotyczące zależności $pK_i = pK_i(x)$ i $A_p = A_p(x)$ są nowością w literaturze przedmiotowej. Oprócz walorów poznawczych, praca dostarcza propozycje realizacji badań, których wyniki mogą znaleźć zastosowanie m.in. w analizie chemicznej do rozdzielania składników techniką HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) w odwróconym układzie faz (zwłaszcza w elucji gradientowej), chromatografii jonowej i strefowej elektroforezie kapilarnej. Innym obszarem zastosowania wyników tych badań są techniki analizy spektralnej: UV-VIS i ¹H NMR. Znajomość pK_i kwasów jest ważna w aspekcie aktywności farmakologicznej, transportu przez błonę oraz metabolizmu leków i układów biologicznych, w których przebiegają reakcje kwasowo-zasadowe sprzężone z reakcjami redoks.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, (3rd ed.), Wiley-VCH 2003.
- [2] Y. Ishihama, Y. Oda, N. Asakawa, *J. Pharm. Sci.*, 1994, **83**, 1500.
- [3] Zs. Dobos, T. Lóránd, F. Hollósy, B. Hallgas, D. Erős, Gy. Mészáros, Gy. Kéri, M. Idei, *Journal of Chromatography B* 2004, **799**, 179.
- [4] S.J. Glück, J.A. Cleveland Jr., *J. Chromatography A*, 1994, **680**, 49.
- [5] G.A. Caliaro, C.A. Herbots, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **26**, 427.
- [6] Wikipedia: wolna encyklopedia [online]. Aktualizowane w dniu 7.12.2009. [dostęp: 20.11.2009]. ADME. Dostępny: <http://en.wikipedia.org/wiki/ADME>.
- [7] R. Kaliszán, P. Haber, T. Bączek, D. Siluk, K. Valko, *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**, 117.
- [8] K.M. Biswas, B.C. Castle, B.A. Olsen, D.S. Risley, M.J. Skibic, Michael J., P.B. Wright, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 692.
- [9] S. Wybraniec, Y. Mizrahi, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1029**, 97.
- [10] S. Wybraniec, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1127**, 70.
- [11] C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A*, 1996, **739**, 3.
- [12] C. Sarzanini, *J. Chromatogr. A*, 2002, **956**, 3.
- [13] I. Zusková, A. Novotná, K. Včeláková, B. Gaš, *J. Chromatogr. B*, 2006, **841**, 129.
- [14] C. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2523.
- [15] M. Perez-Urquiza, J.L. Beltrán, *J. Chromatogr. A*, 2001, **917**, 331.

- [16] E. Jimenez-Lozano, I. Marques, D. Barron, J.L. Beltrán, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **464**, 37.
- [17] J.L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 253.
- [18] T. Michałowski, S. Wybraniec, M. Ponikvar, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2008, **53**, 737.
- [19] J.L. Markley, *Acc. Chem. Res.*, 1975, **8**, 70.
- [20] N. Spitzner, F. Löhr, S. Pfeiffer, A. Koumanov, A. Karshikoff, H. Rüterjans, *Eur. Biophys. J.*, 2001, **30**, 186.
- [21] C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [22] J. Schneede, P.M. Ueland, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 315.
- [23] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.*, 1992, **592**, 157.
- [24] R. Kaliszán, P. Wiczling, M.J. Markuszewski, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1060**, 165.
- [25] K. Sarmini, E. Kennidler, *J. Chromatogr. A*, 1998, **806**, 325.
- [26] B.A. Williams, G. Vigh, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4445.
- [27] J. Barbosa, R. Bergés, I. Toro, V. Sanz-Nebot, *Talanta*, 1994, **44**, 1271.
- [28] J. Barbosa, D. Barrón, R. Bergés, V. Sanz-Nebot, I. Toro, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1997, **93**, 1915.
- [29] J. Barbosa, R. Bergés, V. Sanz-Nebot, I. Toro, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **389**, 43.
- [30] A. Albert, E.P. Serjeant, *The Determination of Ionization Constants*, Chapman & Hall, New York 1984.
- [31] N.U. Perisic, A.A. Muk, V.D. Canic, *Anal. Chem.*, 1973, **45**, 798.
- [32] J. Fan, X. Shen, J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **364**, 275.
- [33] J. Fan, X. Shen, J. Wang, *Talanta*, 1999, **49**, 843.
- [34] L.P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 2666.
- [35] A.V. Zinchuk, B.C. Hancock, E.Y. Shalaev, R.D. Reddy, R. Govindarajan, E. Novak, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 2005, **61**, 158.
- [36] Z. Szakács, M. Kraszni, B. Noszál, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 1428.
- [37] Z. Szakács, G. Hägele, R. Tyka, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **522**, 247.
- [38] Z. Szakács, G. Hägele, *Talanta*, 2004, **62**, 819.
- [39] J. Barbosa, D. Barrón, E. Jiménez-Lozano, V. Sanz-Nebot, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **437**, 309.
- [40] G.M. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York, 1998.
- [41] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, New York, 2000.
- [42] C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR*, vol. 1, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [43] I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 355.
- [44] J.A. Cleveland, M.H. Benko, S.J. Gluck, Y.M. Walbroehl, *J. Chromatogr. A*, 1993, **652**, 301.
- [45] G.A. Caliaro, C.A. Herbots, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **26**, 427.
- [46] D. Koval, V. Kasicka, J. Jiracek, M. Collinsova, T.A. Garrow, *J. Chromatogr. B*, 2002, **770**, 145.
- [47] J. Cai, J.T. Smith, Z.E. Rasi, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1992, **15**, 30.
- [48] A. Jouyban-Gharamaleki, M.G. Khaledi, B.J. Clark, *J. Chromatogr. A*, 2000, **868**, 277.
- [49] S.S. Kurek, B.J. Laskowska, A. Stokłosa, *Electrochim. Acta*, 2006, **51**, 2306.
- [50] D.D. Perrin, B. Dempsey, E.P. Serjeant, *pK_a Prediction for organic Acids and Bases*, Chapman and Hall, New York, NY 1981.
- [51] M.J. Citra, *Chemosphere*, 1999, **38**, 191.
- [52] L.P. Hammett, *J. Chem. Phys.*, 1936, **4**, 613.
- [53] L. Hammett, *Physical Organic Chemistry. Reaction Rates, Equilibria and Mechanisms*, 2nd edn, McGraw-Hill, New York 1970.
- [54] J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, M. Uchimaya, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2007, **25**, 681.

- [55] S.H. Hilal, Y. El-Shabrawy, L.A. Carreira, S.W. Karickhoff, S.S. Toubar, M. Rizk, *Talanta*, 1996, **43**, 607.
- [56] M.J.S. Dewar, *The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York 1969.
- [57] R. Sindreu, M.L. Moyá, F.S. Burgos, A.G. Gonzalez, *J. Solution Chem.*, 1996, **25**, 289.
- [58] L. Sooväli, I. Kaljurand, A. Kütt, I. Leito, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **566**, 290.
- [59] (a) Wikipedia: wolna encyklopedia [online]. Aktualizowane w dniu 7.12.2009. [dostęp: 20.11.2009]. Acid dissociation constant Dostępny: http://en.wikipedia.org/wiki/Acid_dissociation_constant
(b) Acidity-Basicity Data (pKa Values) in Nonaqueous Solvents [online]. Aktualizowane w dniu 1.08.2009. [dostęp: 20.11.2009] Dostępny: http://tera.chem.ut.ee/~ivo/HA_UT/
- [60] S. Nag, D. Datta, *Indian J. Chem.*, 2007, **46**, 1263.
- [61] B. Pilariski, A. Dobkowska, H. Foks, T. Michałowski, *Talanta*, 2010, **80**, 1073.
- [62] B. Pilariski, T. Michałowski, A. Dobkowska, H. Foks, K. Kupiec, *Anal. Chim. Acta*, wysłane do druku.
- [63] Wikipedia: wolna encyklopedia [online]. Aktualizowane w dniu 7.12.2009. [dostęp: 20.11.2009]. Henderson–Hasselbalch equation. Dostępny: http://en.wikipedia.org/wiki/Henderson%E2%80%93Hasselbalch_equation
- [64] O. Redlich, A.T. Kister, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1948, **40**, 341.
- [65] J.D.G. de Oliveira, J.C.R. Reis, *Thermochim. Acta*, 2008, **468**, 119.
- [66] D.M. Myers, R.L. Scott, *Ind. Eng. Chem.* 1963, **55**, 43.
- [67] Wikipedia: wolna encyklopedia [online]. Aktualizowane w dniu 7.12.2009. [dostęp: 20.11.2009]. Fumaric acid. Dostępny: http://en.wikipedia.org/wiki/Fumaric_acid
- [68] F. Rived, I. Casals, E. Bosch, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **315**, 439.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 listopada 2009

FELIETON NAUKOWY



OKRUCHY XV. O STRZEGOMSKIEJ ZIEMI PIECZĘTNEJ

Ignacy Z. Siemion¹, Alicja Szastyńska-Siemion²

*¹ Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

*² Instytut Studiów Klasycznych, Śródziemnomorskich i Orientalnych,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Szewska 49, 50-139 Wrocław*



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 8 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 120 artykułów przeglądowych oraz dotyczących

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



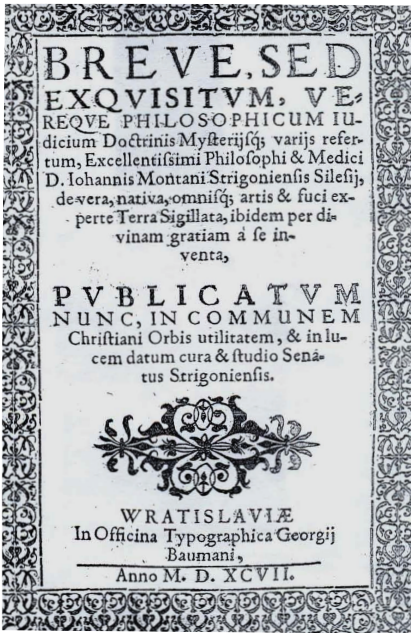
Alicja Szastyńska-Siemion, profesor zwyczajny w Instytucie Studiów Klasycznych, Śródziemnomorskich i Orientalnych Uniwersytetu Wrocławskiego. Autorka licznych prac z zakresu literatury starogreckiej oraz jej recepcji w Polsce i nowożytnej Europie, zwłaszcza różnych gatunków liryki i epigramatu, m.in. książki poświęconej największej poetce greckiej p.t. Muza z Mityleny. Safona (Ossolineum, Wrocław 1994). Współautorka pracy o XVIII-wiecznym lwowskim chemiku, Ignacym Józefie Martinowicsu i tłumaczka z języka łacińskiego obszernych partii jego podręcznika chemii.

„Także te – pisał w *Żywocie człowieka poczciwego* ojciec naszej literatury, Mikołaj Rey – i dziwne lekarstwa, i z dziwnymi przezwiskami nastąpiły. A kto słyszał za starych wieków kankry, karbunkuły, antraxy, francuzy, i z dziwnymi potomki; albo także w lekarstwach: bolus armenum, ira pigra, terra sigillata, rumbardum, reuponticum hermodactylorum, alkibinarum, a kto by je wyliczył?” [1]. Żeby objaśnić wszystkie te terminy, trzeba by napisać całą rozprawę. Tutaj zajmujemy się tylko dwiema nazwami z listy Reya: *bolus armenum* i *terra sigillata*. Były to szeroko używane w dawnej medycynie glinki lecznicze, zwane też ziemiami pieczętnymi. Do używanych jeszcze w starożytności ziem leczniczych należała ziemia lemnijska, wydobywana na wyspie Lemnos na Morzu Egejskim. Tak o niej pisał F. Drzewiński w wydanych w 1816 roku *Początkach mineralogii*: „*Terra lemnia (bolus)*: w starożytności poczytywany był za bardzo skuteczne lekarstwo przeciwko rozmaitym chorobom. Kapłani tej wyspy zbierali go, obmywali z piasku, dawali jego massom foremne kształty okrągławe i wyciskali na nich pieczęć Dyanny z wyobrażeniem kozy, albo herb panującego lub zarządcy wyspy, i stąd pochodzą jego nazwiska: *Terra sigillata, Sphragis, Sphragid*, itd.” [2].

W średniowieczu służyła w Europie lecznicza glinka czerwonego koloru, pochodząca z Armenii, zwana *bolus armenum*, figurująca na liście Mikołaja Reya. W wieku XVI odkryto pod Strzegomiem na Śląsku rodzimą, bardzo aktywną ziemię. Znana ją pod nazwą *Terra sigillata Strigonsis*. Jej odkrywcą był strzegomski lekarz i alchemik Johannes Schulz, zwany Janem Montanusem (Jan Górnik, 1532–1604), osobisty lekarz i doradca cesarza Rudolfa II, znanego opiekuna alchemików. Glina znajdowała się w zwietrzelinach skał w porzuconych sztolniach kopalni złota w Strzegomiu, w pobliżu miasta, na jednym z trzech bazaltowych wzniesień – wzgórze Św. Jerzego – w dawnej kopalni złota Montanus odkrył swoją ziemię. W 400-lecie śmierci odkrywcy, historyk strzegomski Krzysztof Kaszub wydał książeczkę poświęconą odkryciu. W tej wielce interesującej książce znaleźć można sporo szczegółów dotyczących odkrycia [3]. Zdobycie tej książki kosztowało nas nie mało trudu. Wprawdzie ukazała się drukiem zaledwie pięć lat temu, ale nigdzie nie można było już jej dostać. Wybraliśmy się więc autem do Strzegomia, ale i tam ani w miejscowej księgarni, ani nawet u Autora, nie zachował się choćby jeden egzemplarz druku. Na domiar złego, wracając omal nie wpadliśmy, wyprzedzając samochód ciężarowy na wąskiej, leśnej drodze, pod nadjeżdżającego z przeciwka tira, a potem jeszcze ugrzęźliśmy w zasadzce czekającej na kierowców na staromiejskim rynku w Świdnicy. Tymczasem pani Joasia Czyrek z naszej Wydziałowej Biblioteki sprowadziła bez trudu, posiłkując się pocztą elektroniczną, tę książkę z Biblioteki Miejskiej w Strzegomiu.

Ale wróćmy do Jana Montanusa. W roku 1568 Montanus napisał na zlecenie Strzegomskiej Rady Miejskiej broszurę, prezentującą tę strzegomską ziemię jej własności i lecznicze zastosowania. Nosi ona tytuł: *Judicium de terra sigillata Strigonsi*. Broszura miała posłużyć propagowaniu ziemi strzegomskiej jako leku. W krajowych zbiorach bibliotecznych nie ma tej pozycji. W Bibliotece Uniwersy-

teckiej we Wrocławiu zachowało się natomiast kolejne jej wydanie, z roku 1597. Na Rysunku 1 przedstawiamy tytułową stronicę tej broszurki. Z niej wyjęliśmy jedną stronicę tekstu, który tu podajemy w polskim tłumaczeniu. Jej treść dotyczy ogólnych wiadomości o ziemiach pieczętnych, a oparta ona jest, co wydaje się szczególnie interesujące, na poglądach Paracelsusa.



Rysunek 1. Strona tytułowa druku J. Montanusa o ziemi pieczętniej strzegomskiej

„O tej prawdziwej ziemi pieczętniej Teofrastus Paracelsus mówi przede wszystkim to, że – jak się wydaje – użył jej do swej przemiany bożek morski Glaukon (ze względu na jej – przez wielu dawnych i nowych badaczy – pożądane i poszukiwane ziele *gelautium*, jak to wspaniale wyśpiewał Owidiusz Naso, ów znakomity badacz przyrody).

Ona jest prawdziwym wapnem metalicznym, nie pierwszym, nie drugim, lecz trzecim, ostatecznym, i to specjalnie wydzielonym; jest to jakby proszek ziemny, odpieniony i odtłuszczony ze wszystkich złożonych kopalin, przeciw truciznie, śnieci zbożowej, i rozdrobniony prawie do (konsystencji) ziemi; znany jest tylko niektórym kopaczom w kopalniach. Posiada smarowność na kształt metalicznego mydła, nie jest nim jednak, i podobny jest do wapna złota, albo kamienia wapna złota, jest także podobny do białego nalotu górskiego (gliniki), zaiste:

Całkowicie pusta,
 Niczego w sobie nie przyjmująca,
 Także nie zawierająca w sobie trucizny.
 Stąd jest to najlepsza ochrona przed wszelkim
 Trującym podziemnym powietrzem, przez które wielu
 Cierpi.
 Dzięki temu jest pożyteczna dla górników w kopalniach,
 Przyciąga wszystko, także powietrze szkodliwe dla
 Przebywających wyżej
 I wszelką truciznę, wydaje także piękny zapach.
 Używa się jej jak znakomitego *bezoaru*,
 Albo odtrutki (pogromcy trucizny).
 Orła przyjęła za swój znak.

Czysta w ługu górskim, obecna w niektórych kopalinach, we wszystkich kolorach, tych oczywiście, jakie mają istniejące kopaliny i minerały, jest natomiast próżna” [4].

Nie można powiedzieć, byśmy ten tekst rozumieli dzisiaj, ale zapewne nie rozumiano go również w przeszłości. Zawilił językiem miał on epatować czytelników, wzbudzać podziw i szacunek dla kryjącej się (jak wierzono) w tych zawilosciach tajemnicy. Co jednak nas dziś może zainteresować, to fakt, że Montanus przedstawia się tu jako zwolennik nauk Paracelsusa. Dodajmy, że kilkakrotnie powołuje się w swojej broszurze na tego sławnego lekarza.

Dla naszych potrzeb musimy wyjaśnić, czym był wspominany w tym tekście *bezoar*, a w odniesieniu do *Terra sigillata* „znakomity bezoar”. Nazywano tak kuliste konkrety, znajdujące się w żołądkach przeżuwaczy. Miały działać moczopędnie i napotnie, stąd brało się przekonanie, że bezoar sprzyja uwalnianiu organizmu od trucizny. W wieku XVI, kiedy wielkiego znaczenia nabrały leki mineralne, pojawiło się wiele preparatów antymonowych, które, z uwagi na podobieństwo działania, nazwano także bezoarami. Było więc *Bezoardicum lunare*, mieszanina tlenku antymonu z chlorkiem srebra, uzyskiwana przez działanie azotanem srebra na „masło antymonowe” ($SbCl_3$). Było *Bezoardicum solare* (Sb_2O_4 ze śladami metalicznego złota), znano *Bezoardicum venereum*, *Bezoardicum saturninum*, *Bezoardicum martiale*, itd. Jeśli przytaczamy tutaj te miana, to dlatego, że kryją się w nich przecież jakieś pierwociny systematycznego nazewnictwa chemicznego, opartego na nazwach planet – patronów poszczególnych metali.

Odkrycie strzegomskiej ziemi pieczętnej, które przyniosło kasie miejskiej określone profity, wywołało całą serię podobnych odkryć w innych miastach śląskich. Wkrótce więc potem swoje ziemie lecznicze oferowała Legnica, Złotoryja, Piotrowice, Janowice, Srebrna Góra i Masłów.

Odkrycie ziemi leczniczej sławę przyniosło głównie Strzegomiowi. W wydanym w 1612 roku, w Krakowie, poemacie hutniczym Walentego Roździeńskiego, „*Officina terraria, abo huta i warstat z kuźniami szlachetnego dzieła żelaznego*”, w którym Roździeński zawarł szereg wiadomości o kopalinach śląskich, znalazła się też wiadomość o strzegomskiej ziemi pieczętnej. Ale najpierw kilka słów o autorze tego przedziwnego dziełka. Wywodził się on ze „starożytnego rodu Hercyngów”, a jego ojciec nazywał się Jakub Brusek. Urodził się około roku 1560, działał na Śląsku Opolskim, był współwłaścicielem kuźnicy żelaza w Roździeńcu (dzisiaj – Katowice-Szopienice), i stąd wziął nazwisko. Jego poemat zachował się w jedynej, unikalnym egzemplarzu. Odkrył ten druk profesor Roman Pollak, w latach jeszcze trzydziestych. Poemat niewprawnymi rymami sławi śląską ziemię pieczętną tak:

„Nadto, czasów niedawnych Terra sigillata
Zjawiała się w tej ziemi, rzecz godniejsza złota,
Która niewymownie ma dziwną własność w sobie
Przeciw jadom, truciznie i każdej chorobie.

Lepsza jest z doświadczenia niż lemneńska ona,
 Którą z onych tam starych z szybow wybierają
 Z wielkim kosztem, przez morze z lemneńskiej insuły,
 W której się okazał czasem fałsz niemały.
 Rodzi się ta szlachetna ziemia we świdnickim
 Księstwie, u Ostrej Góry, na gruncie strzegomskim,
 W górach starych a w szybiech, tam, kędy przed laty
 Niegdy kopali abo brali kruszec złoty,
 Którą z onych tam starych szybow wybierają
 A z dozorem urzędu zaraz z niej działają
 Kołacki tak okrągłe, jako talerzyki,
 Na których zaś pieczęcią miejską czynią znaki” [5].



Rysunek 2. Wizerunek preparatów handlowych
Terra sigillata Strigoniensis

Rzeczywiście, strzegomską ziemię pieczętowano wizerunkiem trzech wzgórz, gdzie ją odkryto. Na Rysunku 2 przedstawiamy wizerunek preparatów ziemi strzegomskiej, zapożyczony z dziełka K. Kaszuba. Współczesny Rożdzieńskiemu B. Keckermann, sławny uczony gdański, też wymienił ziemię śląską wśród ziem

medycznych, obok leonińskiej i ormiańskiej [6]. Nie wiemy natomiast, jaki rodzaj ziemi sprzedawano na początku XVI wieku w poznańskiej aptece, której inwentarz z 1528 roku się zachował. W zasobach apteki było półtora libry *terra sigillata*, po sześć groszy za libę, (libra to funt aptekarski, liczący 12 uncji) [7].

Sława ziemi strzegomskiej i jej odkrywcy trwała i później. Przebywający w Lesznie lekarz i przyrodnik, autor wielu podręczników dla szkół średnich i wyższych, Jan Jonston (1603–1675), tak pisał w dziele „O stałości natury” (*Naturae constantia*, 1632):

„A więc ziemia śląska jest podobna do armeńskiej czy lemnijskiej, a nawet jest bardziej wartościowa od nich. Odkrywca jej, Johannes Montanus Silesius, który napisał o niej książkę, twierdzi, że „z zarządzeniem Boga i natury złoto przemieniło się w znakomity lek, pomocny zwłaszcza przeciwko truciznom i jadom, nie mniej skutecznym niżeli lekarstwa, które za wielką cenę przyrządza się ze złota węgierskiego” [8].

Leszno leżało tuż za śląską granicą. Tam sława ziemi strzegomskiej mogła bez trudu docierać. Inaczej było w głębi Polski, gdzie poszukiwano własnych ziem leczniczych. Krótki ich opis znajdujemy w sławnym dziele Gabriela Rzączyńskiego,

(1664–1737) profesora kolegiów jezuickich w różnych miejscowościach kraju. Czytamy tam:

„ZIEMIE UZDRAWIAJĄCE są to – zdaniem wielu – pierwociny metaliczne, niezdolne do stopienia się w doskonały metal ze względu na brak pierwiastka rtęciowego. Nazywają się uzdrawiającymi, ponieważ zachowując postać ziemi, wykazują siłę leczniczą, szczerze im nadaną przez Stwórcę natury. TERRA SIGILLATA jest to tłusta, ciężka glinka o zapachu ziemi i ostrym smaku. Raz ma barwę czerwoną, raz białą, ciemną, żółtą, albo inną. Często uformowana jest w kulki. Jest oznaczana pieczęciami oraz wizerunkami i stąd nazywana jest pieczętną. Nazywano ją także Lemnijską, od wyspy Lemnos, a także *Milton Lemnia*, *Pieczeń Lemnijska* (*Sigillum Lemnium*), *Sphragis*, i tak dalej. Posiada wielką moc przeciw zarazie, złośliwym gorączkom, dyzenterii z biegunką, ukąszeniom jadowitych zwierząt. Na brzegach Wisły, pod Warszawą, kopie się tę ziemię, ale ponieważ ma mniejszą siłę, Tylkowski SJ w *Mineralogia curiosa* powiada, że stosuje się ją w podwójnych dawkach. Taka sama kopana jest na Wzgórzu Cmentarnym na Przedmieściu Świętego Wojciecha w Poznaniu. Używał jej doktor medycyny, od którego mam tę informację. W Inflantach jest koloru czerwonego, ukształtowana w pastylki o wadze jednej drachmy, ma wielkie wzięcie. BOLUS ARMENIA (glinka ormiańska) oznacza ziemię przywiezioną z Armenii, w istocie jest to substancja ziemna, barwy od bladej żółtej do czerwonawej, albo też innej, ciężka, tłusta, krucha. Wysusza się w najwyższym stopniu, i wedle przepisu Galena, Nattiolego, Brasawola, leczy dyzenterię, katar, ropne wyrzuty na twarzy. Mówią, że znajduje się ją na Babiej Górze, w pobliżu Krakowa i w Karpatach. Ziemię służącą leczeniu wydobywają na polskim Spiszu, pod miastem Waral mieszkańcy Podhradia” [9].

Jak podaje K. Kaszub, pierwsze badania składu chemicznego ziemi strzegomskiej wykonał we Wrocławiu, w roku 1856, F.W. Jaekel. Uznał on ziemię strzegomską za mieszaninę tlenków glinu, krzemu, wapnia i magnezu. Wynik ten niczego nie mówił o tym, skąd się wzięły lecznicze własności tej ziemi. Odpowiedzi mogą jednak udzielić badania składu mineralogicznego strzegomskiej *terra sigillata*. Badania takie, na 21 próbkach ziemi pieczętnej, wykonali W. Kowalski i A. Wiewiórka. Głównym składnikiem próbek okazał się montmorillonit, minerał glinokrzemianowy. Szeroko są znane sorpcyjne własności tego minerału, jego bardzo wysoka pojemność wymiany jonowej i skłonność do wchłaniania wody. Wysuszony w temperaturze 200°C montmorillonit wchłania wodę w takim samym stopniu jak P₂O₅. To w sposób oczywisty tłumaczy pomocną rolę ziemi strzegomskiej w biegunkach, a także zatruciach truciznami mineralnymi.

W próbkach strzegomskiej *terra sigillata* stwierdzono obecność uwodnionego szczawianu wapnia. Jego pochodzenie nie było dla badaczy jasne. I tutaj chcemy się podzielić własnym na ten temat domysłem. Być może na podłożu montmorillonitowym w starych sztolniach żyły sobie kolonie jednokomórkowych grzybów. Jak wiadomo, produkcja szczawianu wapnia jest charakterystyczną cechą ich metabolizmu. W swoim czasie przekonał się o tym nasz niedawno zmarły kolega, profesor

Andrzej Zabza. Wpadł on na pomysł niezwykle. Interesowały go feromony owadzie i zadał sobie pytanie, czy czasami feromony owada, którym się zajmował (nie pamiętam, o jaki gatunek owadzi chodziło) nie są produktami metabolizmu żyjących w jego przewodzie pokarmowym grzybów. Uruchomił więc u siebie w zakładzie hodowle tych mikroorganizmów. I rzeczywiście, w hodowli pojawiły się białe kryształki jakiegoś związku. Cóż, kiedy analiza rentgenowska wykazała, że był to szczawian wapnia.

Zresztą, przecież od wieków znany jest „kamień piwny”, osadzający się w pojemnikach na piwo. Jest to też czysty szczawian wapnia.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Rey, *Żywot człowieka poczciwego*, Warszawa 1903, T. 2, s. 18–19.
- [2] F. Drzewiński, *Początki mineralogii*, Wilno 1816, s. 227.
- [3] K. Kaszub, *Terra Sigillata de Strigovia*, Strzegom 2004.
- [4] D. *Johannis Montani Strigoniensis Silesii, de vera, nativa, omnisque; artis et fuci experte Terra Sigillata, ibidem per divinam gratiam a se inventa*, Wratislaviae 1597.
- [5] W. Rożdżeński, *Officina ferraria*, Oss., Wrocław 1962, s. 121–122.
- [6] B. Keckermann, *Systema physicum*, Hanoviae 1612.
- [7] W.W. Głowacki, *Apteka cyrulika poznańskiego z roku 1528*, *Kwartalnik Hist. Med.*, 1960, **23**, 467.
- [8] J. Jonston, *O stałości natury*, PWN, Warszawa 1960, s. 45.
- [9] G. Rzączyński, *Historia naturalis curiosa Regni Poloniae, Magniducatus Lithuaniae, annexarumque provinciarum*, *In Tractatus XX divisa*, Sandomierz 1721, s. 10–11.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 grudnia 2009

NOWE WYDAWNICTWA



Marcin Molski, *Chemia piękna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009. Wyd. 2, str. 420, oprawa miękka, foliowana, cena 59,90 zł.

Podkreślenie czynników decydujących o wyglądzie, elegancji stosowane było od dawna przez różne kultury. Trendy w pielęgnacji ciała, włosów, twarzy, zmieniały się wraz z historią ludzkości. Kosmetologia obecnie, stanowi interdyscyplinarną prężnie rozwijającą się dziedzinę badań. Ze względu na swoją specyfikę angażuje specjalistów z bardzo wielu dziedzin: chemików, biologów, fizyków. O dynamice rozwoju tej dyscypliny wiedzy świadczy m.in. pokaźna rozbudowa bazy dydaktycznej i laboratoryjnej.

Książka *Chemia piękna* autorstwa Marcina Molskiego to nowoczesna interesująca publikacja z zakresu chemii kosmetycznej, adresowana do studentów wyższych szkół kosmetycznych, medycznych, studentów chemii i biologii, a także profesjonalistów z branży kosmetycznej – szczególnie zainteresowanych składnikami zawartymi w kosmetykach i preparatach leczniczych wpływających na organizm i urodę człowieka.

Autor rozpoczyna podręcznik od interesującego szkicu historycznego oraz przedstawienia obecnego stanu wiedzy z chemii ogólnej. Kolejna część książki przedstawia charakterystykę pierwiastków i związków nieorganicznych w kosmetyce – tu na uwagę czytelnika może zasługiwać zarówno charakterystyka makroelementów uczestniczących w procesach metabolicznych, pełniących funkcję budulca (kości, włosów, zębów), jak i opis roli mikroelementów pełniących funkcję katalizatorów, regulatorów w procesach przemiany materii.

W porównaniu z bogactwem substancji mineralnych, węgiel stanowi główny budulec związków wchodzących w skład organizmów żywych. W obszernym rozdziale Kosmetyczna chemia organiczna zawarty jest przegląd najważniejszych związków organicznych i ich zastosowanie w kosmetyce. Zrozumienie znaczenia połączeń organicznych (alkoholi, fenoli, eterów, aldehydów, ketonów, kwasów karboksylowych i ich pochodnych, sacharydów), wchodzących w skład ważniejszych kosmetyków jest niezwykle istotne.

Nie bez znaczenia jest też DNA pełniący rolę nośnika informacji genetycznej organizmów żywych, RNA czy nukleotyd ATP. W preparatach kosmetycznych stosuje się hydrolizaty kwasów nukleinowych jako substancje nawilżające i ograniczające transepidermalną utratę wody.

Bardzo cennym rozdziałem *Chemii piękna* jest omówienie funkcji składników kosmetycznych, znaczenia i wykorzystania surowców roślinnych w kosmetyce. Wśród nich, ważne w kosmetologii to naturalne i organiczne substancje przeciwdrobnoustrojowe (cenne olejki eteryczne i ich aktywne komponenty). Nie bez znaczenia są preparaty stosowane do barwienia włosów i skóry, oraz substancje promieniochronne, czy też powierzchniowo czynne (mydła, detergenty, emulgatory).

Substancje zapachowe wyczuwane zmysłem powonienia mogą wywierać ogromny wpływ na samopoczucie człowieka. W książce, w klasie materiałów zapachowych autor omówił związki zapachowe syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego. Kolejną grupę stanowią kompozycje zapachowe pochodzenia

zwierzęcego takie jak: piżmo, cybet, kastoreum i ambra. W produkcji perfum substancje te wykorzystywane są jako utrwalacze zapobiegające zbyt szybkiemu ulatnianiu aromatu.

Marcin Molski w swoim podręczniku omówił też niektóre substancje egzogenne, m.in. witaminy oraz tak zwane quasi-witaminy, substancje o potencjalnym zastosowaniu leczniczym lub kosmetycznym.

W kolejnej części publikacji poświęconej substancjom naturalnym oraz bogatemu źródłu związków biologicznie czynnych stanowiących podstawę produkcji kosmetyków; autor oprócz szczegółowego omówienia takich surowców jak bursztyn, czosnek, drożdże, zielona herbata, produkty pszczele; opisuje możliwości ich stosowania.

Już średniowieczni jatrochemicy i alchemicy produkowali eliksiry młodości destylując, ekstrahując i macerując przeróżne rośliny, jady, tkanki zwierzęce i minerały. Współcześni naukowcy wykrywają coraz to inne substancje hamujące starzenie się organizmu. Temu zagadnieniu autor poświęcił rozdział Elikirsy młodości – z poznawczego punktu widzenia neurotoksyna botulinowa (botoks), kwas boswelliowy czy też embrioblasty (komórki pierwotne zarodkowej tkanki łącznej) zasługują na szczególną uwagę i zainteresowanie czytelnika.

Fitohormony – wykazujące działanie hormonalne to kolejna grupa związków przeciwdziałająca spadkowi aktywności fibroblastów, komórek odpowiedzialnych za syntezę kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego. Związki stosowane do wygładzania zmarszczek i niwelowania symptomów starzenia się skóry twarzy (implanty z kolagenu, kwasu hialuronowego i mlekowego) są ważne w pielęgnacji skóry. Czytelnik znajdzie bardzo interesujące rozważania na temat substancji pobudzających system odpornościowy organizmu (tak zwane immunostymulatory kosmetyczne) takich chociażby jak cynk, selen, aloes.

Mimo że dynamiczny rozwój nauki w zakresie możliwości wykorzystania bogactwa świata roślinnego jest ogromny, to jednak to, co wiemy o roślinach egzotycznych, jest niewspółmierne do tego, czego jeszcze nie wiemy. Część książki *Chemia piękna* stanowi informacja o roślinach amazońskich i andyjskich (ich budowie, zawartości związków chemicznych oraz leczniczym zastosowaniu w formie różnych preparatów kosmetycznych). Na uwagę czytelnika zasługuje zamieszczony na końcu książki praktyczny słownik naturalnych i syntetycznych składników kosmetycznych stanowiący nowatorskie zestawienie nomenklatury INCI zatwierdzonej przez Komisję Europejską.

Chemia piękna stanowi bardzo cenną pozycję na polskim rynku wydawniczym, dającą czytelnikowi bogaty, obiektywny materiał informacyjny o składnikach i związkach chemicznych (m.in. ich budowie) zawartych w kosmetykach wpływających na urodę oraz dobre samopoczucie.

O ponadprzeciętnych walorach recenzowanej książki stanowi aktualność i ranga podjętej tematyki, poziom naukowy, spójność podręcznika. Uznanie budzi logiczna sekwencja rozważań, interesująca treść poszczególnych rozdziałów.

Chemia piękna jest wartościowym i nowatorskim podręcznikiem. Polecam ją w zasadzie wszystkim jako bardzo pomocną w dociekaniach na temat wiedzy z chemii ogólnej, chemii stosowanej w życiu codziennym w higienie, kosmetyce, w działaniach profilaktycznych lub/i leczniczych.

Jadwiga Soloduch

Malcolm Sainsbury, *Chemia związków heterocyklicznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2009. Tłumaczenie z języka angielskiego (Zbigniew Zawadzki). ISBN 978-83-01-15620-6. Str. 147, oprawa miękka, lakierowana, cena 39 PLN.

Tytuł oryginału: *Heterocyclic Chemistry*® The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001.

Chemia związków heterocyklicznych Malcolma Sainsbury'ego jest tłumaczeniem książki tegoż autora, wydanej w języku angielskim w roku 2001 przez The Royal Society of Chemistry. W swojej istocie opracowanie odzwierciedla indywidualne spojrzenie autora na chemię tej grupy związków. Jest to dzieło niezbyt obszerne, liczące zaledwie 147 stron, ale ma swoją zaletę jako podręcznik bo daje się bez znużenia przeczytać od początku do końca. Zważywszy na ogromną liczebność związków heterocyklicznych, ich znaczenie przemysłowe i ważną rolę, którą odgrywają w procesach zachodzących w organizmach żywych; wiedza o nich powinna stanowić ważny element wykształcenia chemików na poziomie akademickim. Niestety narastające ostatnimi czasy spłylenie norm edukacji chemicznej powoduje zubożenie kształcenia w tej dziedzinie.

Recenzowana książka zapełnia lukę wśród polskojęzycznych podręczników poświęconych tej tematyce. Ostatni polskojęzyczny podręcznik wydano piętnaście lat temu – w międzyczasie na rynku wydawniczym ukazało się kilka książek anglojęzycznych, a pośród nich doskonała książka T. Eicher, S Hauptmann „*The Chemistry of Heterocycles*” Wiley-VCH Weinheim 2003 – podręczniki te nie są zbyt rozpowszechnione, w gronie polskich czytelników.

Autorzy związanych podręczników chemii związków heterocyklicznych zmuszeni są dokonać daleko idącej selekcji materiału z pominięciem innych, niekiedy nie mniej ważnych zagadnień co na ogół staje się przedmiotem dyskusji. Tak jest i w tym przypadku. Autor ograniczył swoje rozważania głównie do związków heteroaromatycznych z jednym heteroatomem. Wyjątek stanowi rozdz. 8 poświęcony niearomatycznym związkom o czteroczłonowych pierścieniach. Innym związkom niearomatycznym poświęcono zaledwie krótkie wzmianki w kilku rozdziałach. W pozostałych siedmiu rozdziałach omówione zostało nazewnictwo i zagadnienia ogólne, w tym aromatyczność (rozdz. 1), pirydyna, chinolina i izochinolina (rozdz. 2 i 3), sole piryliowe, piranony, zredukowane pirany, sacharydy i węglowodany (rozdz. 4), sole benzopiryliowe, kumaryny i chromony (rozdz. 5), piroł, furan i tiofen (rozdz. 6) i ich analogi ze skondensowanym pierścieniem benzenowym (rozdz. 7). Ograniczenie omawianych związków do heterocykli z jednym heteroatomem zawęża prezentowaną wiedzę z pominięciem tak ważnych grup jak diazole czy diazyny. Inna ułomność podręcznika wynika z faktu iż jego pierwotna wersja została opracowana przed dziesięć laty przez co literatura źródłowa do której odsyłany jest czytelnik jest na ogół niezbyt aktualna. Niektóre z przytoczonych reakcji np. wyczerpujące metylowanie Hofmanna (ss. 39, 130) mają już tylko znaczenie historyczne. Natomiast szkoda, że pominięto ważne współczesne sposoby tworzenia pierścieni heterocyklicznych, oparte o reakcje cykloaddycji czy też wykorzystanie do tego celu związków palladu (0).

Do lektury podręcznika zachęca logiczna i przejrzysta narracja zilustrowana dobrze opracowanymi przykładami reakcji. Zaprezentowanemu materiałowi towarzyszą zadania, których rozwiązania przytoczono na końcu książki. Podręcznik pozbawiony jest błędów merytorycznych, a jego tłumaczenie dobrze oddaje myśl autora i co ważne, jest dobrze dopracowane pod względem językowym i redakcyjnym. Użyta nomenklatura jest poprawna – odpowiada regułom obowiązującym w polskim nazewnictwie chemicznym.

Uważam, że książkę Malcolma Sainsbury'ego można polecić wszystkim tym, którzy pragną rozszerzyć swoją wiedzę z chemii organicznej poza zakres materiału programowego, omawianego w podstawowych podręcznikach tego przedmiotu. Polecam ją głównie studentom studiującym na kierunkach chemii, farmacji, biochemii oraz wykładowcom opracowującym wykłady monograficzne.

Przekazany mi do oceny egzemplarz książki po dwukrotnym przeczytaniu zamienił się w stos luźnych kartek, co nie wystawia najlepszego świadectwa polskiemu Wydawcy, tym bardziej że nie jest to pierwszy jego podręcznik niedopracowany pod względem technicznym.

Jacek Młochowski

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Podziękowania za współpracę w roku 2009

Redakcja *Wiadomości Chemicznych*, w imieniu całego Komitetu Redakcyjnego składa serdeczne podziękowania wszystkim osobom i instytucjom za zaangażowanie oraz aktywność na rzecz rozwoju Czasopisma w roku 2009.

W ubiegłym roku uzyskaliśmy wsparcie finansowe od:

- Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach,
 - Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej,
 - Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
 - Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej,
 - Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
 - Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu,
 - J. M. Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego;
- w bieżącym roku, jako pierwszy ośrodek wsparł nasze czasopismo,
- Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej.

Jesteśmy wdzięczni wszystkim w/w, za przyłączenie się do akcji wspierania Czasopisma poprzez zamieszczania informacji o swojej działalności na forum *Wiadomości Chemicznych*.

Jednocześnie zachęcamy inne polskie ośrodki chemiczne, aby również zechciały uczestniczyć w tej inicjatywie promującej naukę w Polsce.

Podziękowania dla pani Barbary Latko za pełnienie funkcji sekretarza redakcji *Wiadomości Chemicznych*

Składamy wyrazy podziękowania Pani Barbarze Latko za kilkuletnią pracę w pełnieniu obowiązków sekretarza naszej redakcji. Dziękujemy za ogromne zaangażowanie, profesjonalizm i znakomitą organizację pracy.

Informacje bieżące

Informujemy, że od roku 2010, rezygnujemy z przesyłania do Autorów bezpłatnych odbitek manuskryptu – w zamian będziemy przysyłać elektroniczną wersję opublikowanej pracy. Decyzja ta została podjęta na prośbę wielu autorów jak również ze względu na obniżenie kosztów wydawania czasopisma.

Redakcja „Wiadomości Chemiczne”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2010

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2010 r. wynosi **168 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz **78 zł** dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. 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 2010 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

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

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

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

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

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

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

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

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych 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. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

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

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

Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk, cena 18 zł.

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.

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

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej.

Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

„Wiadomości Chemiczne” nie przyjmują do druku oryginalnych prac własnych. W wyjątkowych przypadkach mogą zostać wydane prace przeglądowe dotyczące dorobku własnego autora (np. nowo mianowanego profesora lub laureata ważnej nagrody) albo prace podsumujące dorobek Instytutu, Wydziału itp. Zamiar złożenia takiego artykułu do druku powinien być jednak wcześniej uzgodniony z Redakcją.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby dla „Wiadomości Chemicznych” taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją i przesłać pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) lub zwykłą informację zawierającą tytuł przygotowywanej publikacji oraz przybliżoną liczbę stron, tabel i rysunków itp.

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

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) oraz **równoległe** – pocztą zwykłą (na adres: Redaktor Naczelny/Sekretarz Redakcji „Wiadomości Chemicznych”; ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław), dwa egzemplarze jednostronnego wydruku komputerowego publikacji z dołączoną płytą CD, zawierającą tekst, tabele i ilustracje.

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

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

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

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

Rysunki (mogą być kolorowe, ale trzeba się liczyć z dopłatą do druku) w formie wydruku należy przesłać w dwóch egzemplarzach. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. Na odwrocie należy wpisać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku – ten sam, który w odpowiednim miejscu został wpisany w manuskrypcie. Na osobnej stronie dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołą-

czyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

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

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

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przesyłane recenzentom. Artykuły niezakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu.

Autorzy zobowiązani są do wykonania jednej korekty tekstu.

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

Redakcja
„Wiadomości Chemicznych”