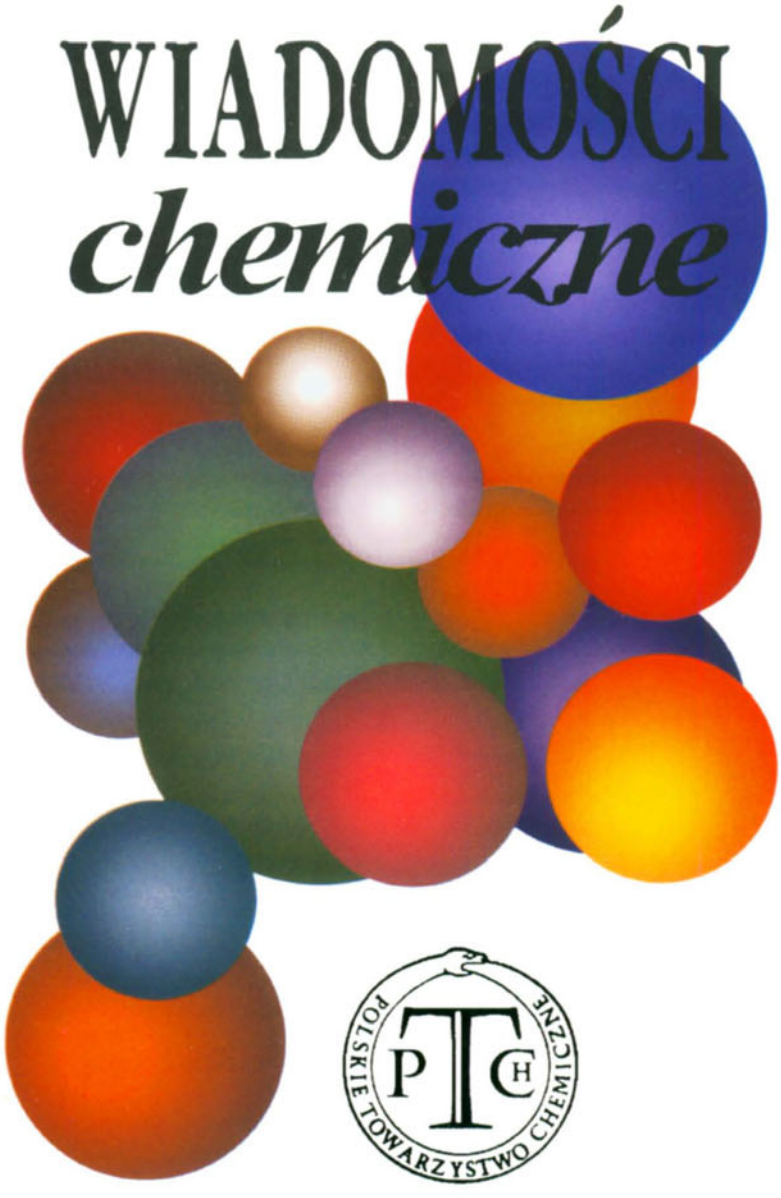
WIADOMOŚCI *chemiczne*



POLSKIE TOWARZYSTWO CHEMICZNE

PROF. DR GEORG ZUNDEL (1931–2007) – WSPOMNIENIE

PROF. DR GEORG ZUNDEL (1931–2007) – AN OBITUARY

STRESZCZENIE

Przedstawiamy krótki życiorys naukowy oraz dorobek naukowy prof. G. Zundela, wybitnego fizyko-chemika niemieckiego. Jego główne osiągnięcia naukowe dotyczyły silnych wiązań wodorowych, spektroskopii układów z wiązaniem wodorowym, a zwłaszcza roli podwójnego minimum potencjału w powstawaniu kontinuów. Większość prac dotyczyła układów biologicznych lub prostych związków będących modelami dla tych układów.

W literaturze światowej najprostszy zhydratowany jon wodorowy $H_5O_2^+$ przyjął nazwę kationu Zundela.

ABSTRACT

A short biography and scientific achievements of Professor Georg Zundel, outstanding German physico-chemist, are presented. His main successes are related to strong hydrogen bonds, spectroscopy of strong specific interactions and particularly the role of a double minimum potential in creation of continua. Majority of papers were devoted to biological systems and simpler compounds modelling these systems. In the world literature the simplest hydrated proton $H_5O_2^+$ is commonly named as the Zundel cation.

Bogumił Brzezinski, Wydział Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza, Poznań
Lucjan Sobczyk, Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

Profesor Georg Zundel urodził się 17 maja 1931 roku w Tybindze. Po ukończeniu miejscowego Uhland – Gimnazjum w Tybindze w roku 1952 rozpoczął studia na Wydziale Fizyki na Uniwersytecie w Monachium. Od 1954 roku, po siedmiu miesiącach podróży po Indiach, kontynuował studia na Uniwersytecie we Frankfurcie nad Menem. Pracę dyplomową wykonał w zespole prof. H. Nollera, z którym do ostatnich lat swojego życia pozostawał w wielkiej przyjaźni. Prof. H. Noller zaproponował dyplomantowi badania otoczonych powłoką ziaren wymieniacza jonowego jako modelu elementarnej komórki biologicznej. Po studiach powrócił do Instytutu Chemii Fizycznej Uniwersytetu w Monachium, kierowanego przez prof. G.M. Schwaba. Nowatorskie zastosowanie metody spektroskopii w podczerwieni pozwoliło na rozwiązanie szeregu ważnych zagadnień efektów hydratacyjnych i ruchliwości protonów, stanowiąc podstawę dla pracy doktorskiej pod tytułem: „IR Untersuchung von Ionenaustauschern auf Polystyrolbasis – insbesondere im Hinblick auf die Ionenhydratation und Protonenbeweglichkeit" (Badania w podczerwieni wymieniaczy jonowych na bazie polistyrenu ze szczególnym uwzględnieniem hydratacji jonów i ruchliwości protonów), obronionej w 1961 roku. Dalsze badania spektroskopowe wykonywane w Instytucie Chemii Fizycznej Uniwersytetu w Monachium doprowadziły Prof. G. Zundela do pracy habilitacyjnej zakończonej kolokwium w 1967 roku i opublikowanej w postaci monografii książkowej pt.: „Hydratation and Intermolecular Interactions", wydanej przez Academic Press w 1969 roku. Książka ta została w 1972 roku wydana również w języku rosyjskim przez Wydawnictwo MIR. Po habilitacji działalność naukowa i dydaktyczna Prof. G. Zundela nadal była związana z Instytutem Chemii Fizycznej Uniwersytetu w Monachium, aż do przejścia na emeryturę w 1996 roku. W 1978 otrzymał tytuł profesora w dziedzinie chemii biofizycznej. Jest autorem i współautorem 314 publikacji naukowych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz szeregu opracowań monograficznych, wypromował 50 doktorantów. Jego prace wniosły ogromny wkład w wyjaśnienie mechanizmu transferu protonów w wiązaniach wodorowych a także ich przejawów spektroskopowych. Wprowadził do literatury pojęcie kontinuum, które zapisało się w literaturze jako „Zundel's continuum". W literaturze utrwaliły się także inne pojęcia jak: „Zundel's polarizability" i „Zundel's cation". Za całokształt działalności naukowej i pokojowej prof. G. Zundel otrzymał najwyższe odznaczenie niemieckie „Bundesverdienstkreuz".

Prof. Georg Zundel był wielkim przyjacielem Polski i Polaków. Nawiązał i prowadził szeroką współpracę z wieloma uczelniami w Polsce, a od 1985 roku był honorowym członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Dorobek naukowy G. Zundela dotyczy szerokiego kręgu zagadnień oddziaływań molekularnych poprzez silne wiązania wodorowe zarówno homo-, jak i hete-

ronuklearne, również wspomagane ładunkiem. Główną techniką badawczą były widma absorpcyjne w podczerwieni, ale wśród prac opublikowanych nie brakuje też zastosowania widm NMR. Wiele z opublikowanych prac powiązanych jest z zastosowaniem metod teoretycznych. Dotyczy to nie tylko teoretycznej analizy widm IR, ale także podstawowych zagadnień potencjału oddziaływań i, w szczególności, potencjałów opisujących ruch protonu.

Niemal wszystkie prace Zundela mają związek z układami biologicznymi. Wiele z nich dotyczy bezpośrednio molekuł biologicznie aktywnych, wiele innych molekuł będących wzorcami dla oddziaływań biologicznych.

Wykaz wszystkich publikacji Zundela można znaleźć w opracowaniu biograficznym [1]. W niniejszym opracowaniu ograniczyliśmy się do wyboru najważniejszych pozycji, które – jak nam się wydaje – w pełni odzwierciedlają jego ogromny dorobek. Wśród nich należy wyróżnić książki i opracowania monograficzne [8, 15, 17, 19, 21, 33, 27, 36, 37, 44, 49, 50, 59–62, 70, 80].

Swoją karierę naukową pod kierunkiem G.M. Schwaba, rozpoczął od badań polielektrolitów i wymieniaczy jonowych oraz membran [2–5, 7, 38], które doprowadziły Go do jednego z głównych tematów tj. hydratowanych protonów [6]. Wkład Zundela do tego tematu był tak duży, że w literaturze światowej zaczęło nazywać jony $H_5O_2^+$ kationami Zundela. Analiza tego kationu doprowadziła do fundamentalnych sformułowań na temat konsekwencji podwójnego minimum potencjału dla ruchu protonu w widmach absorpcyjnych w podczerwieni i powstawania tzw. kontinuów. Istotą zjawiska jest rozszczepienie tunelowe poziomów oscylacyjnych i superpolaryzowalność krótkich wiązań wodorowych i wynikające stąd oddziaływania z otoczeniem [9, 10, 12, 13, 20, 24, 26, 35, 52, 58, 72]. Zundel sformułował przy tym pojęcie protonowych sił dyspersyjnych, przez analogię do oddziaływań wynikających z polaryzowalności elektronowej [10, 11]. W pracach nawiązujących do tych zagadnień można znaleźć wiele wyników zmierzających do określenia kształtu potencjału w konkretnych układach, a także problemu symetrii układów i pojedynczego szerokiego minimum [18, 22, 28, 40, 42, 54, 71]. Nader istotnym zagadnieniem w realnych układach skondensowanych był wpływ otoczenia i ogólnie – pola elektrycznego na wiązania wodorowe [14, 32, 39, 46, 47, 57, 66, 74, 78]. Do istotnych wyników uzyskanych przez Zundela trzeba zaliczyć dwie prace doświadczalne nad rozpraszaniem Rayleigha, dowodzące istnienia superpolaryzowalności pochodzącej od jonów $H_5O_2^+$ [30, 31]. Kilka bardzo ważnych prac Zundel poświęcił ogólnym zagadnieniom wewnątrzmolekularnego i wewnątrzkompleksowego przenoszenia protonu w modelowych układach i termodynamicznego opisu zjawiska [39, 40, 42, 54, 57, 78]. Warto też wspomnieć o jego wkładzie do metodyki badań silnie absorbujących cienkich warstw [16].

Szereg istotnych, jak się wydaje, prac było poświęconych widmom IR układów z mostkami kationowymi – analogami wiązań wodorowych. Zundel pokazał, że w takich przypadkach występują również kontinua w dalekiej podczerwieni, które powiązał z niezwykłą polaryzowalnością jonową [41, 48, 51, 63, 67, 77]. Do waż-

nych prac Zundela można zaliczyć te, które były poświęcił kolektywnym aspektom wiązań wodorowych [53, 56, 64, 68, 73, 75, 76, 79]. Zundelowi wraz z współpracownikami udało się poprzez docelowe syntezy dobrać takie układy gdzie występują wewnątrz molekuły sieci sprzężonych mostków wodorowych. Wreszcie warto w tym miejscu wspomnieć o wynikach Zundela pokazujących wpływ wiązań wodorowych na sprzężenie π-elektronowe [45, 55, 29].

Jak już powiedzieliśmy na początku, najbardziej pasjonowały Zundela układy biologiczne. Do najważniejszych osiągnięć w tej dziedzinie trzeba zaliczyć problemy przekaźników różnych sygnałów poprzez mostki wodorowe [69, 25, 23], a zwłaszcza przenoszenie protonu w bakteriorodopsynie [34, 43, 65].

WYBRANE PUBLIKACJE G. ZUNDELA

[1] G. Zundel, „Es muss viel geschehen", Verlag für Wissenschafts – und Regionalgeschichte, Berlin, 2006.

[2] G. Zundel, H. Noller, G.-M. Schwab, IR-Untersuchungen über Hydratation und Protonenbeweglichkeit in Ionenaustauschern, Z. Elektrochem., Ber Bunsenges, 1961, **65**, 703.

[3] G. Zundel, G.-M. Schwab, Foils of Polystyrenesulfonic Acid and its Salts. VIII. Low-Temperature Investigation of the Infrared Continuous Absorption Spectrum of Aqueous Acid Solutions, J. Phys. Chem., 1963, **67**, 771.

[4] G. Zundel, A. Murr, Nachweis der „zweiten" Hydrathülle durch eine IR-spektroskopische Untersuchung von Polyelektrolyten, Z. Physik. Chem. (Leipzig), 1966, **233**, 415.

[5] G. Zundel, Herstellung und Infrarot-Spektren von Folien aus Polystyrol-Selenon-Säure, Polystyrol-Selenin-Säure und deren Salze, Z. Naturfosch., 1968, **23b**, 119.

[6] G. Zundel and H. Metzger, Energiebänder der tunnelnden Überschuβ-Protonen in flüssigen Säuren – eine IR-spektroskopische Untersuchung der Natur der Gruppierungen $H_5O_2^+$, Z. Physik. Chem. (Frankfurt), 1968, **58**, 225.

[7] G. Zundel, Hydratstruktur und zwischenmolekulare Wechselwirkung in Polyelektrolyten, Angew. Chem., 1969, **81**, 507; Internat. Ed., 1969, **8**, 499.

[8] G. Zundel, *Hydration and Intermolecular Interaction, Infrared Investigations with Polyelectrolyte Membranes*, Academic Press, New York, N.Y. (1969).

[9] E.G. Weidemann, G. Zundel, Field-dependent Mechanism of Anomalous Proton Conductivity and the Polarizability of Hydrogen Bonds with Tunneling Protons. Z. Naturforsch, 1970, **25a**, 627.

[10] G. Zundel, E.G. Weidemann, Tunnel Frequency Dependence of the IR Continuous Absorption and the Proton Dispersion Forces, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1970, **66**, 1941.

[11] G. Zundel, J. Mühlinghaus, Proton Dispersion Forces and Continuous Energy Level Distribution of Protons in the Hydrogen Bonds of Semi-protonated Poly-L-Histidine and with Model Substances, Z. Naturforsch, 1971, **26b**, 546.

[12] R. Janoschek, E.G. Weidemann, H. Pfeiffer, G. Zundel, Extremely High Polarizability of Hydrogen Bonds, J. Amer. Chem. Soc. 1972, **94**, 2387.

[13] D. Schiöberg, G. Zundel, Very Polarizable Hydrogen Bonds in Solutions of Bases having IR Absorption Continua, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 1973, **69**, 771.

[14] E.G. Weidemann, G. Zundel, Influence of the Environment on Proton Transfer in Symmetrical Hydrogen Bonds, Z. Naturforsch, 1973, **28a**, 236.

[15] G. Zundel, *Hydration and Intermolecular Interaction – Infrared Spectroscopic Investigations of Polyelectrolyte Membranes* [extended Russian edition], Mir, Moskau (1972).

[16] K.P. Hofmann, G. Zundel, Ein Verfahren zur Herstellung von Schichten reproduzierbarer Dicke auf Trägern, Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 1974, **78**, 1244.

[17] G. Zundel, Easily Polarizable Hydrogen Bonds – Their Interactions with the Environment – IR Continuum and Anomalous Large Conductivity, [w:] „*The Hydrogen Bond – Recent Developments in Theory and Experiments*", Vol. II, Ch. 15, P. Schuster, G. Zundel and C. Sandorfy, Eds., North Holland Publ. Co., 1976, pp. 683–766.

[18] B. Brzezinski, G. Zundel, „Symmetrical" and Asymmetrical $(NH\cdots H)^+$ Hydrogen Bonds, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 1976, **72**, 2127.

[19] G. Zundel, The Influence of Cations on the Conformation of Biological Membranes and Macromolecular – Infrared Investigations, [w:] „*Charged Gels and Membranes II*", E. Selegny, Ed., Vol. II, Reinhold Reidel Publ. Co., Dordrecht, 1976, pp. 121–141.

[20] A. Hayd, E.G. Weidemann, G. Zundel, Theory of IR Continua with Polarizable Hydrogen Bonds, I. Aqueous Solutions of Strong Acids, J. Chem. Phys., 1979, **70**, 86.

[21] G. Zundel, A. Murr, Influence of Transition Element lons on the Hydrogen Bonds Formed by their First Hydration Shell, [w:] „*Metal-Ligand Interactions in Organic Chemistry and Biochemistry*", part 2, B. Pullmann and N. Goldblum, Eds., Reidel Publ. Co. Dordrecht, Holland, 1977, pp. 264–271.

[22] G. Zundel, A. Nagyrevi, Polarizability, Proton Transfer and Symmetry of Energy Surfaces of Phenol-n-Propylamine Hydrogen Bonds. Infrared Investigations, J. Phys. Chem., 1978, **82**, 685.

[23] G. Zundel, The Charge Relay System in Chymotrypsin – IR Studies of Models for the Hydrogen Bonds, J. Mol. Struct., 1978, **45**, 55.

[24] R. Janoschek, A. Hayd, E.G. Weidemann, M. Leuchs, G. Zundel, Calculated and Observed Isotope Effects with Easily Polarizable Hydrogen and Deuterium Bonds, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 1978, **74**, 1238.

[25] B. Brzezinski, G. Zundel, An Intramolecular Charge Relay System via Easily Polarizable Hydrogen Bonds in N-(4-Methyl-2-Pyridyl)Amide of 6-Methyl Picolinic Acid N-Oxide, J. Phys. Chem., 1979, **83**, 1787.

[26] G. Zundel, E.G. Weidemann, Comment on the „Phonon Theory of IR Continua", Chem. Phys., 1979, **44**, 427.

[27] G. Zundel, The Nature of Hydrogen Bonds and Structure with Solvated Excess and Defect Protons in Liquids, [w:] Acta Universitatis Wratislaviensis 425, *Dielectric and optical aspects of molecular interactions*, Vol. IV, 5, Wrocław, pp. 5–18 (1978).

[28] B. Brzezinski, G. Zundel, Steric Conditions and Polarizability of Structurally Symmetrical Intramolecular Hydrogen Bonds in R-Di-(α-Pyridyl) Hydroperchlorates, Chem. Phys. Letters, 1980, **70**, 55.

[29] B. Brzezinski, G. Zundel, Proton Polarizability of Intramolecular Hydrogen Bonds with Molecules Non-Conjugated and Conjugated between Donor and Acceptor Groups, Chem. Phys. Letters, 1980, **75**, 500.

[30] W. Danninger, G. Zundel, Intense Depolarized Rayleigh Scattering in Raman Spectra of Acids Caused by Large Proton Polarizabilities of Hydrogen Bonds, J. Chem. Phys., 1981, **74**, 2769.

[31] W. Danninger, G. Zundel, Reorientational Motion and Orientational Correlation Functions in Weakly Associated Organic Liquids-Determined by Depolarized Rayleigh Scattering, Chem. Phys. Letters, 1982, **90**, 69.

[32] J. Fritsch, G. Zundel, Influence of the Polarity of the Environment on Easily Polarizable $OH\cdots N \leftrightarrow O^-\cdots H^+N$ Hydrogen Bonds, J. Phys. Chem., 1981, **85**, 556.

[33] G. Zundel, Polare Wechselwirkungen, Hydratation, Protonenleitung und Konformation biologischer Systeme – Infrarot – Untersuchungen, [w:] „*Biophysik – ein Lehrbuch*", W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, Eds., Springer Berlin, 1982, 253–265.

[34] H. Merz, G. Zundel, Proton Conduction in Bacteriorhodopsin via a Hydrogen Bonded Chain with Large Proton Polarizability, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1981, **101**, 540.

[35] B. Brzezinski, G. Zundel, Electronic Structure of Molecules and Infrared Continua Caused by Intramolecular Hydrogen Bonds with Great Proton Polarizability, J. Phys. Chem., 1982, **86**, 5133.

[36] G. Zundel, J. Fritsch, Interactions and Structure of Ionic Solvates – Infrared Results, [w:] „*Chemical Physics of Solvation*", Vol. II, Ch. 2, R.R. Dogonadze, E. Kalman, A.A. Kornyshev, J. Ulstrup, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 21–96.

[37] G. Zundel, J. Fritsch, Infrared Spectroscopic Results on Solvate Structures in Crystals, [w:] „*Chemical Physics of Solvation*", Vol. II, Ch.3, R.R. Dogonadze, E. Kalman, A.A. Kornyshev, J. Ulstrup, Eds. Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 97–117.

[38] G. Zundel, Hydrate Structures, Intramolecular Interactions and Proton Conducting Mechanism in Polyelectrolyte Membranes – Infrared Results, J. Membrane Science, 1982, **11**, 249.

[39] M. Rospenk, J. Fritsch, G. Zundel, Solvent Effect on the Proton-Transfer Equilibria and Thermodynamic Data of the Hydrogen Bond in a Mannich Base, J. Phys. Chem., 1984, **88**, 321.

[40] G. Albrecht, G. Zundel, Phenol-Amine Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizabilities. Position of the $OH\cdots N \leftrightarrow O^{-}\cdots H^{+}N$ Equilibrium as a Function of the Donor and Acceptor, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1984, **180**, 553.

[41] B. Brzezinski, G. Zundel, Far IR continua caused by large polarizabilities of intramolecular $N^{+}Li\cdots N \leftrightarrow N\cdots Li^{+}N$ bonds due to cation motion, J. Chem. Phys., 1984, **81**, 1600.

[42] U. Böhner, G. Zundel, Proton Potentials and Proton Polarizability in Carboxylic Acid – Trimethylamine Oxide Hydrogen Bonds as a Function of the Donor and Acceptor Properties: IR Investigations, J. Phys. Chem., 1986, **90**, 964.

[43] H. Merz, G. Zundel, Thermodynamics of Proton Transfer in Carboxylic Acid-Retinal Schiff Base Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1986, **138**, 819.

[44] G. Zundel, Proton Polarizability of Hydrogen Bonds: Infrared Methods, Relevance to Electrochemical and Biological Systems, [w:] „*Biomembranes, Protons and Water: Structure and Translocation*" (a Volume of Methods in Enzymology), Vol. 127, part 0, L. Packer, Ed., Academic Press, New York, 1986, pp. 439–455.

[45] B. Brzezinski, G. Zundel, Influence of Conjugation of Donor and Acceptor on the Properties of Hydrogen Bonds of cis and trans Isomers, Chem. Phys. Letters, 1985, **115**, 212..

[46] M. Eckert, G. Zundel, Proton Polarizability, Dipole Moment and Proton Transitions of an $AH\cdots B \leftrightarrow A^{-}\cdots H^{+}B$ Proton Transfer Hydrogen Bond as a Function of an External Electrical Field: an *ab initio* SCF Treatment, J. Phys. Chem., 1987, **91**, 5170.

[47] M. Eckert, G. Zundel, Energy Surfaces and Proton Polarizability of Hydrogen-Bonded Chains: an *ab initio* Treatment with Respect to the Charge Conduction in Biological Systems, J. Phys. Chem., 1988, **92**, 7016.

[48] B. Brzezinski, G. Zundel, R. Krämer, Intermolecular Bonds between N-Oxides with Fluctuating Li^{+} ions: an FT-IR Study, Chem. Phys. Letters, 1988, **146**, 138.

[49] G. Zundel, Proton Transfer in and Proton Polarizability of Hydrogen Bonds: IR and Theoretical Studies Regarding Mechanisms in Biological Systems, J. Mol. Struct. 1988, **177**, 43.

[50] G. Zundel, Proton Polarization of Hydrogen Bonds – Its Significance in Electrochemistry and Biology, [w:] Acta Universitatis Vratislaviensis 843, *Dielectric and optical aspects of molecular interactions VIII*, 73–112, (1987).

[51] B. Brzezinski, G. Zundel, Fluctuation of Be^{2+} between Four Acceptors and Be^{2+} Polarizability of Cation Bonds: a FT-IR Study, J. Phys. Chem., 1990, **94**, 4772.

[52] B. Brzezinski, J. Olejnik, G. Zundel, Intermolecular Bonds with Double Minimum Potential Wells, Chem. Phys. Letters, 1990, **167**, 11.

[53] B. Brzezinski, G. Zundel, R. Krämer, An Intramolecular Chain of Four Hydrogen Bonds with Proton Polarizability due to Collective Proton Motion, Chem. Phys. Letters, 1989, **157**, 512.

[54] G. Zundel, Th. Ruhland, Proton Polarizability of $N^+H\cdots N \leftrightarrow N\cdots H^+N$ Hydrogen Bonds and Far-infrared Continua with Nitrogen-base System – a FT-IR Study, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1990, **86**, 3557.

[55] B. Brzezinski, J. Olejnik, G. Zundel, Retinal Schiff bases with aromatic and aliphatic amino-acids – the extremely different nature of the intramolecular hydrogen bond between the two types of compounds, J. Mol. Struct., 1992, **270**, 11.

[56] B. Brzezinski, G. Zundel, An Intramolecular Chain of Four Hydrogen Bonds in 1, 11, 12, 13, 14-Penta-hydroxymethylpentacene Tetrabutylammonium Salt, Chem. Phys. Letters, 1991, **178**, 138.

[57] Th. Keil, B. Brzezinski, G. Zundel, Far-Infrared Investigation of the Proton Transfer with Substituted Phenol + N-Mono- and N-N--Dioxides as a Function of the pK_a of the Phenols, J. Phys. Chem., 1992, **96**, 4421.

[58] E. Kryachko, M. Eckert, G. Zundel, An Approach, Still Analytical, to the Study of Proton Tunneling in Symmetrical Hydrogen Bonds, J. Mol. Struct., 1992, **270**, 33.

[59] G. Zundel, Proton Transfer and Proton Polarizability of Hydrogen Bonds and Hydrogen-Bonded Systems in Electrochemistry, Chemistry Biology and Surface, [w:] „*Physics of Many Particle Systems*", Vol. 19, A.S. Davydov, Ed. Naukovce Dumika, Kiev, 1991, pp. 77–97.

[60] G. Zundel, B. Brzezinski: Proton Polarizability of Hydrogen Bonded Systems due to Collective Proton Motion – with a Remark to the Proton Pathways in Bacteriorhodopsin, [w:] „*Proton Transfer in Hydrogen-Bonded Systems*", T. Bountis, Ed., Plenum Press, New York, 1992, pp. 153–166.

[61] G. Zundel, Hydrogen Bonded Systems with Large Proton Polarizability due to Collective Proton Motion as Pathways of Protons in Biological Systems, [w:] „*Electron and Proton Transfer in Chemistry and Biology*", A. Müller. H. Ratajczak, W. Junge, E. Diemann, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1992, pp. 313–327.

[62] G. Zundel, Proton Polarizability and Proton Transfer Processes in Hydrogen Bonds and Cation Polarizabilities of Other Cation Bonds – Their Importance to Understand Molecular Processes in Electrochemistry and Biology, [w:] „*Trends in Physical Chemistry*", J. Menon, Ed., Publ. Research Trends, Trivandrum, India, Vol. 3, 1992, pp. 129–156.

[63] G. Zundel, B. Brzezinski, J. Olejnik, On Hydrogen and Deuterium Bonds as well as on Li^+, Na^+ and Be_2 Bonds: IR Continua and Cation Polarizabilities, J. Mol. Struct., 1993, **300**, 573.

[64] G. Zundel, Hydrogen-Bonded Chains with Large Proton Polarizability as Charge Conductors in Proteins – Bacteriorhodopsin and the F_o Subunit of the E. Coli, J. Mol. Struct., 1994, **322**, 33.

[65] B. Brzezinski, J. Olejnik, G. Zundel, Active Site of Bacteriorhodopsin – FT-IR and ^{1}H.NMR Studies using a Model Molecule, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1994, **90**, 1095.

[66] A. Rabold, R. Bauer, G. Zundel, Structurally Symmetrical $N^+H\cdots N \leftrightarrow N\cdots H^+N$ Bonds. The Proton Potential as a Function of the pKa of the N-Base. FT-IR Results and Quantum Chemical Calculations, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 1889.

[67] B. Brzezinski, G. Schröder, A. Rabold, G. Zundel, H^+, Li^+ and Na^+ Polarizabilities in 1:1 Crown Ether Cation Complexes. A FT-IR Study, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 8519.

[68] B. Brzezinski, P. Radziejewski, G. Zundel, A Model System for the Hydrogen-Bonded Chain with Large Proton Polarizability Present in the L_{550} Intermediate of Bacteriorhodopsin – an FT-IR Study, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1995, **91**, 3141.

[69] F. Bartl, D. Palm, R. Schinzel, G. Zundel, Proton Relay System in the Active Site of Maltodextrin phosphorylase via Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability – an FT-IR Difference Spectroscopy Study, Eur. J. Biophys., 1999, **28**, 200.

[70] G. Zundel, Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability in Proteins-Studies with Model Systems, Transworld Research Network (Ed.), Trivandrum, India, Recent Res. Devel., Physical Chem. 1998, **2**, 501.

[71] S. Geppert, A. Rabold, G. Zundel, M. Eckert, Theoretical Treatment of the Spectroscopical Data of a Strong Hydrogen Bond with a Broad Single-Minimum Potential, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 12220.

[72] G. Zundel, The Far Infrared Vibration of Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability, J. Mol. Struct., 1996, **381**, 23.

[73] B. Brzezinski, H.Urjasz, G. Zundel, A Cyclic Hydrogen-Bonded System with Large Proton Polarizability in Calixarenes – an FT-IR Study, J. Phys. Chem., 1996, **100**, 9021.

[74] B. Brzezinski, G. Zundel, The Role of Water and Proton Transfer Processes in Hydrogen-Bonded Chains with Large Proton Polarizability, Faraday Discussion 1996, **103**, 363.

[75] B. Brzezinski, H. Urjasz, G. Zundel, A Model Molecule of the Hydrogen-Bonded Chain in the Active Site of Bacteriorhodopsin, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996, **219**, 273.

[76] G. Zundel, B. Brzezinski, Hydrogen-Bonded Chains with Large Proton Polarizability due to Collective Proton Motion – Pathways for Protons in Biological Membranes, Polish J. Chem., 1998, **72**, 172.

[77] G. Zundel, Li^+, Na^+, K^+ and Be^{2+} bonds – IR continua and cation polarizabilities of these bonds, J. Mol. Struct., 1999, **511–512**, 19.

[78] R. Langer, G. Zundel, FT-IR Iinvestigation of $OH\cdots N \leftrightarrow O^{-}\cdots H^{+}N$ Hydrogen Bonds with Large Proton Polarizability in Phosphinic Acid + N-Base Systems in the Middle and Far Infrared Region, J. Phys. Chem. A, 1998, **102**, 6635.

[79] B. Brzezinski, G. Wojciechowski, G. Zundel, L. Sobczyk, E. Grech, Negatively charged hydrogen--bonded chains formed by tetrazole, J. Mol. Struct., 1999, **508**, 175.

[80] G. Zundel, Hydrogen Bondes with Large Proton Polarizability and Proton Transfer Processes in Electrochemistry and Biology, [w:] Adv. Chem. Phys. Chicago, 2000, **111**, 1.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 marca 2007

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNE I FOTOFIZYCZNE WYBRANYCH CZĄSTECZEK AROMATYCZNYCH I INDYWIDUÓW PRZEJŚCIOWYCH W KRÓTKOŻYJĄCYCH STANACH WZBUDZONYCH

SPECTRAL AND PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF SELECTED AROMATIC MOLECULES AND INTERMEDIATE SPECIES IN THE SHORT-LIVING EXCITED STATES

Andrzej Maciejewski[1,3], Gotard Burdziński[2], Krzysztof Dobek[2], Anna Grabowska[4], Jerzy Karolczak[2,3], Ewa Krystkowiak[1], Jacek Kubicki[2], Adam Łukaszewicz[1,2], Ryszard Naskręcki[2], Marcin Ziółek[2,3]

[1] *Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*
[2] *Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 85, 61-614 Poznań*
[3] *Centrum Badawcze Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 85, 61-614 Poznań*
[4] *Instytut Chemii Fizycznej, PAN, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa*

Abstract
Wstęp
1. Zasady Schiffa
   1.1. Dezaktywacja wzbudzonego tautomeru enolowego
   1.2. Tworzenie i zanik wzbudzonego tautomeru *cis-keto*, tworzenie układu fotochromowego
   1.3. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań
2. Aminoftalimidy, związki o właściwościach donorowo-akceptorowych
3. Tioketony, udział odwracalnych procesów fotochemicznych w dezaktywacji ze stanu S_2
Najważniejsze wnioski
Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Andrzej Maciejewski jest profesorem na Wydziale Chemii i kierownikiem Centrum Badawczego Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Jest współautorem około stu publikacji naukowych i kilku patentów. Główne zainteresowania naukowe to: badania właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych tioketonów, związków o własnościach donorowo-akceptorowych, (aminoftalimidów i aminokumaryn), zasad Schiffa i porfiryn; właściwości cząsteczek w wyższych stanach wzbudzonych; rola wiązań wodorowych, odwracalnych reakcji fotochemicznych i ekscipleksów w procesach dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek; właściwości układów micelarnych.

Dr Gotard Burdziński w roku 2003 obronił doktorat polsko-francuski, badając tioketony metodą spektroskopii elektronowej i oscylacyjnej rozdzielczej w czasie najpierw na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu potem w Université des Sciences et Technologies de Lille we Francji i w Ohio State University zbudował układy eksperymentalne oparte na femtosekundowych laserach, a obecnie zajmuje się właściwościami krótkożyjących reaktywnych indywiduów, takich jak karbeny i nitreny (grant „Homing" Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej).

Dr Krzysztof Dobek ukończył studia w 1999 r. na Wydziale Fizyki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. W 2003 r. na tym samym wydziale obronił pracę doktorską, której tematem były badania właściwości układów micelarnych metodami stacjonarnej i rozdzielczej w czasie spektroskopii optycznej. Obecnie, zatrudniony w Zakładzie Elektroniki Kwantowej Wydziału Fizyki UAM, prowadzi badania dotyczące energii i dynamiki oddziaływań międzycząsteczkowych w roztworach oraz badania procesów przenoszenia protonu i tworzenia wiązań wodorowych w wybranych układach. Jest współautorem 10 publikacji naukowych.

Prof. dr hab. Anna Grabowska działalnością naukową związana jest z Instytutem Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Ważniejsze staże: Universteit van Amsterdam i Cambridge University, gościnne profesury: Université de Paris-Sud w Orsay i Université de Bordeaux I w Talence; pobyt badawczy w Institute for Molecular Science w Okazaki.

Główne kierunki badań: fotochemia i spektroskopia; zmiany struktury elektronowej i molekularnej oraz równowag protolitycznych w stanach elektronowo wzbudzonych. Mechanizmy reakcji przenoszenia protonów w cząsteczkach elektronowo wzbudzonych. Reakcje ultraszybkie, głównie mechanizmy fototautomeryzacji fotochromowych zasad Schiffa; femtochemia.

Dr Jerzy Karolczak doktor fizyki, st. wykładowca na Wydziale Fizyki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. W latach 2002–2005 kierownik Centrum Badawczego Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej UAM, a w latach 2000–2002 oraz 2005 do chwili obecnej jego zastępca. Współautor ponad 80 prac naukowych. Za swoją pracę naukową wyróżniany, między innymi: nagrodą Sekretarza Naukowego Polskiej Akademii Nauk, nagrodą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz, wielokrotnie, nagrodą JM Rektora UAM. W latach 1988–1990 oraz 1991–1995 przebywał na stażu w Stanach Zjednoczonych, gdzie zajmował się wysokorozdzielczą spektroskopią małych molekuł i wolnych rodników w schłodzonych wiązkach naddźwiękowych. W latach 1997 i 1999 odbył profesjonalny trening laserowy w siedzibie firmy Spectra Physics, w Mountain View, CA. Od powrotu z USA zajmuje się ultraszybką spektroskopią laserową.

Dr Ewa Krystkowiak ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Na tym wydziale obroniła pracę doktorską, dotyczącą zależnego od czasu wygaszania fluorescencji. Obecnie pracuje jako adiunkt w Zakładzie Fotochemii i Spektroskopii.

Dr Jacek Kubicki ukończył studia magisterskie w 1988 r. na Wydziale Matematyki i Fizyki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. W 1993 r. na Wydziale Fizyki UAM, w zespole prof. Franciszka Kaczmarka, obronił pracę doktorską poświęconą badaniu dynamiki molekularnej wybranych kryształów plastycznych metodą rozpraszania światła. Od roku 1998 współpracuje z profesorem Andrzejem Maciejewskim z Wydziału Chemii UAM, badając własności spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne cząsteczek wieloatomowych w roztworach z wykorzystaniem technik ultraszybkiej spektroskopii laserowej.

Mgr Adam Łukaszewicz jest absolwentem Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Jego praca dyplomowa dotyczyła własności spektralnych i fotofizycznych n-alkilowych pochodnych benzpyrantionu w stanie podstawowym i w stanach trypletowych w układach micelarnych. Obecnie na Wydziale Fizyki UAM w Poznaniu finalizuje pracę doktorską na temat własności spektralnych i fotofizycznych wybranych porfiryn cynkowych w wyższych stanach wzbudzonych.

Dr hab. Ryszard Naskręcki, profesor nadzwyczajny na Wydziale Fizyki UAM. W latach 2002–2005 prodziekan Wydziału, od września 2005 r. dziekan Wydziału Fizyki. W latach 90-tych odbył kilka długoterminowych staży naukowych we Francji. Jest autorem i współautorem trzech książek, ponad 50 artykułów naukowych i ponad 60 wystąpień konferencyjnych. Główne zainteresowania naukowe obejmują fotofizykę i spektroskopię wybranych układów molekularnych oraz fizykę procesu widzenia.

Dr Marcin Ziółek uzyskał stopień doktora w 2003 r. na Wydziale Fizyki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Obecnie jest adiunktem w Centrum Badawczym Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej UAM. Główne zainteresowania naukowe to: femtosekundowa spektroskopia dwuimpulsowa, procesy przenoszenia protonu, fotochromizm.

ABSTRACT

The paper presents results of spectral and photophysical studies obtained for molecules representing three different classes of compounds:

- Schiff bases with strong intramolecular hydrogen bond, occurring in a few phototautomers,
- Aminophtalimides with LE and ICT type electronic excited states forming exciplexes through hydrogen bonds with the solvent molecules,
- Thioketones with a thiocarbonyl group becoming exceptionally reactive in the S_2 state, quenched by molecules of solvent of different properties.

It should be emphasized that for all compounds, irrespective of the complex mechanisms of their deactivation characterised by different dynamics, the dominant final process is the reproduction of the chemically unchanged substrate in the ground state. The necessary condition of the correct interpretation of the complex properties of the compounds studied in electronic excited states is the proper choice of solvents of specific properties. Through this proper choice of solvents it becomes possible to study the role of nonspecific and specific (hydrogen bonds) interactions with the solvent and to observe the intramolecular and intermolecular processes of deactivation. The results presented could be obtained thanks to the use of the steady-state and time-resolved laser methods of absorption and emission spectroscopy with a pico- and femtosecond resolution.

The results obtained can be helpful in the study of compounds of similar properties and more complex systems including biological systems.

Keywords: Schiff bases, aminophtalimides, thioketones, excited states, intramolecular proton transfer, hydrogen bonds, exciplex, picosecond and femtosecond laser spectroscopy

Słowa kluczowe: zasady Schiffa, aminoftalimidy, tioketony, stany wzbudzone, wewnątrzcząsteczkowe przenoszenie protonu, wiązania wodorowe, ekscipleksy, piko i femtosekundowa spektroskopia laserowa

WSTĘP

Bardzo szybki rozwój metod badawczych i technik pomiarowych, w tym szczególnie ultraszybkiej spektroskopii laserowej o rozdzielczości czasowej sięgającej femtosekund, doprowadził do powstania ogromnej wiedzy dotyczącej właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych cząsteczek o różnych właściwościach chemicznych i fizycznych. Dotychczasowe wyniki badań pokazały, jak bardzo złożone i często nieoczekiwane, mogą być właściwości cząsteczek w stanach elektronowo-wzbudzonych. Zaproponowane wiele lat temu reguły empiryczne, w szczególności reguła Kashy i reguła przerwy energetycznej, są spełnione w przypadku sztywnych cząsteczek o tej samej budowie, w stanie podstawowym i w stanach wzbudzonych. Tymczasem reguły te nie opisują poprawnie zachowania szeregu elektronowo wzbudzonych cząsteczek o bardziej złożonych właściwościach strukturalnych i spektroskopowych. Ciągle trudno jest przewidzieć właściwości nowo badanych cząsteczek w stanach elektronowo wzbudzonych. Jedną z przyczyn jest bardzo duży nadmiar energii, którą dysponuje cząsteczka po wzbudzeniu elektronowym. Prowadzić to może do istotnej zmiany jej struktury i rozkładu gęstości elektronowej w stanie wzbudzonym (praktycznie każdym) w stosunku do jej właściwości w stanie podstawowym. Zmiany te mogą zachodzić natychmiast po wzbudzeniu w wyższych stanach singletowych S_n, $n > 1$ (o czasach życia 10^{-14}–10^{-12} s), ale także w stanie S_1 (o czasie życia 10^{-12}–10^{-8} s) oraz w stanach trypletowych (o czasach życia 10^{-8}–10^{-5} s). Choć stwierdzenie obecności tych stanów i ich charakterystyka spektralna jest możliwa (przynajmniej częściowo) przy użyciu stacjonarnej spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, to jednak do ich bezpośredniej obserwacji konieczne jest zastosowanie metod dynamicznych o odpowiednio dużej rozdzielczości czasowej. Aparaturę do takich badań o bardzo dużej czułości i stabilności pracy, znajdującą się w Centrum Badawczym Ultraszybkiej Spektroskopii Laserowej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, zastosowano w celu uzyskania wyników przedstawionych w tej pracy.

Szczególnie trudno bada się właściwości cząsteczek w stanach wzbudzonych nieobserwowanych spektroskopowo, a zwłaszcza cząsteczek istniejących w postaci różnych tautomerów, w tym krótkożyjących konformerów (i to nieświecących) [1, 2, 3]. Podobnie jest w przypadku krótkożyjących indywiduów przejściowych, np. rodników i wzbudzonych kompleksów, powstających w wyniku oddziaływania wzbudzonych cząsteczek z cząsteczkami rozpuszczalnika, najczęściej odtwarzających niezmienione chemicznie substraty [3, 4, 5]. Tymczasem coraz więcej wyników eksperymentalnych świadczy o tym, że tworzenie cząsteczek i indywiduów przejściowych o takich właściwościach ma miejsce znacznie częściej niż dawniej sądzono [1–3, 5–7]. Dlatego w niniejszej pracy przedstawione będą głównie wyniki badań takich właśnie układów (cząsteczek).

Najważniejsze wyniki badań spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych omówiono na przykładzie wybranych cząsteczek z grupy zasad Schiffa, aminoftalimidów i tioketonów oraz indywiduów przejściowych, które one tworzą. Choć czas-

teczki te różnią się bardzo wyraźnie budową i obecnością różnych chromoforów, to jednak wszystkie one mają złożone właściwości w stanach wzbudzonych, związane zarówno z wewnątrz-, jak i międzycząsteczkowymi procesami dezaktywacji. W procesach tych uczestniczą nie tylko stany S_1, ale także wyższe krótkożyjące stany wzbudzone S_n ($n > 1$). W stanach tych może dochodzić do zmian strukturalnych cząsteczek. Ich oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalników (szczególnie protycznych) prowadzą do tworzenia indywiduów przejściowych o różnych właściwościach. Należy podkreślić, że wszystkie badane związki w singletowych stanach wzbudzonych, zarówno istniejące w postaci 2 fototautomerów (zasady Shiffa), jak i tworzące krótkożyjące indywidua przejściowe w reaktywnych i protycznych rozpuszczalnikach (aminoftalimidy i tioketony), dezaktywując się nie tworzą trwałych fotoproduktów, lecz odtwarzają niezmienione chemicznie substraty. Nie jest więc możliwe stosowanie w ich badaniach metod chromatograficznych ani spektroskopowych (NMR, MS, MS-HPLC, IR), niezastąpionych w badaniach fotochemicznych. Konieczne jest stosowanie rozdzielczych w czasie metod spektroskopii laserowej zarówno emisyjnej, jak i absorpcyjnej o rozdzielczości czasowej w zakresie od nano-, do femtosekund.

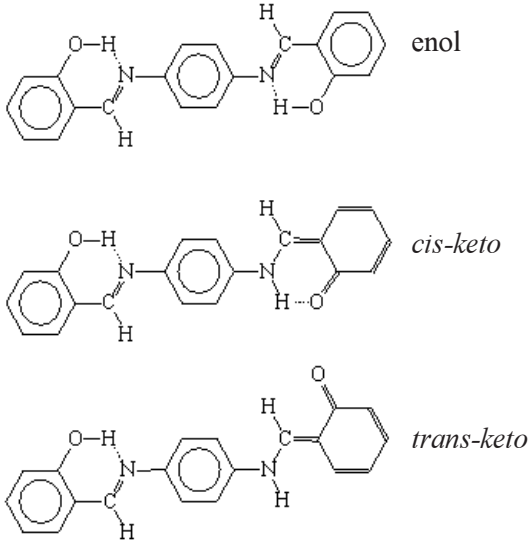
1. ZASADY SCHIFFA

Jedną z często badanych reakcji chemicznych indukowanych przez światło jest proces wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu między fragmentami cząsteczki, które tworzą wiązanie wodorowe. Zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu, zachodzące w wyniku wzbudzenia elektronowego (ang. *excited state intramolecular proton transfer*, ESIPT) między dwoma heteroatomami uczestniczącymi w wewnętrznym wiązaniu wodorowym, na przykład między atomem tlenu grupy hydroksylowej i atomem azotu, obserwuje się między innymi u aromatycznych fotochromowych zasad Schiffa.

Zasady Schiffa znane są od dawna [8]. Duże zainteresowanie tymi związkami wynika między innymi ze znacznego podobieństwa zachodzących w nich procesów do procesów, które przebiegają w układach biologicznych [9, 10]. Prowadzone są także prace związane z potencjalnymi zastosowaniami fotochromowych zasad Schiffa przy zapisie informacji oraz w roli przełączników molekularnych [11]. Wykonuje się wiele badań właściwości fotofizycznych i fotochemicznych tych związków [12]. Fotochromizm zasad Schiffa związany jest z odwracalną zmianą struktury cząsteczki, zachodzącą w wyniku obrotu jej fragmentu najczęściej wokół wiązania węgiel–węgiel.

Przeprowadzone przez nas badania dotyczyły elektronowo wzbudzonych zasad Schiffa należących do salicylidenoanilin [13–16]. Opisane w tym rozdziale badania dotyczą poznania mechanizmu i dynamiki dezaktywacji *N,N'*-bis(salicydeno)-*p*-fenylenodiaminy (BSP) w rozpuszczalnikach o różnych właściwościach. Strukturę trzech fototautomerów cząsteczki BSP podano na Rys. 1. Cząsteczka BSP została wybrana

z kilku powodów. Po pierwsze, spektralne położenie jej pasma absorpcji pasuje do długości fali drugiej harmonicznej laserów tytanowo-szafirowych (400 nm), stosowanych w opisanych poniżej ultraszybkich badaniach. Ponadto, z przebadanych przez nas zasad Schiffa tylko dla BSP występuje na tyle silne pasmo absorpcji przejściowej pierwotnie wzbudzonej formy enolowej, że można je zaobserwować pomimo jej bardzo krótkiego czasu życia. Wreszcie, jak pokazują wcześniejsze badania salicylidenoanilin [14], wzbudzenie i przeniesienie protonu w tej grupie cząsteczek występuje w obrębie pojedynczego chromoforu, dlatego wyniki otrzymane dla symetrycznej cząsteczki BSP z dwoma wiązaniami wodorowymi wydają się być reprezentatywne dla szerokiej gamy związków z tej rodziny, w szczególności dla prostszych zasad Schiffa z pojedynczym wiązaniem wodorowym.

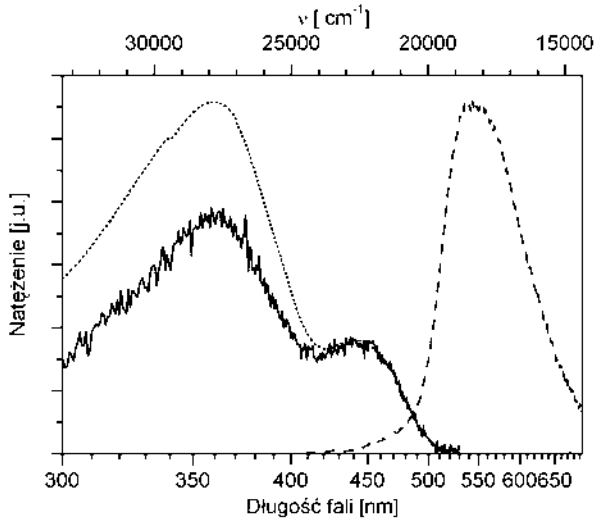


Rysunek 1. Forma enolowa, *cis-keto* oraz fotochromowa (*trans-keto*) cząsteczki BSP

Ze względu na to, że w zasadach Schiffa stałe szybkości zachodzących procesów są bardzo duże, 10^{10}–10^{13} s^{-1} (wyjątkiem jest stosunkowo wolny zanik formy fotochromowej w stanie podstawowym o czasie życia 10^{-3}–10^{-6} s, zależnym od rozpuszczalnika [17]), do badań użyto układ absorpcji przejściowej o zdolności rozdzielczej ~ 50 fs [18–20] oraz układ czasowo skorelowanego zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC) o zdolności rozdzielczej ~ 1 ps i możliwościach pomiarowych opisanych szczegółowo w pracach [21, 22].

1.1. DEZAKTYWACJA WZBUDZONEGO TAUTOMERU ENOLOWEGO

Cząsteczki BSP w stanie podstawowym, podobnie jak inne zasady Schiffa, we wszystkich rozpuszczalnikach (z wyjątkiem silnie protycznych) występują w formie enolowej i tworzą wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe (N···H–O) pomiędzy atomem wodoru grupy hydroksylowej, a wolną parą elektronową atomu azotu, znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie. Z powodu bardzo dużej stałej szybkości procesu ESIPT (patrz niżej), w typowych warunkach nie obserwuje się emisji wzbudzonej formy enolowej BSP, podobnie jak i innych zasad Schiffa. Jednak, dzięki zastosowaniu lasera jako źródła wzbudzenia, obserwuje się dla BSP w różnych rozpuszczalnikach bardzo słabą emisję wzbudzonej formy enolowej w zakresie od około 420 do 500 nm, (Rys. 2), o wydajności kwantowej $\phi_F \sim 10^{-5}$ [14], obok wyraźnie przesuniętej długofalowo emisji formy *cis-keto*, leżącej powyżej 480 nm, o $\phi_F \sim 10^{-3}$ (patrz niżej).

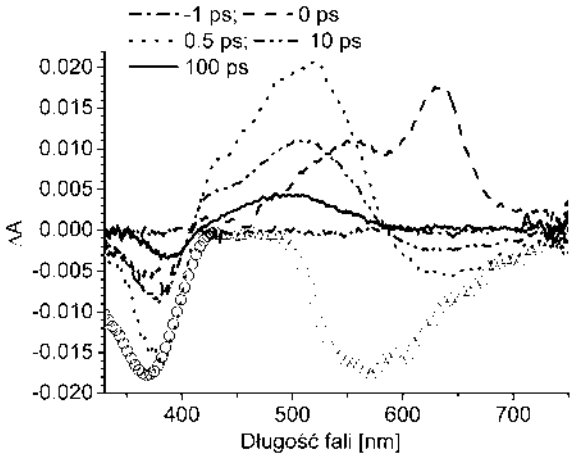


Rysunek 2. Widmo absorptancji (linia kropkowana) emisji, λ_{wzb} = 400 nm (linia przerywana) i widmo wzbudzenia emisji, λ_{em} = 550 nm (linia ciągła) dla BSP w trifluoroetanolu. Słaba emisja formy enolowej występuje w zakresie od około 420 do 500 nm

Czas zaniku krótkofalowej emisji jest poza czasową zdolnością rozdzielczą zastosowanego układu TCSPC i wynosi poniżej 1 ps. Warto zauważyć, że równie krótkie czasy zaniku emisji formy enolowej, wyznaczane w obszarze krótkofalowym, obserwowane były dla innych badanych przez nas fotochromowych zasad Schiffa [15, 16].

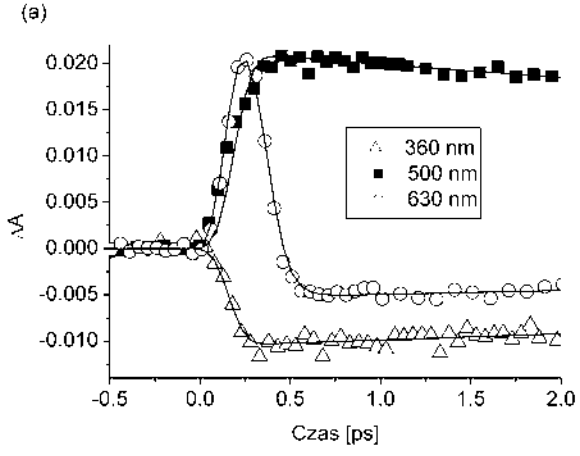
Aby wyznaczyć czas życia wzbudzonej formy enolowej BSP i zbadać wpływ rozpuszczalnika na mechanizm i dynamikę jej dezaktywacji, zastosowano metodę absorpcji przejściowej o femtosekundowej rozdzielczości czasowej. Do badań wybrano niepolarny *n*-hexan, polarny acetonitryl (ACN) oraz polarne rozpuszczal-

niki tworzące wiązania wodorowe etanol (EtOH) i trifluoroetanol (TFE). W widmie absorpcji przejściowej obserwowanym dla BSP w ACN (podobnie jak w pozostałych rozpuszczalnikach) można wyróżnić kilka pasm (Rys. 3).

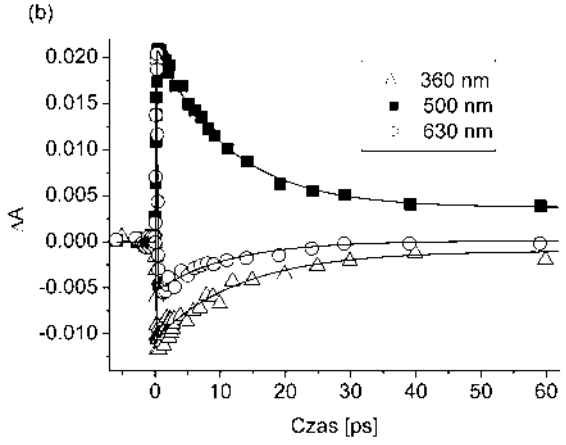


Rysunek 3. Widma absorpcji przejściowej BSP w ACN dla wybranych czasów po wzbudzeniu. Otwarte kółka pokazują widmo absorpcji stacjonarnej, a otwarte trójkąty – emisji stacjonarnej BSP w ACN przemnożone przez wartość (–1) i unormowane do widm absorpcji przejściowej

Należy zauważyć, że dodatnie pasmo z maksimum dla około 630 nm narasta i zanika z czasem trwania funkcji aparaturowej (czyli czasowej funkcji korelacji impulsu pompującego i sondującego). Pasmo to przypisane zostało wzbudzonemu tautomerowi enolowemu [13, 14]. Kinetyka narastania i zaniku tego pasma została przedstawiona na Rys. 4.



Rysunek 4. Kinetyki sygnału absorpcji przejściowej BSP w ACN dla wybranych długości fali w krótkiej (a) i długiej skali czasu (b)



Rysunek 4. Ciąg dalszy

Dzięki wyraźnym zmianom sygnału eksperymentalnego w bardzo krótkich czasach (< 1 ps) możliwe było zbadanie wpływu właściwości rozpuszczalnika na szybkość procesu ESIPT oraz na wydajność tworzenia tautomeru fotochromowego. Stwierdzono, że dla BSP właściwości zastosowanego rozpuszczalnika nie wpływają na czas życia wzbudzonej formy enolowej, który wynosi poniżej 50 fs. Do tej pory tak krótki czas wiązano z bardzo dużą szybkością procesu ESIPT. Przyjmowano, że wyłącznie ten proces uczestniczy w dezaktywacji wzbudzonego tautomeru enolowego. Przeczy temu jednak porównanie widma wzbudzenia emisji (mierzonej na paśmie emisji formy *cis-keto*) z widmem absorptancji BSP (Rys. 2).

Wyraźnie mniejsza intensywność widma wzbudzenia świadczy o tym, że część wzbudzonych cząsteczek tautomeru enolowego nie dezaktywuje się w procesie ESIPT, ale w procesie konwersji wewnętrznej. Poprawny sposób unormowania widma wzbudzenia i widma absorptancji [13] pokazuje, że około 50% cząsteczek wzbudzonego enolu BSP tworzy tautomer *cis-keto*, o ile wzbudzany jest bezpośrednio tautomer enolowy. Podobne widma wzbudzenia emisji uzyskano dla różnych długości fali obserwacji z zakresu emisji tautomeru *cis-keto*. Wynik ten potwierdza, że dezaktywacja wzbudzonego tautomeru enolowego odbywa się na dwóch drogach o podobnych stałych szybkości. Korzystając z czasu życia wzbudzonej formy enolowej, wyznaczonego eksperymentalnie (50 fs), oraz uwzględniając dwa kanały dezaktywacji wzbudzonego enolu (konwersja wewnętrzna formy enolowej oraz tworzenie formy *cis-keto* w wyniku wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu) można było oszacować, że dla BSP w EtOH stała szybkości procesu ESIPT jest rzędu $(100\ \mathrm{fs})^{-1}$ [13]. O konieczności uwzględnienia bardzo szybkiego procesu konwersji wewnętrznej w cząsteczce BSP świadczą wyniki uzyskane dla cząsteczki dimetoksy-*N,N'*-bis(salicydeno)-*p*-fenylenodiaminy ($BSPMe_2$). W cząsteczce tej, w miejscu atomów wodoru w dwóch grupach hydroksylowych obecne są grupy metylowe. Tak więc, w cząsteczce $BSPMe_2$ nie występują wewnątrzcząsteczkowe wiązania

wodorowe, dlatego nie może zachodzić proces ESIPT. Obserwowana jej wyjątkowo szybka dezaktywacja w czasie około 100 fs [13] musi więc zachodzić w procesie konwersji wewnętrznej wzbudzonego enolu, którego model stanowi dwumetylowana pochodna. Dla BSP i innych zasad Schiffa takim procesem może być przejście pomiędzy stanem (π, π^*) i blisko leżącym stanem (n, π^*). Założenie takie potwierdzone jest obliczeniami teoretycznymi dla tych cząsteczek, wskazującymi na to, że stan (n, π^*) leży nieznacznie poniżej stanu (π, π^*) [23–25].

1.2. TWORZENIE I ZANIK WZBUDZONEGO TAUTOMERU *CIS-KETO*, TWORZENIE UKŁADU FOTOCHROMOWEGO

Jak wspomniano wyżej, tautomer *cis-keto* wykazuje fluorescencję w zakresie długofalowym (Rys. 2) o wydajności kwantowej $\phi_F \sim 10^{-3}$. Kinetyki zaniku fluorescencji były identyczne, niezależnie od tego, czy wzbudzano bezpośrednio tautomer *cis-keto* istniejący w rozpuszczalnikach protycznych (Rys. 2), czy też tautomer ten w stanie S_1 powstał wyłącznie w wyniku procesu ESIPT. Czas życia tautomeru *cis-keto* ($\tau_{cis\text{-}keto}$) w stanie S_1 wynosi 10–20 ps, zaś w silnie protycznych rozpuszczalnikach jest wyraźnie dłuższy (Tab. 1). W silnie protycznych rozpuszczalnikach bardziej prawdopodobne jest tworzenie kompleksu pomiędzy cząsteczką zasady Schiffa, a cząsteczką rozpuszczalnika, wskutek tworzenia międzycząsteczkowego wiązania wodorowego. Powoduje to z kolei, że obrót części cząsteczki w celu utworzenia tautomeru fotochromowego (*trans-keto*) jest wolniejszy, a stała szybkości dezaktywacji tautomeru *cis-keto* na tej drodze jest mniejsza.

W Tabeli 1 podano wartości funkcji Lipperta-Matagi, wartości parametrów α i β w skali Kamleta-Tafta dla wybranych do badań rozpuszczalników oraz wyznaczone parametry spektralne i fotofizyczne dla fototautomeru *cis-keto* BSP w tych rozpuszczalnikach [13, 14].

Tabela 1. Parametry fotofizyczne i spektralne dla tautomeru *cis-keto* BSP, w rozpuszczalnikach o różnych właściwościach.

Rozpuszczalnik	$f(\varepsilon,n)$ [a]	α [b]	β [b]	Φ_F [c] [10^{-3}]	$\tau_{cis\text{-}keto}$ [d] [ps]	λ_{max} [e] [nm]	k_F [f] $\times 10^{-7}$ [s^{-1}]	k_{nr} [g] $\times 10^{-10}$ [s^{-1}]
n-heksan	0,00	0,00	0,00	0,6	23	570	2,6	4,3
acetonitryl	0,30	0,19	0,40	0,6	10	570	6,0	10
etanol	0,29	0,86	0,75	1,0	32	555	3,1	3,1
trifluoroetanol	0,32	1,51	0,00	1,3	35	545	3,7	2,9

[a] Funkcja polarności Lipperta-Matagi. [b] Parametry Kamleta-Tafta. [c] Dokładność ± 20%. [d] Dokładność ± 3 ps. [e] Maksimum pasma emisji. [f] Stała szybkości fluorescencji, $k_F = \phi_F \times \tau_{cis\text{-}keto}^{-1}$. [g] Nieradiacyjna stała szybkości, $k_{nr} = \phi_F \times t_{cis\text{-}keto}^{-1} - k_F$.

Ważnych wyników dotyczących właściwości fototautomeru *cis-keto*, a w szczególności mechanizmu jego tworzenia i dezaktywacji, dostarczają badania absorpcji przejściowej (Rys. 3 i Rys. 4).

Narastanie sygnału absorpcji przejściowej związanego z tautomerem *cis-keto* zachodziło w czasie trwania impulsu laserowego, a więc było poza zdolnością rozdzielczą stosowanego układu eksperymentalnego (~ 50 fs) [13, 14]. W widmie absorpcji przejściowej pojawia się pasmo emisji wymuszonej (ujemny sygnał). Czas zaniku tej emisji, taki sam jak czas zaniku fluorescencji tautomeru *cis-keto* uzyskany metodą TCSPC, pozwala przyjąć, że pasmo to jest związane z emisją wymuszoną tautomeru *cis-keto*. Niezależnym potwierdzeniem jest położenie spektralne tego pasma, zgodne z położeniem pasma emisji spontanicznej tautomeru *cis-keto* (Rys. 3). W zakresie spektralnym poniżej 580 nm sygnał związany z absorpcją przejściową jest silniejszy niż sygnał związany z emisją wymuszoną, dlatego też emisja wymuszona jest obserwowana powyżej 580 nm. Pasmo absorpcji przejściowej, z maksimum dla około 520 nm, zostało przypisane wzbudzonemu tautomerowi *cis-keto*. Czas zaniku tego pasma zgodny jest z czasem życia tautomeru S_1-*cis-keto*, wyznaczonym metodą TCSPC. Ponadto, poniżej 400 nm obserwuje się ujemne pasmo depopulacji stanu podstawowego (ang. *ground state depopulation*, GSD) związane z odtwarzaniem enolu w stanie podstawowym. Pasmo to narasta z czasem trwania funkcji aparaturowej, a zanika z czasem życia wzbudzonego tautomeru *cis-keto*. Wynika stąd, że tautomer enolowy w stanie podstawowym jest odtwarzany w bardzo krótkim czasie po zajściu procesu konwersji wewnętrznej, $S_1 \rightarrow S_0$, w ramach tautomeru *cis-keto* (< 1 ps). Widoczne pasmo absorpcji przejściowej dla opóźnienia 100 ps związane jest z absorpcją niewzbudzonego tautomeru fotochromowego. Takie przypisanie pasma wynika stąd, że jego położenie jest zgodne z położeniem pasma absorpcji tautomeru fotochromowego [14], które wyznaczono metodą dwuimpulsową w czasach nanosekundowych [25]. Porównanie wielkości sygnału pasma GSD dla czasu, w którym w układzie obecna jest tylko forma fotochromowa (100 ps) oraz dla czasu, gdy dominujący wkład pochodzi od wzbudzonego tautomeru *cis-keto* (0,5 ps), pozwoliło na stwierdzenie, że około 30% cząsteczek wzbudzonego tautomeru *cis-keto* dezaktywuje się tworząc niewzbudzoną formę fotochromową [14].

1.3. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Dzięki możliwości bezpośredniej obserwacji pasma absorpcji przejściowej wzbudzonego tautomeru enolowego, cząsteczka BSP może być stosowana jako modelowy związek umożliwiający badanie wpływu rozpuszczalnika na stałą szybkości wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT) dla rodziny zasad Schiffa. Uzyskane wyniki pokazały, że niezależnie od właściwości zastosowanego rozpuszczalnika, czas życia wzbudzonego tautomeru enolowego BSP jest bardzo krótki (< 50 fs). Stwierdzono, że dezaktywacja wzbudzonego

tautomeru enolowego odbywa się dwoma drogami: w procesie ESIPT prowadzącym do utworzenia wzbudzonego tautomeru cis-keto oraz w procesie konwersji wewnętrznej. Stała szybkości procesu ESIPT została oszacowana na około 1×10^{13} s^{-1}. Konkurencyjny dla ultraszybkiego procesu ESIPT, proces dezaktywacji formy enolowej, to bardzo szybka konwersja wewnętrzna ze stanu (π, π^*) prawdopodobnie do stanu (n, π^*). Natomiast czas życia wzbudzonego tautomeru *cis-keto* zależy od właściwości zastosowanego rozpuszczalnika i wyraźnie rośnie w silnie protycznych rozpuszczalnikach. Jednym z ważnych kanałów jego dezaktywacji jest tworzenie długożyjącej formy fotochromowej w stanie podstawowym. Jej wydajność tworzenia dla BSP oraz dla innych przebadanych zasad Schiffa jest podobna i wynosi 10–30% [13–15].

Uzyskane wyniki dla BSP w rozpuszczalnikach o różnych właściwościach mogą pomóc w zrozumieniu procesów dezaktywacji zachodzących dla innych związków, w których obserwuje się wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu w wyniku wzbudzenia elektronowego. Celowe jest także zbadanie właściwości spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych cząsteczek BSP umieszczonych wewnątrz układów mikrozorganizowanych (cyklodekstryny, micele) [26, 27]. Ponieważ micele często są wykorzystywane jako układy modelowe o właściwościach zbliżonych do realnych układów biologicznych, wyniki takich pomiarów mogłyby pomóc w interpretacji m.in. procesów tworzenia form fotochromowych zachodzących w takich układach.

2. AMINOFTALIMIDY, ZWIĄZKI O WŁAŚCIWOŚCIACH DONOROWO-AKCEPTOROWYCH

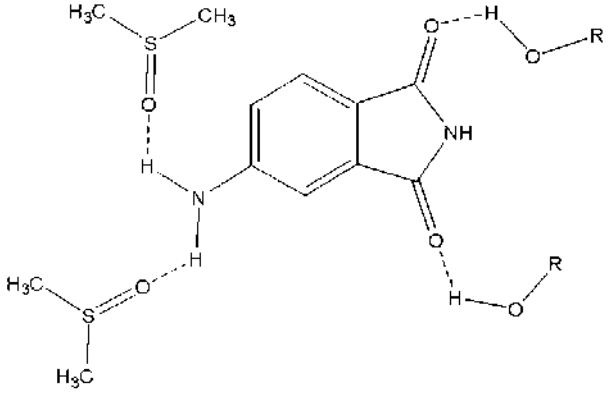
Związki o właściwościach donorowo-akceptorowych (D-A), ze względu na ich ciekawe cechy zarówno w stanie podstawowym, jak i szczególnie w stanach wzbudzonych, a także ze względu na ich liczne zastosowania praktyczne, badano bardzo często [1, 2, 28, 29]. W pracy przeglądowej Grabowskiego i współpracowników [1], która zbiera, systematyzuje i interpretuje dotychczasowe wyniki badań, pokazano, że istnieją różne drogi dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek typu D-A zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe. Procesom tym towarzyszą daleko idące zmiany strukturalne cząsteczki. Bardzo ważną, ale ciągle niewyjaśnioną rolę w złożonych procesach dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek typu D-A odgrywają wiązania wodorowe [1].

Wiązania wodorowe zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe, występują w wielu układach. Szczególnie często, i to różnymi metodami, wiązania te są badane w przypadku niewzbudzonych cząsteczek. W stanach wzbudzonych energia różnego typu wiązań wodorowych może być albo podobna, albo większa, albo też mniejsza niż w stanie podstawowym. Wyznaczenie tej energii, a także innych właściwości wiązań wodorowych, w szczególności określenie ich roli w procesach dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek i tworzenia z ich udziałem indywiduów dwu i więcej czas-

teczkowych (także zmiany stężenia tych indywiduów w wyniku wzbudzenia i dezaktywacji), choć bardzo ważne dla poprawnej interpretacji wyników, nie jest proste.

Cząsteczki o właściwościach D-A stosuje się często jako sondy w badaniach właściwości różnych złożonych układów chemicznych i biologicznych. Wyróżniają się one zależnością od właściwości otoczenia zarówno położenia maksimum pasma absorpcji (ν_A^{max}) i/lub emisji (ν_F^{max}), jak i wydajności kwantowej emisji (ϕ_F) i czasu jej zaniku (τ_F). Niektóre z tych wielkości, a niekiedy wszystkie, zmieniają swoje wartości przy zmianie rozpuszczalnika z niepolarnego na polarny. Szczególnie duże różnice obserwuje się przy zmianie rozpuszczalnika aprotycznego na protyczny. Może to oznaczać, że wzbudzone cząsteczki D-A tworzą z cząsteczkami rozpuszczalnika wiązania wodorowe, które odgrywają ważną rolę w procesach dezaktywacji.

W naszych badaniach jako cząsteczki typu D-A zastosowaliśmy 4-aminoftalimid (4-AP, Rys. 5) i jego *N*-metylową pochodną [30]. Są one sztywne, ich wzbudzenie nie prowadzi do zmian strukturalnych, a w procesach dezaktywacji nie tworzą się stany z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku ze skręceniem (ang. *twisted intramolecular charge transfer*, TICT) [1]. Upraszcza to istotnie i tak złożony mechanizm ich dezaktywacji. Czas życia najniższego stanu wzbudzonego z przeniesieniem ładunku (S_1-ICT), związany z wewnątrzcząsteczkowymi procesami dezaktywacji, jest w aminoftalimidach na tyle długi ($\geq 10^{-8}$ s) [30, 31], że wydajność tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie (w tym szczególnie cząsteczkami rozpuszczalnika) jest duża. Umożliwia to użycie tych związków jako dobrych sond do badania obecności wiązań wodorowych i określenia ich roli w mechanizmie i dynamice dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek.



Rysunek 5. Cząsteczka 4-AP tworząca dwa typy wiązań wodorowych.

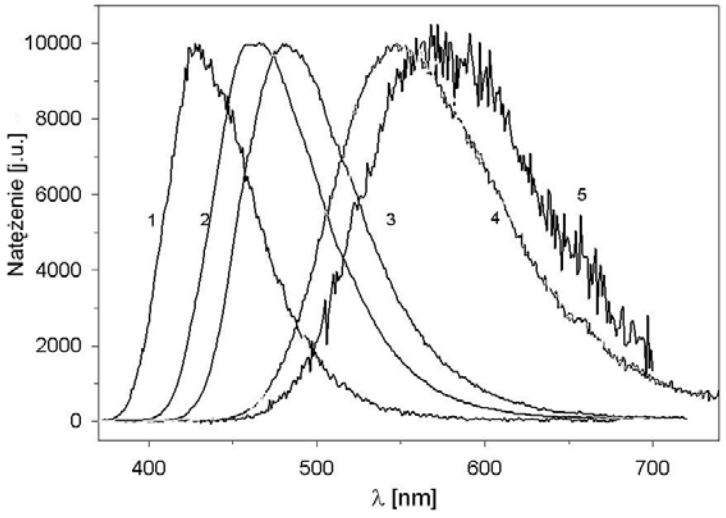
Wzbudzona cząsteczka 4-AP, podobnie jak jej pochodne, występuje zarówno w stanach lokalnie wzbudzonych (LE), jak i stanach z przeniesieniem ładunku (ICT). Posiada ona kilka chromoforów o właściwościach donorowych jak i akceptorowych,

które mogą tworzyć wiązania wodorowe. Powoduje to, że zrozumienie jej zachowania w stanach wzbudzonych, w rozpuszczalnikach o różnych właściwościach, jest bardzo trudne. Ze względu na silną zależność ν_F^{max}, ϕ_F i τ_F od właściwości otoczenia 4-AP był często stosowany jako sonda w badaniach właściwości różnych złożonych układów chemicznych [28, 29, 32–34]. Istniały jednak różne propozycje tłumaczenia tych zależności i pojawiały się kontrowersje, co do przyczyn ich występowania. Przyjmowano, że silnie batochromowe przesunięcie ν_F^{max} w polarnych rozpuszczalnikach, wyraźnie większe od ν_A^{max} [28], jest wynikiem zwiększenia momentu dipolowego (μ) po wzbudzeniu cząsteczki 4-AP [28]. Wg innej interpretacji, jest ono wynikiem tworzenia S_1-ekscipleksu [35], albo też wynikiem tworzenia formy enolowej cząsteczki 4-AP wskutek przenoszenia protonu z udziałem rozpuszczalnika [34].

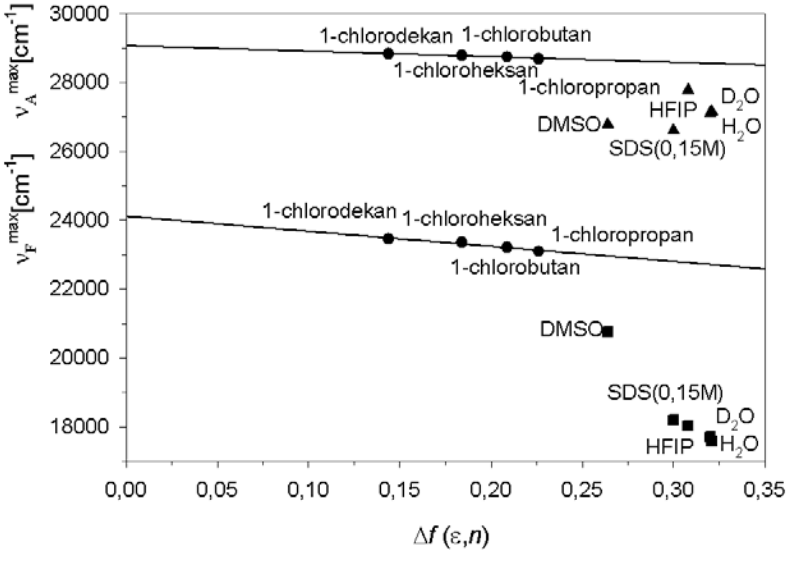
Dlatego ważnym celem naszych badań było wyjaśnienie przyczyn silnego wpływu właściwości otoczenia na właściwości spektralne i fotofizyczne 4-AP i jego pochodnych, a w szczególności określenie roli, jaką odgrywają w tym wiązania wodorowe. Aby to zrealizować, przeprowadzono badania solwatochromowe i fotofizyczne 4-AP i jego pochodnych [30] w 1-chloroalkanach (RCl) o parametrach Kamleta-Tafta $\alpha = \beta = 0$ [36], tzn. rozpuszczalnikach oddziaływujących wyłącznie niespecyficznie, a także w heksafluoroizopropanolu (HFIP) ($\alpha = 1{,}96$, $\beta = 0$) [36] i trójfluoroetanolu (TFE) ($\alpha = 1{,}51$, $\beta = 0$) [36] oraz w dimetylosulfotlenku (DMSO) ($\alpha = 0$, $\beta = 0{,}76$) [36], a więc w rozpuszczalnikach tworzących tylko jeden typ wiązań wodorowych. Ponadto, ze względu na powszechność stosowania wody jako rozpuszczalnika różnych układów mikrozorganizowanych, badania prowadzono w wodzie ($\alpha = 1{,}17$, $\beta = 0{,}47$) [36] i, dla porównania, w wodzie deuterowanej, oraz w alkoholach tworzących wiązania wodorowe (zarówno typu donorowego, jak i akceptorowego), oraz w wybranych układach micelarnych.

Silną zależność położenia ν_F^{max} dla 4-AP od właściwości rozpuszczalnika, w szczególności jego protyczności, przedstawiono na Rys. 6. Użycie RCl w badaniach solwatochromowych pozwoliło na sporządzenie wykresów, na których obserwowane przesunięcia położenia maksimów widm emisji i absorpcji (Rys. 7) są wynikiem wyłącznie oddziaływań niespecyficznych. Korzystając z tych danych wyznaczono udziały pochodzące od oddziaływań niespecyficznych i specyficznych w całkowitym (eksperymentalnym) przesunięciu spektralnym 4-AP, w dowolnym rozpuszczalniku [30]. Umożliwiło to z kolei wyznaczenie zmiany energii wiązań wodorowych (ΔE_{HB}), przy przejściu między stanem podstawowym (S_0) i stanem lokalnie wzbudzonym (S_1-LE) (z widm absorpcji) oraz stanem wzbudzonym z przeniesieniem ładunku (S_1-ICT) i stanem S_0 (z widm emisji) w HFIP i TFE oraz w DMSO. Ponadto oszacowano energie wiązań wodorowych (E_{HB}) tworzonych przez cząsteczkę 4-AP we wzbudzonych stanach S_1-LE i S_1-ICT (Tab. 2 i 3 [30]). Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że w badanych układach obok 4-AP istnieją S_0-kompleksy (S_0-comp) i S_1-excipleksy (S_1-exc), powstające w wyniku tworzenia wiązań wodorowych przez cząsteczkę 4-AP (zarówno w stanie podstawowym, jak i w stanach wzbudzonych), z cząsteczkami takich rozpuszczalników, jak na przykład HFIP, TFE, DMSO, H_2O

i D_2O. Wyniki umożliwiły również stwierdzenie, czy i w jakim zakresie zmienia się stężenie 4-AP oraz powstających kompleksów i excipleksów przy przejściu między dwoma stanami elektronowymi.



Rysunek 6. Widmo fluorescencji 4-AP w wybranych rozpuszczalnikach, gdzie 1 – 1-chloropropan, 2 – ACN, 3 – DMSO, 4 – HFIP, 5 – H_2O



Rysunek 7. Wykresy solwatochromowe dla 4-AP w rozpuszczalnikach oddziaływujących niespecyficznie i specyficznie oraz w miceli SDS (0,15 mol/dm^{-3})

W pracy [30] wykazano, że w wyniku przejścia S_1-LE→S_1-ICT silnie rośnie energia najsilniejszego wiązania wodorowego tworzonego przez grupy karbonylowe cząsteczki 4-AP z wiązaniami H–O cząsteczek rozpuszczalnika. Prowadzi to do powstania S_1-exc, którego stężenie zależy od właściwości protycznych użytego rozpuszczalnika, a w układach bardziej złożonych, np. micelarnych, od właściwości otoczenia 4-AP [32, 33, 37]. Natomiast w wyniku tego samego przejścia, tylko niewiele rośnie energia wiązania wodorowego tworzonego przez wiązania N–H grupy aminowej cząsteczki 4-AP i atomy tlenu cząsteczek DMSO. Energia ta rośnie natomiast znacznie przy przejściu S_0→S_1-LE. O obecności ekscipleksu, powstałego w wyniku tworzenia wiązań wodorowych między wzbudzoną cząsteczką 4-AP i cząsteczkami alkoholu, niezależnie od wyników solwatochromowych, świadczą także wyniki emisyjnych pomiarów dynamiki rotacji [38].

W celu zbadania właściwości cząsteczek 4-AP w stanach wzbudzonych i wyjaśnienia przyczyn silnej zależności ϕ_F i τ_F od właściwości otoczenia (w szczególności roli rozpuszczalników tworzących wiązania wodorowe z cząsteczką 4-AP w jej dezaktywacji), przeprowadzono pomiary fotofizyczne stosując te same rozpuszczalniki co w pomiarach solwatochromowych. Najważniejsze wyniki wydajności kwantowej i czasu zaniku fluorescencji oraz wyznaczone stałe szybkości fluorescencji i dezaktywacji bezpromienistej przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Właściwości fotofizyczne 4-AP w wybranych rozpuszczalnikach (odtlenionych i odwodnionych) w H_2O i D_2O oraz w miceli SDS

Rozpuszczalnik	φ_F	τ_F [ns]	k_F [$\times 10^7$ s^{-1}]	k_{nr} [$\times 10^7$ s^{-1}]	E_{S_1} [cm^{-1}]	Emitujące indywiduum
1-chloropropan	1,0	17,9	5,59	<0,1	23310	S_1-4-AP
DMSO	0,91[b]	19,2	4,74	0,47	20920	S_1-4-AP, S_1-exc(2)
HFIP	0,065	2,8	2,32	33,4	18150	S_1-exc(1)
H_2O	0,022	1,05	2,10	93,1	17830	S_1-exc(1)
D_2O	0,12	5,4	2,22	16,3	17690	S_1-exc(1)
SDS(0,15 mol/dm^3)	0,074	3,2	2,32	28,9	18200	S_1-exc(1)

[a] Wartości E_{S_1} wzięto z położenia maksimum pasm emisji 4-AP w stanie S_1-ICT oraz S_1-exc(1) i S_1-exc(2), [b] taki sam wynik ϕ_F otrzymano w DMSO-d_6.

W roztworze 4-AP w 1-chloropropanie, podobnie jak i w innych RCl, nie występują S_0-comp i S_1-exc. Jak pokazują uzyskane wyniki (Tab. 2), ze stanu S_1-ICT o długim czasie życia, $\tau_{S_1\text{-}ICT} \sim 18$ ns, cząsteczki 4-AP dezaktywują się wyłącznie w procesie fluorescencji, a $k_F = 5{,}6 \times 10^7$ s^{-1}. Natomiast z rozpuszczalnikami protycznymi (HFIP, H_2O, D_2O) cząsteczka 4-AP w stanie S_1-ICT, poprzez grupy karbonylowe, tworzy silne wiązania wodorowe (Rys. 6 i Rys. 7 oraz Tab. 2 i 3 [30]). Prowadzi to do bardzo szybkiego powstania ekscipleksu pierwszego rodzaju (S_1-exc(1)). Ponieważ $\tau_{S_1\text{-}ICT}$ dla 4-AP jest długi (Tab. 2), zarówno w RCl, jak

i w polarnych aprotycznych rozpuszczalnikach, to można przyjąć, że tworzenie S_1-exc(1) z HFIP oraz z H_2O i D_2O jest praktycznie jedynym procesem dezaktywacji 4-AP w stanie S_1-ICT. Brak jakichkolwiek zmian w położeniu i kształcie widm emisji rozdzielonych w czasie (TRES) dla 4-AP w H_2O (mierzonych na układzie TCSPC z rozdzielczością 0,61ps/ch) [33], a zarazem bardzo podobne położenie ν_F^{max} (t = 0) w TRES i ν_F^{max} w stacjonarnym widmie emisji 4-AP w H_2O oznacza, że proces tworzenia wiązania wodorowego z udziałem tego i podobnych rozpuszczalników zachodzi rzeczywiście bardzo szybko.

W rozpuszczalnikach protycznych, inaczej niż w RCl, wartość ϕ_F jest znacznie mniejsza niż 1,0, a głównym procesem dezaktywacji S_1-exc(1) jest konwersja wewnętrzna. Stała szybkości tego procesu zależy od energii S_1-exc(1). Ta z kolei, przede wszystkim zależy od ilości i energii wszystkich wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczkę 4-AP. W wodzie, w której w wyniku tworzenia wiązań wodorowych zarówno przez grupy karbonylowe, jak i grupę aminową, wartość E_{S_1} jest najmniejsza, stała szybkości konwersji wewnętrznej ($k_{S_1S_0}$) dla S_1-exc(1) jest prawie 50 razy większa od wartości k_F. W rezultacie, wartość ϕ_F dla S_1-exc(1) wynosi zaledwie 0,02, zaś czas życia ulega skróceniu do 1 ns. Przy zamianie rozpuszczalnika z H_2O na D_2O, obserwuje się silny efekt izotopowy. Wartość $k_{S_1S_0}$ w D_2O jest aż 5,7 razy mniejsza aniżeli w H_2O, pomimo nieco mniejszej wartości E_{S_1} w D_2O (Tab. 2). Przyczyną jest znacznie mniejsza wartość współczynnika Francka-Condona w D_2O, ze względu na wyraźnie mniejszą częstość drgania rozciągającego O-D ($\nu_{O\text{-}D} \sim 2500$ cm^{-1}) niż drgania O-H ($\nu_{O\text{-}H} \sim 3500$ cm^{-1}). Ten interesujący wynik jest nie tylko bezpośrednim potwierdzeniem tworzenia S_1-exc(1) w tych rozpuszczalnikach, ale świadczy o tym, że silne wiązania wodorowe, tworzone przez te rozpuszczalniki z grupami karbonylowymi cząsteczki 4-AP, uczestniczą bezpośrednio w dezaktywacji S_1-exc(1). We wszystkich rozpuszczalnikach silnie protycznych (HFIP, H_2O i D_2O) wartość k_F wynosi $2{,}2 \times 10^7$ s^{-1} i jest charakterystyczna dla S_1-exc(1). Dla 4-AP w protycznych rozpuszczalnikach obserwuje się nie tylko wyraźne obniżenie ϕ_F, ale także skrócenie τ_F. O tym, że np. w HFIP wartość ϕ_F maleje 16 razy, w stosunku do otrzymanej wartości w 1-chloropropanie, zaś τ_F ulega skróceniu o 7 razy, decyduje ponad dwukrotnie większa wartość k_F dla 4-AP w stanie S_1-ICT w porównaniu z S_1-exc(1).

Trudniej jest zinterpretować wyniki fotofizyczne uzyskane dla 4-AP w DMSO, a także w innych polarnych, ale aprotycznych rozpuszczalnikach. Wartości ϕ_F i τ_F w DMSO są podobne jak w 1-chloropropanie. Jednak wyniki solwatochromowe w DMSO (Rys. 7) jednoznacznie świadczą o tworzeniu stosunkowo silnych wiązań wodorowych przez dwa wiązania N-H grupy aminowej cząsteczki 4-AP z atomem tlenu rozpuszczalnika. Można by oczekiwać, że wynikiem będzie tworzenie ekscipleksu drugiego rodzaju (S_1-exc(2)). Niestety, brak zmian w widmach TRES (nawet w czasach < 10 ps) mierzonych dla 4-AP w DMSO, a także zgodność tych widm ze stacjonarnym widmem emisji świadczą o bardzo szybkim tworzeniu wiązań wodorowych. W efekcie, bezpośrednia obserwacja tworzenia S_1-exc(2) nie jest możliwa.

Pośrednim potwierdzeniem tworzenia nowego indywiduum w DMSO jest mniejsza wartość $k_F = 4{,}7 \times 10^7\ s^{-1}$ w tym rozpuszczalniku niż dla 4-AP w stanie S_1-ICT, otrzymana w RCl, $k_F = 5{,}6 \times 10^7\ s^{-1}$.

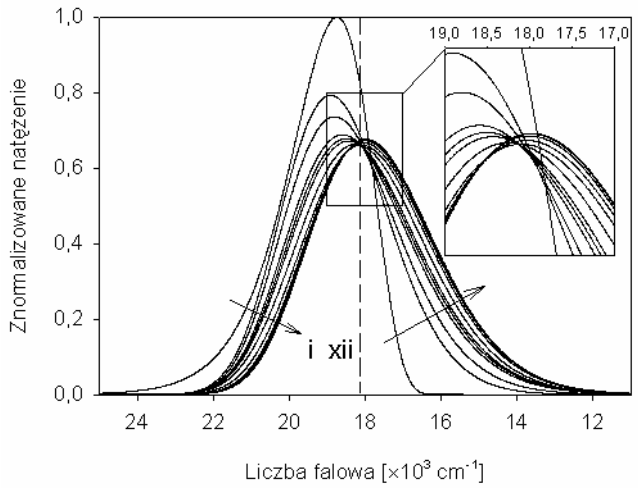
Warto zauważyć, że dla *N*-metylo-4-aminoftalimidu we wszystkich rozpuszczalnikach otrzymano podobne wyniki spektralne (w szczególności solwatochromowe) i fotofizyczne jak dla 4-AP [30]. Pozwala to stwierdzić, że choć grupa iminowa w cząsteczce 4-AP może tworzyć wiązania wodorowe, to jednak ich obecność nie wpływa na mechanizm i dynamikę dezaktywacji, zarówno cząsteczki 4-AP w stanie S_1-ICT, jak i S_1-exc(1) i S_1-exc(2).

Na przykładzie cząsteczki 4-AP zawierającej grupę donorową i akceptorową pokazano, że w wyniku jej wzbudzenia bardzo wyraźnie zmienia się energia wiązań wodorowych, które ona tworzy. Mimo złożonych właściwości spektralnych i fotofizycznych 4-AP (w szczególności tworzeniu kilku różnych wiązań wodorowych) możliwe było określenie, w oparciu o wyniki pomiarów spektralnych (szczególnie solwatochromowych) i fotofizycznych, jakie indywidua istnieją w układzie i jak zmienia się ich stężenie przy przejściu między dwoma stanami elektronowymi. Ponadto, wyznaczenie najważniejszych właściwości fotofizycznych (τ_F, ϕ_F) cząsteczki 4-AP w stanie S_1-ICT oraz S_1-exc, łącznie z wynikami pomiarów solwatochromowych w RCl oraz w HFIP i w DMSO, pozwoliło na wyjaśnienie przyczyn silnej zależności ν_F^{max}, τ_F, i ϕ_F od właściwości otoczenia. Jest to kluczowe nie tylko dla zbadania właściwości spektralnych i fotofizycznych badanej cząsteczki, ale jest także warunkiem koniecznym poprawnego opisania właściwości złożonego układu (np. układu mikrozorganizowanego w tym micelarnego), w którym cząsteczkę tę stosuje się jako sondę.

Badania z użyciem cząsteczki 4-AP przeprowadziliśmy dla trzech popularnych miceli zbudowanych z cząsteczek surfaktantów dodecylo siarczanu sodu (SDS), bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB) i tritonu X-100 (TX-100) [32, 33, 37]. Głównymi celami tych badań było stwierdzenie obecności cząsteczek wody we wnętrzu miceli i zbadanie, jak stężenie surfaktanta wpływa na właściwości miceli, a szczególnie na ich uwodnienie. Widma fluorescencji 4-AP w badanych trzech układach micelarnych są podobne jak w wodzie, ale są przesunięte hipsochromowo (Rys. 7). Świadczy to o mniejszym stężeniu cząsteczek H_2O we wnętrzu miceli aniżeli w samej wodzie jako rozpuszczalniku.

Wyniki pomiarów fotofizycznych dla 4-AP w micelach SDS, a w szczególności wartości ϕ_F, τ_F, k_F (Tab. 2), są podobne do odpowiednich uzyskanych w H_2O. Są one w pełni zgodne z wynikami spektralnymi i wskazują na to, że dezaktywacja 4-AP w stanie S_1-ICT w micelach SDS ma miejsce prawie wyłącznie poprzez proces efektywnego wygaszania przez cząsteczki wody obecne w układzie micelarnym. Tworzenie się silnych wiązań wodorowych z 4-AP prowadzi do powstania S_1-exc(1), podobnie jak w wodzie użytej jako rozpuszczalnik. Jednakże ze względu na znacznie niższe stężenie wody w pobliżu molekuł 4-AP w micelach niż w wodzie, czas potrzebny do utworzenia S_1-exc(1) w micelach jest znacznie dłuższy. Warto zauwa-

żyć, że wyznaczone TRES i powierzchniowo znormalizowane TRES (TRANES) (Rys. 8, [33]) oraz interpretacja zależnych od czasu zmian położenia i kształtu tych widm przedstawione w pracach [32, 33, 37] są w pełni zgodne z wynikami badań solwatochromowych [30]. Dobrze widoczne zmiany w TRES dla 4-AP w micelach SDS, obserwowane w czasach ~ 10–50 ps po wzbudzeniu, są głównie wynikiem bardzo wydajnego procesu tworzenia się S_1-exc(1).



Rysunek 8. Wykres TRANES dla 4-AP ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol/dm³) w M-SDS ($c_{SDS} = 0{,}15$ mol/dm³) wygenerowane za pomocą dopasowania krzywej log-normal, 2,44 ps/kanał, dla czasów opóźnień: (i) – 0,00 ps, (ii) – 2,44 ps, (iii) – 4,88 ps, (iv) – 7,32 ps, (v) – 9,76 ps, (vi) – 12,2 ps, (vii) – 24,4 ps, (viii) – 48,8 ps, (ix) – 100 ps, (x) – 200 ps, (xi) – 400 ps and (xii) – 800 ps. Linia przerywana-liczba falowa, przy której znajduje się punkt izoemisyjny

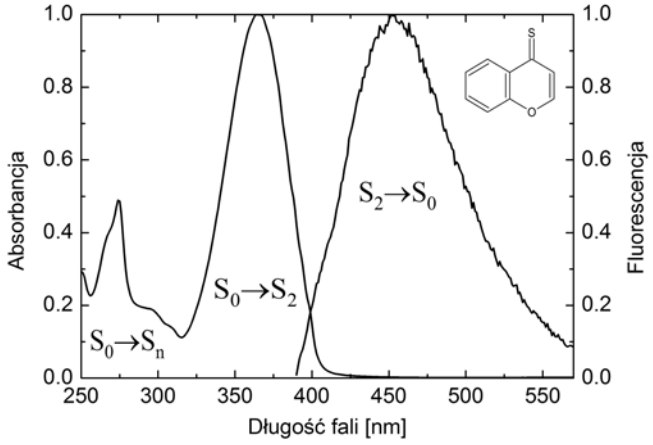
W czasach dłuższych od 50 ps po wzbudzeniu i aż do czasu 900 ps w widmie TRANES obserwuje się stosunkowo niewielkie zmiany spektralne związane z oddziaływaniami niespecyficznymi powstałego S_1-exc(1) z otoczeniem (Rys. 8). Po tym czasie widmo TRANES jest takie samo jak stacjonarne widmo fluorescencji 4-AP w M-SDS w wodzie. Krzywe TRANES obserwowane dla czasów krótszych niż ~ 10 ps nie współtworzą punktu izoemisyjnego. Wpływa na to ograniczona rozdzielczość czasowa stosowanej aparatury pomiarowej i znaczący wpływ solwatacji niespecyficznej na kształt i położenie widm w tym okresie czasu.

Warto zauważyć, że obecność punktu izoemisyjnego w TRANES dla 4-AP w micelach SDS (Rys. 8) [32, 33] i micelach TX-100 [37] wskazuje na istnienie w tych układach dwóch indywiduów świecących: cząsteczki 4-AP w stanie S_1-ICT i S_1-exc(1). W przedziale czasu, w którym punkt ten występuje, procesem mającym największy wpływ na postać TRES 4-AP jest tworzenie wiązania wodorowego przez grupę(y) karbonylową cząsteczki 4-AP z cząsteczką(ami) wody, w wyniku czego zwiększa się stężenie S_1-exc(1). Ponieważ towarzyszy temu silnie batochromowe przesunięcie TRES, można powiedzieć, że powstające wiązanie wodorowe wnosi

największy wkład w obserwowane w tym widmie zmiany spektralne [33, 37]. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są pierwszą spektralną ilustracją rozseparowania wpływu oddziaływań specyficznych i niespecyficznych w całkowitym oddziaływaniu cząsteczki sondy z jej otoczeniem.

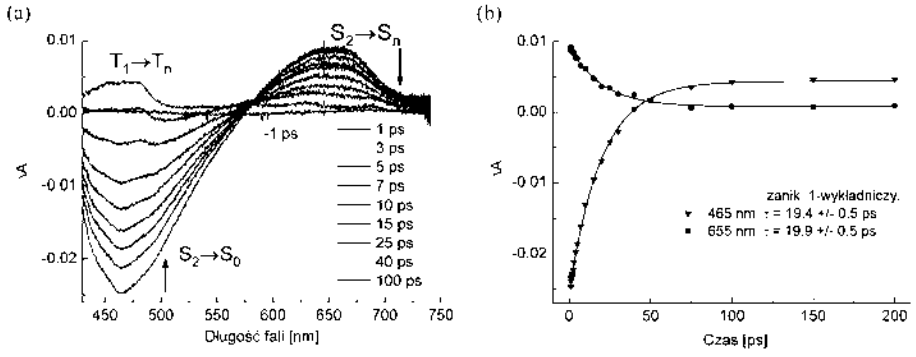
3. TIOKETONY, UDZIAŁ ODWRACALNYCH PROCESÓW FOTOCHEMICZNYCH W DEZAKTYWACJI ZE STANU S_2

Tioketony charakteryzują się nietypowymi właściwościami spektralnymi i fotofizycznymi [3, 7]. Związki te próbuje się wykorzystać w biologii i optyce nieliniowej [39, 40] oraz, jako sondy, w badaniach właściwości układów mikrozorganizowanych (micelarnych i cyklodekstryn) [41–43]. W literaturze powszechnie przyjmuje się, że ze względu na krótki czas życia cząsteczek w stanie S_1, a tym bardziej w wyższych stanach singletowych, S_n ($n > 1$), procesy międzycząsteczkowe praktycznie nie uczestniczą w dezaktywacji tych stanów. Jednak prowadzone od około dwudziestu lat badania tioketonów alifatycznych i aromatycznych jednoznacznie pokazały, że we wszystkich rozpuszczalnikach z wyjątkiem perfluorowęglowodorów (PF), głównym, a często dominującym (o wydajności > 90%) procesem dezaktywacji ze stanu $S_2(\pi,\pi^*)$, jest międzycząsteczkowe wygaszanie przez rozpuszczalnik [3, 5, 7, 44]. Powodem jest wyjątkowo duża reaktywność grupy tiokarbonylowej w stanie S_2. Sprawia to, że procesy wygaszania międzycząsteczkowego, niezależnie od natury użytego rozpuszczalnika i mechanizmu tego procesu, przebiegają z bardzo dużą stałą szybkości (pseudopierwszego rzędu), $k_s = 10^{10}$–10^{11} s^{-1} [5, 44–47]. W rezultacie, wygaszanie powoduje znaczące skrócenie czasu życia w stanie S_2, τ_{S_2} i obniżenie ϕ_F tioketonów w sytuacji, kiedy PF (w których zanik tioketonów w stanie S_2 jest całkowicie wewnątrzcząsteczkowy) zastąpi się rozpuszczalnikiem bardziej reaktywnym lub silniej oddziałującym, np. nasyconym węglowodorem. Dla cząsteczki benzopyrantionu (BPT), Rys. 9, typowego tioketonu aromatycznego, w stanie S_2 w perfluoroheksanie otrzymano τ_{S_2} = 187,2 ps, zaś w heksanie czas życia uległ dziesięciokrotnemu skróceniu, τ_{S_2} = 19,5 ps [48]. Pikosekundowe czasy życia wyznaczono z zaniku fluorescencji metodą TCSPC, a mierzone krzywe zaniku miały zawsze przebieg jednowykładniczy, niezależnie od długości fali wzbudzenia (w zakresie pasma absorpcji S_0–S_2) oraz długości fali emisji (w zakresie widma fluorescencji S_2–S_0). Wyniki te świadczą o tym, że jedynym indywiduum emitującym w reaktywnych rozpuszczalnikach węglowodorowych są tioketony w stanie S_2. Dlatego w celu zbadania mechanizmu wygaszania oraz obserwacji powstających indywiduów przejściowych, konieczne było użycie metody absorpcji przejściowej o femtosekundowej rozdzielczości czasowej. Metoda ta pozwala na uzyskanie kinetycznych danych o zachodzących procesach w postaci sygnałów: depopulacji stanu podstawowego w wyniku wzbudzenia próbki impulsem laserowym, emisji wymuszonej ze stanu S_2 do stanu podstawowego, absorpcji ze stanów S_2 i T_1, oraz powstających indywiduów przejściowych, w szczególności rodników nieświecących.



Rysunek 9. Stacjonarne widmo absorpcji i widmo fluorescencji (λ_{wzb} = 370 nm) BPT (1×10^{-4} mol/dm^3) w *n*-heksanie.

Wyniki badań metodą absorpcji przejściowej o femtosekundowej rozdzielczości czasowej dla BPT wzbudzonego do stanu S_2 w heksanie przedstawiono na Rys. 10. W widmach absorpcji przejściowej bezpośrednio po wzbudzeniu, obserwuje się dwa pasma: w zakresie 570–750 nm, związane z przejściem $S_2 \rightarrow S_n$, i w zakresie 430–570 nm wymuszonej fluorescencji $S_2 \rightarrow S_0$. Widmo tej emisji dobrze zgadza się ze stacjonarnym widmem fluorescencji (Rys. 9). Dla czasów opóźnień 3–40 ps intensywność obu pasm silnie maleje i stosunkowo niewiele zmienia kształt. Dla czasu opóźnienia 100 ps i dłuższych obserwuje się widmo absorpcji przejściowej związanej z przejściem ze stanu T_1 do wyższych stanów T_n [5]. Widmo to ma taki sam kształt jak widmo zmierzone dla znacznie dłuższych czasów opóźnień 10^{-8} s (na układzie nanosekundowej absorpcji przejściowej), kiedy w roztworze obecne są wyłącznie cząsteczki BPT w stanie T_1. Wyznaczone zarówno z pasma absorpcji przejściowej jak i emisji wymuszonej, kinetyki zaniku mają przebieg jednowykładniczy. Wyznaczony czas życia wynosi τ_{S_2} = 19,7 ps i jest taki sam jak wyznaczony z zaniku fluorescencji metodą TCSPC [48]. Wyniki te świadczą o tym, że w widmie absorpcji przejściowej obserwuje się jedynie cząsteczkę BPT w stanie S_2 i T_1. Brak sygnału ze stanu S_1 wynika z jego bardzo krótkiego czasu życia, τ_{S_1} < 1 ps. Jest to charakterystyczne dla tioketonów aromatycznych, dla których przerwa energetyczna $\Delta E(S_1\text{-}T_1)$ jest mała (< 1000 cm^{-1}) [5, 49, 50].

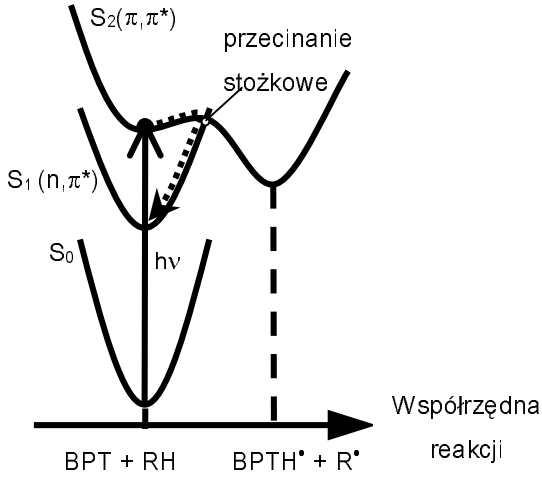


Rysunek 10. (a) Widma absorpcji przejściowej dla BPT w *n*-heksanie po wzbudzeniu λ_{wzb} = 400 nm, mierzone dla czasów opóźnień od 1 do 100 ps, (b) kinetyki mierzone dla długości fal 465 i 655 nm

Nasze wcześniejsze badania wskazywały na to, że międzycząsteczkowe oddziaływanie pomiędzy grupą C=S cząsteczki tioketonu w stanie S_2 i będącym w pobliżu wiązaniem C–H cząsteczki rozpuszczalnika prowadzi do bardzo wydajnego, prawie odwracalnego, odrywania atomu wodoru, powodującego wygaszanie aromatycznych S_2-tioketonów [3, 5, 45, 48]. Na przebieg tego procesu wskazywał efekt podstawienia izotopowego. Stosunek stałych szybkości wygaszania S_2-tioketonów przez węglowodory i ich pochodne deuterowane wynosi k_H/k_D = 2–3 [3, 45, 48]. Wydajność kwantowa zaniku fotochemicznego badanych tionów w tych warunkach jest mała (poniżej 10^{-2} [7, 51]), co świadczy o bardzo dużej odwracalności procesu wygaszania. W oparciu o uzyskane wyniki badań fotochemicznych tioketonów w stanie S_2 w rozpuszczalnikach węglowodorowych, wielokrotnie przyjmowano tworzenie rodników tililowych i tioketylowych, jako indywiduów przejściowych w tych procesach [52–56]. Mimo tego, do chwili obecnej nie udało się stwierdzić tworzenia takich rodników ani też zarejestrować ich widm absorpcji przejściowej przy wzbudzeniu tioketonów do stanu S_2.

Proces odrywania atomu wodoru od cząsteczek rozpuszczalnika i tworzenie w nim rodników ketylowych był stosunkowo szeroko badany dla cząsteczek ketonów w stanie trypletowym T_1 (n,π^*) [57, 58]. Natomiast bardzo niewiele wiadomo na temat rodników powstających w procesie wygaszania stanu S_1, a tym bardziej rodników i ekscipleksów powstających z wyższych stanów singletowych S_n $(n \geq 2)$ [3–6, 47, 59]. W oparciu o wyniki badań eksperymentalnych i obliczeń teoretycznych dla ketonów alifatycznych i azoalkanów, wzbudzonych do stanu $S_1(n,\pi^*)$ [4, 6, 60], stwierdzono, że dezaktywują się one w międzycząsteczkowym procesie wygaszania i mogą tworzyć rodniki albo dezaktywować się na drodze konkurencyjnego procesu przecinania stożkowego. Powyższe dane literaturowe pozwalają wyjaśnić, z jakiej przyczyny w widmie absorpcji przejściowej BPT wzbudzonego do stanu S_2 w heksanie (podobnie jak w kilku innych węglowodorach, w tym w cykloheksanie) nie widać sygnału pochodzącego od rodników tioketylowych i/lub tililowych [5], mimo że rozdzielczość czasowa i czułość stosowanego femto-

sekundowego spektrometru absorpcji przejściowej jest wystarczająco duża. Przyczyną może być bardzo krótki czas życia tych rodników $\tau_R < 3$ ps, znacznie krótszy od czasu życia BPT w stanie S_2, $\tau_{S_2} \sim 20$ ps. Taka relacja czasów życia powoduje, że choć wydajność tworzenia rodników nie jest mała, to jednak ich chwilowe stężenie jest zbyt małe, aby mogło być bezpośrednio obserwowane. O bardzo krótkim czasie życia rodników powstających z BPT w stanie S_2 może decydować bardzo szybki proces ich rekombinacji pierwotnej w klatce rozpuszczalnika. Jak dotąd, proces takiej rekombinacji we wzbudzonym stanie singletowym był badany dla rodników powstałych w wyniku wewnątrzcząsteczkowej fotodysocjacji małych, 2–3 atomowych [61–66], bądź wieloatomowych cząsteczek [54, 67–69]. Najkrótszy czas trwania procesu rekombinacji w tych układach wynosił kilka pikosekund [67]. Natomiast do tej pory nie badano procesu rekombinacji par rodników uformowanych w międzycząsteczkowym procesie odrywania wodoru od cząsteczki rozpuszczalnika przez krótkożyjące reaktywne cząsteczki we wzbudzonym stanie singletowym. Warto zauważyć, że de Mayo i współpracownicy [55, 56], w oparciu o analizę stacjonarnych wyników fotochemicznych, przyjęli, że czas życia rodników powstających w procesie wygaszania alifatycznego tioketonu S_2-adamantanotionu przez cząsteczki cykloheksanu wynosi zaledwie 2 ps. Niestety, ta bardzo ciekawa propozycja nie została do tej pory zweryfikowana przez bezpośrednią obserwację tworzenia i zaniku powstających rodników. Jest także możliwe, że brak sygnału absorpcji przejściowej pochodzącej od rodników jest wynikiem przebiegu bardzo szybkiego konkurencyjnego procesu przecinania stożkowego. Mechanizm tego procesu o naturze chemicznej można ogólnie opisać jako międzycząsteczkowy proces dezaktywacji bezpromienistej poprzez oddziaływanie wyjątkowo reaktywnej grupy tiokarbonylowej cząsteczki BPT w stanie S_2 i wiązania C–H o dostatecznie małej energii w cząsteczce rozpuszczalnika (wygaszacza). Jak pokazał Nau ze współpracownikami, proces ten może uczestniczyć w dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek ketonów alifatycznych i azaalkanów w stanie S_1 (n, π^*), w dostatecznie reaktywnych rozpuszczalnikach [4, 6, 60]. W warunkach tych proces odrywania atomu wodoru od cząsteczki rozpuszczalnika jest procesem uprzywilejowanym energetycznie. W przypadku BPT w stanie S_2, w węglowodorach prowadzi to do przecinania krzywych energii potencjalnej stanu S_2 ze stanem wzbudzonym S_1 wzdłuż współrzędnej reakcji odpowiadającej odrywaniu atomu wodoru od cząsteczki rozpuszczalnika (Rys. 11) [5].



Rysunek 11. Schemat krzywych energii potencjalnej dla procesu przecinania stożkowego między stanem S_2 i S_1 oraz odrywania atomu wodoru z cząsteczki rozpuszczalnika RH przez cząsteczkę BPT wzbudzoną do stanu S_2

Wydaje się, że cząsteczki wielu związków, szczególnie zawierających heteroatomy posiadające elektrony z trzeciej i wyższych powłok walencyjnych oraz reaktywne grupy funkcyjne lub też pojedyncze wiązania o małej energii, po wzbudzeniu do stanów S_n ($n \geq 2$) o wysokiej energii, podobnie jak tioketony w stanie S_2, mogą ulegać dezaktywacji z udziałem procesów międzycząsteczkowych. Warto zauważyć, że wzbudzenie tych cząsteczek do stanów S_n ($n \geq 2$) ma często miejsce zarówno w laboratorium, jak i w wyniku absorpcji promieniowania słonecznego. Dlatego wyniki zaprezentowane dla tioketonów w stanie S_2 mogą mieć charakter modelowy.

NAJWAŻNIEJSZE WNIOSKI

W pracy zaprezentowano wyniki badań spektralnych i fotofizycznych uzyskane przez nas dla cząsteczek będących przedstawicielami trzech różnych klas związków:

- zasad Schiffa – posiadających silne wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, tworzących kilka fototautomerów,
- aminoftalimidów – posiadających stany elektronowe typu LE i ICT, tworzących ekscipleksy poprzez wiązania wodorowe z cząsteczkami rozpuszczalników,
- tioketonów – zawierających w stanie S_2 wyjątkowo reaktywną grupę tiokarbonylową, ulegających wygaszaniu przez cząsteczki rozpuszczalników o różnych właściwościach.

Warto podkreślić, że dla wszystkich badanych związków, niezależnie od złożonych mechanizmów ich dezaktywacji przebiegających z bardzo różną dynamiką,

dominującym końcowym procesem jest odtwarzanie niezmienionego chemicznie substratu w stanie podstawowym.

Koniecznym warunkiem poprawnego zinterpretowania złożonych właściwości badanych związków w stanach elektronowo wzbudzonych jest dobór rozpuszczalników o odpowiednich właściwościach. Umożliwia to zbadanie roli niespecyficznych i specyficznych (wiązań wodorowych) oddziaływań z rozpuszczalnikiem oraz obserwację zarówno wewnątrzcząsteczkowych, jak i międzycząsteczkowych procesów dezaktywacji.

Uzyskanie zaprezentowanych wyników było możliwe dzięki użyciu stacjonarnych i rozdzielczych w czasie laserowych metod spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, o rozdzielczości czasowej piko- i femtosekundowej.

Otrzymane wyniki mogą być pomocne w badaniach związków o podobnych własnościach oraz układów bardziej złożonych, w tym również układów biologicznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca była finansowana z grantów N 204 124 31/2853 i N 204 149 32/3777.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] Z.R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, Chem. Rev., 2003, **103**, 3899.
[2] J. Waluk, *Conformational Analysis of Molecules in Excited States*, 1st ed., Wiley-VCH, New York, 2000.
[3] G. Burdziński, J. Kubicki, A. Maciejewski, R.P. Steer, S. Valete, E.K.L. Yeow [w:] *Organic Photochemistry and Photophysics*, Ramamurthy V., Schanze, K.S. Eds., Taylor and Francis, Inc., New York, 2006, pp. 1.
[4] W.M. Nau, U. Pischel [w:] *Organic Photochemistry and Photophysics*, Ramamurthy V., Schanze K.S. Eds., Taylor and Francis, Inc., New York, 2006, pp. 56.
[5] G. Burdziński, A. Maciejewski, G. Buntinx, O. Poizat, C. Lefumeux, Chem. Phys. Lett., 2003, **368**, 745.
[6] W.M. Nau, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 1998, **102**, 476.
[7] A. Maciejewski, R.P. Steer, Chem. Rev., 1993, **93**, 67.
[8] A. Senier, F.G. Shepheard, R. Clarke, J. Chem. Soc., 1912, **101**, 1950.
[9] A.N. Bondar, S. Fischer, S. Suhai, J.C. Smith, J. Phys. Chem. B, 2005, **109**, 14786.
[10] R.S. Becker, Photochem. Photobiol., 1988, **48**, 369.
[11] *Special Issue on Photochromism: Memories and Switches*, Chem. Rev., 2000, 100.
[12] T. Elsaesser, H.J. Bakker, *Ultrafast Hydrogen Bonding Dynamics and Proton Transfer Processes in the Condensed Phase*, Dordrecht ed., Kluwer Academic Publishers, 2002.
[13] M. Ziółek, J. Kubicki, A. Maciejewski, R. Naskręcki, A. Grabowska, J. Chem. Phys., 2006, **124**, 124518.
[14] M. Ziółek, J. Kubicki, A. Maciejewski, R. Naskręcki, A. Grabowska, Chem. Phys. Lett., 2003, **369**, 80.

[15] M. Ziółek, J. Kubicki, A. Maciejewski, R. Naskręcki, A. Grabowska, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, **6**, 4682.
[16] M. Ziółek, J. Kubicki, A. Maciejewski, R. Naskręcki, W. Luniewski, A. Grabowska, J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 2006, **180**, 101.
[17] K. Kownacki, *Fotofizyka zasad Schiffa z wewnątrzmolekularnym wiązaniem wodorowym*, Instytut Chemi Fizycznej PAN, Warszawa, 1994.
[18] R. Naskręcki, M. Lorenc, M. Ziolek, J. Karolczak, J. Kubicki, A. Maciejewski, M. Szymański, Bull. Pol. Acad. Sci.-Chem., 1999, **47**, 333.
[19] R. Naskręcki, *Femtosekundowa spektroskopia absorpcji przejściowej*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza: Poznań, 2000.
[20] A. Maciejewski, R. Naskręcki, M. Lorenc, M. Ziółek, J. Karolczak, J. Kubicki, M. Matysiak, M. Szymański, J. Mol. Struct., 2000, **555**, 1.
[21] T. Wróżowa, B. Ciesielska, D. Komar, J. Karolczak, A. Maciejewski, J. Kubicki, Rev. Sci. Instrum., 2004, **75**, 3107.
[22] J. Karolczak, D. Komar, J. Kubicki, T. Wróżowa, K. Dobek, B. Ciesielska, A. Maciejewski, Chem. Phys. Lett., 2001, **344**, 154.
[23] N. Otsubo, C. Okabe, H. Mori, K. Sakota, K. Amimoto, T. Kawato, H. Sekiya, J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 2002, **154**, 33.
[24] M.Z. Zgierski, A. Grabowska, J. Chem. Phys., 2000, **112**, 6329.
[25] K. Kownacki, A. Mordzinski, R. Wilbrandt, A. Grabowska, Chem. Phys. Lett., 1994, **227**, 270.
[26] D. Zhong, A. Douhal, A.H. Zewail, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**, 14056.
[27] A. Douhal, T. Fiebig, M. Chachisvilis, A.H. Zewail, J. Phys. Chem. A, 1998, **102**, 1657.
[28] N.G. Bakhsiev, *Solvatochromism*, Leningradskij Gosudarstwiennyj Univiersitiet, Leningrad, 1989.
[29] P. Suppan, N. Ghoneim, *Solvatochromism*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.
[30] E. Krystkowiak, K. Dobek, A. Maciejewski, J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 2006, **184**, 250.
[31] T. Soujanya, R.W. Fessenden, A. Samanta, J. Phys. Chem., 1996, **100**, 3507.
[32] A. Maciejewski, J. Kubicki, K. Dobek, J. Phys. Chem. B, 2005, **109**, 9422.
[33] A. Maciejewski, J. Kubicki, K. Dobek, J. Phys. Chem. B, 2003, **107**, 13986.
[34] S. Das, A. Datta, K. Bhattacharyya, J. Phys. Chem. A, 1997, **101**, 3299.
[35] W.R. Ware, S.K. Lee, G.J. Brant, P.P. Chow, J. Chem. Phys., 1971, **54**, 4729.
[36] Y. Marcus, *The Properties of Solvents*, John Wiley & Sons, Chichester, U.K., 1998.
[37] A. Maciejewski, J. Kubicki, K. Dobek, J. Col. Int. Sci., 2006, **295**, 255.
[38] J.A. Ingram, R.S. Moog, N. Ito, R. Biswas, M. Maroncelli, J. Phys. Chem. B, 2003, **107**, 5926.
[39] M. Borges, A. Romão, O. Matos, C. Marzano, S. Caffieri, R.S. Becker, A.L. Maçanita, Photochem. Photobiol., 2002, **75**, 97–106.
[40] R.F. Bradford, G.B. Schuster, J. Org. Chem., 2003, **68**, 1075.
[41] M. Milewski, W. Augustyniak, A. Maciejewski, J. Phys. Chem. A, 1998, **102**, 7427.
[42] M. Milewski, A. Maciejewski, W. Augustyniak, Chem. Phys. Lett., 1997, **272**, 225.
[43] A. Maciejewski, A. Jakubowska, E. Dutkiewicz, W. Augustyniak, J. Col. Int. Sci., 1996, **177**, 528.
[44] A. Maciejewski, D.R. Demmer, D.R. James, A. Safarzadeh-Amiri, R.E. Verrall, R.P. Steer, J. Am. Chem. Soc., 1985, **107**, 2831.
[45] A. Maciejewski, M. Sikorski, W. Augustyniak, M. Fidecka, J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 1996, **94**, 119.
[46] K. Dobek, A. Maciejewski, J. Karolczak, W. Augustyniak, J. Phys. Chem. A, 2002, **106**, 2789.
[47] G. Burdziński, A. Maciejewski, G. Buntinx, O. Poizat, C. Lefumeux, Chem. Phys. Lett., 2004, **384**, 332.
[48] J. Kubicki, A. Maciejewski, M. Milewski, T. Wróżowa, R.P. Steer, Phys. Chem. Chem. Phys., 2002, **4**, 173.

[49] D. Tittelbach-Helmrich, R.P. Steer, Chem. Phys. Lett., 1996, **262**, 369.
[50] A. Maciejewski, M. Szymański, R.P. Steer, J. Phys. Chem., 1986, **90**, 6314.
[51] J. Kozłowski, A. Maciejewski, M. Milewski, W. Urjasz, J. Phys. Org. Chem., 1999, **12**, 47.
[52] D.S. Blackwell, K.H. Lee, P. de Mayo, G.L.R. Petrasiunas, G. Reverdy, Nouv. J. Chim., 1979, **3**, 123.
[53] A.H. Lawrence, C.C. Liao, P. de Mayo, V. Ramamurthy, J. Am. Chem. Soc., 1976, **98**, 3572.
[54] U. Bruhlmann, J.R. Huber, J. Photochem., 1979, **10**, 205.
[55] K.Y. Law, P. De Mayo, S.K. Wong, J. Am. Chem. Soc., 1977, **99**, 5813.
[56] K.Y. Law, P. De Mayo, J. Am. Chem. Soc., 1976, **101**, 3251.
[57] P. Wagner, B.S. Park, Eds., *Photoinduced Hydrogen Atom Abstraction by Carbonyl state*, Marcel Dekker, New York, 1991; Vol. 11.
[58] S.J. Formosinho, L.G. Arnaut, Adv. Photochem., 1991, **16**, 67.
[59] M. Lorenc, A. Maciejewski, M. Ziółek, R. Naskręcki, J. Karolczak, J. Kubicki, B. Ciesielska, Chem. Phys. Lett., 2001, **346**, 224.
[60] W.M. Nau, W. Adam, J.C. Scaiano, Chem. Phys. Lett., 1996, **253**, 92.
[61] Y. Hirata, Y. Niga, T. Okada, Chem. Phys. Lett., 1994, **221**, 283.
[62] A. Mank, C. Starrs, M.N. Jego, J.W. Hepburn, J. Chem. Phys., 1996, **104**, 3609.
[63] S.C. Hayes, M.J. Philpott, J. Chem. Phys., 1998, **109**, 2596.
[64] T.W. Scott, S.N. Liu, J. Phys. Chem., 1989, **93**, 1393.
[65] J. Thogersen, P.U. Jepsen, C.L. Thomsen, J.A. Poulsen, J.R. Byberg, S.R. Keiding, J. Phys. Chem. A, 1997, **101**, 3317.
[66] C.L. Thomsen, D. Madsen, J. Thogersen, J.R. Byberg, S.R. Keiding, J. Chem. Phys., 1999, **111**, 703.
[67] T. Bultmann, N.P. Ernsting, J. Phys. Chem., 1996, **100**, 19417.
[68] M. Fujiwara, A. Yamasaki, K. Mishima, K. Toyomi, J. Chem. Phys., 1998, **109**, 1359.
[69] K. Sumathi, A.K. Chandra, J. Photochem. Photobiol. A: Chem, 1988, **43**, 313.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 października 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

STRUKTURALNE ZAGADKI KOMPLEKSOWANYCH GRAMICYDYN W ICH KRYSZTAŁACH

STRUCTURAL PUZZLES OF COMPLEXED GRAMICIDINS IN THEIR CRYSTALS

Marek L. Główka, Andrzej Olczak, Joanna Bojarska, Małgorzata Szczesio

Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź
marekglo@p.lodz.pl

Abstract
Wstęp
1. Budowa gramicydyny
   1.1. Rola naprzemienności aminokwasów D i L
   1.2. Rola heterogeniczności gramicydyny
2. Budowa kanałów gramicydynowych w kryształach
   2.1. Kanały gramicydynowe. Dimery jedno- czy dwuniciowe?
   2.2. Równoległe czy antyrównoległe ułożenie helis w dimerach?
   2.3. Helisy prawo- czy lewoskrętne?
3. Gramicydynowe zagadki strukturalne
   3.1. Gramicydyna w kryształach otrzymanych z kwasu octowego
   3.2. Stechiometria w kryształach kompleksów gramicydyny z solami litowców
   3.3. Kierunek skrętu helis gramicydyny w jej kompleksach
   3.4. Heterogeniczność dimerów gramicydynowych
   3.5. Asymetria rozkładu kationów w dimerach
   3.6. Rola anionów w strukturach krystalicznych kompleksowanych gramicydyn
Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. inż. Marek Leszek Główka ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w 1970 roku (dr 1977, dr hab. 1983, tytuł 1992). Od 1998 roku jest profesorem zwyczajnym w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej. Współautor wdrożonego patentu (przemysł farmaceutyczny), 2 skryptów, około 150 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej, wydawca „Słownika Terminów Krystalograficznych", Przewodniczący Komisji Analizy Strukturalnej i członek Prezydium Komitetu Krystalografii PAN, wiceprzewodniczący III Wydziału Łódzkiego Towarzystwa Naukowego, przewodniczący łódzkiego Oddziału PTCh, Dyrektor Narodowego Centrum Afiliowanego przez Cambridge Crystallographic Data Centre. Wypromował 6 doktorów.

Zajmuje się rentgenograficzną analizą strukturalną związków molekularnych o znaczeniu biologicznym, polimorfizmem, poszukiwaniem zależności między strukturą a właściwościami związków organicznych (zwłaszcza substancji czynnych leków), oddziaływaniami międzycząsteczkowymi oraz projektowaniem materiałów o przewidywanych właściwościach.

Dr inż. Andrzej Olczak jest absolwentem Wydziału Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej Politechniki Łódzkiej, który ukończył w roku 1987. Od 1992 roku pracuje w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Wydziale Chemicznym tejże uczelni. Stopień doktora uzyskał w roku 1997. W latach 1999–2000 i 2001 odbył staże naukowe w Wielkiej Brytanii (The University of Manchester), w zespole prof. Johna Helliwella. Jest współautorem ponad 30 publikacji z zakresu rentgenowskiej analizy strukturalnej. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z metodyką badań rentgenograficznych, zwłaszcza z anomalnym rozpraszaniem promieniowania rentgenowskiego na kryształach.

Dr inż. Joanna Bojarska ukończyła studia w roku 2001 na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Pracę magisterską z zakresu chemii strukturalnej a następnie doktorską pod kierunkiem prof. Marka Główki (w 2005 roku) wykonała w Zespole Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii. Praca doktorska była poświęcona badaniom krystalograficznym gramicydyny. Jest współautorką 6 publikacji, 4 komunikatów ustnych oraz 14 komunikatów posterowych.

Dr inż. Małgorzata Szczesio ukończyła studia w 2002 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w zakresie Chemii Strukturalnej. Pracę doktorską, związaną z badaniami struktury krystalicznej kompleksów gramicydyny z solami litowców lekkich, wykonaną pod kierunkiem prof. Główki, obroniła w 2006 roku. Jest współautorką 6 publikacji i 17 komunikatów konferencyjnych.

ABSTRACT

Gramicidin D (gD) is a naturally occurring mixture of six linear pentadecapeptides produced by *Bacillus brevis* species in soil, which exhibit significant antibacterial activity against all Gram+ bacteria. The peptides are modified at both ends and the six forms differ at 1st (Val or Ile) and 11th (Trp, Phe or Tyr) positions. The most populated gramicidin A (VgA) has a sequence CH(O)-Val_1-Gly-Ala-D--Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-Trp-D-Leu-Trp_{11}-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp--$NHCH_2CH_2OH$.

Gramicidin was isolated in 1939 and its sequence was determined five years later. First models of its secondary structure based on helical conformation were proposed in 1971–1974 explaining channel-like properties of the peptide.

Despite over 60 years of studies on gramicidin, there are still numerous unanswered questions concerning its structure and functioning. Even fundamental issues of dimers type and handedness of helices in the gramicidin channel formed by the peptide in the bacterial cell membranes are not univocally accepted.

After refining several crystal structures of gramicidin D complexes with alkali metal salts, we have at hands not only more facts concerning double-stranded antiparallel gramicidin dimers, but also new puzzled observations due to very high resolution data collected. These, among others, include visible asymmetry of cations' sites and occupations in the gramicidin channels, as well as specific arrangement of heterodimers in the crystals.

The paper describes these interesting features of the complexed gramicidin structure and proposes some new explanations.

Keywords: complexes of gramicidin, crystal structure of gramicidin, heterogeneity of gramicidin dimers, distribution of cations in the gramicidin dimers

Słowa kluczowe: kompleksy gramicydyny, struktura krystaliczna gramicydyny, heterogeniczność dimerów gramicydynowych, rozkład kationów w dimerach gramicydynowych

WSTĘP

Pierwsza wzmianka o gramicydynie D pochodzi z 1939 roku, kiedy to Dubos wyizolował ją z bakterii glebowych *Bacillus brevis* [1–3]. W 1944 roku doniesiono o bakteriobójczych właściwościach tej substancji zwalczającej bakterie Gram dodatnie [4], a więc posiadające tylko pojedynczą, cytoplazmatyczną błonę komórkową. Skład mieszaniny sześciu peptydów liniowych, zwanej gramicydyną D, oraz jej budowę chemiczną określił Sarges [5–7].

Kolejnym ważnym etapem było odkrycie przez Pressmana w 1965 roku mechanizmu bakteriobójczego działania gramicydyny, w wyniku samoasocjacji jej cząsteczek, w tzw. kanały gramicydynowe [8] transportujące m.in. kationy K^+ i Na^+, zgodnie z gradientem stężeń. Wywołane tym zaburzenia fizjologicznych stężeń wymienionych jonów powodują śmierć komórek bakteryjnych.

Pierwsze modele kanałów gramicydynowych powstały w latach siedemdziesiątych. Najpierw Urry zaproponował model kanału jako jednoniciowego dimeru, w którym dwie helikalnie zwinięte cząsteczki gramicydyny ustawiają się do siebie *N*-końcami (antyrównolegle, głowa do głowy) [9]. Następnie Veatch ze współpracownikami opracował model kanału jako dwuniciowego dimeru z wzajemnie owiniętymi wokół siebie peptydami gramicydyny, biegnącymi w przeciwnych kierunkach [10, 11]. Oba modele dobrze objaśniały najważniejszą właściwość gramicydyny, jaką jest tworzenie kanałów zdolnych do transportowania kationów.

Niniejsze opracowanie opiera się przede wszystkim na wysokorozdzielczych badaniach rentgenograficznych i odnosi się do wyników osiągniętych innymi metodami tylko w zakresie niezbędnym do opisania i zrozumienia poruszanych zagadnień.

Pierwsze kryształy gramicydyny otrzymała w 1949 r. Dorothy Hodgkin, późniejsza laureatka (1964) Nagrody Nobla za rozwiązanie struktury krystalicznej witaminy B_{12} [12]. Jednak ówczesne próby rozwiązania struktury gramicydyny zakończyły się niepowodzeniem. Musiało upłynąć prawie 40 lat, zanim w 1988 roku, w tym samym numerze „*Science*", ukazały się dwa artykuły opisujące strukturę gramicydyny. Jeden z nich, autorstwa Langsa [13], opisywał strukturę kryształów tego peptydu w stanie wolnym. Drugi, autorstwa Wallace i Ravikumara – strukturę kompleksu gramicydyny z chlorkiem cezu [14]. W kolejnych latach Langs otrzymał i rozwiązał strukturę jednoskośnej odmiany polimorficznej wolnej gramicydyny [15], a Doyle i Wallace, izostrukturalnego kompleksu z rodankiem potasu [16]. Wyniki tych badań strukturalnych, zwłaszcza kompleksowanej gramicydyny, która w kryształach zawierała kationy litowców wewnątrz helikalnie zwiniętego dimeru, stały się podstawą proponowanych modeli działania kanału gramicydynowego, mimo niskiej rozdzielczości użytych danych oraz kilku istotnych krystalochemicznych nieprawidłowości, opisanych poniżej. Natomiast struktury krystaliczne wolnej gramicydyny, mimo iż jakościowo o wiele lepsze od struktur krystalicznych jej kompleksów z solami jednowartościowych kationów, mają mniejsze znaczenie z biologicznego

punktu widzenia, bowiem w cylindrycznych dimerach gramicydyny tej formy nie mieszczą się ani kationy, ani woda.

1. BUDOWA GRAMICYDYNY

Gramicydyna D (gD) jest mieszaniną sześciu naturalnych hydrofobowych pentadekapeptydów z resztą formylową na *N*-końcach i resztą etanoloaminową na C-końcach, wytwarzaną przez mikroorganizmy glebowe *Bacillus brevis*. Ten jonoforowy antybiotyk działający na bakterie Gram+ zawiera sześć liniowych form różniących się rodzajem aminokwasu w pozycji 1 (Val w Vg lub Ile w Ig) i 11 (Trp w gA, Tyr w gC lub Phe w gB). Gramicydyna D zawiera przeciętnie 80% gA, 5% gB, 15% gC, w tym jest 80% Vg, i 20% Ig [17], a sekwencja dominującej formy, zwanej gramicydyną A (VgA), jest następująca:

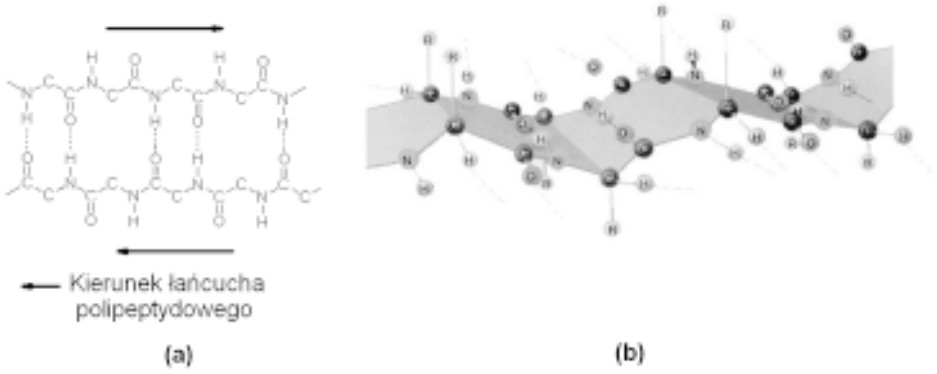
$$\mathbf{CH(O)\text{-}Val_1\text{-}Gly_2\text{-}Ala_3\text{-}D\text{-}Leu_4\text{-}Ala_5\text{-}D\text{-}Val_6\text{-}Val_7\text{-}D\text{-}Val_8\text{-}}$$
$$\mathbf{\text{-}Trp_9\text{-}D\text{-}Leu_{10}\text{-}Trp_{11}\text{-}D\text{-}Leu_{12}\text{-}Trp_{13}\text{-}D\text{-}Leu_{14}\text{-}Trp_{15}\text{-}NHCH_2CH_2OH}$$

Schemat 1. Sekwencja aminokwasów w walinogramicydynie A (VgA)

Najważniejszą cechą gramicydyny jest naprzemienność konfiguracji D i L tworzących ją aminokwasów. Od chwili określenia budowy gramicydyny było jasne, że naprzemienność aminokwasów D i L (achiralna glicyna znajduje się w miejscu przynależnym aminokwasom szeregu D), rodzaj aminokwasów w niej obecnych oraz blokowanie końców N i C tego peptydu nie są przypadkowe i wiążą się z możliwością wbudowywania gramicydyny w błony lipidowe. Nie było natomiast jasne, dlaczego w pozycji 1 może występować walina (Vg) lub izoleucyna (Ig), a w pozycji 11 tryptofan (gA), tyrozyna (gC) lub fenyloalanina (gB) (Schemat 1), i jaki jest sens występowania takich modyfikacji.

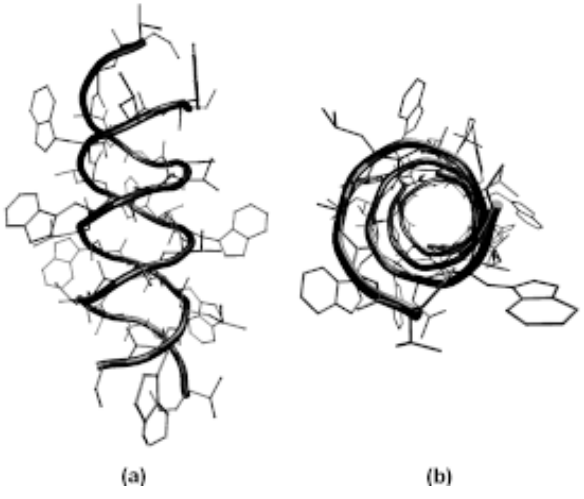
1.1. ROLA NAPRZEMIENNOŚCI AMINOKWASÓW D I L

Z topologicznego punktu widzenia, drugorzędową strukturę gramicydyny we wszystkich do chwili obecnej rentgenograficznie zbadanych kryształach tworzą dwa antyrównolegle biegnące łańcuchy peptydowe, połączone wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupami amidowymi (Rys. 1 [18, 19]), tak jak w antyrównoległej β-kartce (β-arkuszu).



Rysunek 1. Struktura antyrównoległej β-kartki:
a) widok z góry, b) widok z boku [18, 19]

W przypadku białek zbudowanych z aminokwasów naturalnych (szeregu L), β-kartka jest pofałdowaną warstwą, w której łańcuchy boczne aminokwasów, przyjmujących preferowane konformacje wokół wiązań C_α–C(O) oraz C_α–N (Rys. 1), znajdują się naprzemiennie po obu stronach β-kartki. Zawada przestrzenna, spowodowana obecnością łańcuchów bocznych, wymusza skręt jednostek peptydowych w stosunku do siebie, przy czym większość β-kartek ma tendencję do skręcania się w lewo. W przypadku gramicydyny, wobec naprzemiennego występowania aminokwasów D i L, wszystkie łańcuchy boczne w dimerycznej β-kartce są po tej samej stronie kartki, powodując jej jeszcze silniejsze zakrzywianie się i w końcu, zamykanie za pomocą wiązań wodorowych w formę krótkiej rurki, zwanej kanałem gramicydynowym (Rys. 2).



Rysunek 2. Struktura dwuniciowego antyrównoległego dimeru gramicydyny D:
a) widok z boku kanału gramicydynowego, a) widok wzdłuż osi helisy

1.2. ROLA HETEROGENICZNOŚCI GRAMICYDYNY

Na podstawie pomiarów elektrofizjologicznych stwierdzono, że rodzaj aminokwasu w pozycji 11 ma duże znaczenie dla funkcjonowania kanału gramicydynowego, ponieważ wpływa na czas otwarcia kanału oraz jego właściwości transportujące [20–22]. Rodzaj aminokwasu w pozycji 11 (Trp w gA, Phe w gB czy Tyr w gC) wpływa na energię wiązania kationów w kanale, a także na transport pojedynczego kationu [21]. Potwierdzeniem takiego wpływu aminokwasu w pozycji 11 są wyniki pomiarów przewodnictwa dla pojedynczego kanału, wykonane dla gramicydyn liniowych i ich analogów [21, 22]. Natomiast heterogeniczność, związana z obecnością w pozycji 1 waliny lub izoleucyny, nie ma wpływu na przewodnictwo kanału gramicydynowego, co znajduje swój wyraz również w katalogach producentów chemikaliów, w których oferowane są przeważnie gramicydyny A i D (mieszanina gA, gB i gC) bez wyszczególniania, jaki jest w nich udział walinogramicydyn i izoleucynogramicydyn [23].

2. BUDOWA KANAŁÓW GRAMICYDYNOWYCH W KRYSZTAŁACH

Pojęcie kanał gramicydynowy w pracach biologicznych oznacza dimer gramicydyny, który wbudowując się w błonę komórkową, tworzy w niej otwór (kanał), przez który mogą przepływać jednowartościowe kationy [24].

2.1. KANAŁY GRAMICYDYNOWE. DIMERY JEDNO- CZY DWUNICIOWE?

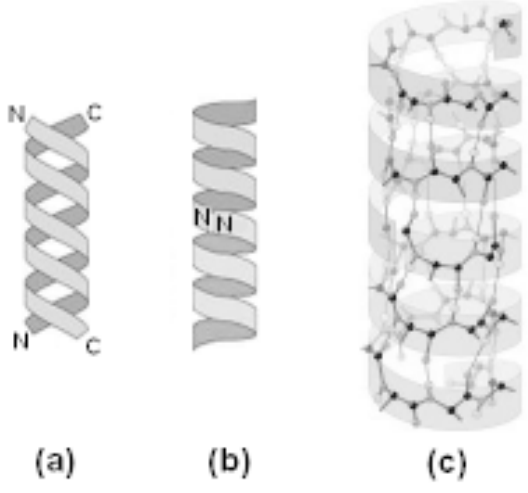
Udział i pozycja poszczególnych aminokwasów w gramicydynie (Schemat 1) nie są przypadkowe. Bliżej *N*-końca występują wyłącznie aminokwasy alifatyczne (najwięcej waliny), zaś bliżej C-końca występują na przemian leucyna i tryptofan, a więc aminokwasy z największymi łańcuchami bocznymi, przy czym tryptofan, choć może tworzyć wiązania wodorowe, ma znaczną lipofilowość, porównywalną z leucyną [25]. Nie ulega wątpliwości, że taki skład aminokwasów zapewnia duże powinowactwo gramicydyny do lipofilowego środowiska błony komórkowej, zwłaszcza że zwinięty dimer gramicydynowy (kanał) ma ukryte w swym wnętrzu i zablokowane wiązaniami wodorowymi hydrofilowe ugrupowania peptydowe, podczas gdy na zewnątrz kanału wystają łańcuchy boczne o znacznej lipofilowości (Rys. 2).

Grupowanie się aminokwasów z łańcuchami bocznymi zdolnymi do tworzenia wiązań wodorowych (Trp w gA i Tyr w gC) blisko końców antyrównoległych dimerów gramicydynowych, występujące w obu odmianach antyrównoległych dimerów zarówno typu jedno-, jak i dwuniciowego, sprzyja poprzecznemu ustawianiu się kanału w błonie komórkowej, dzięki czemu łańcuchy boczne tych aminokwasów oraz grupy hydroksyetylenoaminowe znajdują się bliżej fazy wodnej (granicy błony), podczas gdy łańcuchy boczne pozostałych aminokwasów, prawie wyłącznie alifatycznych, są „zanurzone” w lipofilowym środowisku tej błony.

Poprzeczne ustawienie cylindrycznych dimerów gramicydyny w błonie umożliwia im pełnienie roli kanałów jonowych, transportujących zgodnie z gradientem stężeń kationy, dzięki hydrofilowemu charakterowi wnętrza wszystkich typów dimerów gramicydyny. Jednak w zależności od wewnętrznej średnicy dimerów, zależnej z kolei od topologii między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych łączących łańcuchy dimeru, nie mieszczą się w jego wnętrzu ani jony, ani woda.

Potwierdzają to rentgenograficzne badania kryształów wolnej gramicydyny otrzymywanych z czystych rozpuszczalników organicznych, które zawierają antyrównoległe dimery o średnicy wewnętrznej mniejszej od 2 Ĺ, a więc zbyt małej by pomieścić kationy lub wodę [13]. Natomiast kryształy gramicydyny, otrzymywane w obecności soli jednowartościowych kationów, zawierają te kationy oraz znaczną liczbę cząsteczek wody wewnątrz dimerów, dzięki większej ich średnicy wynoszącej ok. 4 Ĺ [26–28].

Poprzeczne ustawianie się dimerów gramicydyny umożliwiające im pełnienie roli kanałów jonowych dotyczy zarówno formy HHSH (ang. *head to head single helices*), znanej również jako antyrównoległy jednoniciowy dimer, w którym helisy gramicydynowe zwrócone są do siebie *N*-końcami, jak i odmiany DSDH (ang. *double stranded double helix*), zwanej też antyrównoległym dwuniciowym dimerem, występującej we wszystkich do chwili obecnej zbadanych rentgenograficznie gramicydynach, w której mamy do czynienia z dwoma przeciwnie zorientowanymi, wzajemnie oplatającymi się helisami gramicydynowymi (Rys. 3).



Rysunek 3. Dwa główne modele antyrównoległego dimeru gramicydynowego:
a) dwuniciowy b) jednoniciowy, c) dimer jednoniciowy [29] w powiększeniu z pominiętym łańcuchem bocznym dla przejrzystości rysunku.

Choć dzisiaj nikt nie kwestionuje dimerycznej natury fizjologicznie aktywnych kanałów gramicydynowych, nie do końca rozstrzygnięto sprawę ich struktury. Praw-

dopodobnie jest to wymodelowany przez Urry'ego [8, 9, 30] antyrównoległy dimer jednoniciowy (HHSH). Stąd też propozycja na razie jeszcze powszechnie niezaakceptowana, aby dimery HHSH nazywać kanałami a DSDH porami [31–33].

Obie wymienione formy mają taką samą łączną długość ok. 30 Å, a więc znacznie mniej niż grubość błony komórkowej. Niemniej jednak fakt transportowania kationów przez sztuczne błony z wbudowanymi dimerami gramicydyny [34, 35] oraz obserwowane zmniejszenie grubości błony w pobliżu kanału gramicydynowego potwierdzają możliwość występowania dimeru w charakterze kanału gramicydynowego.

2.2. RÓWNOLEGŁE CZY ANTYRÓWNOLEGŁE UŁOŻENIE HELIS W DIMERACH?

Jak już wspomnieliśmy wcześniej, mimo iż występująca w stanie krystalicznym gramicydyna ma strukturę β-kartki, z powodu naprzemienności konfiguracji aminokwasów i występowania łańcuchów bocznych po tej samej stronie β-kartki, następuje jej zwijanie dające helikalny przebieg łańcucha peptydowego i przybliżone podobieństwo drugorzędowej struktury gramicydyny do α-helisy białkowej. Chociaż w roztworze stwierdzono występowanie zarówno dimerów o równoległym, jak i antyrównoległym ułożeniu helis gramicydynowych [36], w kryształach do chwili obecnej zaobserwowano jedynie odmiany antyrównoległe. Wszystkie one zostały otrzymane z rozpuszczalników organicznych, przeważnie alkoholi, które stanowią środowisko izotropowe, a więc znacznie odbiegające od warunków istniejących w realnych błonach komórkowych. Takie warunki sprzyjają występowaniu w kryształach antyrównoległych dimerów gramicydynowych typu dwuniciowego (DSDH). Próby krystalizacji w anizotropowych macierzach organicznych i micelach, które miały spowodować krystalizację jednoniciowych lub równoległych dimerów, nie powiodły się.

2.3. HELISY PRAWO- CZY LEWOSKRĘTNE?

Najciekawszym chyba problemem, z jakim przyszło zmierzyć się wszystkim badaczom zajmującym się gramicydyną, jest określenie kierunku skrętu ich helis. Badania NMR i CD wskazują na obecność dimerów jedno- i dwuniciowych, z helisami gramicydynowymi prawo- lub lewoskrętnymi, układającymi się równolegle lub antyrównolegle [9, 10, 15, 30, 37]. Natomiast badania rentgenograficzne, w których wykryto jedynie dwuniciowe antyrównoległe dimery, pokazują helisy lewoskrętne w przypadku wolnej gramicydyny [13, 38] i helisy o obu skrętnościach (patrz paragraf 3.3) w przypadku kompleksów soli potasowców z gramicydyną [14, 16, 20, 27, 28, 39]. Co ciekawe, w laboratorium Wallace otrzymano dwie struktury krystaliczne kompleksów gramicydyny z CsCl i z KSCN, w których helisy pepty-

dowe były lewoskrętne [14, 16], podczas gdy we wszystkich tego typu strukturach krystalicznych zbadanych w grupie Duaxa [20, 26, 39, 40] helisy były prawoskrętne, mimo zastosowania tych samych metod i warunków krystalizacji.

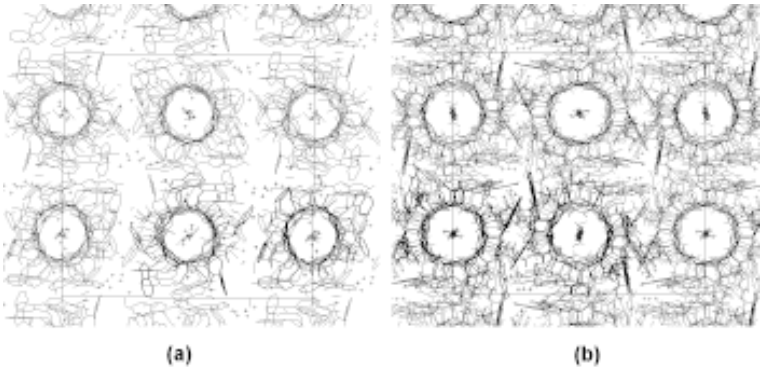
Prawoskrętne były również dwuniciowe helisy gramicydynowe w zbadanych przez nasz Zespół kryształach pięciu kompleksów gramicydyn, w tym również z CsCl i KSCN [27, 28]. Wszystkie pięć kryształów zostało zmierzonych z użyciem promieniowania synchrotronowego, w temp. 100 K, co pozwoliło osiągnąć rozdzielczość atomową (Tabela 1).

Tabela 1. Dane krystalograficzne zbadanych rentgenograficznie struktur krystalicznych kompleksowanych gramicydyn. We wszystkich strukturach grupa przestrzenna $P2_12_12_1$. W nawiasach podano kody w Bazie PDB.

Struktura gramicydyny z:	Rozdzielczość [Å]	a [Å]	b [Å]	c [Å]	Objętość $[Å]^3$
Lewoskrętne:					
CsCl (1C4D)	2,00	32,12	31,17	52,10[a]	52168
KSCN (1GMK)	2,50	32,06	31,04	51,80[a]	51548
Prawoskrętne:					
CsCl (1AV2)	1,40	31,06	31,88	52,11	51599
CH_3COOH (1BDW)	1,70	20,58	27,91	52,04	29892
CsCl[b]	0,95	30,02	31,54	51,78	49028
RbCl (1W5U)[b]	1,14	30,06	31,30	51,69	48635
KI (2IZQ)[b]	0,80	30,14	31,32	51,55	48671
KSCN[b]	0,95	30,23	31,48	51,74	49236
NaI[b]	1,25	29,82	31,26	51,67	48148

[a] Stałe sieciowe a i c zostały zamienione dla uwidocznienia izostrukturalności.
[b] Struktury zbadane z zastosowaniem promieniowania synchrotronowego.

Jak widać z danych w Tabeli 1, wszystkie kompleksowane gramicydyny mają zbliżone wymiary komórek elementarnych, takie same grupy przestrzenne oraz upakowanie (Rys. 4), z wyjątkiem struktury gramicydyny krystalizowanej z kwasu octowego [26] o innej komórce elementarnej, co zostanie wyjaśnione w Rozdziale 3.1.



Rysunek 4. Upakowanie cząsteczek w krysztale kompleksu gramicydyny z CsCl:
a) z lewoskrętnymi, b) z prawoskrętnymi helisami garmicydyny

Opublikowana przez Wallace i Ravikumara struktura, zbudowana z lewoskrętnych dimerów [14], chociaż oparta o pomiary wykonane z rozdzielczością zaledwie 2 Ĺ, wydawała się wówczas (1988) prawidłowa, gdyż w równolegle opublikowanej przez Langsa [13] strukturze krystalicznej wolnej gramicydyny, helisy peptydu były również lewoskrętne. W tej sytuacji zbadanie przez Duaxa (z dużo lepszą rozdzielczością) kilku kompleksów gramicydyny z solami litowców, w tym również z CsCl, w których helisy gramicydyny były bez wyjątku prawoskrętne, a komórki elementarne i upakowanie niemal identyczne mimo całkowicie różnej orientacji grup bocznych, wywołało ożywioną polemikę [41–43], w której jako podstawę kwestionowania poprawności struktur zawierających lewoskrętne helisy wykazano wiele krystalochemicznych „nieprawidłowości", m.in. obecność kationów na zewnątrz kanałów a anionów w ich wnętrzu, niemalże identyczne wymiary komórek elementarnych, a także takie samo upakowanie, mimo całkowicie różnej orientacji grup bocznych.

Ponieważ pierwotne dane eksperymentalne struktur lewoskrętnych nie zostały udostępnione, nie ma możliwości przeprowadzenia bezpośredniej weryfikacji w procesie ich udokładniania. Był to m.in. dodatkowy powód podjęcia przez nas badań strukturalnych kompleksowych gramicydyn z jeszcze lepszą rozdzielczością [27, 28].

3. GRAMICYDYNOWE ZAGADKI STRUKTURALNE

Opisane wyżej, do dziś nierozwiązane wątpliwości dotyczące budowy i funkcjonowania kanałów gramicydynowych, raczej nie będą rozwiązane metodami dyfrakcyjnymi. Natomiast nasze wyniki, sięgające granic możliwości współczesnych metod krystalograficznych (Tabela 2), pozwoliły dostrzec wiele szczegółów strukturalnych, które nasunęły nowe pytania zamiast odpowiedzieć na dotychczas stawiane.

W dalszej części artykułu przedstawiamy te zagadki oraz podejmujemy próbę ich rozwiązania.

Tabela 2. Wybrane dane krystalograficzne dla znanych struktur gramicydynowych w ich kompleksach z solami litowców. W nawiasach podano kody w Bazie PDB

	Kompleks gramicydyny z								
	g:CsCl (1C4D) 1988	*g:KSCN (1GMK) 1997*	*g:CsCl (1AV2) 1997*	*g:CH_3COOH (1BDW) 1998*	*g:CsCl 2001*	*g:RbCl (1W5U) 2002*	*g:KI (2IZQ) 2004*	*g:KSCN 2006*	*g:NaI 2006*
Rozdzielczość [Å]	2 ,00	2,50	1,40	1,70	0,95	1,14	0,80	0,95	1,25
Kompletność danych [%]	99,8	83,3	92,4	95,0	98,8	98,7	98,17	98,99	95,04
Liczba więzów			6720	1360	6382	9395	15555	11714	9756
Liczba udokładnianych parametrów			5261	1359	10177	6591	8994	7279	6687
*R_1 dla $F>4\sigma F$	0,232		0,1444	0,1572	0,0838	0,1618	0,106	0,140	0,147
R_1 dla wszystkich danych			0,1466	0,1690	0,0885	0,1624	0,110	0,15	0,16
R_{free}			0,1743	0,2346	0,1117	0,2018	0,116	0,1521	0,1588
R_{merge}		0,0325	0,096	0,050	0,068	0,070	0,081	0,074	0,127
GooF					1,06	1,19	1,028	1,009	1,020
$\Delta\rho_{max,\ min}$ [e/Å^3]					0,45 -0,37	0,45 -0,45	0,97 -0,34	0,43 -0,36	0,73 -0,34

* Wskaźniki (czynniki) rozbieżności *R* dotyczą zgodności obserwowanych (otrzymanych doświadczalnie) i obliczonych na podstawie udokładnionego modelu struktury. Oznacza to, że im mniejszy *R*, tym bardziej wiarygodne wyniki.

3.1. GRAMICYDYNA W KRYSZTAŁACH OTRZYMANYCH Z KWASU OCTOWEGO

Oprócz wolnej gramicydyny i jej kompleksów z solami litowców, otrzymano i rozwiązano strukturę krystaliczną gramicydyny z kwasu octowego [26], w której wymiary komórki elementarnej są zupełnie inne (Tabela 1), z wyjątkiem stałej sieciowej c, równoległej do osi dimeru gramicydynowego, równej 52 Å. Co więcej, średnica wewnętrzna kanału i kierunek skrętu helis peptydu w tej strukturze są identyczne jak w strukturach kompleksowanych gramicydyn.

Można spekulować, że rolę litowca w tym przypadku spełnia jon hydroniowy (nieodróżnialny dla promieniowania rentgenowskiego od wody), niewątpliwie obecny w znacznym stężeniu w środowisku kwasu octowego, o rozmiarach praktycznie równych jonowi sodowemu, i że to on determinuje rodzaj dimeru gramicydynowego. Jednak ze względu na obecność większych niż halogenkowe (czy nawet rodankowe) anionów octanowych w krysztale, upakowanie i wymiary komórki elementarnej są inne (Tabela 1).

3.2. STECHIOMETRIA W KRYSZTAŁACH KOMPLEKSÓW GRAMICYDYNY Z SOLAMI LITOWCÓW

Kryształy mogą zawierać więcej niż jeden związek chemiczny. Np. w kryształach jonowych podobne chemicznie jony mogą się wzajemnie zastępować w szerokich granicach stężeń (sole podwójne), a w kryształach molekularnych, zbudowanych z cząsteczek o nieregularnym kształcie, mogą się tworzyć duże puste przestrzenie, zapełnione najczęściej przez rozpuszczalnik lub inne składniki roztworu. W zależności od stężenia, dopasowania kształtu do powstających luk i sił wiążących je z głównym składnikiem kryształu, te dodatkowe substancje mogą występować w ilościach stechiometrycznych (kompleksy molekularne, solwaty) lub niestechiometrycznych. W badaniach dyfrakcyjnych nie zawsze jest możliwe udokładnianie parametrów obsadzenia kationów i anionów, szczególnie w przypadku pomiarów o niskiej rozdzielczości. Taka sytuacja miała miejsce w pierwszych pracach opisujących struktury gramicydyny [14, 16, 44], w których zakładano całkowite lub częściowe obsadzenie jonów zlokalizowanych na mapie gęstości elektronowej, bez udokładniania tego parametru. W rezultacie liczba formalnych cząsteczek soli przypadająca na dimer gramicydyny, obliczona na podstawie liczby zlokalizowanych kationów, nie jest miarodajna.

Natomiast w przypadku struktur krystalicznych, rozwiązanych przez autorów w oparciu o dane o wysokiej rozdzielczości, parametry obsadzenia były udokładniane. Co więcej, ze względu na obecność w niezależnej części komórki elementarnej dwóch takich dimerów, sumaryczne obsadzenia kationów zlokalizowanych wewnątrz poszczególnych dimerów mogą być różne. Jednak suma udokładnionych parametrów obsadzenia anionów, które znajdują się we wspólnej przestrzeni poza oboma kanałami, z oczywistych powodów powinna być zgodna z poprzednio wspomnianą

sumą parametrów obsadzenia kationów w obu dimerach. W zależności od rodzaju soli, bardzo różna może być dokładność i pewność oznaczenia w ten sposób zawartości obu przeciwjonów tworzących sól.

Z danych zestawionych w Tabeli 3 wynika, że liczba formalnych cząsteczek soli (odpowiadająca w praktyce sumie parametrów obsadzenia wszystkich zlokalizowanych kationów lub anionów) przypadająca na jeden dimer w strukturach o wysokiej rozdzielczości, waha się od 0,5 w jednym z dimerów w kompleksie z KI (średnio 0,55) do 1,6 w jednym z dimerów w kryształach kompleksu gramicydyny z RbCl (średnio 1,40). Są to więc kompleksy niestechiometryczne.

Tabela 3. Zawartość jonów soli oraz cząsteczek wody
w strukturach krystalicznych kompleksów gramicydynowych.
I i II oznaczają dwa krystalograficznie niezależne dimery gramicydynowe.
„Poza" oznacza obszar poza kanałem

Kompleks gramicydyny z	Suma obsadzeń kationów (liczba miejsc)			Suma obsadzeń wody (liczba miejsc)			Suma obsadzeń anionów (liczba miejsc)		
	I	II	Poza	I	II	Poza	I	II	Poza
Struktury z lewoskrętnymi helisami gramicydyny									
CsCl (1C4D)	**6,00 (8)**			**20,00 (20)**			**6,00 (6)**		
	2,00 (2)	2,00 (2)	2,00 (4)	3,00 (3)	1,00 (1)	16,00 (16)	3,00 (3)	3,00 (3)	
KSCN (1GMK)	**3,2 (4)**			**3,2 (4)**					
	1,50 (2)	1,70 (2)		1,00 (1)	1,00 (1)	1,20 (2)			
Struktury z prawoskrętnymi helisami gramicydyny									
CsCl (1AV2)	**1,96 (7)**			**15,52 (22)**			**2,00 (4)**		
	1,02 (4)	0,94 (3)		5,00 (7)	6,77 (10)	3,75 (5)			2,00 (4)
CH_3COOH (1BDW)				**11,00 (22)**			**3,50 (5)**		
				7,50 (15)		3,50 (7)			3,50 (5)
CsCl	**2,67 (14)**			**40,01 (112)**			**2,52 (10)**		
	1,43 (8)	1,24 (6)		9,27 (33)	9,74 (30)	21,0 (76)			2,52 (10)
RbCl (1W5U)	2,81 **(14)**			**18,60 (32)**			**2,54 (12)**		
	1,59 (7)	1,22 (7)		5,64 (11)	7,14 (11)	5,82 (10)			2,54 (12)
KI (2IZQ)	1,10 **(6)**			**27,04 (85)**			**1,09 (8)**		
	0,50 (3)	0,60 (3)		8,36 (29)	8,43 (25)	10,25 (32)			1,09 (8)

Tabela 3. Ciąg dalszy

Kompleks gramicydyny z	Suma obsadzeń kationów (liczba miejsc)			Suma obsadzeń wody (liczba miejsc)			Suma obsadzeń anionów (liczba miejsc)		
	I	II	Poza	I	II	Poza	I	II	Poza
Struktury z prawoskrętnymi helisami gramicydyny									
KSCN	**1,92 (8)**			**18,49 (55)**			**1,97 (7)**		
	1,05 (4)	0,87 (4)		5,35 (19)	7,18 (24)	5,96 (12)			1,97 (7)
NaI	1,75 **(8)**			**14,04 (60)**			**1,71 (8)**		
	1,08 (5)	0,67 (3)		5,46 (25)	4,93 (25)	3,65 (10)			1,71 (8)

Większą niż 1 liczbę formalnych cząsteczek soli, a więc i kationów przypadającą na dimer, można łatwo wyjaśnić na podstawie od dawna znanego faktu, że w dimerze gramicydynowym są 3 główne miejsca wiążące, jedno na środku i dwa bliżej końców kanału [45], przy czym obsadzenie środkowej pozycji wyklucza jednoczesne obsadzenie brzegowych miejsc wiążących, wobec zbyt małej odległości między nimi, w której musi się zmieścić kilka cząsteczek wody. W rezultacie można założyć istnienie dimerów zawierających albo 1, albo 2 kationy. Po uśrednieniu tych wartości na cały kryształ możliwe są wszystkie wartości pośrednie, nieprzekraczające 4 kationów (formalnych cząsteczek soli) w komórce elementarnej.

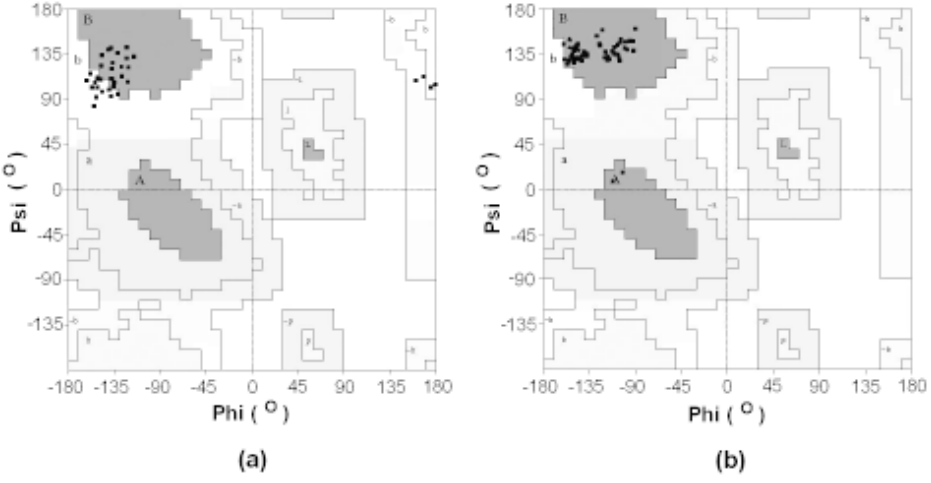
Jak się wydaje, większa zawartość soli w kompleksach z chlorkiem rubidu i cezu niż w kompleksach soli sodu i potasu jest zgodna z obserwacją, że eksperymentalnie wyznaczone powinowactwo kationów litowców do gramicydyny też jest większe dla ciężkich litowców [46]. Trudno jednak wyjaśnić, dlaczego więcej kationów przypada na 1 dimer w przypadku kompleksu gramicydyny z RbCl niż z CsCl, mimo iż to Cs^+ wykazuje większe powinowactwo do gramicydyny niż Rb^+ i dlaczego zawartość potasu w kompleksie z KI jest inna niż w kompleksie z KSCN. Można przypuszczać, że stężenie soli w roztworze użytym do krystalizacji miało wpływ na ilość jonów kompleksowanych przez gramicydynę, ponieważ krystalizację prowadzono z roztworów soli o różnym stężeniu.

Odmiennie przedstawia się sytuacja w przypadku kompleksów gramicydyny z solami litowców lekkich, w których suma obsadzeń zlokalizowanych kationów i/lub anionów przypadająca na jeden dimer jest mniejsza od 1, co oznacza występowanie w krysztale „pustych" dimerów. Problem ten dotyczy zwłaszcza struktury kompleksu gramicydyny z KI (Tabela 3), w której liczba formalnych cząsteczek soli przypadająca statystycznie na jeden dimer wynosi tylko 0,55, zamiast co najmniej 1,00. Przyznajemy, że choć suma udokładnionych parametrów obsadzenia jonów K^+ mogła być obarczona dużym błędem, z pewnością błąd nie mógł być tak duży (prawie 100%), tym bardziej że analogiczna suma dla anionów jodkowych, w przypadku których – ze względu na duży sygnał anomalny – nie mamy żadnych wątpliwości co do ich identyfikacji, wynosiła 1,09, czyli tyle samo co dla K^+ (1,10) (Tabela 3).

3.3. KIERUNEK SKRĘTU HELIS GRAMICYDYNY W JEJ KOMPLEKSACH

Jak już wspomnieliśmy, w kryształach kompleksów z CsCl i KSCN, w których helisy gramicydyny opisano jako lewoskrętne [14, 16], wymiary komórek elementarnych są zbliżone, a upakowanie jest identyczne jak w kryształach o helisach prawoskrętnych (Tabela 1) [26–28, 39]. Wobec powyższego oraz w związku z obserwowanymi w tych pierwszych strukturach krystalochemicznymi nieprawidłowościami, oraz nieudostępnieniem oryginalnych danych przez autorów (co umożliwiłoby weryfikację wyników), można mieć wątpliwości co do poprawności tych struktur.

Wobec wymienionych ograniczeń, wykonaliśmy próbę udokładnienia struktury kompleksu „lewoskrętnej" gramicydyny z CsCl [14] na podstawie danych dyfrakcyjnych pochodzących od analogicznej, zbadanej przez nas struktury „prawoskrętnej", ograniczonych do rozdzielczości zastosowanej w tym pierwszym badaniu. Udokładnienie dało podobne czynniki rozbieżności jak w opublikowanych strukturach lewoskrętnych oraz podobne nieprawidłowości strukturalne. Warto też zauważyć, że lewoskrętne helisy gramicydyny wymuszają znaczne deformacje konformacji aminokwasów, widoczne na mapach Ramachandrana [47–49], czego nie obserwuje się dla struktur prawoskrętnych (Rys. 5).



Rysunek 5. Mapa Ramachandrana [47–49]:
a) dla lewoskrętnej oraz b) prawoskrętnej gramicydyny w jej kompleksach z CsCl.
Znaki kątów torsyjnych dla aminokwasów szeregu D zostały zmienione na przeciwne

Można więc podejrzewać, że model struktur z lewoskrętnymi helisami gramicydynowymi w dimerach jest błędny, tym bardziej że dotychczas nikomu, poza autorami prac opisujących struktury lewoskrętnych helis w kryształach kompleksowanej gramicydyny, nie udało się takich kryształów otrzymać.

3.4. HETEROGENICZNOŚĆ DIMERÓW GRAMICYDYNOWYCH

W strukturach krystalicznych kompleksów gramicydyny z solami litowców, określonych na podstawie wysokorozdzielczych danych dyfrakcyjnych, w przypadku których do krystalizacji stosowano gramicydynę D, można było zidentyfikować obok dominującej gramicydyny VgA również inne jej odmiany, przy czym zaskakujący był brak statystycznego uśrednienia ich składu (Tabela 4) w krystalograficznie niezależnych dimerach, a nawet w poszczególnych łańcuchach (niciach) dimerów.

Tabela 4. Procentowa zawartość gramicydyn A, B oraz C w strukturach krystalicznych zbadanych przez autorów z wysoką rozdzielczością. 1, 2, 3 i 4 oznaczają odpowiednio cząsteczki (łańcuchy, nici) gramicydyny według przyjętego w większości prac krystalograficznych systemu, w którym dimer I tworzą gramicydyna 1 i 2 a dimer II odpowiednio 3 i 4.

	gD:CsCl			gD:RbCl			gD:KI			gD:KSCN			gD:NaI		
	gA	gB	gC	gA	gB	gC	gA	gB	gC	gA	gB	gC	gA	gB	gC
1	61	–	39	100	–	–	75	–	25	100	–	–	100	–	–
2	50	–	50	77	–	23	50	15	35	58	42	–	60	40	–
3	67	–	33	100	–	–	74	–	26	78	–	22	100	–	–
4	55	25	20	81	–	19	70	12	18	80	–	20	64	36	–

Szczególną uwagę zwracają następujące (nie)prawidłowości:

– zróżnicowanie zawartości poszczególnych gramicydyn w obu krystalograficznie niezależnych dimerach;

– zróżnicowanie zawartości gramicydyn w poszczególnych łańcuchach, przy czym większe zróżnicowanie dotyczy łańcuchów należących do tego samego dimeru (porównując łańcuch 1 z 2 a 3 z 4);

– odpowiadające sobie łańcuchy 1 i 3 oraz 2 i 4 w obu krystalograficznie niezależnych dimerach mają podobny skład. Jest to widoczne zwłaszcza w kompleksach z NaI oraz RbCl, gdzie np. łańcuchy 1 i 3 tworzy wyłącznie gramicydyna A;

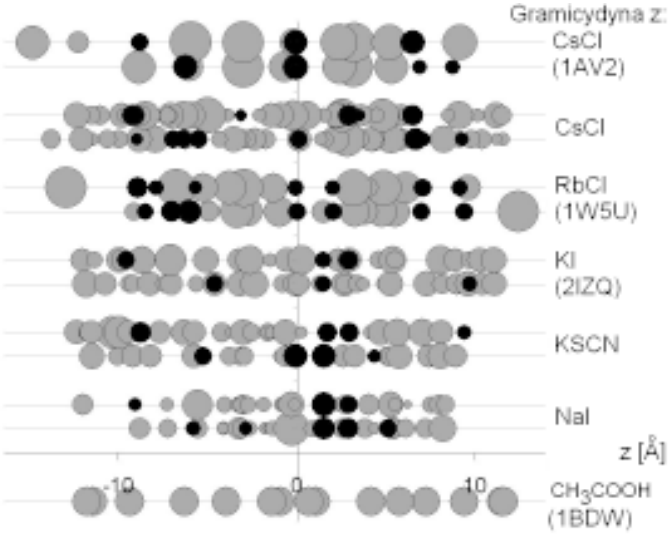
– zwiększona zawartość gramicydyny C w stosunku do składu wyjściowego (gD) w kryształach kompleksu z CsCl oraz jej brak w przypadku kompleksu z NaI;

– nieobecność gB w kryształach kompleksu gramicydyny z RbCl, wyraźnie zwiększona zawartość gB i jej występowanie w krysztale kompleksu z NaI, oraz jej obecność tylko w jednym z czterech łańcuchów w kompleksach z CsCl i z KSCN.

Wydaje się, że obserwowane prawidłowości, dotyczące zróżnicowania składu dimerów, mają swoje źródło w upakowaniu i oraz rodzaju anionów, a także mogą być powiązane z obserwowaną w kryształach asymetrią rozkładu kationów w dimerach.

3.5. ASYMETRIA ROZKŁADU KATIONÓW W DIMERACH

Ze względu na cylindryczną symetrię dimerów gramicydynowych, a tym bardziej ich wewnętrznej „ściany", można było spodziewać się w kryształach zbadanych kompleksów statystycznie symetrycznego rozkładu kationów wzdłuż osi cylindrycznego dimeru względem jego geometrycznego środka. Wyniki prezentowanych w tej pracy badań rentgenograficznych (Rys. 6) nie potwierdzają w pełni takiego przypuszczenia.



Rysunek 6. Porównanie pozycji kationów i wody w dimerach w kryształach kompleksów z solami litowców, zawierających prawoskrętne helisy gramicydynowe. Na rysunku pokazano dwa krystalograficznie niezależne dimery (na górze I, na dole II) odpowiednio dla każdej struktury. Początek układu współrzędnych znajduje się w środku dimeru. Kationy oznaczono kolorem czarnym, natomiast cząsteczki wody – szarym. Wielkość średnicy koła oznaczającego jon lub wodę jest proporcjonalna do ich obsadzenia

Widoczna na Rysunku 6 asymetria dotyczy nie tylko rozkładu miejsc, w których zlokalizowano kationy, ale również zawartości kationów w poszczególnych dimerach gramicydynowych oraz w ich symetrycznych połówkach w poszczególnych kompleksach, obliczonej jako suma parametrów obsadzenia zidentyfikowanych miejsc obsadzonych kationami (Tabela 3). Co ciekawe, asymetria rozkładu miejsc wiążących kationy jest najmniejsza w przypadku struktury kompleksu gramicydyny z RbCl a największa (różnice dochodzą do 30%) w przypadku kompleksu z KI oraz CsCl. O ile można mieć wątpliwości co do lokalizacji kationów lekkich litowców (Na i K), o tyle mało prawdopodobne jest popełnienie większego błędu w przypadku jonów litowców ciężkich, zwłaszcza Cs^+, w przypadku których ze względu na bardzo duży anomalny sygnał nie ma wątpliwości co do identyfikacji kationów w dimerze, a ze względu na duży atomowy czynnik rozpraszania, małe drgania termiczne i niewielką swobodę tych dużych jonów w dimerze, wyznaczone parame-

try obsadzenia powinny być najdokładniejsze ze wszystkich struktur krystalicznych, reprezentowanych na Rysunku 6. Co więcej, w zbadanych strukturach występują też znaczne różnice pomiędzy krystalograficznie niezależnymi dimerami (Rys. 6 i Tabela 3).

Nie ma prostego wyjaśnienia tej obserwacji.

3.6. ROLA ANIONÓW W STRUKTURACH KRYSTALICZNYCH KOMPLEKSOWANYCH GRAMICYDYN

Zbadanie m.in. dwóch kompleksów gramicydyny z różnymi solami tego samego litowca (KSCN i KI) oraz kompleksów różnych litowców z tymi samymi anionami stworzyło możliwość zaobserwowania wpływu rodzaju anionu na strukturę gramicydyny w kryształach.

Porównując lokalizację i ilość anionów – chlorków w kryształach dwóch kompleksów gramicydyny z litowcami ciężkimi, jodków w kompleksach dwóch litowców lekkich oraz rodanku w kompleksie potasowym – można zauważyć, że chlorki i jodki, a nawet rodanki, zajmują w kryształach różnych kompleksów gramicydyny podobne miejsca, co oczywiście wynika z ich strukturalnego podobieństwa. Wobec dotychczasowych niepowodzeń w krystalizacji kompleksów zawierających bardziej złożone aniony, zdaje się to świadczyć, że obserwowane upakowanie kanałów gramicydynowych w kryształach kompleksów jest bardzo stabilne i że nie ma w nich miejsca na większe aniony. Z tego powodu, w jedynym znanym przypadku kryształu garmicydyny zawierającego bardziej złożone aniony (octanowe), kryształ ma inne upakowanie i komórkę elementarną [26].

Ze względu na preferencję w upakowaniu wydaje się również możliwe, że rodzaj anionów użytych w zakończonych sukcesem krystalizacjach może wpływać na skład heterodimerów i może tłumaczyć różnice pomiędzy składem dimerów i zawartością soli w komórce elementarnej w dwu różnych kompleksach potasowych: z KI i KSCN (Tabela 3).

PODZIĘKOWANIE

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2004–2006, jako projekt badawczy 3 T09A 047 26.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] R.J. Dubos, J. Exper. Med., 1939, **70**, 1.
[2] R.D. Hotchkiss, R.J. Dubos, J. Biol. Chem., 1940, **132**, 791.
[3] R.D. Hotchkiss, J. Biol. Chem., 1940, **132**, 793.
[4] R.D. Hotchkiss, Adv. Enzymol., 1944, **4**, 153.

[5] R. Sarges, B. Witkop, J. Am. Chem. Soc., 1964, **86**, 1862.
[6] R. Sarges, B. Witkop, J. Am. Chem. Soc., 1965, **87**, 2011.
[7] R. Sarges, B. Witkop, J. Am. Chem. Soc., 1965, **87**, 2020.
[8] B.C. Pressman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1965, **53**, 1076.
[9] D.W. Urry, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 1971, **68**, 672.
[10] W.R. Veatch, E.T. Fossel, E.R. Blout, Biochemistry, 1974, **13**, 5257.
[11] W.R. Veatch, E.R. Blout, Biochemistry, 1974, **13**, 5259.
[12] D.C. Hodgkin, Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol., 1949, **14**, 65.
[13] D.A. Langs, Science, 1988, **241**, 188.
[14] B.A. Wallace, K. Ravikumar, Science, 1988, **241**, 182.
[15] D.A. Langs, G.D. Smith, C. Courseille, G. Precigoux, M. Hospital, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, **28**, 5345.
[16] D.A. Doyle, B.A. Wallace, J. Mol. Biol., 1997, **266**, 963.
[17] S. Weinstein, B.A. Wallace, J.S. Morrow, W.R. Veatch, J. Mol. Biol., 1980, **143**, 1.
[18] http://project.bio.iastate.edu/Courses/BIOL202/Proteins/Images/sheet.gif
[19] http://Lectures.molgen.mpg.de/ProteinStructure/Levels/betasheet.gif
[20] B.M. Burkhart, R.M. Gassman, D.A. Langs, W.A. Pangborn, W.L. Duax, Biophys. J., 1998, **75**, 2135.
[21] L.E. Townsley, W.A. Tucker, S. Sham, J.F. Hinton, Biochemistry, 2001, **40**, 11676.
[22] M.D. Becker, D.V. Greuthouse, R.E. Koeppe II, O.S. Andersen, Biochemistry, 1991, **30**, 8830.
[23] www.sigmaaldrich.com
[24] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd, ed. Sinauer, Associates, Sunderland, M.A., 2001.
[25] L.P. Liu, C.M. Deber, J. Biol. Chem., 1998, **273**, 23645.
[26] B.M. Burkhart, N. Li, D.A. Langs, W.L. Duax, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, **95**, 12950.
[27] M.L. Główka, A. Olczak, J. Bojarska, M. Szczesio, W.L. Duax, B.M. Burkhart, W.A., Acta Cryst. D, 2005, **61**, 433.
[28] A. Olczak, M.L. Główka, M. Szczesio, J. Bojarska, W.L. Duax, B.M. Burkhart, Z. Wawrzak, Acta Cryst. D, 2007, zaakceptowane do druku.
[29] http://www.web.virginia.edu/Heidi/chapter10/Images/8883n10-41.jpg
[30] D.W. Urry, M.C. Goodall, J.D. Glickson, D.F. Mayers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 1907.
[31] B.A. Wallace, J. Struct. Biol., 1998, **121**, 123.
[32] A.M. O'Connel, R.E. Koeppe II, O.S. Andersen, Science, 1990, **250**, 1256.
[33] E. Bamberg, P. Lauger, J. Memb. Biol., 1973, **11**, 177.
[34] G.V. Miloshevsky, P.C. Jordan, Biophys. J., 2004, **86**, 92.
[35] S.W. Chiu, S. Subramaniam, E. Jakobsson, Biophys. J., 1999, **76**, 1929.
[36] V.F. Bystrov, A. S. Arseniev, Tetrahedron, 1988, **44**, 925.
[37] Y. Chen, A. Tucker, B.A. Wallace, J. Mol. Biol., 1996, **264**, 757.
[38] J. Willey, *Gramicidin and Related Ion Channels – Forming Peptides*, Ltd. 1999.
[39] B.M. Burkhart, R.M. Gassman, W. Pangborn, W.L. Duax, Biophys. J., 1997, **72**, 395.
[40] W.L. Duax, B.M. Burkhart, W.A. Pangborn, V. Pletnev, Z. Wawrzak, M.L. Główka, Advances in Supramolecular Chemistry, 2002, **8**, 224.
[41] O.S. Andersen, H.-J. Apell, E. Bamberg, D.D. Busath, R.E. Koeppe, F.J. Sigworth, G. Szabo, D.W. Urry, A. Wooley, Nature Struct. Biol., 1999, **6**, 609.
[42] T.A. Cross, A. Arseniev, B.A. Cornell, J.H. Davis, J.A. Killian, R.E. Koeppe, L.K. Nicholson, F. Separovic, B.A. Wallace, Nature Struct. Biol., 1999, **6**, 610.
[43] B.M. Burkhart, W.L. Duax, Nature Struct. Biol., 1999, **6**, 611.
[44] B.A. Wallace, W.A. Hendrickson, K. Ravikumar, Acta Cryst., 1990, **B46**, 440.

[45] O.S. Andersen, J. Procopio, Acta Physiol. Scand. Suppl., 1980, **481**, 27.
[46] C. Steinem, A. Janshoff, H.J. Galla, M. Sieber, Biochemistry & Bioenergetics, 1997, **42**, 213.
[47] G.N. Ramachandran, V. Saisekharan, Adv. Protein Chem., 1968, **23**, 283.
[48] G.N. Ramachandran, R. Chandrasekaran, Prog. Peptides Res., 1972, **2**, 195.
[49] G.N. Ramachandran, R. Chandrasekaran, Ind. J. Biochem. Biophys., 1972, **9**, 1,

Praca wpłynęła do Redakcji 28 grudnia 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

NANOSTRUKTURALNE MATERIAŁY WYBUCHOWE – OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI

NANOSTRUCTURED EXPLOSIVES – PREPARATION AND PROPERTIES

Stanisław Cudziło, Wojciech Kiciński

Instytut Chemii, Wydział Nowych Technologii i Chemii
Wojskowa Akademia Techniczna
ul. S. Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa

Abstract
Wprowadzenie
1. Nanokompozyty planarne
   1.1. Warstwowy kompozyt glinowo-niklowy
   1.2. Termit Al/CuO_x o strukturze warstwowej
   1.3. Termit Al/Fe_2O_3 o strukturze warstwowej
2. Metastabilne intermolekularne mieszaniny wybuchowe (MIC)
   2.1. Metody otrzymywania supertermitów
   2.2. Właściwości fizykochemiczne i wybuchowe
3. Mieszaniny wybuchowe otrzymywane metodą zol-żel
   3.1. Kompozyty zawierające żele nieorganiczne
      3.1.1. Nanostrukturalny termit Al/Fe_2O_3
      3.1.2. Wieloskładnikowe nanokompozyty pirotechniczne
      3.1.3. Nanostrukturane mieszaniny materiałów wybuchowych z krzemionką
   3.2. Kompozyty zawierające żele organiczne
      3.2.1. Żele rezorcynowo-formaldehydowe (RF) i bazujące na nich materiały wybuchowe
      3.2.2. Żele melaminowo-formaldehydowe (MF)
4. Inne nanostrukturalne kompozycje wybuchowe
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. inż. Stanisław Cudziło, prof. WAT, jest absolwentem Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Na rodzimej uczelni uzyskał stopień doktora (1994) i doktora habilitowanego (2003). Pracuje w Instytucie Chemii WAT. Jest specjalistą z zakresu chemii i technologii materiałów wysokoenergetycznych.

Mgr inż. Wojciech Kiciński jest absolwentem Wojskowej Akademii Technicznej (2003). Obecnie realizuje doktorat w Instytucie Chemii WAT i zajmuje się otrzymywaniem oraz badaniem nanostrukturalnych materiałów wybuchowych.

ABSTRACT

Nanostructured energetic materials (NanoEMs) are compositions of a fuel and an oxidizer that are homogenous at a nanometric scale. They are prepared in three basic forms: (I) as thin multilayered foils consisting of alternating layers of oxidizer and fuel, (II) mixtures of fuel and oxidizer nanoparticles, and (III) mixtures obtained via sol-gel synthesis. Thin foils are nanoscaled only in one dimension. In such composites, there are large, regular planar interfaces between fuel and oxidizer layers which thickness is below 100 nm. The composites are characterized by a very close physical contact of reactants and a lack of impurities between them as they are usually obtained by vacuum deposition of the components. The second kind of NanoEMs are mixtures prepared by powder mixing of nanometer sized particles of oxidizer and fuel. Components are previously produced via chemical or physical processing and then mixed in an appropriate solvent. Being consisted of the same components as conventional thermites (metal powders - usually Al, and metal oxides – usually Fe_2O_3), this nanocomposites are known as „superthermites". In contrast to the conventional thermites, supertermites are very sensitive to ignition and they may burn at a velocity of 1 km/s or even more. Synthesis of NanoEMs using sol-gel chemistry is a solution phase synthetic route. Its benefits include the convenience of low-temperature preparation using general and inexpensive laboratory equipment. The nanoparticles of both oxidizer and fuel precipitate from a colloidal solution (sol). This means that nanocomposites are formed by simultaneous condensation and/or crystallization of dissolved molecular precursors, i.e. by growth of particles and not by their size reduction. The obtained gels (organic and/or inorganic substances) are dried either by controlled evaporation of solvent, by freeze--drying or by supercritical extraction. The size of the particles (homogeneity of the composition) can be varied by changing synthesis and drying conditions.

Keywords: energetic materials, nanostructures, sol-gel synthesis

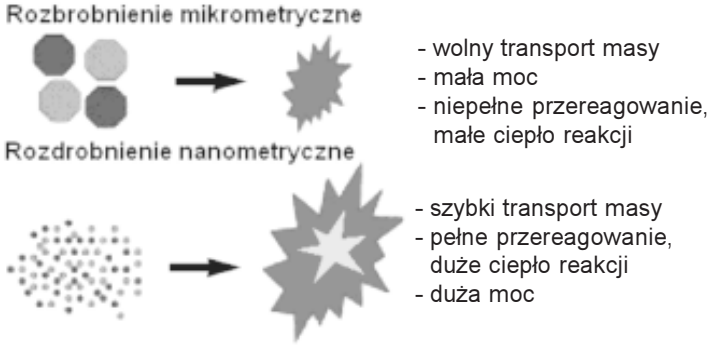
Słowa kluczowe: materiały wysokoenergetyczne, nanostruktury, synteza zol-żel

WPROWADZENIE

Przez ponad 1200 lat, tj. od czasu wynalezienia prochu czarnego, materiały wybuchowe (MW) są produkowane albo w wyniku wymieszania paliwa z utleniaczem (proch czarny), albo na drodze syntezy związków chemicznych zawierających jednocześnie ugrupowania atomów o charakterze utleniającym i redukującym (np. trinitrotoluen, TNT). W mieszaninach wybuchowych można z łatwością regulować wartość parametrów energetycznych poprzez zmianę wzajemnego stosunku paliwa i utleniacza. Największą gęstość energii (dochodzącą obecnie nawet do 23 kJ/cm^3 [1]) uzyskuje się zazwyczaj, gdy skład mieszaniny jest zbilansowany na całkowite przereagowanie składników palnych z utleniającymi. Jednakże z powodu ziarnistej struktury stałych mieszanin utleniacz-reduktor, szybkość reakcji chemicznych w trakcie przemiany wybuchowej jest uzależniona od szybkości transportu masy pomiędzy reagentami. Dlatego, pomimo dużej koncentracji energii, szybkość jej uwalniania jest znacznie mniejsza od tej, jaką można uzyskać w procesach wybuchowych, w których o szybkości reakcji decyduje nie dyfuzja, lecz kinetyka chemiczna.

Rozkład molekularnych MW charakteryzuje się dużo większymi mocami, ponieważ transport masy odbywa się w tym przypadku na bardzo krótkich odległościach – rzędu kilku długości wiązań chemicznych. Podstawowym ograniczeniem jest natomiast ilość energii, która może być zawarta w jednostce objętości takiego MW. Dotychczas otrzymano związki wybuchowe, dla których wartość tego parametru wynosi ok. 12,6 kJ/cm^3, czyli zaledwie połowę ilości energii uzyskiwanej z najlepszych mieszanin wybuchowych. Ostre wymagania odnośnie stabilności chemicznej i bezpieczeństwa praktycznie uniemożliwiają dalsze zwiększanie gęstości związków wybuchowych oraz gromadzenie większej ilości atomów utleniacza w cząsteczce [2].

W tej sytuacji optymalnym rozwiązaniem jest stworzenie układów wybuchowych łączących doskonałe charakterystyki termodynamiczne mieszanin wybuchowych z kinetyką reakcji chemicznych właściwą dla rozkładu molekularnych materiałów wybuchowych. Osiągnięcie tego celu jest możliwe po opracowaniu metod otrzymywania mieszanin utleniacz-paliwo jednorodnych w skali nanometrowej (Rys. 1).



Rysunek 1. Porównanie właściwości mieszanin wybuchowych jednorodnych w skali mikro- i nanometrowej

Zmniejszenie wymiarów cząstek powoduje zwiększenie powierzchni wzajemnego kontaktu paliwa i utleniacza, gdyż wzrasta wówczas liczba atomów lub cząsteczek tworzących powierzchnię ziarna. W przypadku gęsto upakowanych cząstek sferycznych, zawierających tysiąc atomów, 40% jest zlokalizowanych na powierzchni cząstki, natomiast cząstki zbudowane z miliona atomów mają zaledwie 4% atomów powierzchniowych [3]. Jeżeli w reakcji chemicznej biorą udział wyłącznie atomy z powierzchni, nie tylko szybkość reakcji (szybkość uwalniania energii), ale również stopień przereagowania (ilość uwolnionej energii) będą bardzo gwałtownie wzrastały wraz ze zmniejszeniem wymiarów cząstek składników mieszaniny. Ponadto należy pamiętać, że atomy powierzchniowe są zasobniejsze w energie niż atomy z wnętrza cząstek, a to skutkuje zwiększeniem ich aktywności chemicznej. Malejąca wartość energii aktywacji reakcji chemicznych oznacza ostatecznie większą podatność mieszaniny na zainicjowanie przemiany wybuchowej.

Klasycznym sposobem wytwarzania stałych nanostrukturalnych materiałów wysokoenergetycznych jest mieszanie (mechaniczne lub ultradźwiękowe), w obecności rozpuszczalnika, wcześniej otrzymanych (w procesach chemicznych lub fizycznych) nanowymiarowych cząstek składników. Do tej grupy zaliczyć można mieszaniny pirotechniczne, znane jako tzw. metastabilne intermolekularne kompozyty (MIC). Zostały one opracowane i są badane przede wszystkim w Los Alamos National Laboratory, USA. W ostatnich latach zaproponowano inną metodę, w której wzrost nanocząstek poszczególnych składników i formowanie nanokompozytu zachodzi podczas jednego procesu. Powszechnie wykorzystuje się do tego celu znaną od dawna technikę zol-żel. Metody te są szczególnie intensywnie badane w Lawrence Livermore National Laboratory, USA [4–7]. W końcu, za nanostrukturalne materiały wysokoenergetyczne można uznać także folie zbudowane z naprzemiennych, ultaracienkich warstw paliwa i utleniacza. Otrzymuje się je metodami napylania próżniowego, osadzania z fazy gazowej lub osadzania elektrochemicznego [8–12].

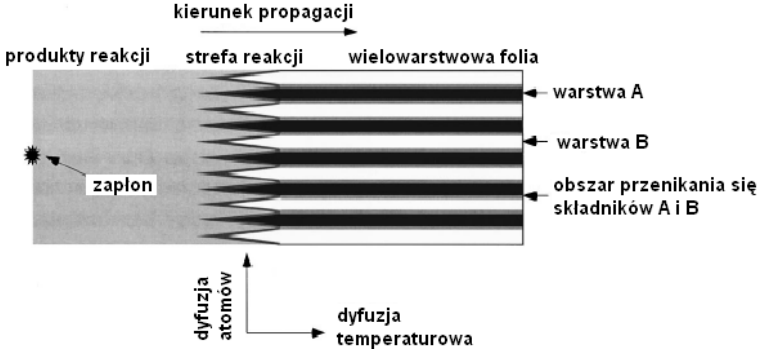
Zaletą wszystkich wymienionych sposobów sporządzania NanoMW jest to, iż pozwalają one na precyzyjną kontrolę nie tylko składu i gęstości kompozycji, ale

również morfologii i rozmiarów cząstek jej składników w skali nanometrycznej. Parametry te determinują z kolei najważniejsze charakterystyki użytkowe materiału, tj. jego wrażliwość oraz efekt energetyczny i siła przemiany wybuchowej. Mieszaniny wybuchowe jednorodne w skali mikrometrowej nie pozwalają uzyskać optymalnego zestawu wspomnianych parametrów.

1. NANOKOMPOZYTY PLANARNE

Nanokompozyty planarne to materiały w formie cienkich folii, które składają się z naprzemiennych warstw paliwa i utleniacza o grubości nanometrowej. W ich strukturze można wyróżnić rozległe, płaskie powierzchnie, stanowiące granice kontaktowe pomiędzy składnikami. Kompozyty tego typu są nanostrukturalne tylko w jednym wymiarze, jednak obydwa reagenty pozostają w bardzo bliskim kontakcie. Dzięki temu, ich przereagowanie wymaga pokonania od 10 do 1000 razy mniejszych odległości niż ma to miejsce w przypadku mieszanin proszków. Poza tym zawierają stosunkowo mało zanieczyszczeń (w tym na granicy kontaktowej), ponieważ poszczególne warstwy są nanoszone z fazy gazowej w wysokiej próżni. Te właściwości sprawiają, że nanokompozyty planarne spalają się z dużymi prędkościami, a samopodtrzymujące się procesy spalania mogą być realizowane nawet wówczas, gdy ciepło reakcji ma umiarkowaną wartość [8].

Na Rys. 2 przedstawiono schematycznie proces spalania wielowarstwowej foli składającej się z substancji A i B. Pomiędzy nimi występuje warstwa przejściowa, gdzie składniki częściowo przenikają się tworząc nową fazę.



Rysunek 2. Schemat spalania foli składającej się z naprzemiennych, ultracienkich warstw utleniacza (A) i paliwa (B) [8]

Aby proces mógł się rozprzestrzeniać w reżimie samopodtrzymującym się, szybkość wydzielania ciepła (określana szybkością dyfuzji reagentów w kierunku poprzecznym do kierunku propagacji fali spalania) musi być większa od szybkości jego odprowadzania (dyfuzja cieplna głównie w kierunku zgodnym i przeciwnym

do kie-runku propagacji fali spalania). Prędkość rozprzestrzeniania się strefy reakcji zależy przede wszystkim od grubości poszczególnych warstw utleniacza i reduktora. Ponadto istotne znaczenie ma grubość i skład warstwy przejściowej powstającej w wyniku powierzchniowego mieszania się składników podczas ich osadzania. Zarówno jeżeli warstwy są zbyt cienkie, jak i zbyt grube samopodtrzymujące się rozprzestrzenianie procesu jest niemożliwe [8, 9].

Podstawową metodą otrzymywania nanokompozytów o morfologii wielowarstwowych folii i filmów jest osadzanie kolejnych warstw z fazy gazowej [8–10]. Napylanie jest realizowane w komorach próżniowych, zwykle za pomocą dział magnetronowych, w atmosferze czystego argonu, przy ciśnieniu ok. 5×10^{-2} Pa (ang. *magnetron sputter depositing*). Składniki są podgrzewane elektrycznie prądami stałymi (ang. *dc preheating*) lub zmiennymi o wysokiej częstotliwości (ang. *rf preheating*). Pierwsza warstwa jest osadzana na polerowanej [8] lub zabezpieczonej litograficznie [9] płytce krzemowej. Kolejne warstwy są nakładane tak długo i w takiej ilości, aż każda z nich i cała folia uzyskają żądaną grubość. Po naniesieniu ostatniej warstwy, folia jest zdejmowana z płytki krzemowej przez zwykłe jej odklejenie (płytka polerowana) lub przez rozpuszczenie pokrycia litograficznego.

1.1. WARSTWOWY KOMPOZYT GLINOWO-NIKLOWY

Gavens i in. [8] otrzymali i dokładnie zbadali wielowarstwowe folie glinowo-niklowe o grubości ok. 11 mm, w których grubość poszczególnych warstw Al-Ni wynosiła 12,5, 25, 50, 100 i 200 nm. Ilość glinu i niklu (grubości warstw glinu i niklu) dobrano tak, aby finalnym produktem reakcji mógł być związek międzymetaliczny o wzorze Al_3Ni_2. Otrzymane kompozyty poddawano badaniom obejmującym ich analizę termiczną, pomiary prędkości spalania oraz analizę składu fazowego. Badano także próbki ogrzewane w temperaturze 150°C, w ciągu 1,5, 6 i 24 godzin.

W kompozytach, które nie były wygrzewane, stwierdzono metodą XRD obecność wyłącznie glinu i niklu, natomiast nawet krótkotrwałe ogrzewanie w 150°C (1,5 godz.) powodowało pojawienie się metastabilnej fazy o wzorze Al_9Ni_2. Zupełne przereagowanie glinu (zanik fazy Al w widmie XRD) następowało po 6- i 24-godzinnym wygrzewaniu próbek, zawierających warstwy Al/Ni grubości odpowiednio 12,5 i 25 nm. Badania za pomocą różnicowej mikrokalorymetrii skaningowej (DSC) wykazały z kolei, że reakcje niklu z glinem są inicjowane w temperaturze 141°C. Wraz ze wzrostem grubości warstw Al/Ni od 12,5 do 50 nm, ciepło reakcji monotonicznie rośnie (od ok. 34 kJ/mol), osiągając wartość maksymalną równą ok. 51 kJ/mol, która jest bliska entalpii tworzenia związku o wzorze Al_3Ni_2 (–56,5 ± 2,9 kJ/mol). Wstępne ogrzewanie próbek w 150°C powoduje zmniejszenie ciepła reakcji, przy czym zmiany te są największe w przypadku foli z najcieńszymi warstwami Al/Ni. Fakty te pozwoliły stwierdzić, że w pierwszym etapie termicznie inicjowanych reakcji niklu z glinem powstaje Al_9Ni_2. Związek ten tworzy się w nie-

wielkiej ilości także podczas wytwarzania kompozytu. Świadczy o tym malejąca wartość ciepła reakcji wraz ze wzrostem ilości granic kontaktowych Al/Ni (powstawanie Al_9Ni_2 jest procesem egzotermicznym).

Liniowe prędkości spalania folii glinowo-niklowych systematycznie wzrastają od ok. 1 do ok. 10 m/s, gdy grubość warstw Al/Ni zmniejsza się od ok. 200 do ok. 25 nm. Dalsze zwiększanie ilości granic kontaktowych powoduje gwałtowny spadek prędkości spalania – do ok. 4 m/s w przypadku folii z warstwami Al/Ni o grubości 12,5 nm. Wstępne ogrzewanie próbek w 150°C powoduje znaczące obniżenie prędkości spalania, zwłaszcza tych folii, które zawierają najwięcej granic kontaktowych. Na tej podstawie, autorzy pracy [8] dochodzą do wniosku, że prędkość spalania określana jest przez dwa konkurencyjne efekty – rosnącą szybkość oraz malejące ciepło reakcji, wraz ze zmniejszeniem grubości warstw Al/Ni. Szybkość reakcji wzrasta gdy rośnie ilość granic kontaktowych, ponieważ zwiększa się powierzchnia reakcji i maleje zasięg dyfuzji reagentów, ale jednocześnie zmniejsza się ciepło reakcji, bo powiększa się udział fazy przejściowej Al_9Ni_2 w mieszaninie reakcyjnej.

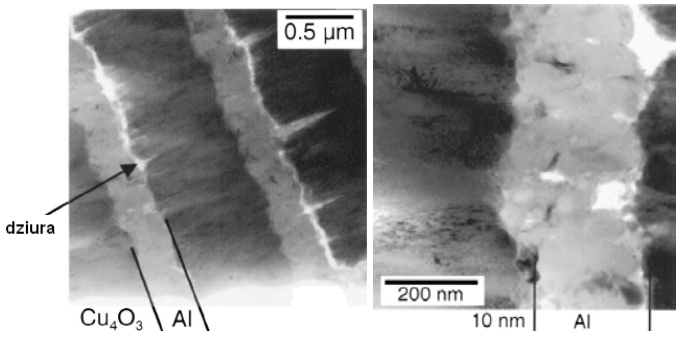
1.2. TERMIT Al/CuO_x O STRUKTURZE WARSTWOWEJ

Blobaum i in. [9] przeprowadzili obszerne badania struktury i właściwości kompozytu Al/Cu_4O_3, uzyskanego metodą próżniowego, naprzemiennego napylania glinu i tlenku miedzi(II). Folia miała grubość ok. 14 mm i składała się z czternastu podwójnych warstw glinu i tlenku miedzi (grubość warstwy podwójnej wynosiła ok. 1 mm). Stosunek molowy Al/Cu_4O_3 był równy ok. 1/0,4.

Uzyskanie takiego kompozytu nastręcza szereg trudności, ponieważ w czasie napylania wydziela się dostatecznie dużo ciepła, aby zainicjować egzotermiczną reakcję termitową, a ponadto glin ulega utlenieniu w reakcji z tlenem uwalnianym w wyniku rozkładu CuO. Te niekorzystne zjawiska udało się znacznie ograniczyć po zastosowaniu chłodzenia płytki krzemowej, na której osadzano poszczególne warstwy kompozytu, i po częściowym przesłonięciu wylotów dział magnetronowych.

Analiza fazowa (XRD) próbek uzyskanych w tych warunkach potwierdziła, że nie zawierają one metalicznej miedzi i krystalicznego tlenku glinu (nie wyklucza to obecności amorficznego Al_2O_3), co może oznaczać, że w trakcie formowania kompozytu tlenek miedzi nie był redukowany w dużych ilościach. Napylony tlenek miedzi ma strukturę melakonitu ($Cu_2^{1+}Cu_2^{2+}O_3$). Faza ta jest bogatsza w miedź niż wyjściowy CuO, a zatem część tlenu została utracona podczas napylania.

Regularna warstwowa struktura kompozytu została jednoznacznie potwierdzona za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Zdjęcia poprzecznego przekroju kompozytu przedstawiono na Rys. 3.



Rysunek 3. Zdjęcia TEM poprzecznego przekroju kompozytu Al/Cu_4O_3 [9]

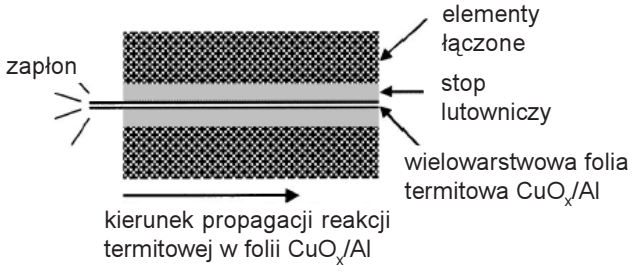
Warstwy glinu (jaśniejsze obszary o grubości ok. 300 nm) składają się z regularnych i równoosiowych krystalitów Al, natomiast warstwy tlenku miedzi (ciemniejsze obszary o grubości ok. 700 nm) są zbudowane z wydłużonych kryształów ułożonych poprzecznie do płaszczyzn kontaktowych. Pomiędzy warstwami Al i Cu_4O_3 widoczne są puste przestrzenie powstałe podczas przygotowywania próbki do badań mikroskopowych (przecinania folii).

Dokładne badania struktury (transmisyjna mikroskopia elektronowa wysokiej rozdzielczości, HR TEM) i składu pierwiastkowego (spektroskopia elektronów Augera, AES) bezpośredniego otoczenia granic kontaktowych Al/Cu_4O_3 ujawniły obecność ok. 10 nm warstwy amorficznego i nanokrystalicznego tlenku glinu Al_2O_3. Wykryto także obszary, przyległe do granicy kontaktowej, o zwiększonej zawartości miedzi. Grubość warstwy Al_2O_3 w badanych kompozytach jest ok. czterokrotnie większa od warstw tlenkowych powstających na powierzchni glinu pod wpływem tlenu atmosferycznego. Zdaniem cytowanych autorów, jest to wynik bombardowania powierzchni glinu wysokoenergetycznymi jonami tlenu, powstającymi podczas magnetronowego napylania tlenku miedzi.

Pomimo obecności inhibitujących warstewek tlenkowych i stosunkowo dużej grubości warstw Al/Cu_4O_3, proces spalania badanej folii jest procesem samopodtrzymującym się i w warunkach pokojowych rozprzestrzenia się ze stałą prędkością ok. 1 m/s. Ciepło spalania, oszacowane w oparciu o wyniki różnicowej analizy termicznej, wynosi 3,9 ± 0,9 kJ/g, natomiast temperatura spalania osiąga temperaturę wrzenia miedzi (2846 K). W produktach spalania wykryto obecność metalicznej miedzi, tlenku miedzi(I) i tlenku glinu(III).

Wykorzystując związek pomiędzy parametrami kinetycznymi, temperaturą spalania i prędkością fali spalania, autorzy pracy [9] oszacowali, że energia aktywacji reakcji glinu z tlenkiem miedzi ma wartość z przedziału 146–460 kJ/mol i jest istotnie większa od energii aktywacji, omówionej wcześniej reakcji glinu z niklem (ok. 128 kJ/mol). Niemniej jednak, fala spalania w folii Al/Cu_4O_3 rozprzestrzenia się trzykrotnie szybciej niż w folii Al/Ni o identycznej geometrii, ponieważ ciepło i temperatura spalania pierwszej kompozycji są dużo większe.

Wysokoenergetyczne kompozyty planarne spalają się stacjonarnie nawet w niewielkich ilościach i dlatego idealnie nadają się do łączenia (spawania) elementów nieodpornych na długotrwałe oddziaływania termiczne, które są nieuniknione w przypadku wykorzystywania znacznie większych, klasycznych ładunków termitowych. Na Rys. 4 przedstawiono ideę tego pomysłu.

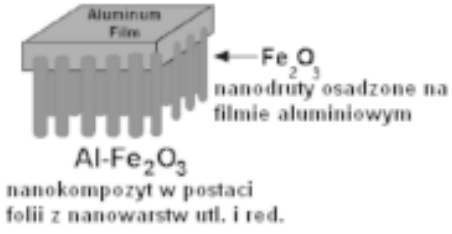


Rysunek 4. Zastosowanie wielowarstwowych nanokompozytów termitowych do łączenia elementów wrażliwych na temperaturę [9]

Wysokie temperatury są generowane jedynie w bezpośrednim sąsiedztwie folii, a ponadto jej grubość może być dobrana tak, aby większość wydzielonego ciepła została zużyta do stopienia materiału lutowniczego. Dzięki temu, nawet małe i wrażliwe na temperaturę elementy nie ulegają uszkodzeniu.

1.3. TERMIT Al/Fe_2O_3 O STRUKTURZE WARSTWOWEJ

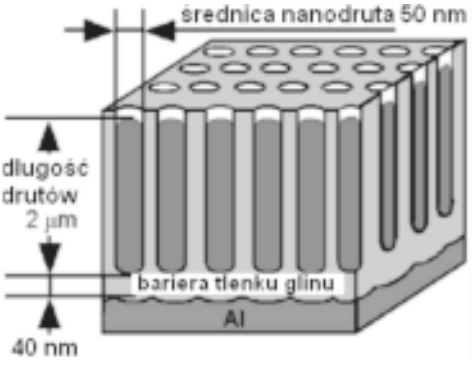
Odmienny od dotychczas omówionych i bardziej złożony sposób otrzymywania warstwowych materiałów kompozytowych opisano w pracy [10]. Menon i in. uzyskali wysoko uporządkowaną strukturę, zbudowaną z matrycy nanodrutów tlenku żelaza(III), osadzonych i częściowo zanurzonych w cienkim filmie glinowym (Rys. 5).



Rysunek 5. Schemat folii zbudowanej matrycy nanodrutów tlenku żelaza(III), osadzonej w warstwie glinu [10]

Kompozyty tego typu otrzymano w wieloetapowym procesie obejmującym przygotowanie matrycy ustawionych równolegle nanodrutów tlenku żelaza, na której osadzano glin z fazy gazowej. W pierwszym etapie sporządzano nanoporowatą mem-

branę z tlenku glinu poprzez anodowe utlenienie foli glinowej w 3% roztworze kwasu szczawiowego. Pory w takiej membranie są ustawione prostopadle do powierzchni i mają kształt cylindryczny o średnicy od 8 do 200 nm, zależnie od warunków anodyzacji. Proces jest przerywany, zanim folia glinowa zostanie zupełnie utleniona i wytrawiona, tzn. zanim pory są z jednej strony zamknięte (Rys. 6).

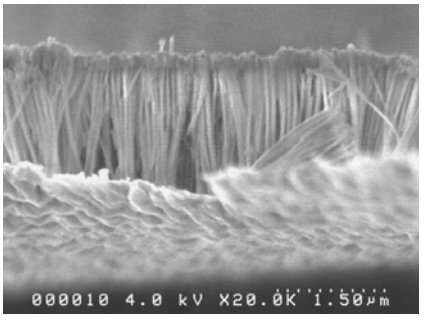


Rysunek 6. Schemat membrany z tlenku glinu z porami wypełnionymi żelazem [10]

W drugim etapie w porach membrany jest osadzane elektrochemicznie żelazo, po czym wytrawia się pozostałą warstwę glinu (za pomocą 3% roztworu chlorku rtęci(II)), a następnie część matrycy Al_2O_3 (za pomocą mieszaniny kwasów chromowego(VI) i fosforowego(V), w temperaturze 60°C.). Odsłonięte w tym etapie końce drutów żelazowych ulegają utlenieniu do Fe_2O_3.

Wytrawiona powierzchnia pokrywana jest warstwą glinu o grubości ok. 50 nm (osadzanie z fazy gazowej), a produkt tego etapu jest ponownie zanurzany w mieszaninie kwasów chromowego(VI) i fosforowego(V) w celu usunięcia pozostałej części tlenku glinu i utlenienia żelaza do tlenku żelaza(III).

Produkt końcowy to kompozyt zawierający nanodruty Fe_2O_3 osadzone prostopadle w warstwie glinu (Rys. 7).



Rysunek 7. Zdjęcie SEM dwuwarstwowej foli zbudowanej z nanodrutów tlenku żelaza(III), osadzonych w warstwie glinu [10]

Pojedynczy drut tlenku żelaza ma średnicę równą ok. 50 nm, a na jednym cm^2 foli jest osadzonych ok. 10^{10} takich drutów [10]. Autorzy podkreślają, że metoda ta pozwala na precyzyjną kontrolę rozmiarów cząstek utleniacza. Ponadto, na powierzchni kontaktowej Al/Fe_2O_3 nie ma żadnych zanieczyszczeń (w tym Al_2O_3), ponieważ glin jest osadzany z fazy gazowej w warunkach wysokiej próżni. Dzięki temu, spalanie kompozytu może być z łatwością zainicjowane impulsem termicznym lub laserowym. Temperatura zapłonu wynosi zaledwie ok. 410°C, a zatem jest dużo niższa od temperatury topnienia glinu (660°C).

2. METASTABILNE INTERMOLEKULARNE MIESZANINY WYBUCHOWE (MIC)

Aumann [13] zdefiniował kompozyty MIC (ang. *Metastable Intermolecular Composites, Metastable Interstitial Composites*) jako jednorodne mieszaniny dwóch lub więcej składników, z których przynajmniej dwa reagują ze sobą egzotermicznie, a każda cząstka kompozytu oddalona jest od innej, z którą wchodzi w reakcję na odległość typową dla skali atomowej, tj. nie większą niż długość kilku wiązań chemicznych. Ponadto istnieje bariera, która chroni składniki przed spontaniczną niekontrolowaną reakcją.

Kompozyty MIC, zwane też supertermitami, znane są od kilkunastu lat [14]. Do najbardziej znanych supertermitów należą mieszaniny glinu z tlenkami molibdenu (MoO_3), żelaza (Fe_2O_3), miedzi (CuO) i wolframu (WO_3) o rozdrobnieniu nanometrowym. Poza tym proponuje się wykorzystanie manganianu(VII) potasu jako wyjątkowo reaktywnego utleniacza, ponieważ – w odróżnieniu od wcześniej wspomnianych tlenków – ulega rozkładowi już w ok. 300°C [15]. Wszystkie kompozyty MIC charakteryzują się dużymi gęstościami energii, wysoką wrażliwością na bodźce inicjujące oraz prędkościami spalania przekraczającymi 1000 m/s, a więc znacznie większymi niż prędkości spalania klasycznych termitów [16].

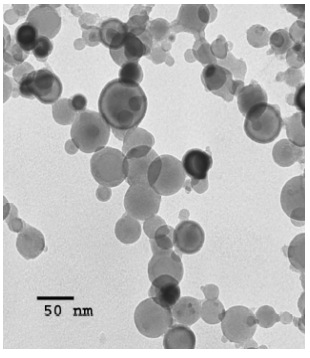
2.1. METODY OTRZYMYWANIA SUPERTERMITÓW

Supertermity otrzymuje się z wcześniej przygotowanych nanometrowych proszków glinu i odpowiedniego utleniacza. Aby uniknąć aglomeracji cząstek, mieszanie składników odbywa się w rozpuszczalniku, np. w heksanie lub 2-propanolu. Zawiesinę poddaje się ultradźwiękowej homogenizacji, po czym rozpuszczalnik jest odparowywany.

Nanoproszki glinu produkowane są najczęściej metodą elektrowybuchową [17], polegającą na przepuszczeniu krótkotrwałego impulsu prądowego o dużym natężeniu (energia 10^2–10^3 J w ciągu 1 ms) przez drut glinowy, umieszczony w reaktorze wypełnionym argonem. W tych warunkach metal ulega jonizacji i wybuchowemu odparowaniu, ponieważ jego temperatura wzrasta gwałtownie nawet do 15000 K.

Rozrzucone wybuchem klastery plazmy glinowej schładzają się w argonie i kondensują w postaci sferoidalnych cząstek o średnicach mniejszych od. 100 nm. Krystality glinu produkowane tą metodą są silnie zdefektowane i bardzo reaktywne. Mogą być stosowane jedynie w formie pasywowanej, tzn. po częściowym, kontrolowanym utlenieniu (podczas krótkotrwałej ekspozycji na suche powietrze wytwarzane są warstewki Al_2O_3 o grubości ok. 3 nm) lub pokryciu powierzchni cząstek cienką warstwą kwasu palmitynowego. W pierwszym przypadku zawartość aktywnego metalu wynosi ok. 90%, natomiast w drugim proszek zawiera ok. 5% palnego dodatku.

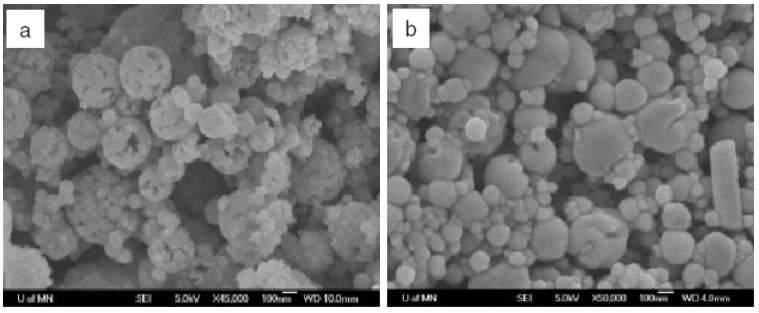
Proszki glinu o nanometrowym rozdrobnieniu i kulistych kształtach cząstek (Rys. 8) otrzymuje się też przez kondensacje glinu z fazy gazowej [17]. W metodzie tej idealnie czysty glin ogrzewany jest rezystancyjnie lub indukcyjnie do temperatury ok. 1300°C. Pary glinu wprowadzane są do komory wypełnionej obojętnym gazem pod obniżonym ciśnieniem, gdzie atomy zderzają się, tworzą zarodki fazy stałej i krystalizują. Zmieniając warunki panujące w reaktorze, można regulować szybkość nukleacji i wzrostu kryształów, a tym samym ich wymiary. Przed wydobyciem proszku glinu, do reaktora powoli wprowadza się niewielką ilość tlenu w celu wytworzenia pasywujących warstewek tlenkowych.



Rysunek 8. Zdjęcie TEM nanoproszku glinu otrzymanego przez kondensację z fazy gazowej [14]

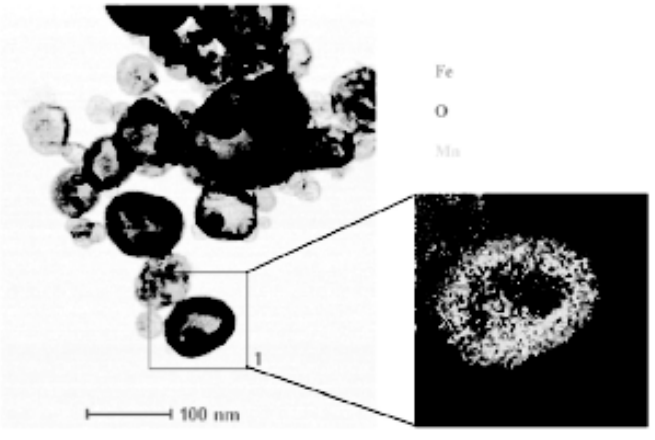
Nanoproszki niektórych tlenków metali można wytwarzać metodą zol-żel, która jest dokładnie opisana w dalszej części pracy. Nanowymiarowe cząstki innych utleniaczy otrzymuje się przez pneumatyczne rozpylanie ich rozcieńczonych, wodnych roztworów (2–5%) i następnie suszenie uzyskanego aerozolu. Dyspergowanie roztworów odbywa się w atomizerach kolizyjnych, umożliwiających uzyskanie kropel o wymiarach ok. 1 mm. W ten sposób produkuje się sferoidalne krystality manganianu(VII) potasu o średnicach mniejszych od 250 nm, (Rys. 9) [15]. Tą samą techniką można także syntezować nanostruturalne tlenki metali. Wówczas rozpyla się wodny roztwór azotanu danego metalu, a aerozol jest ogrzewany do temperatur przekraczających temperaturę rozkładu azotanu. W przypadku tlenku miedzi prekursorem był 5% wodny roztwór azotanu miedzi(II), a temperatura suszenia wynosiła

500°C. Uzyskano submikronowe aglomeraty składające się z krystalitów CuO, których średnice nie przekraczały 100 nm (Rys. 9) [15].



Rysunek 9. Zdjęcia SEM próbek CuO (a) i $KMnO_4$ (b), otrzymywanych techniką rozpylania i suszenia aerozoli [15]

Prakash i in. [18] opisali syntezę złożonego utleniacza, którego cząstki są zbudowane z jądra $KMnO_4$, okrytego mniej reaktywnym Fe_2O_3. Uzyskuje się je w wyniku pirolizy mikrokropel wodnego roztworu azotanu(V) żelaza(III) i manganianu(VII) potasu o całkowitym stężeniu 2%. Aerozol, po wstępnym odwodnieniu na żelu krzemionkowym, jest przepuszczany przez piece rurowe ogrzane do temperatury 120 i 240°C. W pierwszym piecu rozkłada się azotan żelaza i powstaje tlenek żelaza, w drugim topi się $KMnO_4$. Po pojawieniu się fazy ciekłej, stałe cząstki Fe_2O_3 migrują w kierunku powierzchni, wytwarzając enkapsulaty $KMnO_4@Fe_2O_3$. Pełne pokrycie krystalitów $KMnO_4$ tlenkiem żelaza wymaga użycia roztworu prekursorów ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ i $KMnO_4$) w stosunku masowym nie mniejszym niż 3:1. Wówczas 150-nm cząstki kompozytu pokryte są ok. 4-nm warstwą Fe_2O_3 (Rys. 10).



Rysunek 10. Zdjęcia TEM nanocząstek $KMnO_4$ pokrytych warstewką Fe_2O_3 i mapa rozkładu pierwiastków w pojedynczej cząstce, uzyskana metodą skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej STEM [18]

Zdjęcia TEM pozwoliły stwierdzić, że większość cząstek ma strukturę kapsułkową, natomiast mapy rozkładu pierwiastków potwierdziły, że zewnętrzne warstwy cząstek zawierają głównie żelazo i tlen, a ich wnętrze jest zbudowane z $KMnO_4$.

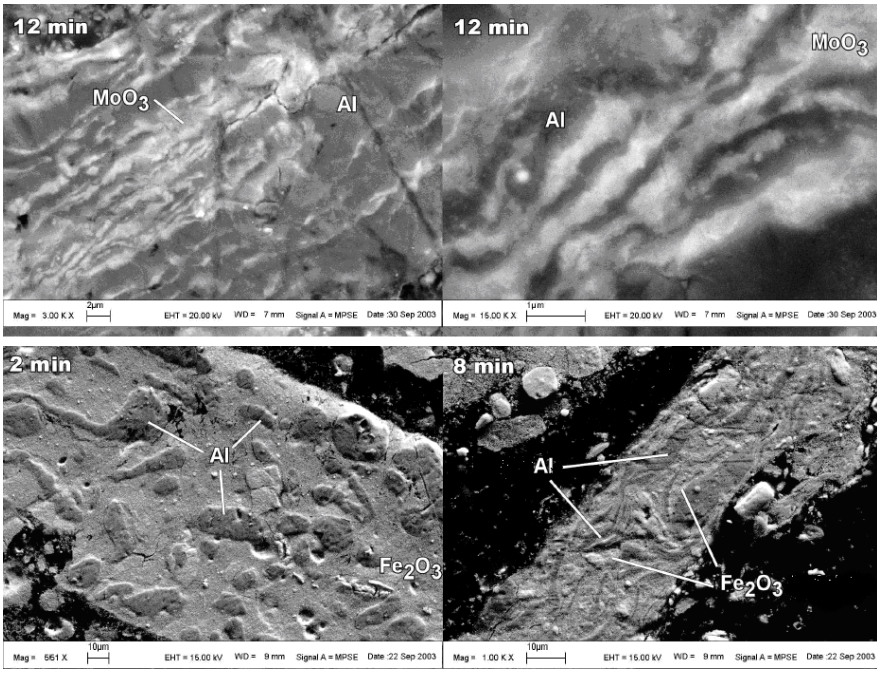
Dogodną metodą syntezy nanoproszków wielu tlenków metali jest piroliza żeli zawierających azotany tych metali i różne hydrofilowe, organiczne polimery. O jej użyteczności świadczy chociażby to, że w latach 1993–2003 była wielokrotnie patentowana [19–22]. W najogólniejszym przypadku polega ona na zmieszaniu wodnego roztworu azotanu danego metalu z rozpuszczalnym (lub częściowo rozpuszczalnym) w wodzie polimerem i następnie kalcynacji uzyskanego żelu, w warunkach gwarantujących rozkład azotanu i całkowite usuniecie wody oraz składników organicznych.

Gruenbauer i in. [22] proponują zastosowanie polimerów i kopolimerów epoksydowych (tlenku etylenu z tlenkiem propylenu lub butylenu) o średniej masie cząsteczkowej z przedziału 1 000–50 000, w roli czynnika żelującego. Małocząsteczkowe, ciekłe polimery epoksydowe mieszają się z wodą w każdym stosunku już w temperaturze pokojowej, natomiast w przypadku polimerów o dłuższych łańcuchach niezbędne jest wstępne podgrzanie roztworu do ok. 60°C. Zaletą żelowania polimerami epoksydowymi jest możliwość sporządzania prekursorów o dużej zawartości soli metali. Mają one konsystencje pasty i po kalcynacji ze 100 g żelu można uzyskać od 10 do nawet 50 g tlenku metalu, zawierającego cząstki o średnicach mniejszych od 200 nm. Jeżeli substratem jest roztwór dwóch lub większej ilości soli, otrzymuje się tlenki złożone, charakteryzujące się dużą jednorodnością składu. Cytowani autorzy stwierdzili też, że w niektórych przypadkach zmniejszeniu wymiarów cząstek produktu sprzyja zastosowanie koagulantów. Proponują wykorzystanie w tej roli wodorotlenku amonu oraz organicznych kwasów (kwas cytrynowy, EDTA) lub zasad (aminy i hydroksyaminy), ponieważ substancje te ulegają zupełnej gazyfikacji podczas kalcynacji żelu [22].

Perry i in. [23] otrzymali nanostrukuralne tlenki wolframu metodą strąceniową. Substratem był parawolframian amonu $(NH_4)_{10}W_{12}O_{41}$. Jego roztwór w stężonym kwasie solnym (35 mg w 1 ml) wlewano do wody (jedna objętość roztworu na cztery objętości wody), strącony osad odwirowywano, suszono w 100°C, a następnie wyrzewano w 200°C. Uzyskano bezwodny tlenek wolframu(III) o morfologii płytek, których średnica wynosiła ok. 100 nm, a grubość ok. 20 nm.

Nanostrukturalne, wysokoenergetyczne kompozycje mogą być także otrzymywane w wyniku rozdrabniania i mieszania składników o mikronowych wymiarach cząstek w młynach kulowych [24]. Podczas tej operacji cząstki paliwa i utleniacza poddawane są wielokrotnym intensywnym obciążeniom mechanicznym (lokalnie ciśnienia mogą osiągać nawet 5 GPa) i w ich wyniku ulegają silnym plastycznym odkształceniom. W tych warunkach warstewki tlenkowe, występujące zwykle na powierzchni cząstek metali, ulegają uszkodzeniu i zerwaniu, a na nowopowstałych granicach kontaktowych tworzą się obszary, gdzie substraty są wymieszane na poziomie atomowym. Produktami ostatecznym i są proszki mieszanin paliwa i utle-

niacza o mikronowych średnicach ziaren (1–100 μm), z których każde ma nanowymiarową strukturę (Rys. 11) [25].



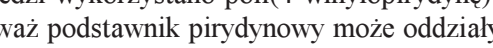
Rysunek 11. Zdjęcia SEM nanokompozytów Al/MoO_3 i Al/Fe_2O_3 otrzymywanych metodą ARM, na zdjęciach podano czasy mielenia składników [25]

Jednoczesne mechaniczne rozdrabnianie i mieszanie substancji zdolnych do silnie egzotermicznych reakcji jest oczywiście procesem niebezpiecznym. Dlatego w ten sposób mogą być otrzymywane jedynie mieszaniny mało i średnio reaktywnych substancji. Najczęściej są to kompozycje termitowe (np. Al/MoO_3, Al/Fe_2O_3, Al/CuO, Al/WO_3) [25] albo mieszaniny boru z tytanem lub cyrkonem [26]. Jednak nawet w tych przypadkach niezbędne jest wcześniejsze, eksperymentalne określenie czasu, jaki upływa od momentu rozpoczęcia mieszania w danych warunkach (szybkość obrotowa młyna, ilość i wymiary kul, itp.) do momentu zainicjowania reakcji spalania mieszaniny. Właściwy proces mieszania, realizowany w większej skali, jest przerywany po upływie od 50 do 90% czasu niezbędnego do zainicjowania reakcji. W praktyce mieszanie termitów trwa zwykle kilkanaście minut, natomiast układy metal-bor mogą być homogenizowane nawet w ciągu kilku godzin. Im dłuższy jest czas mieszania, tym kompozyt jest bardziej jednorodny, ale jednocześnie zwiększa się prawdopodobieństwo samozapłonu. Krytyczny reżim procesu jest podkreślony w jego angielskojęzycznej nazwie: *Arrested Reactive Mailling* (ARM) [25, 26].

Sbramaniam i in. [27] opracowali metodę otrzymywania kompozytu Al/CuO, wykorzystującą samoorganizację nanocząstek składników w celu zwiększenia stopnia jednorodności mieszaniny. W roli molekularnego łącznika nanocząstek glinu i tlenku miedzi wykorzystano poli(4-winylopirydynę) (P4VP). Wybrano ten polimer, ponieważ podstawnik pirydynowy może oddziaływać zarówno z glinem, jak i z tlenkiem miedzi.

W pierwszym etapie syntetyzowano nanopręty tlenku miedzi, w reakcji chlorku miedzi z wodorotlenkiem sodu:

$$CuCl_2 + 2NaOH \rightarrow Cu(OH)_2 + 2NaCl$$



$$Cu(OH)_2 \rightarrow CuO + H_2O$$

Reakcja zachodzi w wodzie, w obecności alkoholu poliwinylowego, który pełni rolę surfaktanta ograniczającego i jednocześnie ukierunkowującego wzrost cząstek CuO. Produkt ma morfologię nanoprętów o średnicy 10–20 nm i długości 70–90 nm. Cylindryczny kształt cząstek utleniacza jest korzystny, ponieważ mają one większą powierzchnię niż cząstki kuliste, a zatem mogą bezpośrednio kontaktować się z większą liczbą cząstek paliwa.

Pokrywanie cząstek CuO polimerem P4VP oraz ich mieszanie z proszkiem glinowym wykonywano w mieszalnikach ultradźwiękowych, w 2-propanolu. Produkt oddzielano od rozpuszczalnika przez wirowanie i suszono w temperaturze 95°C. Schemat procesu przedstawiono na Rys. 12.

Rysunek 12. Schemat otrzymywania nanokompozytu Al/CuO w procesie wykorzystującym samoorganizację cząstek składników [27]

Wydłużony kształt cząstek utleniacza oraz duża jednorodność składu kompozytu, będąca wynikiem samoorganizacji jego struktury w skali nanometrowej, gwarantują większą od typowej powierzchnię kontaktu reagentów i szybkość uwalniania energii.

2.2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I WYBUCHOWE

Kompozyty MIC, podobnie jak i inne typy nanostrukturalnych materiałów pirotechnicznych, charakteryzują się dużą wrażliwością na bodźce inicjujące. Proces ich wybuchowej przemiany może być z łatwością zainicjowany uderzeniem, iskrą

elektryczną czy impulsem promieniowania laserowego. Po zapoczątkowaniu reakcji w niewielkiej objętości próbki, szybko formuje się samopodtrzymująca się fala reakcyjna, która rozprzestrzenia się z prędkościami nawet o dwa rzędy wielkości większymi niż w mieszaninach sporządzonych ze składników o rozdrobnieniu mikronowym.

Valliappan i in. [28] zbadali wpływ rodzaju utleniacza oraz pokrycia nanocząstek glinu warstewką polimerową na prędkość rozprzestrzeniania się fali reakcyjnej oraz czas niezbędny do zainicjowania autotermicznych reakcji w próbce. Do sporządzania mieszanin używano nanostrukturalnego proszku glinu (powierzchnia właściwa S_{BET} ok. 40 m^2/g) oraz tlenków miedzi(II), molibdenu(VI), wolframu(VI) i żelaza(III). Składniki mieszano w heksanie za pomocą ultradźwięków. Próbki spalano w otwartej przestrzeni. Przewidywane równania reakcji i zmierzone prędkości propagacji fali spalania przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Parametry procesu spalania nanostrukturalnych termitów [28]

Przewidywane równanie reakcji	Powierzchnia właściwa tlenku, S_{BET} [m^2/g]	Prędkość fali spalania [m/s]
$2Al + 3CuO = Al_2O_3 + 3Cu$	28,0	280
$2Al + MoO_3 = Al_2O_3 + Mo$	40,0	335
	76,0	362
	1,5	80
$2Al + WO_3 = Al_2O_3 + W$	40,0	412
$2Al + Fe_2O_3 = Al_2O_3 + 2Fe$	40,0	30

Stechiometryczna mieszanina glinu z tlenkiem wolframu(VI) spala się z największą prędkością (412 m/s), natomiast najmniej reaktywnym utleniaczem okazał się tlenek żelaza(III). Zmniejszenie wymiarów cząstek tlenku molibdenu(VI) powoduje spadek prędkości fali spalania, jeżeli jednak wymiary te pozostają w zakresie nanometrowym, obniżenie prędkości jest stosunkowo małe. Wyraźny wpływ stopnia rozdrobnienia tego utleniacza na prędkość fali spalania obserwuje się po przejściu od wymiarów nanometrowych do mikrometrowych (S_{BET} = 1,5 m^2/g). Autorzy cytowanej pracy tłumaczą to tym, że nanocząstki utleniacza o wymiarach mniejszych od pewnej krytycznej wartości, odparowują lub rozkładają się na tyle szybko, że zmiany ich wymiarów nie powodują istotnych zmian prędkości spalania.

Zastosowanie w termicie Al/CuO cząstek glinu pokrytych cienką warstwą trimetoksyfenylosilanu (ok. 2% mas.) spowodowało ponad dwukrotny wzrost prędkości spalania (z 280 do 570 m/s), natomiast dalsze zwiększanie zawartości silanu (do 10%) skutkowało stopniowym zmniejszaniem prędkości spalania. Autorzy uważają, że niewielka ilość silanu poprawia homogeniczność mieszaniny, ponieważ zapobiega on aglomeracji cząstek glinu. Po przekroczeniu 2% zawartości, prędkość sys-

tematycznie maleje z powodu obniżającego się ciepła reakcji i rosnącej grubości warstewek rozdzielających cząstki substratów [28].

Son i in. [14, 29] badali proces spalania supertermitów Al/MoO_3 = 42,5/57,5 zawierających glin o średnich wymiarach cząstek 120, 80 i 44 nm. Autorzy ci donoszą, że średnia prędkość spalania sypkich próbek termitów w otwartej przestrzeni wzrastała od ok. 750 do ok. 950 m/s po zmniejszeniu wymiarów cząstek glinu z 120 do 80 mm. Dalsze zwiększanie stopnia rozdrobnienia glinu nie powodowało znaczących zmian prędkości spalania [14].

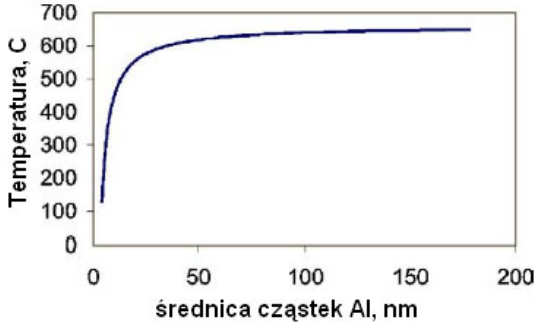
W pracy [29] opisano eksperymenty, których celem było zidentyfikowanie dominującego mechanizmu rozprzestrzeniania się fali spalania w supertermicie Al/MoO_3 = 42,5/57,5, sporządzonym z proszków glinu (44 nm) i tlenku molibdenu (15,5 nm). Stwierdzono, że zmiany gęstości ładunków (z 0,27 do 0,4 g/cm^3) i ciśnienia początkowego (od 3,3 Pa do ok. 71 kPa) nie powodują zauważalnych zmian prędkość fali spalania. Jej wartość, zmierzona w kilkudziesięciu eksperymentach, była równa ok. 857 m/s. Jeżeli jednak ładunek nie wypełniał w pełni przekroju rury, w której był spalany, prędkość propagacji wzrastała do ok. 1690 m/s, zarówno pod ciśnieniem atmosferycznym, jak i obniżonym. Fakt ten dowodzi, zdaniem autorów cytowanej pracy, że transport energii od strefy reakcji chemicznej do frontu czoła fali spalania odbywa się głównie przez konwekcję. Potwierdzeniem tego wniosku był eksperyment polegający na obserwacji zachowania się fali spalania po wstawieniu w ładunek cienkich szafirowych przegród. Ich zadaniem było uniemożliwienie konwekcyjnego transportu energii, przy jednoczesnym umożliwieniu przekazywania jej przez promieniowanie. W każdym przypadku zarejestrowano przerwanie procesu spalania po dotarciu fali do przegrody. Nie można wykluczyć, że pewien udział w przekazywaniu energii odgrywają także fale nadciśnienia. Fala spalania rozprzestrzenia się bowiem z prędkością naddźwiękową, a ciśnienie osiąga ok. 24 MPa w ciągu zaledwie ok. 11 ms. Uwzględniając ponadto, że prędkość fali wynosi ok. 900 m/s, można przyjąć, iż szerokość strefy reakcji chemicznych w fali spalania wynosi ok. 10 mm.

Proces inicjowania i spalania prasowanych ładunków supertermitów Al/MoO_3 o różnym składzie i gęstości był przedmiotem badań w pracach [30, 31]. Do sporządzenia mieszanin wykorzystywano sferoidalne proszki glinu o średnich wymiarach cząstek z zakresu od 17 nm do 20 mm. Zawartość aktywnego metalu w tych proszkach wynosiła odpowiednio od ok. 38 do 99%. Krystality tlenku molibdenu(VI) miały kształt prostokątnych płytek o długości ok. 1 mm i grubości 10–20 nm. Mieszaniny prasowano w walcowe ładunki, których średnica i wysokość była równa 4,5. Ich spalanie inicjowano promieniowaniem laserowym 10,6 mm, generowanym przez laser CO_2 o mocy 50 W, pracujący w sposób ciągły. Średnica wiązki promieniowania wynosiła 4 mm.

Granier i in. [30] mierzyli czas od momentu oświetlenia próbki promieniowaniem laserowym do zainicjowania samopodtrzymujących się reakcji spalania oraz prędkość propagacji fali spalania w ładunkach o gęstości równej 38% maksymalnej

gęstości kompozycji. Zmieniano stopień rozdrobnienia glinu oraz jego zawartość w mieszaninie w zakresie od 30 do 70% z krokiem 10%.

Zastąpienie nanostrukturalnego proszku glinu proszkiem o rozdrobnieniu mikronowym wydłuża czas do inicjacji o dwa-trzy rzędy wielkości (od ok. 12 ms do 1–6 s). Najszybciej ulegają zapłonowi mieszaniny zawierające niewielki nadmiar glinu (10–20%), w stosunku do składu stechiometrycznego. Stwierdzono też, że grubość warstewek tlenkowych na cząstkach glinu (od 2,5 do 3,9 nm) nie wpływa istotnie na czas do inicjacji. Autorzy cytowanej pracy uważają, że tak gwałtowna redukcja czasu niezbędnego do zainicjowania procesu spalania, przy przejściu od kompozycji nanostrukturalnych do mikrostrukturalnych, to wynik wyraźnego spadku temperatury topnienia glinu wraz ze zmniejszaniem średnicy jego cząstek. Zależność ta staje się szczególnie silna, gdy wymiary cząstek są mniejsze od 100 nm (Rys. 13).



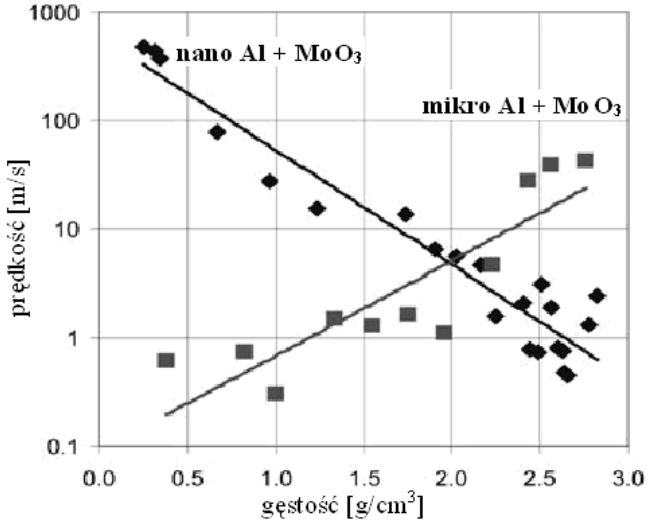
Rysunek 13. Zależność temperatury topnienia glinu od średnicy cząstek (wyznaczona na podstawie równania Gibasa-Thompsona) [30]

Wyniki teoretyczne zostały potwierdzone eksperymentalnie. Próbka zawierająca nanoproszek glinu (1–50 nm) uległa zainicjowaniu już po ogrzaniu jej powierzchni do ok. 100°C, natomiast zapłon próbki zawierającej cząstki o średnicach z przedziału 3–4 mm następował dopiero w temperaturze 610°C, tzn. bliskiej temperaturze topnienia glinu 660°C.

Nieoczekiwanym wynikiem omawianych badań było stwierdzenie, że prędkość spalania ładunków zaprasowanych z mieszanin zawierających glin o mikrometrowych wymiarach cząstek jest zdecydowanie większa niż ich odpowiedników z nanoproszkiem glinu. Stwierdzono, że parametr ten zmienia się w porównywanych grupach mikro- i nanostrukturalnych kompozycji w zakresie, odpowiednio od ok. 23 do 30 m/s oraz od ok. 1 do 12 m/s, zależnie od stopnia rozdrobnienia i zawartości aktywnego metalu. Wiarygodną przyczyną takiego zachowania się badanych ładunków jest ich temperatura początkowa. W przypadku próbek mikrostrukturalnych fala spalania propagowała się we wstępnie podgrzany materiał (do 300°C na przeciwległym końcu próbki), ponieważ były one oświetlane promieniowaniem laserowym nawet przez kilka sekund. Z kolei czas ekspozycji próbek nanostrukuralnych

na impuls laserowy wynosił zaledwie ok. 10 ms, a zatem były one ogrzewane tylko powierzchniowo.

Pantoya i in. [31] zbadali wpływ gęstości początkowej prasowanych ładunków z nano- i mikrostrukturalnych mieszanin Al/MoO_3 na prędkość spalania oraz wykonali analizy termiczne, w celu wyjaśnienia mechanizmu reakcji chemicznych podczas zapłonu próbki i na froncie fali spalania. Do sporządzania badanych mieszanin używano proszków glinu o rozdrobnieniu 10–14 nm oraz 76–80 mm. Gęstość próbek zmieniano w przedziale od 6,5 do 73% gęstości maksymalnej. Wyniki pomiarów prędkości spalania przedstawiono na Rys. 14.



Rysunek 14. Prędkość spalania prasowanych ładunków nano- i mikrokompozytów w funkcji gęstości

Nanokompozyty spalają z tym większą prędkością, im mniejsza jest ich gęstość. W przypadku mieszanin z mikronowym proszkiem glinu, zależność jest odwrotna. Cytowani autorzy są zdania, że wraz ze wzrostem gęstości nanokompozytów, coraz więcej glinu i tlenku molibdenu reaguje już na etapie zgęszczania próbki. Reakcje te zachodzą wyłącznie w fazie stałej i dlatego ich szybkość jest niewielka, a tempo wydzielania energii zbyt małe, aby spowodować samozapłon próbki. Niemniej jednak, część energii chemicznej jest konsumowana i nie jest dostępna w trakcie wybuchowej przemiany próbki. W mieszaninach mikrostrukturalnych wzrost gęstości oznacza eliminowanie wypełnionych powietrzem porów i wzrost współczynnika przewodzenia ciepła w ładunku. Ponieważ w procesie spalania dominującym sposobem transportu energii jest przewodzenie, wyższy współczynnik przewodnictwa oznacza większą prędkość fali spalania.

Porównawcze badania nano- i mikrokompozytów Al/MoO_3 metodą różnicowej mikrokalorymetrii skaningowej DSC dostarczyły dowodów, że mechanizm reakcji w obydwu przypadkach jest inny. Jeżeli cząstki glinu mają mikronowe wymiary,

szybkie silnie egzotermiczne reakcje pomiędzy glinem i tlenkiem molibdenu rozpoczynają się dopiero w temperaturze ok. 960°C, tzn. po całkowitym stopieniu glinu i częściowej sublimacji MoO_3. W nanokompozytach egzotermiczne reakcje inicjowane są już w ok. 460°C, gdy obydwa substraty występują w fazie stałej. Dyfuzja w fazie stałej jest oczywiście znacznie powolniejsza niż w układzie gaz–ciecz i to może być dodatkową przyczyną niższej prędkości spalania nanokompozytów, przy gęstościach przekraczających 2 g/cm^3 (Rys. 14).

Perry i in. [23] wykazali, że nanostrukturalne tlenki wolframu, mogą być równie efektywnymi utleniaczami w supertermitach jak tlenek molibdenu(VI). Mieszanina Al/WO_3 o składzie odpowiadającym reakcji

$$2Al + WO_3 = Al_2O_3 + W$$

spala się z prędkością ok. 250 m/s. Pomiary ciśnienia podczas spalania próbek tej mieszaniny w zamkniętej przestrzeni pozwoliły oszacować, że z 1 kg mieszaniny można uzyskać do 2 MJ energii z maksymalną mocą ok. 20 MW.

Supertermity zawierające manganian(VII) potasu w roli utleniacza spalają się znacznie gwałtowniej niż mieszaniny glinu z tlenkami metali. Udowodnili to Prakash i in. [16], spalając sypkie 25-mg próbki nanokompozytu Al/$KMnO_4$ = 35/65 w komorze o objętości 13 ml. Stwierdzono, że w tych warunkach szybkość narastania ciśnienia wynosiła ok. 2 MPa/ms i była odpowiednio ok. 40 i 17000 razy większa niż w przypadku spalania nanostrukturalnych kompozycji Al/MoO_3 i Al/Fe_2O_3. Cytowani autorzy przypisują to niskiej temperaturze dekompozycji $KMnO_4$ (ok. 300°C).

Niestety, mieszaniny glinu z $KMnO_4$ charakteryzują się zbyt małą trwałością chemiczną. Aby wyeliminować przedwczesne reakcje tych substancji, krystality $KMnO_4$ pokrywano warstewkami tlenku żelaza(III) o różnej grubości [18]. Stwierdzono, że szybkość wzrostu ciśnienia podczas spalania tak zmodyfikowanych supertermitów jest proporcjonalna do grubości warstewek Fe_2O_3 i wynosi ok. 0,1 i 0,83 MPa/ms, jeżeli grubość ta jest równa odpowiednio 16 i 4 nm. Autorzy podkreślają, że zwykłe zmieszanie proszków dwóch utleniaczy o różnej reaktywności nie tylko nie poprawia trwałości kompozytu, ale również nie umożliwia tak szerokiego zakresu regulowania parametrów spalania, jak ma to miejsce w przypadku, gdy zastosuje się złożony utleniacz w formie kapsułek.

Supertermity Al/CuO, otrzymane przez Subramaniam i in. [27] w procesie wykorzystującym samoorganizację cząstek paliwa wokół cząstek utleniacza, spalają się z prędkościami 1800–2200 m/s, a więc znacznie większymi niż otrzymane innymi metodami (Tabela 1). Cytowani autorzy tłumaczą to wysokim stopniem homogeniczności mieszaniny i w związku z tym silnie rozwiniętą powierzchnią reakcji. W konsekwencji fala reakcyjna rozprzestrzenia się z prędkością naddźwiękową, co sugeruje, że dominującym mechanizmem transportu energii mogą być w tym przypadku fale nadciśnienia.

Badania supertermiów Al/MoO_3 i Al/F_2O_3 otrzymanych metodą ARM, tzn. w wyniku łącznego mielenia proszków glinu i tlenków metali w młynach kulowych wykazały, że parametry ich spalania zależą przede wszystkim od czasu mielenia. Schoenitz i in. [26] wykonali pomiary ciśnienia podczas spalania sypkich próbek mieszanin Al/MoO_3 i Al/F_2O_3 w pojemniku wypełnionym argonem oraz zmierzyli szybkość spalania ich ładunków o przekroju kwadratowym 2,5 × 2,5 mm w otwartej przestrzeni. Uzyskane przez nich wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

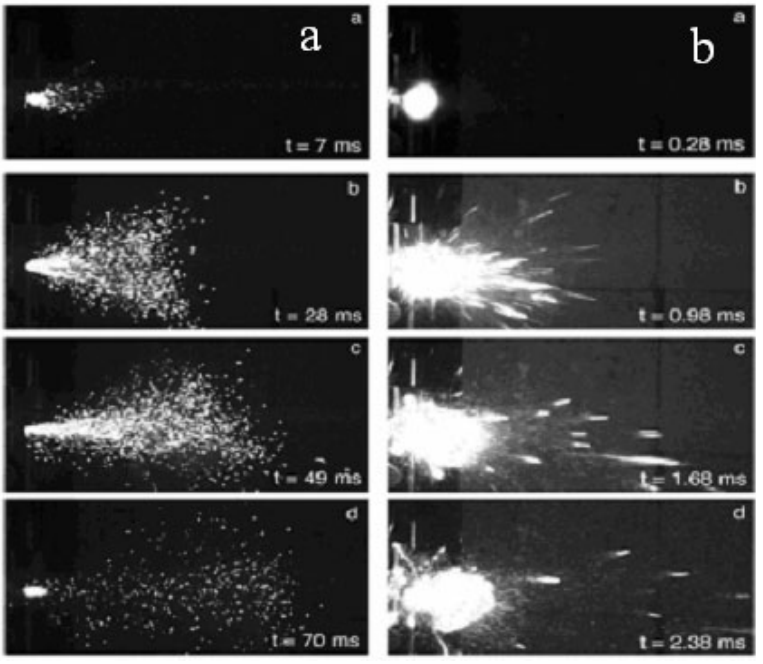
Tabela 2. Parametry procesu spalania supertermitów otrzymanych metodą ARM [26]

Rodzaj termitu, Czas mielenia	Ciśnienie maksymalne, p_{max}, MPa	Szybkość narastania ciśnienia, dp/dt, MPa/s	Prędkość spalania m/s
Al/MoO_3, m* = 3,81g			
10 min.	0,31	3,0	–
6 min.	0,29	2,1	–
0 min.	0,26	1,2	–
Al/Fe_2O_3, m* = 4,50g			
19 min.	0,26	1,0	0,50
10 min.	0,24	0,5	0,17
0 min.	0,19	0,1	0,0

* – masy spalanych próbek dobrano tak, aby ilość wydzielonej energii była identyczna.

Maksymalne ciśnienie w komorze (stopień przereagowania mieszaniny) i szybkość jego narastania (szybkość reakcji chemicznych) systematycznie wzrastają wraz z wydłużeniem czasu mieszania, ponieważ poprawia się jednorodność kompozytu. W otwartej przestrzeni mieszanina Al/Fe_2O_3, która w ogóle nie była mielona, nie jest zdolna do sampodtrzymującego się spalania, natomiast po zmieleniu proces rozprzestrzenia się tym szybciej, im dłuższy był czas mielenia. Prędkości spalania są jednak o dwa rzędy wielkości mniejsze niż w przypadku sypkich kompozytów MIC, otrzymanych przez ultradźwiękowe zmieszanie nanocząstek paliwa i utleniacza w heksanie (Tabela 1). Równie małe wartości tego parametru obserwowano po zagęszczeniu kompozytów MIC (Rys. 14). Można więc przypuszczać, że przyczyną spowolnienia propagacji fali spalania jest ograniczenie ilości energii przekazywanej na drodze konwekcji oraz częściowe przereagowanie substratów już na etapie sporządzania kompozytu. W odróżnieniu od zwykłych kompozytów MIC, poszczególne cząstki mieszanin typu ARM składają się zarówno z glinu, jak i z tlenku żelaza, a ich gęstość jest bliska gęstości teoretycznej [26].

Wysoka wrażliwość supertermitów na bodźce cieplne i mechaniczne oraz duża prędkość rozprzestrzeniania się fali spalania umożliwia wykorzystanie ich do produkcji spłonek zapalających, inicjowanych elektrycznie lub uderzeniem. W Los Alamos National Laboratory [14] skonstruowano elektryczne spłonki zapalające wykorzystujące nanostrukturalną mieszaninę Al/MoO_3. Na Rysunku 15 przedstawiono zdjęcia ilustrujące działanie spłonek klasycznych i nowoopracowanych. W sposób oczywisty wynika z nich, że nowe spłonki są znacznie lepsze zarówno pod względem szybkości generacji impulsu ogniowego, jak i wielkości płomienia.



Rysunek 15. Zdjęcia ilustrujące działanie klasycznych (a) i nowych (b) spłonek zapalających, zawierających nanokompozyt Al/MoO_3 [14]

Dodatkową zaletą proponowanego rozwiązania jest to, że supertermity zastępują mieszaniny inicjujące, zawierające wysoko toksyczne sole metali ciężkich, np. piorunian rtęci, trinitrorezorcynian ołowiu, azotan baru, siarczki antymonu. Ponadto parametry wytwarzanego impulsu inicjującego mogą być z łatwością dostosowane do potrzeb przez prostą w realizacji zmianę składników mieszanin, stopnia ich rozdrobnienia i stosunku ilościowego.

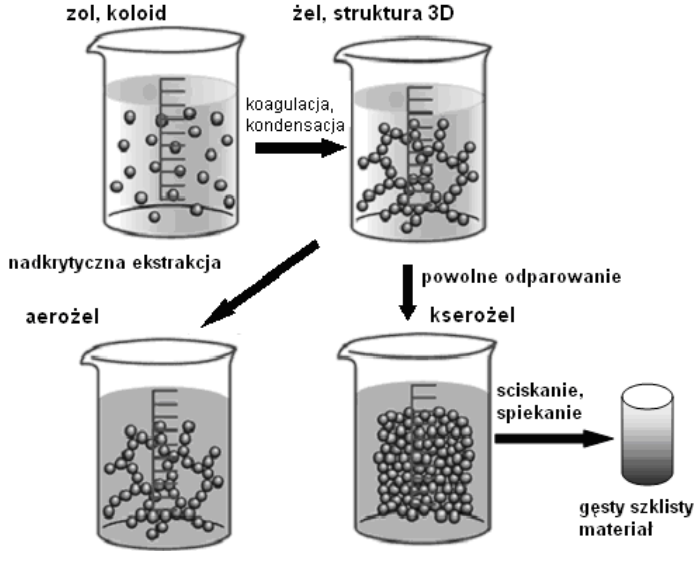
Poważną wadą supertermitów jest natomiast ich duża wrażliwość, zbliżona niekiedy do wrażliwości inicjujących materiałów wybuchowych. Należy podkreślić, że w tym przypadku nie można zastosować znanego sposobu zmniejszenia wrażliwości mieszanin inicjujących przez ich zwilżenie, ponieważ woda reaguje z nanostruturalnym proszkiem glinu. W związku z tym, wszelkie operacje z supertermitami wymagają szczególnej ostrożności [14].

3. MIESZANINY WYBUCHOWE OTRZYMYWANE METODĄ ZOL–ŻEL

Synteza nanostrukturalnych materiałów metodą zol–żel przebiega w środowisku rozpuszczalnika (Rys. 16). Wyjściowy zol (roztwór koloidalny) powstaje w wyniku hydrolizy i/lub polikondensacji prekursora, tworząc nanometrowe, jednorodne

pod względem kształtu i wymiarów cząstki, które początkowo poruszają się swobodnie w rozpuszczalniku. Żel tworzy się wówczas, gdy w układzie koloidalnym znajduje się tak dużo cząstek, że stykają się one lub łączą z sobą w wielu punktach, tworząc sztywną trójwymiarową sieć, która rozprzestrzenia się w całej objętości cieczy, uniemożliwiając przemieszczanie się cząstek fazy rozproszonej. Proces ten nazywa się koagulacją.

W przypadku żeli zbudowanych z polimerów, koagulacja może też następować na skutek reakcji polimeryzacji, polikondensacji lub sieciowania. Tak więc strukturę żelu tworzą połączone kowalencyjnie (lub w inny sposób, np. za pomocą wiązań wodorowych, oddziaływań jonowych lub van der Walsa) wielofunkcyjne cząstki i włókna (zazwyczaj o wymiarach 0,1–20 nm), pomiędzy nimi występują zaś pory (10–50 nm) wypełnione rozpuszczalnikiem.



Rysunek 16. Schemat ideowy otrzymywania nanostrukturalnych materiałów metodą zol–żel [5]

Zmieniając rozpuszczalnik, temperaturę, wskaźnik pH roztworu, rodzaj i stężenie reagentów, można regulować wymiary cząstek zolu, czas żelowania i strukturę żelu oraz jego zachowanie podczas procesu suszenia.

Powolne, kontrolowane odparowywanie rozpuszczalnika prowadzi do otrzymania **kserożelu** – litego optycznie materiału o dużej gęstości i wytrzymałości mechanicznej. Jeżeli natomiast zawarty w porach rozpuszczalnik jest ekstrahowany w warunkach nadkrytycznych (za pomocą CO_2), powstaje **aerożel** – rodzaj sztywnej piany o wyjątkowo małej gęstości. W obydwu przypadkach są to materiały porowate, charakteryzujące się dużą powierzchnią właściwą (kilkaset m^2/g) i jednorodnym rozmieszczeniem porów w przestrzeni. Wypełnienie tych porów substancją utleniającą lub redukującą (zależnie od natury szkieletu żelu) pozwala uzyskać wysoko-

energetyczny kompozyt, homogeniczny w skali nanometrowej i dzięki temu zdolny do szybkich przemian wybuchowych (Rys. 17).

Rysunek 17. Schemat struktury wysokoenergetycznego materiału otrzymanego metodą zol–żel [5]

Wprowadzenie drugiego składnika kompozytu może być zrealizowane w następujący sposób [32, 33]:

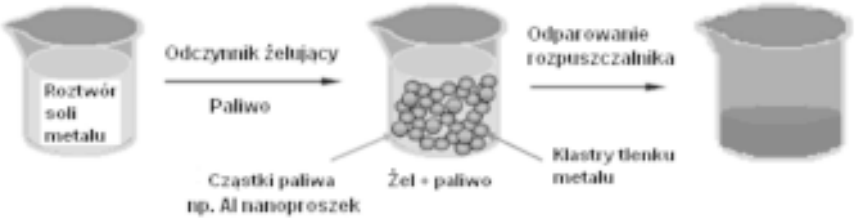
(I) przez dodanie stałych cząstek – nanometrowe proszki utleniacza, reduktora lub związku wybuchowego miesza się z zolem lub żelem pierwszego składnika, a następnie usuwa rozpuszczalnik.

(II) przez dodanie roztworu – do roztworu/zolu pierwszego składnika dodaje się roztwór drugiego w tym samym lub kompatybilnym rozpuszczalniku, a po żelatynizacji rozpuszczalniki są odparowywane lub ekstrahowane.

(III) przez wymianę rozpuszczalnika – faza ciekła żelu pierwszego składnika jest wymieniana na inną ciecz, w której rozpuszczony jest drugi składnik.

3.1. KOMPOZYTY ZAWIERAJĄCE ŻELE NIEORGANICZNE

Pierwszy etap otrzymywania wysokoenergetycznych nanokompozytów techniką zol–żel, zawierających tlenek metalu (najczęściej tlenek żelaza(III)) w roli utleniacza, polega na zbudowaniu tlenkowego szkieletu żelu ze zdolnych do hydrolizy soli tych metali (zwykle stosuje się chlorki lub azotany). Fazę ciekłą stanowi etanol, woda lub inny polarny i protyczny rozpuszczalnik. Składnik palny dodawany jest w formie stałej lub w roztworze bezpośrednio przed procesem koagulacji, inicjowanej wprowadzeniem związków epoksydowych (oksiranów lub oksetanów). Suszenie kompozytu jest realizowane przez powolne odparowanie rozpuszczalnika lub jego ekstrakcję w warunkach nadkrytycznych (Rys. 18) [32–36].



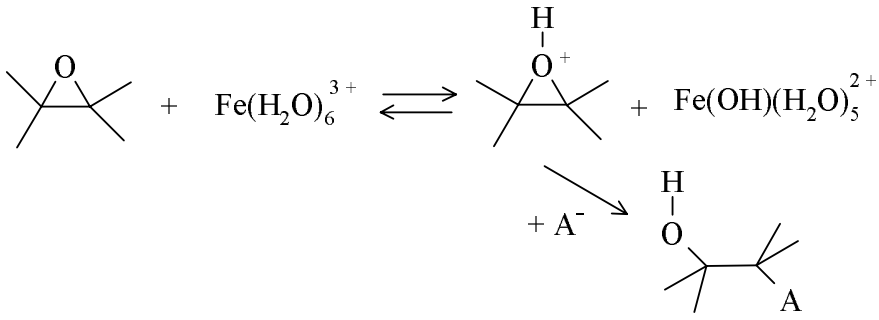
Rysunek 18. Schemat otrzymywania kompozytów utleniacz-paliwo metodą zol–żel

Bezpośrednio po dodaniu związku epoksydowego (np. tlenku propylenu) do etanolowego roztworu soli żelaza rozpoczyna się egzotermiczna reakcja, której towarzyszy zmiana koloru roztworu z pomarańczowego na ciemno czerwony oraz stopniowe zwiększanie jego lepkości. Proces tworzenia zolu polega na polikondensacji uwodnionych jonów żelaza(III) (Rys. 19). Najpierw powstają małe oligomery, które łączą się w większe cząstki tworząc zol, ulegający systematycznej koagulacji, w miarę jak rośnie stężenie i rozmiary cząstek. Sztywny żel formuje się w ciągu zaledwie kilku minut [34].

Rysunek 19. Schemat tworzenia żelu tlenku żelaza [38]

Szybkość żelowania i jakość żelu w znacznym stopniu zależą od właściwości fazy ciekłej (np. napięcia powierzchniowego, stałej dielektrycznej, momentu dipolowego). Gash i in. [35] stwierdzili, że koagulacja zachodzi najłatwiej w polarnych, protycznych rozpuszczalnikach, ponieważ ich zdolność do tworzenia silnych wiązań wodorowych sprzyja łączeniu się cząstek tlenku żelaza (zawierających niewątpliwie powierzchniowe grupy hydroksylowe) w sztywną przestrzenną sieć żelu.

Rola związków epoksydowych w procesie żelowania roztworów soli żelaza była przedmiotem badań w pracach [35, 36]. Zdaniem autorów tych prac hydroliza i kondensacja uwodnionych jonów żelaza jest inicjowana przeniesieniem protonu od akwakompleksu do tlenu związku epoksydowego. Powstały przejściowo kation oksoniowy wchodzi w reakcję z obecnymi w środowisku nukleofilami (np. $A^- = Cl^-$, H_2O, NO_3^-), która prowadzi do otwarcia pierścienia i nieodwracalnego usunięcia protonu ze środowiska reakcji (Rys. 20).



Rysunek 20. Schemat reakcji związków epoksydowych z uwodnionymi jonami żelaza podczas tworzenia żelu tlenku żelaza [35]

Związki epoksydowe są stosunkowo słabymi zasadami i można je dokładnie rozprowadzić w całej objętości roztworu, bez nagłej zmiany jego odczynu. W efekcie wskaźnik pH mieszaniny reakcyjnej powoli i systematycznie wzrasta, umożliwiając tworzenie dimerów, oligomerów, cząstek zolu i w końcu monolitycznego żelu tlenku żelaza. Mocne zasady, takie jak OH^-, CO_3^{2-}, reagują bardzo szybko z uwodnionymi jonami żelaza. Tworzą się wówczas duże cząstki zasadowych tlenków żelaza, które wytrącają się w postaci osadu.

Kinetyka reakcji kationu oksoniowego z nukleofilami, a więc również szybkość nukleacji i wzrostu cząstek zolu, zależą od struktury użytego związku epoksydowego. W pracy [36] wykazano na przykład, że zastępując oksirany oksetanami można znacząco zmieniać mikrostrukturę żelu. W pierwszym przypadku proces koagulacji zachodzi szybciej, a żel zbudowany jest z kulistych cząstek o średnicach z przedziału 5–15 nm, natomiast w drugim otrzymuje się produkt o strukturze włóknistej.

3.1.1. Nanostrukturalny termit Al/Fe_2O_3

Tillotson i in. [34] opisali sposób otrzymywania oraz właściwości termitu Al/Fe_2O_3. Typowa procedura syntezy obejmowała rozpuszczenie 1 g $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ w 5 g bezwodnego etanolu oraz wprowadzenie do mieszanego roztworu najpierw 1 g tlenku propylenu, a następnie 0,034 g proszku glinu. Używano glinu o mikronowym (ok. 6 μm) oraz nanometrowym rozdrobnieniu (ok. 30 nm). W obydwu przypadkach skład termitu odpowiadał stechiometrii reakcji:

$$2Al + Fe_2O_3 = Al_2O_3 + 2Fe$$

Rozpuszczalnik odparowywano w suszarce próżniowej, w 70°C przez 5–6 dni, lub ekstrahowano ditlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych. Wymiana etanolu na CO_2 polega na długotrwałym (3–4 dni) płukaniu próbki żelu ditlenkiem

węgla w temperaturze 10°C i pod ciśnieniem ok. 10 MPa. Następnie reaktor powoli ogrzewano do 45°C i dekompresowano w ciągu ok. 100 min.

Wyniki badań strukturalnych (transmisyjna mikroskopia elektronowa, izotermy adsorpcji) potwierdziły, że otrzymane mieszaniny są generalnie jednorodne w skali nanometrowej, chociaż obserwowano także aglomeraty cząstek glinu. Autorzy uważają, że problem ten da się rozwiązać przez zastosowanie mieszania ultradźwiękowego na etapie wprowadzenia proszku glinowego do zolu. Pomimo kontaktu glinu z fazą ciekłą zawierającą wodę, nie stwierdzono zwiększenia grubości warstewek tlenkowych na powierzchni cząstek, a zatem mieszanie komponentów w umiarkowanie zasadowym środowisku zawierającym wodę jest dopuszczalne. Termity z nanometrowym proszkiem glinu z łatwością zapalały się od płomienia gazowego i ulegały gwałtownemu spaleniu. Egzotermiczne reakcje w próbkach ogrzewanych z szybkością 10°C/min inicjowane są już w temperaturze ok. 400°C i przebiegają z największą szybkością w ok. 530°C, a więc znacznie poniżej temperatury topnienia glinu. Zmierzone ciepło tych reakcji wynosi 1,5 kJ/g i jest dużo mniejsze od wartości teoretycznej (3,9 kJ/g). Plantier i in. [7] wykazali, że jest to efekt obecności dużej ilości zanieczyszczeń w tlenku żelaza, wytworzonym metodą zol–żel. Surowe aero- kserożele F_2O_3 zawierają odpowiednio ok. 24 i 28% wody i związków organicznych (rozpuszczalnik, produkty przemian czynnika koagulującego), które w procesie spalania kompozycji głównie pochłaniają energię. Powoduje to istotne obniżenie prędkości fali spalania. Cytowani autorzy stwierdzili, że termity sporządzone z aerożeli zawierających 92 i 76% F_2O_3 spalają się w otoczkach o średnicy 6,35 mm z prędkościami odpowiednio 542 i 13 m/s. Większość zanieczyszczeń może być usunięta podczas ogrzewania surowych żeli tlenku żelaza w temperaturze ok. 400°C, w atmosferze powietrza. Kalcynacja powoduje także zmniejszenie powierzchni właściwej i transformację amorficznego uwodnionego tlenku żelaza (prawdopodobnie $Fe_5O_8 \cdot 4H_2O$) w fazę α-Fe_2O_3 [7].

Zarówno aero- jak i kserożele Al/Fe_2O_3 okazały się wrażliwe na uderzenie. Pięćdziesięcioprocentową skuteczność pobudzeń obserwowano, gdy energia uderzenia wynosiła odpowiednio 22 i 38 J. Stwierdzono też, że jedynie aerożel Al/Fe_2O_3 charakteryzuje się dużą wrażliwością na iskrę elektryczną (0,03 J). Większą wrażliwość aerożeli przypisać można ich małej przewodności cieplnej i w związku z tym – małej szybkości dyssypacji energii z gorących punktów wytworzonych impulsem inicjującym. Żaden z badanych kompozytów nie jest wrażliwy na tarcie. Dolna granica wrażliwości na ten bodziec jest większa niż 360 N.

3.1.2. Wieloskładnikowe nanokompozyty pirotechniczne

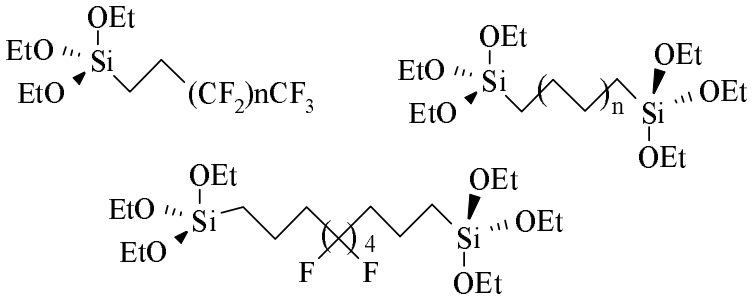
Jedną z zalet syntezy zol–żel jest możliwość wykorzystania jej do sporządzania mieszanin jednorodnych w skali nanometrowej lub nawet molekularnej. Żelowaniu poddaje się wówczas roztwór dwóch lub większej ilości prekursorów. Stosując tę metodę, Clapsaddle i in. [37] otrzymali mieszany tlenek żelazowo-krzemowy,

wychodząc ze wspólnego roztworu uwodnionego chlorku żelaza ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) i tetrametoksysilanu (TMOS) w etanolu. W roli czynnika żelującego stosowano tlenek propylenu lub oksetan. Rozpuszczalnik usuwano przez powolne odparowanie lub na drodze ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych.

Stwierdzono, że homogeniczne zole i żele powstają tylko wtedy, gdy zachowana jest właściwa kolejność wprowadzania reagentów. Najlepsze rezultaty uzyskano mieszając roztwór TMOS w etanolu z zolem soli żelaza (tzn. z częściowo zżelowanym roztworem $FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Do otrzymanej mieszaniny wprowadzano dodatkową porcję czynnika żelującego. Po wysuszeniu uzyskano monolityczne ksero- lub aerożele o powierzchni właściwej z przedziału 350–450 m^2/g i średnim wymiarze porów od 15 do 30 nm. Jeżeli czynnikiem żelującym był tlenek propylenu, sieć przestrzenna żeli była zbudowana ze sferoidalnych cząstek o średnicach 2–5 nm, natomiast zastosowanie w tej roli oksetanu skutkuje zwiększeniem średnicy cząstek do 15–20 nm.

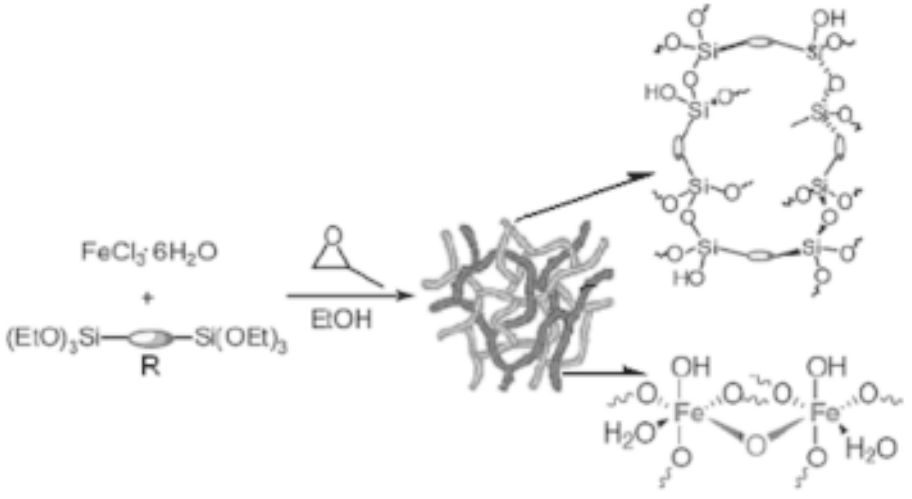
Ten sam schemat postępowania można zastosować do otrzymywania innych mieszanych żeli. Na przykład koagulacja zolu tlenku żelaza w obecności chlorku glinu(III) prowadzi do mieszanego tlenku żelazowo-glinowego. Wprowadzenie SiO_2 lub Al_2O_3 do termitu Al/Fe_2O_3 zmniejsza ciepło i liniową prędkość spalania, ale w niektórych zastosowaniach może być to korzystne. Ponadto obecność SiO_2 w mieszaninach termitowych przyczynia się do obniżenia temperatury topnienia produktów spalania i dzięki temu, do zwiększenia ich zdolności zapalającej. Jeszcze ważniejsza jest możliwość modyfikowania widma promieniowania emitowanego przez płomień, przez wprowadzenie dodatków będących selektywnymi emiterami. Podkreślić należy, że zmiany składu końcowej kompozycji dokonywane są już w wyjściowym roztworze, a zatem w sposób bezpieczny i nie pogarszający homogeniczności kompozycji.

Zhao i in. [38] opisali syntezę zol–żel, której produktem końcowym był hybrydowy nanokompozyt organiczno-nieorganiczny. Jego szczególną zaletą jest jednorodność składu sięgająca poziomu molekularnego, ponieważ tworzą go dwie oddzielne, lecz wzajemnie przenikające się sieci – tlenku żelaza i węglowo-siloksanowej (ang. *interpenetrating networks*, IPNs). Struktury te otrzymano w wyniku reakcji biegnących równolegle w jednym roztworze. Prekursorem sieci tlenku żelaza był uwodniony chlorek żelaza(III), natomiast sieć krzemianowo-organiczna powstawała w wyniku kondensacji węglowodorowych lub fluorowęglowodorowych pochodnych trietoksysilanu (Rys. 21).



Rysunek 21. Struktury organicznych pochodnych trietoksysilanu, wykorzystywanych w syntezie kompozytów typu IPNs [38]

Podobnie jak w przykładach opisanych powyżej, reakcja przebiegała w środowisku etanolu, a czynnikiem żelującym był tlenek propylenu lub oksetan (Rys. 22). Zależnie od rodzaju użytego związku silanowego oraz stosunku molowego żelaza i krzemu, czas żelowania wynosił od ok. 1 min. do 20 godzin.



Rysunek 22. Schemat syntezy zol–żel kompozytów zbudowanych z wzajemnie przenikających się sieci tlenku żelaza i węglowo-siloksanowej Fe_2O_3-$SiO_{3/2}$-R-$SiO_{3/2}$ [38]

Żele suszono klasycznie lub na drodze ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych. Badania strukturalne produktów wykazały, że otrzymano ksero- lub aerożele o powierzchni właściwej od ok. 70 do 350 m^2/g, nie wykazujące różnic w składzie fazowym w obszarach o wymiarach większych od 5 nm. Autorzy twierdzą, że również sole innych metali oraz inne organiczne pochodne silanów będą mogły być wykorzystane w zaproponowanej przez nich metodzie syntezy hybrydowych kompozytów organiczno-nieorganicznych [38].

3.1.3. Nanostrukturane mieszaniny materiałów wybuchowych z krzemionką

W patentach [32, 33] opisano otrzymywanie i właściwości nanostukturalnych mieszanin klasycznych materiałów wybuchowych (pentrytu (PETN), heksogenu (RDX)) z żelem krzemionkowym. Powstaje przez mieszanie acetonowego roztworu tych substancji z koagulującym roztworem tetrametoksysilanu (TMOS) w acetonie. Żelatynizacja może być katalizowana kwasami lub zasadami, ale autorzy zalecają wykorzystanie w tej roli kwasu tetrafluoroborowego HBF_4. Wprowadza się go w formie roztworu wodno-acetonowego. Wówczas żel powstaje w ciągu ok. 24 godzin. Krystalizacja materiału wybuchowego w matrycy krzemionkowej jest wymuszana przez wymianę acetonu na etanol, który następnie usuwa się na drodze nadkrytycznej ekstrakcji ditlenkiem węgla. Wcześniejsza krystalizacja zapobiega wymywaniu materiału wybuchowego na etapie suszenia żelu. Zdaniem autorów, tak otrzymane mieszaniny mają znacznie zmniejszoną wrażliwość na bodźce mechaniczne, szczególnie na uderzenie. Na przykład kompozyt PETN/SiO_2 = 90/10, otrzymany metodą zol–żel, wybucha z 50% skutecznością po spadku na próbkę 2,5-kg odważnika z wysokości 133 cm, podczas gdy wrażliwość czystego pentrytu oraz jego mechanicznej mieszaniny z krzemionką, wyznaczona w tych samych warunkach, wynosi odpowiednio 17 i 10 cm. Przyczyny tak małej wrażliwości nanostrukturalnych kompozytów nie są dokładnie znane. Przypuszcza się, że może to być skutek jednorodnego rozłożenia naprężeń powstałych podczas obciążenia próbki. Wygenerowane uderzeniem gorące punkty mają podkrytyczne rozmiary i szybko zanikają, ponieważ szybkość wydzielania energii jest w tym przypadku mniejsza od szybkości jej rozpraszania (duży stosunek powierzchni do objętości).

Przykłady syntez podane w opisach patentowych [32, 33] oczywiście nie wyczerpują wszystkich możliwości techniki zol–żel. Cytowani autorzy uważają, że pozwoli ona użyć w roli składnika wybuchowego także inne wrażliwe materiały wybuchowe, np. oktogen, nadtlenki organiczne, HNIW, itp. Problemem jest jedynie ograniczona rozpuszczalność tych związków w rozpuszczalnikach, które mogą stanowić środowisko żelatynizacji silanów.

3.2. KOMPOZYTY ZAWIERAJĄCE ŻELE ORGANICZNE

Pod koniec lat 80 ubiegłego wieku Pekala [39] po raz pierwszy opisał przezroczyste organiczne żele uzyskane w wyniku katalizowanej węglanem sodu polikondensacji 1,3-dihydroksybenzenu (rezorcyny) z formaldehydem w środowisku wodnym. W późniejszych latach otrzymano i scharakteryzowano także żele powstałe w wyniku reakcji *m*-trihydroksybenzenu (pirokatechina), *p*-dihydroksybenzenu (hydrohinon), 2,4,6-triamino-1,3,5-triazyny (melamina), mocznika oraz fenylodiaminy z formaldehydem lub furfuralem [40–42]. We wszystkich przypadkach udało się otrzymać przestrzenne, sztywne sieci zbudowane z łańcuchów węglowodorowych, połączonych mostkami metylenowymi i eterowymi. Po usunięciu rozpusz-

czalnika (odparowanie, ekstrakcja nadkrytyczna) uzyskano ksero-lub aerożele zawierające pory wielkości mniejszej od 100 nm.

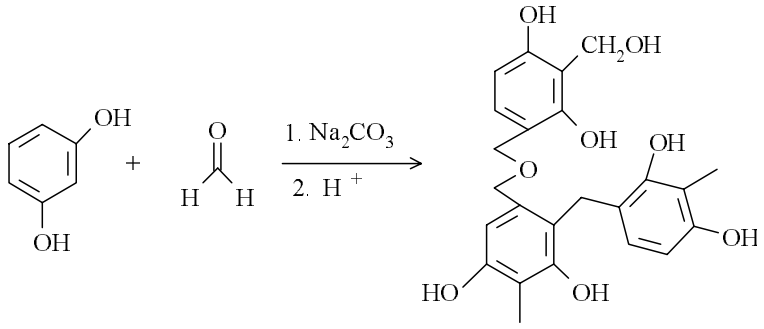
Jeżeli jednak proces polikondensacji prowadzi się w roztworze substancji utleniających, produktem mogą być wysokoenergetyczne kompozyty homogeniczne w skali nanometrowej. Najnowszym pomysłem jest wykorzystanie do budowy struktury żelu wielofunkcyjnych monomerów zawierających w swej strukturze grupy eksplozoforowe – nitrowe ($–NO_2$), azotanowe ($–ONO_2$) lub azydkowe ($–N_3$). Indywidualny rozkład produktów ich polimeryzacji/sieciowania jest procesem egzotermicznym i to przyczynia się do poprawy bilansu energetycznego kompozytu. Ponadto możliwe jest wówczas zbilansowanie reakcji utlenienia i redukcji przy mniejszej zawartości utleniacza [32, 33].

3.2.1. Żele rezorcynowo-formaldehydowe (RF) i bazujące na nich materiały wybuchowe

Kondensacja 1,3-dihydroksybenzenu i aldehydu mrówkowego, prowadząca do przezroczystego żelu organicznego RF, przebiega najłatwiej w roztworze wodnym o obojętnym odczynie (pH z przedziału 6,5–7,4), w temperaturze ok. 85°C [40]. Stosunek molowy formaldehydu do rezorcyny powinien wynosić 2:1. W roli katalizatora stosuje się zwykle węglan sodu. Całkowita zawartość reagentów wynosi ok. 5%. W tych warunkach żel tworzy się w ciągu ok. 36 godz., a następnie rozpoczyna się długotrwały proces sieciowania powstałych wcześniej klastrów.

Kondensacja polega na tworzeniu mostków metylenowych ($–CH_2–$) i eterowych ($–CH_2–O–CH_2–$) między cząsteczkami *m*-dihydroksybenzenu (Rys. 23). Z upływem czasu kondensująca mieszanina RF systematycznie zmienia barwę od jasno pomarańczowej do ciemnoczerwonej. Jest to wynik utlenienia rezorcyny i tworzenia rozległych układów sprzężonych wiązań podwójnych (np. chinonów).

W celu intensyfikacji procesu sieciowania, powstały żel płucze się w roztworze kwasu trifluorooctowego. Powoduje to kondensacje sąsiadujących grup hydroksymetylowych ($–CH_2OH$) i utworzenie dodatkowych połączeń eterowych pomiędzy pierścieniami rezorcyny. Właściwości mechaniczne otrzymanego żelu zależą zarówno od czasu sieciowania, jak i ilości użytego węglanu sodu oraz od czasu jego płukania w roztworze kwasu.



Rysunek 23. Schemat syntezy żelu rezorcynowo-formaldehydowego (RF) [40]

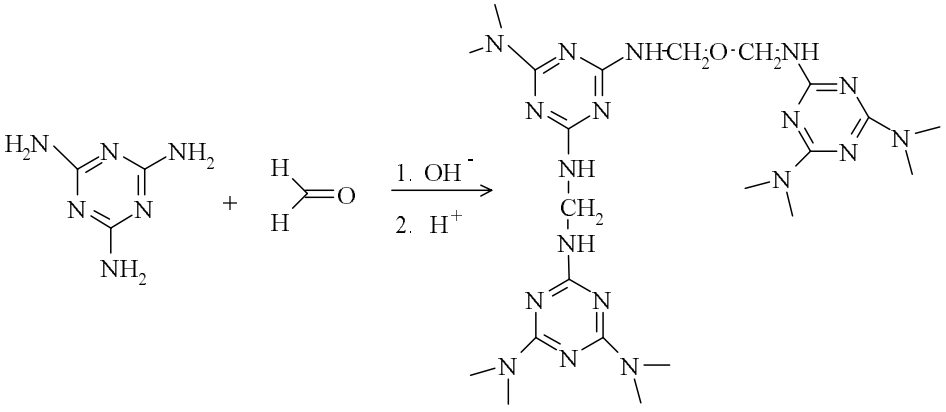
Aby przygotować żel RF do nadkrytycznej ekstrakcji ditlenkiem węgla, poddaje się go wielokrotnemu płukaniu w acetonie, w celu całkowitej wymiany na aceton wody pozostającej w porach. Wodę można wymienić też na metanol, izopropanol lub inne rozpuszczalniki mieszające się z ditlenkiem węgla. Uzyskane w ten sposób aerożele RF są porowatymi, ciemnoczerwonymi substancjami o gęstości mniejszej od 0,1 g/cm^3. W ich strukturze zidentyfikowano puste obszary (pory) o rozmiarach mniejszych od 100 nm, rozdzielone krzyżującymi się łańcuchami zbudowanymi ze sferoidalnych cząstek o średnicach 70–100 Å.

Simpson i in. [1, 33] zaproponowali wykorzystanie kompozytów, w których węglowodorowa porowata matryca żelu RF wypełniona jest krystalitami chloranu(VII) amonu. Ich zdaniem, taki materiał powinien być równie wysokoenergetyczny jak paliwo rakietowe, a jednocześnie moc jego przemiany wybuchowej mogłaby osiągać wartości typowe dla związków wybuchowych. Nanokompozyt RF/NH_4ClO_4 otrzymano, wprowadzając wodny roztwór chloranu(VII) amonu do kondensującego wodnego roztworu rezorcyny i formaldehydu wziętych w stosunku molowym 2:1. Autorzy zalecają, aby stosunek molowy rezorcyny do węglanu sodu (katalizator kondensacji) wynosił 50:1. W tych warunkach proces żelowania trwa aż ok. 50 godz., a więc znacznie dłużej niż w czystej wodzie.

Krystalizację NH_4ClO_4 w porach żelu inicjowano wymieniając wodę na metanol, jeżeli planowano klasyczne suszenie kompozytu, lub na octan etylu, w przypadku suszenia na drodze nadkrytycznej ekstrakcji ditlenkiem węgla. Uzyskano produkt zawierający nanometrowe cząstki organiczne wymieszane z krystalitami utleniacza, których wymiary nie przekraczały 20 nm. Metodami mikroanalizy rentgenowskiej potwierdzono jednorodność rozkładu azotu w skali mniejszej niż 43 nm (graniczna rozdzielczość analizatora). W oparciu o izotermy adsorpcji-desorpcji azotu wykazano, że powierzchnia właściwa kompozytu przekracza 300 m^2/g. Tak więc wszystkie zastosowane metody badania struktury potwierdziły, iż mieszanina jest jednorodna w skali nanometrowej. Jej rozkład rozpoczyna się w temperaturze ok. 150°C (ok. 100°C poniżej temperatury topnienia NH_4ClO_4) i jest procesem silnie egzotermicznym. Oznacza to, że produkt może faktycznie być wysokoenergetycznym materiałem wybuchowym [1, 33].

3.2.2. Żele melaminowo-formaldehydowe (MF)

Dotychczas żele MF nie były stosowane jako osnowy kompozytów wybuchowych, jednak kondensacja 2,4,6-triamino-1,3,5-triazyny (melamina) z formaldehydem zachodzi w wodzie, która jest dobrym rozpuszczalnikiem wielu soli nieorganicznych – potencjalnych utleniaczy. Z tego względu zdecydowaliśmy się opisać syntezę i podstawowe właściwości tych substancji.



Rysunek 24. Schemat syntezy żelu melaminowo-formaldehydowego [42]

Melamina jest cząsteczką sześciofunkcyjną. W obecności zasadowego katalizatora, formaldehyd przyłącza się do grup aminowych z utworzeniem grup $–CH_2OH$, które pod wpływem jonów H^+ wchodzą w reakcję kondensacji z utworzeniem mostków metylenowych ($–NHCH_2NH–$) oraz eterowych ($–NHCH_2OCH_2NH–$). Powstałe w pierwszym etapie klastry melaminowo-formaldehydowe (tzn. cząstki o średnicach ok. 0,5 nm) zawierają na powierzchni reaktywne grupy hydroksymetylowe, które odpowiadają za dalsze sieciowanie i powstanie żelu (Rys. 24). Warunki prowadzenia syntezy, tzn. stosunek molowy reagentów, czas reakcji, temperatura, rodzaj katalizatora, a w szczególności pH mieszaniny reakcyjnej, bardzo silnie wpływają na mikrostrukturę, gęstość i klarowność żeli MF [42].

Preferowany stosunek molowy formaldehydu do melaminy wynosi 3,7:1. W roli katalizatora reakcji przyłączania formaldehydu do grup aminowych stosuje się najczęściej NaOH, chociaż inne zasady mogą być również użyte. Reakcję należy prowadzić w temperaturze ok. 70°C. Po kilkunastu minutach mieszaninę chłodzi się do temperatury ok. 45°C i zadaje stężonym kwasem solnym lub kwasem trifluorooctwoym. Przezroczyste żele tworzą się, jeżeli wskaźnik pH po tej operacji osiąga wartość z przedziału 1–2. W przeciwnym wypadku strąca się biały osad, powstaje biała, kleista substancja albo twarda żywica.

Mieszanina reakcyjna, która zawiera ponad 20% reagentów, ulega żelatynizacji w ciągu ok. 48 godzin, w temperaturze pokojowej, natomiast bardziej rozcień-

czone roztwory (poniżej 15%) muszą być żelowane nawet przez 4 tygodnie w temperaturze ok. 90°C. Przed nadkrytyczną ekstrakcją, żel należy zobojętnić wodą amoniakalną, a następnie wymienić wodę na rozpuszczalnik mieszający się z ditlenkiem węgla (zwykle jest to aceton).

Badania strukturalne wykazały, że żele MF pod względem mikrostruktury, porowatości i cech mechanicznych są bardzo podobne do żeli krzemionkowych. W zależności od warunków syntezy, ich powierzchnia właściwa wynosi od 900 do 1100 m^2/g. Są to zatem materiały nanoporowate, zbudowane z cząstek o średnicach ok. 0,5 nm. Dzięki temu, mogą być całkowicie przezroczyste i bezbarwne, podobnie jak nieorganiczne żele krzemionkowe.

4. INNE NANOSTRUKTURALNE KOMPOZYCJE WYBUCHOWE

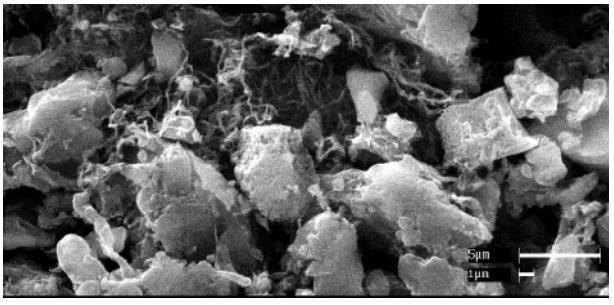
Mikulec i in. [43] oraz Kovalev i in. [44] potwierdzili, że mieszaniny nanokrystalitów krzemu z utleniaczami wykazują właściwości wybuchowe. Proponują ich wykorzystanie jako źródła energii w układach mikroelektromechnicznych (MEMS) oraz jako elementów powodujących samozniszczenie komputerów w przypadku nieuprawnionego ich wykorzystania.

Nanostrukturalny krzem otrzymuje się najczęściej przez elektrochemiczne trawienie cienkich płytek krzemowych [45]. Czynnikiem trawiącym jest wodno-etanolowy roztwór fluorowodoru. Podczas procesu galwanostatycznej anodyzacji niektóre obszary kryształu krzemu ulegają aktywacji i reagują z jonami fluorkowymi z utworzeniem rozpuszczalnych związków fluorokrzemowych. Produktem jest silnie porowata, nieregularna geometrycznie matryca krzemowa w postaci ok. 25-μm warstw z poprzecznymi porami o średnicy ok. 1 μm. Pomimo kontaktu z tlenem atmosferycznym, wiszące wiązania łańcuchów krzemowych są wysycane atomami wodoru, a nie tlenu, dając hydrofobową i aktywną chemicznie powierzchnię [45].

Świeżo otrzymany, nie zawierający powierzchniowych tlenków porowaty krzem, poddany impregnacji etanolowym roztworem $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, tworzy inicjujący materiał wybuchowy, który pod wpływem bodźców mechanicznych lub termicznych gwałtownie wybucha w miligramowych ładunkach [43]. Z kolei Kovalev i in. [44] stwierdzili, że kondensacja tlenu w pasywowanej wodorem matrycy krzemowej prowadzi do spontanicznego wybuchu. Jego energia została oszacowana na ok. 12 kJ/g. W przypadku, gdy porowaty krzem jest utleniony na powierzchni, zainicjowanie detonacji wymaga oświetlenia próbki promieniowaniem ultrafioletowym lub słabym uderzeniem.

Zdumiewającego odkrycia dokonali Manaa i in. [46] w 2005 r. Okazało się, że wybuch i detonacja sproszkowanych próbek materiałów wybuchowych może być zainicjowany impulsem niespójnego promieniowania (generowanego zwykłą, fotograficzną lampą błyskową), jeżeli oświetlana powierzchnia próbki jest pokryta warstwą jednościennych nanorurek węglowych. Próbki sproszkowanego pentrytu o masie 10 mg, pozostające w luźnym kontakcie z nanorurkami węglowymi (Rys. 25),

ulegały w tych warunkach gwałtownemu spaleniu z silnym efektem optycznym i dźwiękowym.

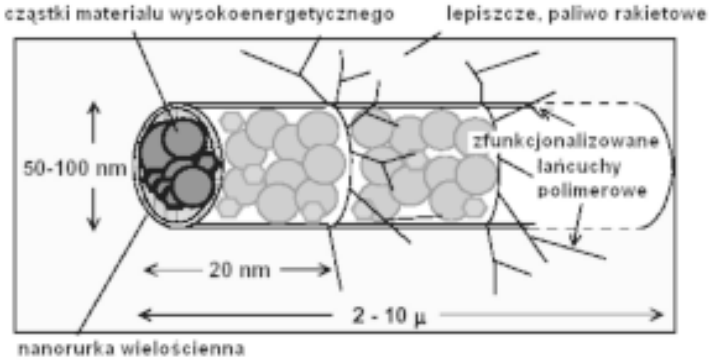


Rysunek 25. Zdjęcie SEM próbki mieszaniny krystalitów pentrytu (wymiary ok. 5 μm) z nanorurkami węglowymi [46]

Przeprowadzono także próby optycznej inicjacji wybuchu w większej skali. W tym celu, 30-gramowy ładunek K-6 (Keto-RDX, 2-oxo-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacykolheksan) został umieszczony w rurce miedzianej o średnicy wewnętrznej ok. 13 mm i pokryty cienką warstwą nanorurek węglowych (0,02 g). Ładunek zdetonował po oświetleniu go impulsem promieniowania o energii ok. 161 J.

Cytowani autorzy uważają, że jest to wynik dużej opto-termicznej aktywności nanorurek węglowych, które dzięki temu efektywnie zamieniają energię promienistą na cieplną. Oszacowano, że w warunkach eksperymentu, lokalne temperatury mogły wynosić nawet 1500–2000°C, a zatem obszary te z powodzeniem spełniały rolę tzw. gorących punktów. Jeżeli uwzględni się dodatkowo, że nanorurki są wyjątkowo dobrymi przewodnikami ciepła, staje się zrozumiałe, dlaczego spalanie tak szybko zamienia się w detonację. Niezależnie od mechanizmu aktywującego działania nanorurek węglowych, należy podkreślić niezwykle duże znaczenie praktyczne odkrycia Manaa i in. Po raz pierwszy eksperymentalnie potwierdzono możliwość optycznej inicjacji spalania i detonacji materiałów wybuchowych na dużej powierzchni, wykorzystując typowe źródła światła o miliwatowych mocach.

Wyjątkowe właściwości mechaniczne i termofizyczne nanorurek węglowych sprawiają, że rozważa się możliwość ich wykorzystania jako składnika paliw rakietowych [47, 48]. Dzięki dużej przewodności cieplnej (ok. 2000 W/mK), z łatwością można by regulować szybkość spalania ładunku, poprzez zmianę ich zawartości. Obecność nanorurek miałaby też niewątpliwie korzystny wpływ na wytrzymałość mechaniczną finalnej kompozycji. W chwili obecnej dąży się nawet do funkcjonalizacji nanorurek oligomerami zawierającymi grupy eksplozoforowe, w celu nadania im cech indywidualnego materiału wybuchowego i poprawy ich zgodności kontaktowej z typowymi składnikami paliw rakietowych [47]. Idea tego rozwiązania została przedstawiona na Rys. 26.



Rysunek 26. Koncepcja sfunkcjonalizowanych i wypełnionych małocząsteczkowymi utleniaczami nanorurek węglowych [47, 48]

Unikalna struktura nanorurek węglowych umożliwia zamykanie w ich wnętrzu małocząsteczkowych utleniaczy i związków wybuchowych. Prawdopodobnie pozwoli to na poprawę stabilności (mała wrażliwość), przy jednoczesnym zachowaniu zdolności kompozycji do szybkich przemian (wysokie parametry detonacyjne) [48]. Dotychczas polepszenie jednej z tych cech użytkowych oznaczało pogorszenie drugiej.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie zasad nanoinżynierii materiałowej do otrzymywania wysokoenergetycznych kompozycji pirotechnicznych i wybuchowych pozwala na precyzyjną kontrolę składu i gęstości kompozycji, a także morfologii i rozmiarów cząstek jej składników w skali nanometrycznej. Parametry te określają wrażliwość kompozycji i moc przemiany wybuchowej materiału. Umożliwia to także tworzenie układów wybuchowych łączących doskonałe charakterystyki termodynamiczne mieszanin wybuchowych z kinetyką reakcji chemicznych, właściwą dla rozkładu molekularnych materiałów wybuchowych.

Każda z omówionych grup nanostrukuralnych materiałów wybuchowych ma zalety i wady. Kompozyty o strukturze planarnej idealnie nadają się do pewnego i szybkiego inicjowania procesu spalania na dużych powierzchniach. Mogą też służyć do precyzyjnego spawania wrażliwych na temperaturę elementów. Niestety, ich wytwarzanie jest czasochłonne i wymaga skomplikowanego oprzyrządowania. Metastabilne intermolekularne mieszaniny wybuchowe, zwane także supertermitami, otrzymuje się wyniku mechanicznego zmieszania nanoczastek paliwa i utleniacza. Charakteryzują się dużymi gęstościami energii, wysoką wrażliwością na bodźce inicjujące oraz prędkościami spalania przekraczającymi 1000 m/s. Proponuje się wykorzystanie ich do produkcji środków inicjujących pozbawionych metali ciężkich. Wśród wad należy przede wszystkim wymienić wysoką cenę nanoproszków utle-

niacza i paliwa oraz duże zagrożenie samozapłonem w trakcie sporządzania mieszaniny i jej dalszego przetwarzania. Techniką zol–żel mogą być wytwarzane zarówno nanokompozyty pirotechniczne, jak i materiały wybuchowe. Jej podstawową zaletą jest prostota oprzyrządowania oraz względnie duże bezpieczeństwo procesu produkcyjnego. Dotychczas nie udało się jednak zapewnić dostatecznie dużej czystości kompozytów, a uzyskanie wymaganej homogeniczności wymaga czasami specjalnych zabiegów, nawet jeżeli syntezę realizuje się w mikroskali [49]. Niewątpliwie intrygujące właściwości posiadają mieszaniny wybuchowe zawierające nanorurki węglowe. Jedynym ograniczeniem szerszego wykorzystania tego typu kompozycji jest wciąż niewielka dostępność i wysoka cena nanorurek węglowych.

PODZIĘKOWANIE

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2008 jako projekt badawczy nr 0 T00C 010 30.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] U. Teipel, ed., *Energetic Materials – Particle Processing and characterization*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005, p. 238.

[2] B. Vogelsanger, B. Berger, *Energetic Materials – Performance and Safety*, Proceedings of the 36th International Annual conference of ICT, Karlsruhe, Germany, 2005, pp. 1–15.

[3] A. Pivkina, P. Ulyanova, Y. Frolov, S. Zavyalov and J. Schoonman, Propellants, Explos. Pyrotech., 2004, **29**, 39.

[4] W.J. Dalton, N. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials: Chemistry and Application*, Gordon and Breach Science Publisher, Amsterdam, 2001.

[5] A. Gash, J. Satcher, R. Simpson, B. Clapsaddle, *Nanostructured energetic materials with sol-gel chemistry*, Materials Research Society Fall Meeting, Boston, MA, USA, 2003.

[6] G.A. Fox, T.F. Baumann, L.J. Hope-Weeks, A.L. Vance, *Chemistry and processing of nanostructured materials*, Lawrence Livermore National Laboratory, USA, Report UCRL-ID-146820, 2002.

[7] K.B. Plantier, M.L. Pantoya, A.E. Gash, Combust. Flame, 2005, **140**, 299.

[8] A.J. Gavens, D. Van Heerden, A.B. Mann, M.E. Reiss, and T.P. Weihsa, J. Appl. Phys., 2000, **87**, 1255.

[9] K.J. Blobaum, M.E. Reiss, J. M. Plitzko Lawrance, T.P. Weihs, J. Appl. Phys., 2003, **94**, 2915.

[10] L. Menon, S. Patibandla, K. Bhargava Ram, S. I. Shkuratov, D. Aurongzeb, J. Yun, M. Holtz, J. Berg, H. Temkin, Appl. Phys. Lett., 2004, **84**, 4735.

[11] G. Powell, M. Place, C. Leach, R. James, and J. Hall, *Developments in Vapor Deposited Pyrotechnic Materials*, 28th Int. Annual Conference of ICT, Karlsruhe, Germany, June 24–27, 1997.

[12] S.J. Graham, G.A. Leiper, Ch.A. Bishop, UK Patent Application GB 2 269 380 A, 1994.

[13] C.E. Aumann, A.S. Murray, G.L. Skofronick, and J.A. Martin, *Metastable Interstitial Composites: Super Termite Powders*, Insensitive Munitions Technology Symposium, Williamsbuer, VA, 6–9 June 1994.

[14] S.F. Son, P*erformance and Characterization of Nanoenergetic Materials at Los Alamos*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 2004, **800**, 161.

[15] B.W. Asay, S.F. Son, J.R. Busse, and D.M. Oschwald, Propellants, Explos. Pyrotech., 2004, **29**, 216.
[16] A. Prakash, A.V. McCormik, M.R. Zachariah, Adv. Mater., 2005, **17**, 900.
[17] U. Teipel, ed., *Energetic Materials, Particle Processing and Characterization*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, p. 251.
[18] A. Prakash, A.V. McCormick, M.R. Zachariah, Nano Lett., 2005, **5**, 1357.
[19] Y.S. Zhen, K. Hrdina, US Patent 5,240,493, 1993.
[20] E.T. Ong, V. Sendijarevic, US Patent 5,698,483, 1997.
[21] H.J.M. Gruenbauer, US Patent 5,998,523 A, 1999.
[22] H.J.M. Gruenbauer, US Patent 6,527,825 B1, 2003.
[23] W.L. Perry, B.L. Smith, Ch.J. Bulian, J.R. Busse, C.S. Macomber, R.C. Dye, and S.F. Son, Propellants, Explos. Pyrotech. 2004, **29**, 99.
[24] C.C. Koch, Nano-Structured Mater., 1997, **9**, 13.
[25] M. Schoenitz, E.L. Dreizin, *Consolidated energetic nanocomposites: mechanical and reactive properties*, Proceedings of the 36th International Annual conference of ICT, Karlsruhe, Germany, 2005, p. 133.
[26] M. Schoenitz, T.S. Ward, E.L. Dreizin, *Fully dense nano-composite energetic powders prepared by arrested reactive milling*, Proceedings of the Combustion Institute, 2005, **30**, 2071.
[27] S. Subramanian, S. Hasan, S. Bhattacharya, Y. Gao, S. Apperson, M. Hossain, R.V. Shende, S. Gangopadhyay, P. Render, D. Kapoor, S. Nicolich, Self-Assembled Nanoenergetic Composite, Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 2006, **896**, 9.
[28] S. Valliappan, J. Swiatkiewicz, J.P. Puszynski, Powder Technology, 2005, **156**, 164.
[29] B.W. Asay, S.F. Son, J.R. Busse, D.M. Oswald, Propellants, Explos. Pyrotech., 2004, **29**, 216.
[30] J.J. Granier, M.L. Pantoya, Combust. Flame, 2004, **138**, 373.
[31] M.L. Pantoya, J.J. Granier, Propellants, Explos. Pyrotech., 2005, **30**, 53.
[32] R.L. Simpson, T.M. Tillotson, L.W. Hrubesh, US Patent 6,986,819 B2, 2006.
[33] R.L. Simpson, R.S. Lee, T.M. Tillston, L.W. Hrubesh, R.W. Swansiger, G.A. Fox, US Patent,666,935 B1, 2003.
[34] T.M. Tillotson, A.E. Gash, R.L. Simpson, L.W. Hrubesh, J.H. Satcher, Jr., J.F. Poco, J. Non-Cryst. Solids, 2001, **285**, 338.
[35] A.E. Gash, T.M. Tillotson, J.H. Satcher, Jr., J.F. Poco, L.W. Hrubesh, and R.L. Simpson, Chem. Mater., 2001, **13**, 999.
[36] A.E. Gash, J.H. Satcher, Jr., R.L. Simpson, Chem. Mater., 2003, **15**, 3268.
[37] B.J. Clapsaddle, A. E. Gash, J.H. Satcher Jr., R.L. Simpson, J. Non-Cryst. Solids, 2003, **331**, 190.
[38] L. Zhao, B.J. Clapsaddle, J.H. Satcher, Jr., D.W. Schaefer, and K.J. Shea, Chem. Mater., 2005, **17**, 1358.
[39] R.W. Pekala, J. Mater. Sci., 1989, **24**, 3221.
[40] R.W. Pekala, US Patent 4,997,804, 1991.
[41] R.W. Pekala, US Patent 5,556,892, 1996.
[42] R.W. Pekala, US Patent 5,086,085, 1992.
[43] F.V. Mikulec, J.D. Kirtland, M.J. Sailor, Adv. Mater., 2002, **14**, 38.
[44] D. Kovalev, V.Y. Timoshenko, N. Kunzner, Phys. Rev. Lett., 2001, **87**, 068301.
[45] C.N.R. Rao, A. Muller, A. K. Cheetham, *The chemistry of nanomaterials. Synthesis, properties and applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004, p. 539.
[46] M. Riad Manaa, A.R. Mitchell, R.G. Garza, P.F. Pagoria, and B.E. Watkins, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127**, 13786.
[47] A.L. Ramaswamy, P. J. Kaste, A. Miziolek, B. Homan, S. Trevino, and M.A. O'Keefe, *Weaponization and Characterization of Nanoenergetics,* Defence Applications of Nanomaterials, 2003.

[48] P.J. Kaste, A.L. Ramaswamy, M. O'Keefe, *Ultra-high resolution imaging of energetic material modifiers*, Lawrence Berkeley National Laboratory, LBNL-52384, 2003.
[49] S.H. Kim, M.R. Zachariah, Adv. Mater., 2004, **16**, 821.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 stycznia 2007

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

WANKOMYCYNA I JEJ CHEMICZNE MODYFIKACJE

VANCOMYCIN AND ITS CHEMICAL MODIFICATIONS

Agnieszka Łakomiec, Justyna Samaszko, Janusz Madaj

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
e-mail: lakomi@chem.univ.gda.pl

Abstract
Wykaz stosowanych skrótów
Wstęp
1. Wankomycyna
   1.1. Biosynteza
   1.2. Synteza chemiczna
   1.3. Mechanizm działania
   1.4. Oporność bakterii
   1.5. Modyfikacje
Piśmiennictwo cytowane

Mgr Agnieszka Łakomiec urodziła się w 1980 r. w Skarżysku-Kamiennej. W roku 2005 ukończyła studia – kierunek chemia – na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W tym samym roku zaczęła na tej uczelni studia doktoranckie. Pracę doktorską przygotowuje na temat modyfikacji wankomycyny jednostkami sacharydowymi.

Mgr Justyna Samaszko urodziła się w 1980 r. w Gdańsku. W 2004 r. ukończyła studia – kierunek chemia, specjalizacja chemia biologiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W tym też roku rozpoczęła tam studia doktoranckie. Obecnie przygotowuje pracę doktorską na temat chemicznej syntezy fragmentu peptydoglikanu ściany komórkowej gronkowca złocistego (*S. aureus*).

Dr hab. Janusz Madaj urodził się w 1965 r. w Pucku. W roku 1989 ukończył studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od tego roku jest związany zawodowo z tą uczelnią. Pracę doktorską, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Wiśniewskiego, pt. „O reakcjach przegrupowania per--*O*-acetylowych pochodnych 1,5-anhydro-2-deoksy-1-enitoli", obronił w 1995 r. W roku 1998 odbył roczny staż naukowy w Case Western Reserve University, Cleveland (USA). W roku 2005 uzyskał stopień doktora habilitowanego. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i pracuje naukowo w Zakładzie Chemii Cukrów. Jest współautorem ponad trzydziestu prac z dziedziny chemii cukrów.

ABSTRACT

Antibiotics, such as penicillin or streptomycin, are substances produced by or derived from certain fungi or bacteria, that can destroy or inhibit the growth of other microorganisms. Antibiotics are widely used in the prevention and treatment of infectious diseases.

Glycopeptide antibiotics are a class of antibiotic drugs. They consist of a glycosylated cyclic or polycyclic nonribosomal peptide. Important glycopeptide antibiotics include vancomycin, teicoplanin, ramoplanin, and decaplanin. This class of drugs inhibits the synthesis of cell walls in susceptible microbes by inhibiting peptidoglycan synthesis. Glycopeptides exhibit a narrow spectrum of activity as principally effective against gram positive cocci. They are the last line of effective defense against MRSA and multiresistant enterococci for patients who are critically ill.

At the beginning of the 90' there started a large scale research program for finding glycopeptide antibiotics with optimized properties. These studes resulted in the discovery of the hemi-synthetic compounds (1996 oritavancin) which have lower toxicity than vancomycin.

Keywords: vancomycin, glycopeptide, glycopeptide resistance

Słowa kluczowe: wankomycyna, glikopeptydy, oporność glikopeptydów

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

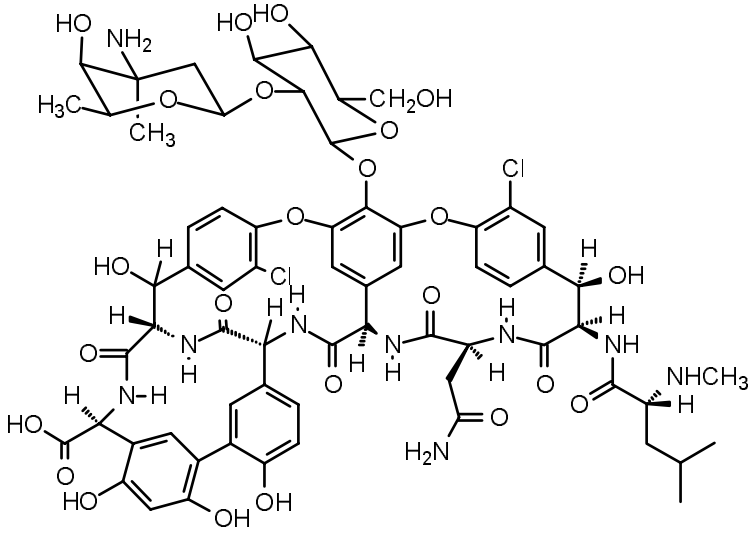
Ac	– acetyl
Alloc	– alliloksykarbonyl
Bn	– benzyl
Cbz	– benzyloksykarbonyl
GlcNAc	– *N*-acetylo-D-glukozamina
Me	– metyl
MIC	– minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii
MRSA	– metycylinooporne szczepy *S. aureus*
MurNAc	– kwas *N*-acetylo-D-muraminowy
PEP	– fosfoenolopirogronian
TBS	– *t*-butylodimetylosilil
UDP	– urydynodifosforan
VISA	– wankomycynopośrednie szczepy *S. aureus* (ang. *vancomycin intermediate S. aureus*)
VRE	– wankomycynooporne szczepy *Enteroccocus*

WSTĘP

Antybiotyki są substancjami naturalnymi wytwarzanymi przez mikroorganizmy. W niewielkich stężeniach wykazują właściwości bakteriobójcze lub bakteriostatyczne wobec innych drobnoustrojów. Obecnie do antybiotyków zaliczamy także półsyntetyczne pochodne naturalnie występujących związków, a także syntetyczne, działające w sposób zbliżony do naturalnych. Podział antybiotyków uzależniony jest od mechanizmu ich działania na drobnoustroje [1] lub od budowy chemicznej [2]. Ze względu na sposób działania, antybiotyki dzielimy na: a) uszkadzające strukturę ściany i (lub) błony komórkowej; b) hamujące syntezę białek strukturalnych i enzymatycznych; c) hamujące syntezę materiału genetycznego. Biorąc pod uwagę budowę chemiczną, wyróżniamy: β-laktamy, tetracykliny, fluorochinolony, aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, oligosacharydy, antybiotyki ketolidowe, antybiotyki oksazolidinonowe, antybiotyki polipeptydowe, antybiotyki glikopeptydowe.

1. WANKOMYCYNA

Wankomycyna (Rys. 1) po raz pierwszy została wyizolowana ze szczepu *Streptomyces* (obecnie *Amycolatopsis*) *orientalis* [3] w połowie lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia [4]. Dzięki badaniom prowadzonym przez C.M. i T.M. Harrisów [5] na początku lat osiemdziesiątych, poznaliśmy jej strukturę krystalograficzną. Te doniesienia pozwoliły utworzyć nową grupę antybiotyków – glikopeptydów, czyli makromolekuł zbudowanych z peptydów i węglowodanów [6].



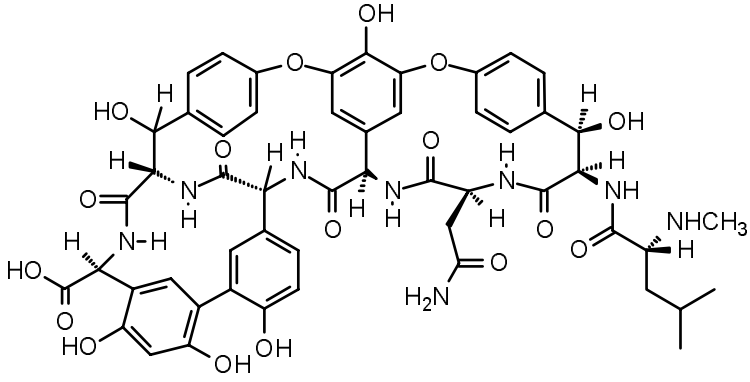
Rysunek 1

1.1. BIOSYNTEZA

Antybiotyki glikopeptydowe są naturalnymi produktami wytwarzanymi przez różne gatunki promieniowców [7]. Zbudowane są z siedmiu aminokwasów połączonych ze sobą, które tworzą się w wyniku mechanizmu nierybosomalnego [8]. Tak utworzony heptapeptyd ulega następnie modyfikacjom, takim jak: chlorowanie, hydroksylowanie, sulfonowanie i/lub glikozylowanie [9]. Reakcje prowadzące do otrzymania antybiotyków glikopeptydowych nie mogłyby zajść, gdyby nie udział specyficznych enzymów, między innymi: glukozylotransferaz, oksygenaz, syntetaz [10, 11].

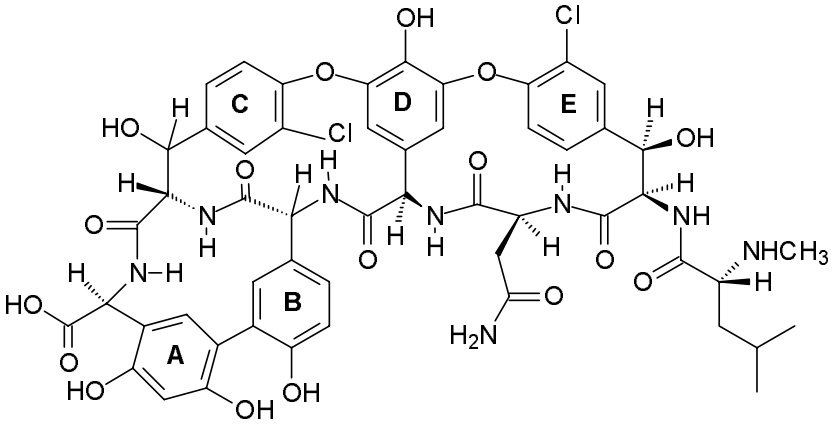
1.2. SYNTEZA

Chemiczna synteza antybiotyków glikopeptydowych stwarzała początkowo szereg trudności. Przełom przyniósł rok 1997, gdy Evans i współpracownicy [12] przedstawili pracę dotyczącą syntezy aglikonu orientacynu C (Rys. 2).



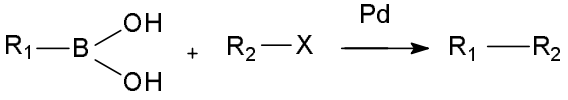
Rysunek 2

Prace Harris [5] i Evans [12] pozwoliły zaplanować syntezę, której końcowym etapem było otrzymanie wankomycyny. Tak trudnego zadania podjęła się grupa naukowców kierowana przez Nicolaou [11]. Pomyślnie zaplanowana strategia była wynikiem zastosowania nowoczesnych, katalityczno-asymetrycznych reakcji, w wyniku których uzyskano fragment peptydowy [13]. Cyklizacja rdzenia heksapeptydu w kolejności C-O-D → AB/C-O-D → AB/C-O-D-E doprowadziła do otrzymania aglikonu wankomycyny (Rys. 3).



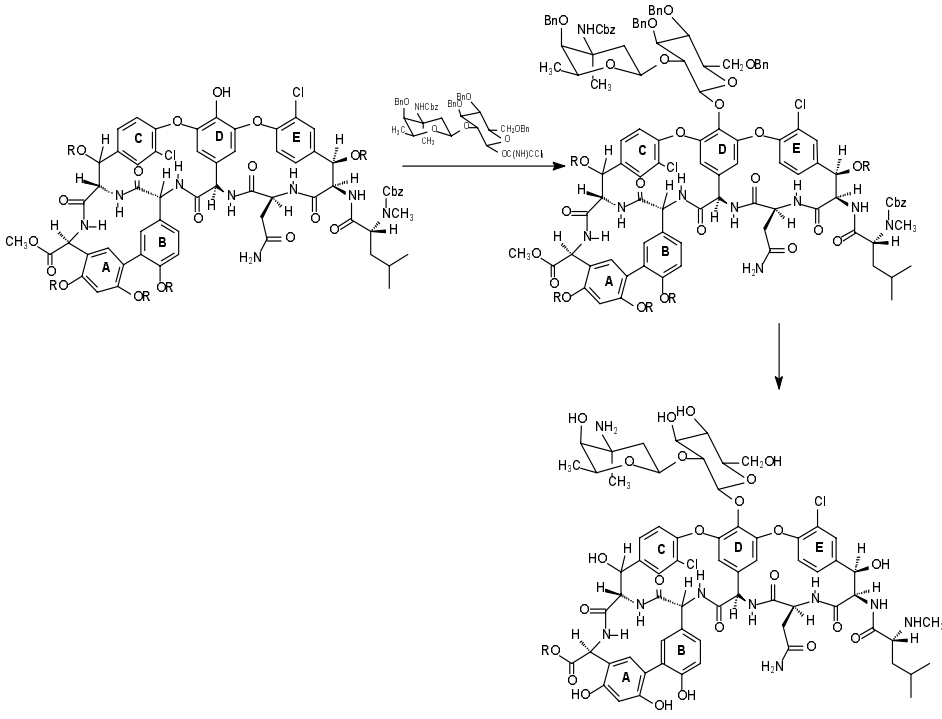
Rysunek 3

Makrocykliczne układy C-O-D i D-O-E otrzymane zostały w wyniku procesu cyklizacji aktywnych pochodnych zawierających ugrupowania triazenowe ($NH_2N{=}NH$). Pierścień AB zsyntezowano w reakcji makrolaktonizacji, z wykorzystaniem związków Suzuki, które są powszechnie stosowane do tworzenia wiązania C–C. Reakcje Suzuki przebiegają z udziałem związków arylowych lub winylowych pochodnych kwasu borowego z halogenkami arylu lub winylu, przy udziale katalizatorów, którymi są kompleksy zawierające pallad(0) (Schemat 1) [14–16].

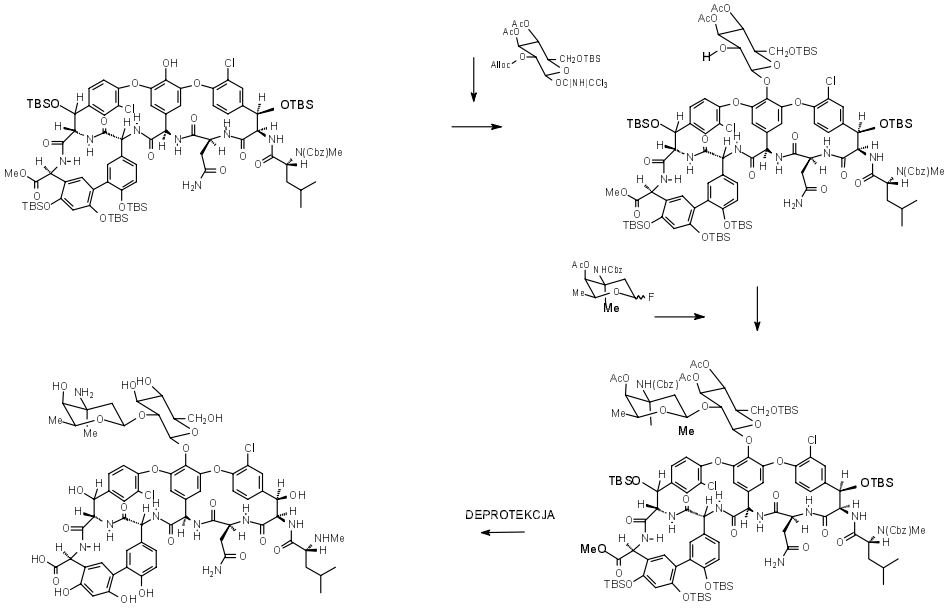


Schemat 1

Końcowym etapem syntezy wankomycyny było przyłączenie fragmentu cukrowego do aglikonu, prowadzone według dwóch metod: glikozylacji odpowiednim disacharydem (Schemat 2) [13] lub sekwencyjnego dołączania zaktywowanych jednostek monosacharydów (Schemat 3) [17].



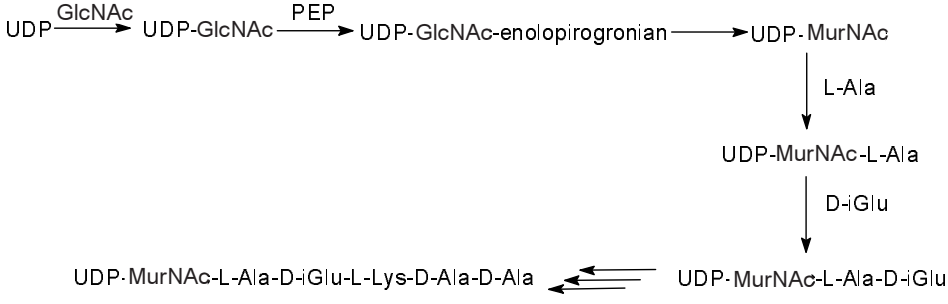
Schemat 2



Schemat 3

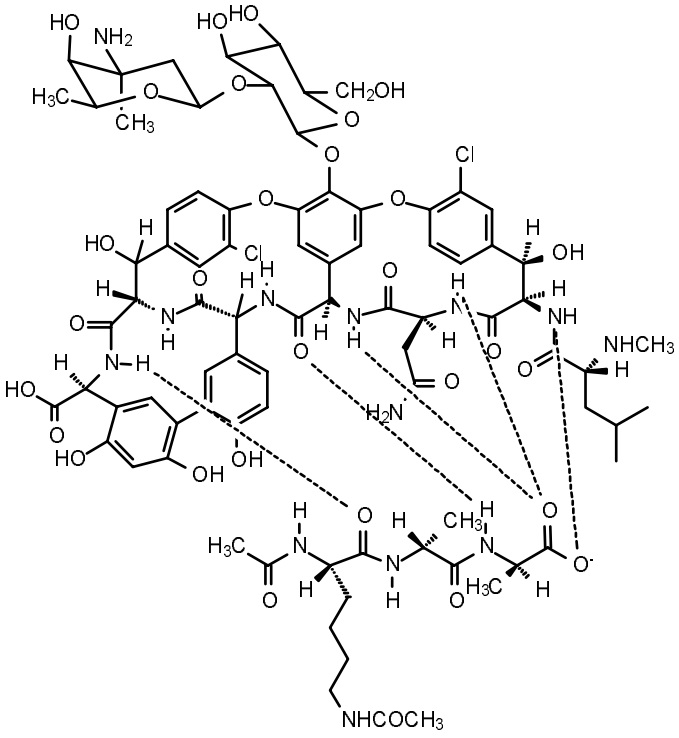
1.3. MECHANIZM DZIAŁANIA

Jednym z wielu poznanych mechanizmów działania antybiotyków jest hamowanie biosyntezy ściany komórkowej bakterii, która jest wielowarstwową strukturą, zbudowaną z membrany cytoplazmatycznej, warstwy peptydoglikanu (grubsza u bakterii Gram-dodatich), z membrany zewnętrznej i periplazmatycznej [18]. Dwa ostatnie składniki są częścią ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Peptydoglikan zbudowany jest z długich łańcuchów polisacharydowych, złożonych z powtarzających się jednostek *N*-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylo-D-muraminowego (MurNAc). Do MurNAc przyłączony jest fragment peptydu, który poprzez mostek peptydowy łączy się z kolejnym łańcuchem tworząc silnie usieciowaną, sztywną strukturę, która chroni bakterie przed pękaniem wywołanym przez wysokie ciśnienie osmotyczne w cytoplazmie [19]. Wynika z tego, że peptydoglikan jest niezbędną i najważniejszą częścią ściany komórkowej bakterii, ponieważ chroni ją przed degradacją [20]. Wiedza na ten temat pozwoliła wykorzystać do walki z bakteriami antybiotyki, które wpływają na biosyntezę peptydoglikanu (Rys. 4). Synteza ta jest procesem wieloetapowym, polegającym na: a) biosyntezie kwasu UDP-*N*-acetylo-D-muraminowego; b) przyłączeniu do tego kwasu fragmentu pentapeptydu; c) transporcie tego fragmentu przez błonę plazmatyczną i przyłączeniu go do powiększającego się peptydoglikanu [21]. Przeciwdrobnoustrojowe działanie antybiotyków polega na zahamowaniu określonego etapu tej syntezy.



Rysunek 4

Wankomycyna zaburza polimeryzację peptydoglikanu i/lub tworzenie się wiązań poprzecznych w wyniku oddziaływania z substratami transglikozylaz i transpeptydaz [22]. Niewrażliwość bakterii na wankomycynę jest konsekwencją powstawania kompleksu tego antybiotyku z dipeptydem D-Ala-D-Ala, będącego fragmentem prekursora peptydu (Rys. 5) w miejscu wiązania podjednostek peptydoglikanu.



Rysunek 5

1.4. OPORNOŚĆ

Aleksander Fleming, odkrywca penicyliny, dał ludziom nadzieję na opanowanie chorób gnębiących ich od stuleci. Dziś lekarze utracili jednak wiele z optymizmu pionierów antybiotykoterapii. Obecnie największym problemem związanym ze szpitalnymi (i nie tylko) zakażeniami, wywołanymi przez *S. aureus*, jest oporność tego drobnoustroju na metycylinę, co w praktyce oznacza oporność na wszystkie antybiotyki β-laktamowe. Szczepy takie określa się mianem MRSA (ang. *methicillin resistant S. aureus*) [23]. Stanowią one poważny problem, ponieważ niezależnie od oporności na β-laktamy, wykazują oporność na wiele innych antybiotyków. Pojawiły się również doniesienia o izolacji enterokoków i gronkowców o zmniejszonej wrażliwości na glikopeptydy, określane mianem „ostatniej szansy" w infekcjach gronkowcowych i enterokokowych.

Lekooporność tych niewidocznych zabójców jest fenotypem najpowszechniej kojarzonym z obecnością u nich plazmidów z grupy tzw. opornościowych (plazmidy R), jednakże należy pamiętać, iż geny warunkujące oporność bakterii na antybiotyki mogą także występować w chromosomie komórki [24]. Zidentyfikowano szereg genów niesionych na plazmidach, które umożliwiają bakteriom przetrwanie

w niekorzystnym środowisku gospodarza. Liczba determinantów genetycznych niesionych przez plazmidy jest ogromna, mimo to wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy oporności, które są przez nie warunkowane [25]. Pierwszy, najczęściej występujący, polega na syntezie enzymu, który chemicznie modyfikuje antybiotyk, inaktywując go. Drugi mechanizm polega na modyfikacji docelowego miejsca wiązania antybiotyku w komórce. Trzeci aktywnie usuwa niezmieniony związek z komórki. Konsekwencją modyfikacji enzymatycznej jest unieczynnienie antybiotyku, osiągane przez jego hydrolizę, lub tworzenie jego nieaktywnej pochodnej chemicznej [26]. Oporność wynikająca z modyfikacji docelowego miejsca działania antybiotyku może być osiągnięta w dwojaki sposób: albo przez enzymatyczną modyfikację struktury miejsca docelowego, albo przez jego zamianę [27]. Zmieniona struktura wciąż pełni swoją fizjologiczną rolę w komórce, jednak substancja antybakteryjna nie jest już wobec niej aktywna. Modyfikację, wynikającą ze zmiany miejsca docelowego, poprzez jego zamianę, wykształciły enterokoki charakteryzujące się opornością na wankomycynę [28]. Oporność zależna od zespołu genów *vanA* wynika z syntezy zmienionego prekursora: zamiast dipeptydu D-Ala-D-Ala powstaje związek alaniny z mleczanem D-Ala-D-Lac. W zespole wyżej wymienionych genów gen *vanA* koduje białko VanA (ligazę o zmienionych preferencjach substratowych), odpowiedzialne za tworzenie się związku D-Ala-D-Lac. Dehydrogenaza D-hydroksykwasów (VanH) wytwarza pulę D-mleczanu, która nie występuje naturalnie, a jest niezbędna do reakcji łączenia. VanH jest więc enzymem niezbędnym do nadania fenotypu oporności VanA. Ponadto w zespole genów *vanA* znajdują się geny regulatorowe *vanR* i *vanS* oraz geny kodujące inne białka funkcjonalne: VanY, VanZ. Szczepy VanA charakteryzują się opornością zarówno na wankomycynę, jak i tejkoplaninę [29]. Kluczowym enzymem w fenotypie VanB jest ligaza, wykazująca powinowactwo do związku D-Ala-D-Lac, a także dipeptydaza $VanX_B$, dostarczająca substratów do reakcji ligacji, poprzez wytworzenie D-mleczanów. Szczepy o tym fenotypie charakteryzują się opornością na wankomycynę, przy zachowanej wrażliwości na tejkoplaninę. Wyizolowano także szczepy o fenotypie VanC, charakteryzujące się naturalną opornością na wankomycynę oraz wrażliwością na tejkoplaninę. O oporności decyduje ligaza VanC, wykazująca powinowactwo do dipeptydu D-Ala-D-Ser. Znane są także szczepy o fenotypie VanD, charakteryzującym się opornością zarówno na wankomycynę, jak i tejkoplaninę oraz VanE, wykazującym oporność na wankomycynę, a wrażliwość na tejkoplaninę [30].

Wprowadzenie do lecznictwa wankomycyny było wynikiem narastającej oporności *S. aureus* na metycylinę. Jednakże szerokie stosowanie tego pierwszego doprowadziło do pojawienia się szczepów *S. aureus* charakteryzujących się niewrażliwością na glikopeptydy [28]. Niewrażliwość ta jest konsekwencją zwiększenia grubości ściany komórkowej u tych szczepów, w wyniku czego antybiotyk źle penetruje do komórki i często nie osiąga w niej stężenia terapeutycznego [28].

1.5. MODYFIKACJE

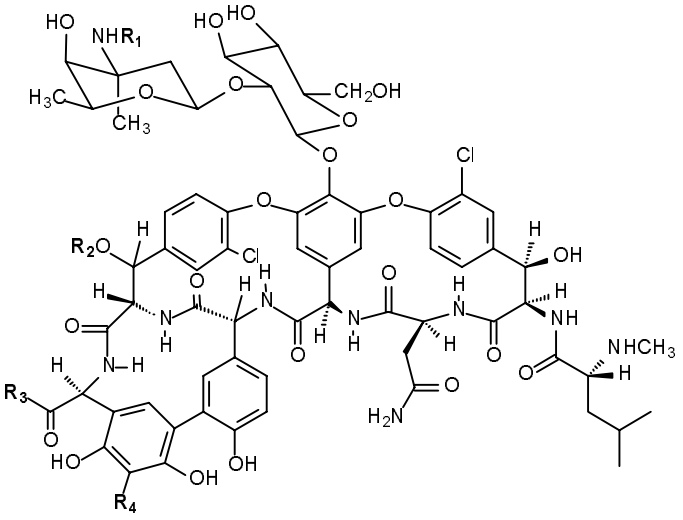
Czynniki genetyczne i środowiskowe doprowadziły do wykształcenia się oporności bakterii na antybiotyki. Znając potencjał glikopeptydów w infekcjach wywołanych przez enterokoki i gronkowce, włożono dużo pracy, aby otrzymać nowe pochodne charakteryzujące się lepszymi właściwościami farmakologicznymi, a także aktywnością w stosunku do szczepów opornych. Całkowita synteza glikopeptydów nie należy do najłatwiejszych, ze względu na strukturę tych antybiotyków. W związku z tym, większość nowo otrzymanych molekuł to półsyntetyczne pochodne wankomycyny (Tab. 1), a także innych antybiotyków należących do glikopeptydów. Spośród wielu otrzymanych pochodnych, przedstawionych w Tabeli 1, na uwagę zasługują trzy. Jednak należy podkreślić, iż synteza pozostałych pochodnych wpłynęła na kierunek badań mających na celu otrzymanie tych najważniejszych pochodnych. Związek 1 – chloroeremomycyna jest około 4–8 razy aktywniejsza niż wankomycyna względem wrażliwych bakterii [9]. Jednakże posiada niższą wartość MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii) dla VRE, w porównaniu z wankomycyną, zakres jej aktywności jest zbyt niski, by zakwalifikować ją do testów klinicznych. Molekuła 2 – oritawancyna wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec wszystkich wankomycynoopornych fenotypów [31]. Obecnie jest w III fazie badań klinicznych. Pochodna 3 – telawancyna, będąca w II fazie badań klinicznych, wykazuje wyższą aktywność (*in vitro*) względem enterokoków VanA, a także wobec VISA, w porównaniu do wankomycyny.

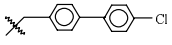
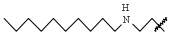
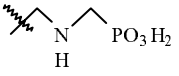
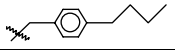
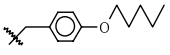
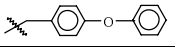
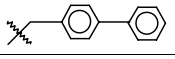
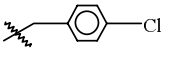
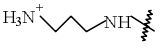
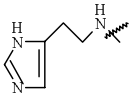
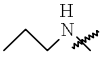
W związku z aktywnością antybakteryjną związków 2 i 3, zaczęto zastanawiać się, co jest przyczyną ich silniejszej aktywności wobec opornych szczepów, w porównaniu do wankomycyny. Badania nad ich budową pozwoliły sformułować wniosek, iż podstawniki hydrofobowe w reszcie cukrowej wpływają korzystnie na aktywność przeciwbakteryjną nowo otrzymanych pochodnych, ponieważ umożliwiają dimeryzację antybiotyków, a także ich silniejsze kotwiczenie w membranie [31].

Nadmierne stosowanie antybiotyków glikopeptydowych, w tym także wankomycyny, doprowadziło do wykształcenia się szczepów bakterii opornych na te antybiotyki. Prace nad nowymi półsyntetycznymi analogami glikopeptydów przyczyniły się do otrzymania szeregu pochodnych. W rezultacie, między innymi, otrzymano dwie pochodne wankomycyny, wykazujące aktywność wobec opornych szczepów, będące obecnie w różnych fazach badań klinicznych.

Główne modyfikacje chemiczne w obrębie antybiotyków glikopeptydowych przyczyniają się do powstawania glikopeptydów trzeciej generacji. Zmiany te dotyczą między innymi zastąpienia istniejących już jednostek cukrowych alternatywnymi sacharydami, a także modyfikacji łańcucha hydrofobowego, występującego w pochodnych wankomycyny. Prawdopodobnie nowo zsyntezowane pochodne będą wykazywały lepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, niż te stosowane obecnie i problem oporu glikopeptydów wobec bakterii Gram-dodatnich nie będzie tak znaczący.

Tabela 1. Półsyntetyczne pochodne wankomycyny:



Zw.	R_1	R_2	R_3	R_{4-}	Odn. lit.
1	–H	4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	33
2		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
3		–H	–OH		35
4-		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
5		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
6		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
7		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
8		4-*epi*-wankozamina	–OH	–H	34-
9		4-*ep*-wankozamina	–OH	–H	36
10	–H	–H		–H	37
11	–H	–H		–H	37
12	–H	–H		–H	37
13	–H	–H	Ph–CH_2NH–	–H	35

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję Pani Katarzynie Wiśniewskiej, dr nauk medycznych za pomoc przy pisaniu tej pracy oraz cenne wskazówki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] D.T.W. Chu, J.J. Plattner, L. Katz, Journal of Medicinal Chemistry, 1996, **39**, 3853.
[2] Z. Markiewicz, Z.A. Kwiatkowski, *Bakterie, Antybiotyki, Lekooporność*, PWN, Warszawa 2001.
[3] M.P. Lechevalier, H. Praser, D.P. Labeda, J.S. Ruan, Int. J. Sys. Bacteriol., 1986, **36**, 29.
[4] a) P.F. Wiley, K. Gerzon, E.H. Flynn, M.V. Sigal, Jr., O. Weave, U.C. Quarck, R.R. Chauvette, R. Monahan J. Am. Chem. Soc., 1957, **79**, 6062; b) I. Paterson, M.M. Mansuri, Tetrahedron, 1958, **41**, 3569; c) J.D. Smilack, W.R. Wilson, F.R. Cockerill III, Mayo Clin. Proc., 1999, **66**, 1270; d) D.C. Brittain, Med. Clin. North Am., 1987, **71**, 1147.
[5] C.M. Harris, T.M. Harris, J. Am. Chem. Soc., 1982, **10**4, 4293.
[6] R. Rocchi, L. Biondi, F. Filira, m. Golbo, Chimica oggi = chemistry today, 2003, **6**, 17.
[7] F.J. Schmitz, M.E. Jones, International Journal of Antimicrobial Agents, 997, **9**, 1.
[8] H. Kleinkauf, H. Von Dohren, Eur. J. Biochem., 1996, **236**, 335.
[9] E.A. Norris, I.N. Thalia, FEMS Microbiology Reviews, 2003, **26**, 511.
[10] C.T. Walsh, H.C. Losey, C.L. Freel Meyers, Biochemical Society, 2003, **31**, 487.
[11] K.C. Nicolaou, C.N.C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger., Angew. Chem. Int. Ed., 1999, **38**, 2096.
[12] D.A. Evans, M.R. Wood, B.W. Trotter, Angew. Chem., 1998, **110**, 2864; Angew. Chem. Int. Ed., 1998, **37**, 2700.
[13] K.C. Nicolaou, H.J. Mitchell, N.F. Jain, T. Bando, R. Hughes, N. Wissinger, S. Natarajan, A.E. Koumbis., Chem. Eur. J., 1999, **5**, 2648.
[14] N. Miyaura, A. Suzuki, Chem. Rev., 1995, **95**, 2457.
[15] A. Suzuki, Pure Appl. Chem., 1985, **57**, 1749.
[16] A. Suzuki, Pure Appl. Chem., 1994, **66**, 213.
[17] K.C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P.S. Baran., Angew. Chem. Int. Ed., 2000, **39**, 44.
[18] A.T.Jr. Scheldon, Clin. Lab. Sci., 2005, **18**, 170.
[19] C.H. Wong, M.C. Bryan, Pure Appl. Chem., 2003, **75**, 179.
[20] K. Hiramatsu, Lancet Infections Diseases, 2001, **1**, 147.
[21] J. Van Heijenoon, *Bacterial Cell Wall*, edited by J.M. Ghuysen & R. Hakenbeck, Amsterdam, Science, 39.
[22] D. Kahne, K. Leimkuhler, W. Lu, C. Walsh, Chem. Rev., 2005, **105**, 425.
[23] I.A. Holder, A.N. Neely, Burns, 1998, **24**, 99.
[24] M. Włodarczyk, Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych, 2002, **51**, 241.
[25] J. Davies, Science, 1994, **264**, 375.
[26] H.C. Neu, Science, 1992, **257**, 1064.
[27] J. Potrykus, Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych, 2002, **51**, 331.
[28] K. Hiramatsu, H. Hanaki, t. Ino, K. Jabuta, T. Oguri, F.C. Tenover, J. Antimicrob. Chemother., 1997, **40**, 135.
[29] D. Dzierżanowska, A. Pawińska, W. Kamińska, J. Patzer, Post. Mikrobiol., 2004, **43**, 81.
[30] S. Méndez-Álvarez, X. Pérez-Hernández, F.C. Martin, Internatt. Microbiol., 2000, **3**, 71.
[31] J. Halliday, D. McKeveney, C. Muldoon, P. Rajaratnam, W. Meutermans, Biochemical Pharmacology, 2006, **71**, 957.

[32] J.L. Pace, G. Yang, Biochemical Pharmacology, 2006, **71**, 968.
[33] A. Malabarba, R. Ciabatti, Current Medicinal Chemistry, 2001, **8**, 1759.
[34] T.I. Nicas, D.L. Mullen, J.E. Flokowitsch, D.A. Preston, N.J. Snyder, M.J. Zweifel, S.C. Wilkie, M.J. Rodriguez, R.C. Thompson, R.D.G. Cooper, Antimicrob. Agents Chemother., 1996, **40**, 2194.
[35] F. Van Bambeke, Current Opinion in Pharmacology, 2004, **4**, 471.
[36] Z. Shi, J.H. Griffin, J. Am. Chem. Soc., 1993, **115**, 6482-6486.
[37] U.N. Sundram, J.H. Griffin, J. Org. Chem., 1995, **60**, 1102-1103.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 grudnia 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

NODULARYNY I INNE TOKSYNY PRODUKOWANE PRZEZ CYJANOBAKTERIE (SINICE)

NODULARINS AND OTHER TOXINS PRODUCED BY CYANOBACTERIA (BLUE-GREEN ALGAE)

Hanna Mazur-Marzec, Anna Toruńska

Instytut Oceanografii, Uniwersytet Gdański,
Al. Marszałka Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia

Abstract
Wstęp
1. Toksyny produkowane przez cyjanobakterie
   1.1. Hepatotoksyny
   1.2. Neurotoksyny
   1.3. Cytotoksyny
   1.4. Dermatotoksyny
   1.5. Lipopolisacharydy
2. Nodularyna – cykliczny pentapeptyd produkowany przez *Nodularia spumigena*
   2.1. Zakwity *Nodularia spumigena*
   2.2. Struktura i aktywność biologiczna nodularyny
   2.3. Występowanie i przemiany nodularyny w środowisku
3. Metody analizy cyjanotoksyn
Piśmiennictwo cytowane

Dr Hanna Mazur-Marzec jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Doktorat z nauk o ziemi uzyskała na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii w 1995 r. Tematem rozprawy doktorskiej była analiza auksyny, kwasu indolo-3-octowego w Zatoce Gdańskiej i Morzu Adriatyckim. Od 2000 r. zatrudniona w Instytucie Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie zajmuje się toksynami produkowanymi przez cyjanobakterie. Od 2006 r. kieruje Regionalnym Centrum Sinicowym przy Instytucie Oceanografii. Jest autorką 30 publikacji naukowych.

Główne zainteresowania naukowe: związki biologicznie aktywne w środowiskach wodnych, ekotoksykologia morza.

Mgr Anna Toruńska jest słuchaczką Środowiskowego Studium Doktoranckiego z Biologii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. W ramach programu Sokrates-Erazmus odbyła 4-miesięczne stypendium na Uniwersytecie w Faro, Portugalia. Zdobyła I Nagrodę na Sympozjum Młodych Oceanografów w 2006 r.

Główne zainteresowania to: chemia morza, ekotoksykologia, toksyny produkowane przez cyjanobakterie i ich transformacje w środowisku.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that produce a wide range of secondary metabolites. Part of them is toxic or shows bioactivity in other organisms, including mammals [1–2]. The main classes of cyanobacterial toxins comprise of hepatotoxins, neurotoxins, cytotoxins, dermatotoxins and lipopolysaccharides [1]. Hepatotoxins, microcystins and nodularins are the most common cyanotoxins. Microcystins, the cyclic heptapeptides [3] are produced by freshwater cyanobacteria of the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix (Oscillatoria)*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* and *Anabaenopsis*. Nodularin (NOD-R) the cyclic pentapeptide hepatotoxin [4] is produced by brackish water cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Microcystins and nodularins are extremely toxic due to their action on type 1 and 2A protein phosphatase enzymes that play a key role in the control of cellular metabolism [5]. The main groups of neurotoxins produced by cyanobacteria include anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxins [1] and the recently identified *β-N*-methylamino--L-alanine (BMAA) [6]. The latter has been reported to biomagnify within the Guam ecosystem and was suggested to be a possible cause of the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) [6].

In the Baltic Sea *N. spumigena* is the main toxic and bloom-forming cyanobacterial species [7]. Nodularin concentration can temporarily reach over 20 mg dm^{-3} [7]. The toxin accumulates in different elements of the Baltic ecosystem, including sediments, mussels and fish [8–9]. Apart from NOD-R, minor amounts of other NOD analogues have been characterized in *N. spumigena* cells [4, 10]: geometrical isomers, linear forms, three demethylated analogues and three analogues with additional methyl group. Nodularin is characterized by high stability. The loss of the toxin in water is mainly due to degradation by the naturally occurring bacterial community [11]. However, the UV radiation as well as sorption on sediments and suspended particles has also some impact on nodularin concentration. In organisms microcystins are detoxified by conjugation with activated glutathione, however, the pathway of nodularin biotransformation has not been revealed yet.

Keywords: cyanobacteria, hepatotoxins, neurotoxins, nodularin, *Nodularia spumigena*

Słowa kluczowe: cyjanobakterie, hepatotoksyny, neurotoksyny, nodularyna, *Nodularia spumigena*

WSTĘP

Cyjanobakterie (gr. κυανοσ = niebieskie), tlenowe bakterie fotosyntezujące, są jedną z najstarszych formy życia na Ziemi. Podczas swej długiej ewolucji (ok. 3,5 mld lat) przystosowały się do bytowania w skrajnie odmiennych warunkach środowiska. Organizmy te zasiedlają oceany, wody słodkie i słonawe, a także skały i gleby. Cyjanobakterie syntezują wiele związków zaliczanych do wtórnych metabolitów, którym nie przypisuje się istotnej roli w podstawowych procesach życiowych. Niekiedy produkcja tych związków jest elementem mechanizmu chemicznej obrony przed wyżeraniem przez organizmy z wyższych poziomów troficznych. Mogą one również pełnić rolę substancji sygnałowych. Zainteresowanie związkami syntezowanymi przez cyjanobakterie wynika z ich odmiennej niż u organizmów lądowych struktury oraz aktywności biologicznej. Związki te znalazły zastosowanie jako leki, dodatki pokarmowe oraz składniki kosmetyków. Obok wielu wtórnych metabolitów wykazujących aktywność przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczną, cyjanobakterie produkują także związki o działaniu toksycznym.

1. TOKSYNY PRODUKOWANE PRZEZ CYJANOBAKTERIE

Zakwity cyjanobakterii występują w wodach słodkich na całym świecie. Szacuje się, iż ponad 50% tych zakwitów tworzą gatunki toksyczne, warto wspomnieć, że jeden szczep cyjanobakterii może produkować kilka różnych toksyn. Występowanie toksycznych cyjanobakterii, takich jak *Trichodesmium sp.* (Wyspy Dziewicze), *Lyngbya majuscula* (Hawaje) i *Nodularia spumigena* (Bałtyk), odnotowano również w środowisku morskim i słonawowodnym. W wielu krajach poważny problem stanowi obecność cyjanotoksyn w wodzie pitnej, zwłaszcza gdy jej źródłem są ujęcia powierzchniowe, charakteryzujące się intensywnymi zakwitami toksycznych gatunków cyjanobakterii. Liczne przypadki zatruć ludzi i zwierząt zostały opisane m.in. przez Kuiper-Goodmana i in. [1], Falconera [2] oraz Codda i in. [3]. Najbardziej dramatyczny przypadek ostrego zatrucia miał miejsce w 1996 roku w centrum dializy w Caruaru, w Brazylii. Na 136 dializowanych pacjentów u 117 (86%) stwierdzono objawy zatrucia w postaci nudności, wymiotów, osłabienia mięśni, bolesnego powiększenia wątroby. U 100 pacjentów nastąpiło poważne uszkodzenie wątroby, które w rezultacie było powodem śmierci 50 osób. Analiza surowicy krwi oraz wątroby dializowanych pacjentów wykazała obecność mikrocystyn-YR, -LR i -AR, cyklicznych heptapeptydów produkowanych przez cyjanobakterie. Równie niebezpieczne jest chroniczne narażenie organizmu na działanie toksyn, zwłaszcza że związki te są promotorami lub inicjatorami zmian nowotworowych. Istnieją przesłanki wskazujące, iż obecność toksyn cyjanobakterii w ujęciach wody pitnej w południowo-wschodnich Chinach była przyczyną dużej liczby przypadków pierwotnego nowotworu wątroby w tym rejonie (60 zachorowań na 100000 mieszkańców) [4]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na myszach dały podstawę do wyliczenia

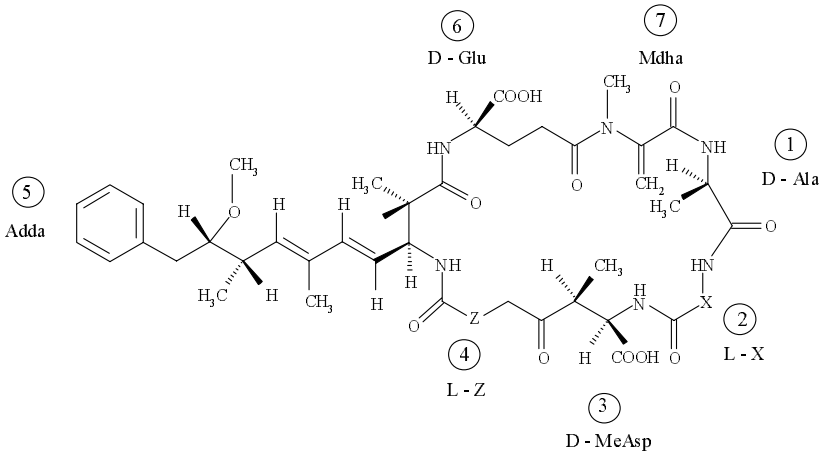
dopuszczalnej wartości stężenia mikrocystyny-LR w wodzie pitnej. Według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia, stężenie to nie powinno przekraczać 1 μg dm^{-3}.

Większość cyjanobakterii produkujących związki toksyczne należy do trzech rzędów: *Chroococcales*, *Oscillatoriales* oraz *Nostocales*. Ponad 40 gatunków należących do rzędu *Nostocales*, głównie *Anabaena* i *Nostoc sp.*, produkuje około 120 metabolitów wtórnych o działaniu cytotoksycznym. Związki te wykazują m.in. aktywność przeciwnowotworową, przeciwgrzybiczną; mogą być też stosowane w zwalczaniu malarii i wirusa HIV [5]. Duża ilość produkowanych toksyn powoduje, że cyjanobakterie są ważnym źródłem tego typu związków zarówno w wodach śródlądowych, jak i morskich. Najczęściej występującą grupą cyjanotoksyn są hepato- i neurotoksyny.

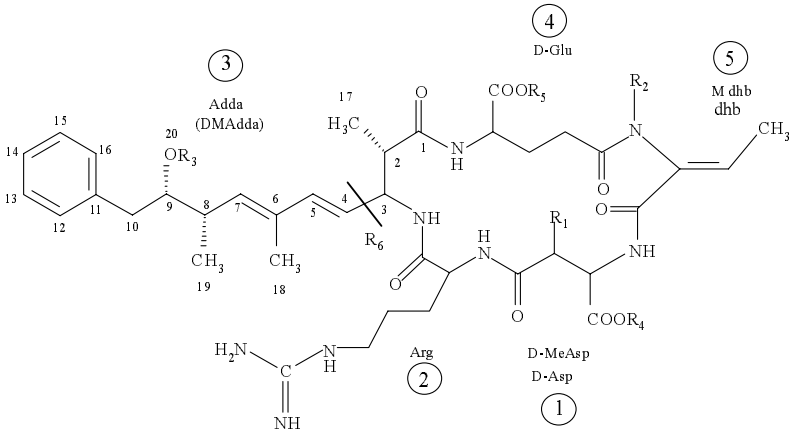
1.1. HEPATOTOKSYNY

Główne hepatotoksyny cyjanobakterii, nodularyny i mikrocystyny (Schemat 1), są cyklicznymi penta- i heptapeptydami, z reguły dobrze rozpuszczalnymi w wodzie, o masie cząsteczkowej w zakresie 800–1100 Da. Charakterystycznymi cechami struktury tych toksyn jest obecność wiązania γ-peptydowego przy kwasie D-glutaminowym oraz występowanie α,β-nienasyconych aminokwasów, takich jak Mdha czy Mdhb. Dehydroaminokwasy są związkami powszechnie występującymi u bakterii, do których zaliczają się również cyjanobakterie. Peptydowe hepatotoksyny cyjanobakterii syntezowane są pozarybosomalnie, przy udziale kompleksu enzymatycznego kodowanego przez syntetazę białkową i syntazę poliketydową [6–7]. Mikrocystyny (MC) są związkami o ogólnej strukturze cyklo-(D-Ala^1-X^2-D-$MeAsp^3$-Z^4-$Adda^5$-D-Glu^6-$Mdha^7$), gdzie X i Z oznacza zmienne reszty L-aminokwasowe [8–9] (Schemat 1). W pozycji 2 i 4 jednej z najczęściej spotykanych i najbardziej toksycznych mikrocystyn, MC-LR (LD_{50} = 50 μg kg^{-1}) występują odpowiednio leucyna i arginina. W cząsteczkach innych mikrocystyn pozycje te zajmowane są m.in. przez kwas D-glutaminowy, homoargininę, metioninę, fenyloalaninę, tryptofan lub tyrozynę. W strukturze mikrocystyn występuje również kwas D-*erytro*-β-metyloasparaginowy (MeAsp), charakterystyczny tylko dla cyjanobakterii, 20-węglowy kwas (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoksy-2,6,8-trimetylo-10-fenyldeka-4,6-dienowy (Adda) oraz *N*-metylodehydroalanina (Mdha). Stereochemię układu dienowego Adda określono jako 4*E*, 6*E* [10]. Mikrocystyny produkowane są przez cyjanobakterie z rodzaju *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc* oraz *Hapalosiphon* (glebowa) [11]. W komórce cyjanobakterii toksyny te występują w tylakoidach, nukleoplazmie i w niewielkich ilościach w ścianie komórkowej i pochwie [12]. Cyjanobakterie z gatunku *Nodularia spumigena* syntezują cykliczny pentapeptyd o masie 824 Da i ogólnej strukturze cząsteczki cyklo-(D-$MeAsp^1$-L-Arg^2-$Adda^3$-D-Glu^4-$Mdhb^5$), gdzie $Mdhb^5$ oznacza kwas *N*-metylodehydromasłowy (Schemat 1). Dotychczas wyizolowano i zidentyfikowano ponad 80 analogów mikrocystyn; poza dwoma

L-aminokwasami (X i Z), peptydy te różnią się rodzajem i ilością podstawników przy poszczególnych resztach aminokwasowych [9, 11, 13].



Mikrocystyna



Nodularyna

Nodularyna [NOD]	$R_1, R_2, R_3 = CH_3$	$R_4, R_5, R_6 = H$
[D-Asp^1] NOD	$R_2, R_3 = CH_3$	$R_1, R_4, R_5, R_6 = H$
[DMAdda^3] NOD	$R_1, R_2 = CH_3$	$R_3, R_4, R_5, R_6 = H$
[dhb^5] NOD	$R_1, R_3 = CH_3$	$R_2, R_4, R_5, R_6 = H$
[Glu^4(OMe)] NOD	$R_1, R_2, R_3, R_5 = CH_3$	$R_4, R_6 = H$
[MeAdda] NOD	$R_1, R_2, R_3 = CH_3$	$R_4, R_5, R_6 = H$
[MeAsp^1(OMe)] NOD	$R_1, R_2, R_3, R_4 = CH_3$	$R_5, R_6 = H$

Schemat 1

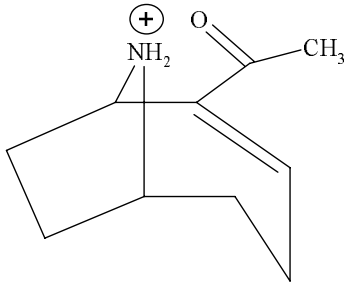
Modyfikacje struktury peptydowych toksyn skutkują zmianą ich aktywności biologicznej. W przypadku większości mikrocystyn, wartości parametru LD_{50}, przy dootrzewnowym podaniu u myszy, mieszczą się w zakresie od 50 do 250 µg na kg wagi ciała. Ze względu na polarność, dyfuzja mikrocystyn i nodularyn przez błony biologiczne jest utrudniona. Aktywny transport przez błony zachodzi jedynie w hepatocytach. Jest to możliwe dzięki specjalnym białkom ułatwiającym przenoszenie kwasów żółciowych do wątroby [14]. Stwierdzono, iż w wątrobie kumuluje się 50–70% dawki mikrocystyn podanej dożylnie lub dootrzewnowo; toksyny te kumulują się też w niewielkim stopniu w jelitach i nerkach. Toksyczne działanie mikrocystyn i nodularyn wynika z ich silnego niekowalencyjnego wiązania się w cytozolu komórek wątroby z fosfatazami serynowo-treoninowymi typu PP 2A i PP 1. Wiązanie z fosfatazami białkowymi powoduje zahamowanie aktywności enzymów, co z kolei prowadzi do nadmiernej fosforylacji białek (filamentów pośrednich i mikrofilamentów) i uszkodzenia cytoszkieletu komórek wątroby. Ponadto mikrocystyny i nodularyny powodują apoptozę i nekrozę hepatocytów, są też promotorami guzów nowotworowych [15]. Wykazano, iż u szczura nodularyna znacznie łatwiej przenika do hepatocytów niż mikrocystyna-LR [16]. W komórkach wątroby wiązanie się nodularyny z fosfatazami białkowymi PP-1 i PP-2A powoduje zahamowanie ich aktywności [17]. Enzymy te biorą udział w metabolizmie węglowodanów i tłuszczów w przekazywaniu sygnałów komórkowych, ponadto oddziaływują na strukturę i funkcję włókien cytoszkieletowych, apoptozę oraz na tempo podziałów komórkowych [16, 18, 19]. W przypadkach ciężkich zatruć może dojść do przesączania się krwi z naczyń do tkanki wątroby, gdzie gromadząc się, powoduje miejscowe uszkodzenie i w konsekwencji, wstrząs. Charakterystycznymi objawami zatrucia są zaburzenia żołądkowo-jelitowe i wątrobowe, osłabienie, anoreksja. Lankoff i in. [20] oraz Bouaicha i Maatouk [21] w ostatnich latach prowadzili badania, które rzuciły nowe światło na mechanizm działania nodularyny. Wyniki prac sugerują, iż w wyizolowanych komórkach wątroby szczura niskie stężenia nodularyny (wykluczające działanie cytotoksyczne związku) wywołują stres oksydacyjny, ujawniający się zmianą stężenia zredukowanego glutationu (GSH), zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) oraz utlenianiem tłuszczów.

Kluczowymi elementami decydującymi o aktywności biologicznej mikrocystyn i nodularyn są: reszta Adda, wolna grupa karboksylowa w kwasie D-glutaminowym oraz cykliczna struktura cząsteczek. Izomeryzacja peptydów do formy [6(Z)Adda], nasycenie wiązań podwójnych w Adda, estryfikacja grupy metylowej w reszcie D-Glu lub utworzenie formy liniowej powodują ok. 100-krotne obniżenie toksyczności [9, 22]. Usunięcie grup metylowych w resztach aminokwasowych nie ma większego wpływu na aktywność biologiczną hepatotoksyn. Badania prowadzone przez Harada i in. [23] wykazały, iż sama reszta Adda nie wpływa na aktywność fosfataz. Natomiast wszelkie zmiany w strukturze fragmentu Adda-Glu powodują osłabienie lub zniesienie toksyczności mikrocystyn i nodularyn [9, 24].

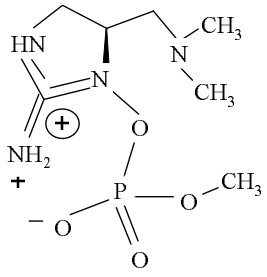
Kondo i in. [25] wykazali, iż w środowisku zasadowym, *in vitro*, mikrocystyny tworzą koniugaty z glutationem oraz cysteiną. Glutation jest ważnym antyoksydantem, który chroni komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu. Obecność koniugatów z GSH wykryto również w wątrobach zwierząt, którym podawano hepatotoksyny cyjanobakterii. Reakcja sprzęgania mikrocystyn z glutationem zachodzi z udziałem S-transferazy glutationowej i jest elementem mechanizmu detoksykacji. Powstałe produkty są lepiej rozpuszczalne w wodzie, a co za tym idzie – łatwiej wydalane z organizmu [25].

1.2. NEUROTOKSYNY

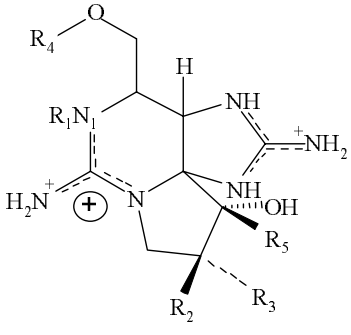
Cyjanobakterie syntezują trzy grupy neurotoksycznych alkaloidów: anatoksynę-a i jej pochodne, anatoksynę-a(s) oraz saksitoksynę i jej pochodne (Schemat 2).



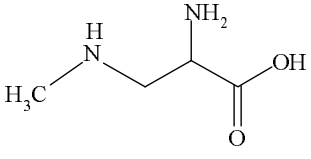
Anatoksyna-a



Anatoksyna-a(s)



Saksitoksyna



BMAA

Schemat 2

Anatoksyna-a (M_{cz} = 165 Da) była pierwszą toksyną, którą zidentyfikowano u cyjanobakterii [26]. Toksyna ta występuje u słodkowodnych szczepów z rodzaju – *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* oraz w niewielkich ilościach również u *Microcystis* [27]. Obecność metylowej pochodnej tego związku, homoanatoksyny-a (M_{cz} = 179 Da), wykryto u *Planktothrix formosa* [28]. Anatoksyna-a jest silnym agonistą nikotynowego receptora cholinergicznego, występującego w błonie postsynaptycznej. Wiązanie się anatoksyna-a z receptorem, podobnie jak w przypadku neuroprzekaźnika – acetylocholiny, powoduje otwarcie kanału jonowego i przepływ jonów do komórki mięśniowej. W wyniku depolaryzacji synapsy nerwowo-mięśniowej dochodzi do pobudzenia komórek mięśniowych. Acetylocholinoesteraza, która w normalnych warunkach powoduje rozkład acetylocholiny i zamknięcie kanału jonowego, nie działa na anatoksynę-a związaną z receptorem. W tej sytuacji dochodzi do stałego pobudzenia komórek mięśniowych, co w przypadku zatruć ostrych może wywołać drżenie i skurcze mięśni, a w skrajnych przypadkach porażenie mięśni oddechowych i śmierci w wyniku uduszenia [11]. Wartość LD_{50} dla anatoksyny-a, przy dootrzewnowym podaniu u myszy, wynosi 200–250 $\mu g\ kg^{-1}$. Dawka ta powoduje śmierć zwierzęcia w ciągu 2–30 min od podania. Anatoksyna-a(s), produkowana przez cyjanobakterie z rodzaju *Anabaena* (*A. flos-aquae* NRC-525-17 oraz *A. lemmermannii*), wywołuje podobne objawy do anatoksyny-a, jednak jej budowa oraz mechanizm działania są inne. Anatoksyna-a(s) (M_{cz} = 252 Da) jest naturalnie występującym związkiem fosforoorganicznym, który hamuje aktywność acetylocholinoesterazy, uniemożliwiając rozkład acetylocholiny. W rezultacie dochodzi do nagromadzenia acetylocholiny w synapsie, co skutkuje nadmiernym pobudzeniem komórek mięśniowych. Charakterystycznym objawem działania anatoksyny-a(s) u kręgowców jest obfity ślinotok (*salivation*), stąd w nazwie toksyny występuje litera (s). Wartość LD_{50} dla anatoksyny-a(s), przy dootrzewnowym podaniu u myszy, wynosi 20 $\mu g\ kg^{-1}$. Trzecią grupą alkaidowych neurotoksyn cyjanobakterii są saksitoksyny (LD_{50} = 8 $mg\ kg^{-1}$). Obecnie znanych jest ponad 21 analogów tych guanidynowych toksyn, które różnią się miejscem podstawienia i ilością grup hydroksylowych i sulfonowych w cząsteczce. Ze względu na rodzaj podstawnika R-4, saksitoksyny podzielono na cztery grupy: karbaminianowe, sulfokarbamoilowe, dekarbamoilowe i deoksykarbamoilowe (Schemat 2). Saksitoksyny zawierające w swej strukturze jedną grupę sulfonową nazwano goniautoksynami, natomiast zawierające dwie grupy sulfonowe – C-toksynami. Pochodne te różnią się zasadniczo aktywnością biologiczną; ich toksyczność maleje w szeregu od karbaminianowych, przez dekarbamoilowe, do sulfokarbamoilowych. W odróżnieniu od anatoksyn, których miejscem działania są synapsy, saksitoksyny i ich pochodne działają w aksonie komórki nerwowej. Blokując transport jonów Na^+ przez kanały jonowe, zaburzają propagację potencjału czynnościowego wzdłuż wypustki nerwowej. Saksitoksyny i ich pochodne wytwarzane są przez słodkowodne cyjanobakterie z gatunku *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Oscillatoria mougeotti*, *Lyngbya wollei* i *Cylindrospermopsis raciborskii* [11, 29]. Jest to jedyna

grupa toksyn cyjanobakterii, która występuje również u innych organizmów, głównie bruzdnic. Związki o strukturze saksitoksyn wyizolowane z *Aphanizomenon flos--aquae* nazwano wcześniej afanotoksynami. W 1991 r. masowy zakwit *Anabaena circinalis*, cyjanobakterii produkującej saksitoksyny, wystąpił na 1000-km odcinku rzeki Darling w Australii [30].

Związki o działaniu neurotoksycznym produkowane są również przez nitkowatą cyjanobakterię *Trichodesmium*, tworzącą zakwity w rejonie Wysp Dziewiczych, jednak ich struktury nie zostały dokładnie poznane. Wiadomo, iż są to polietery podobne do neurotoksyn produkowanych przez bruzdnice. Zakwity *Trichodesmium* były powodem śmierci ryb, krabów i ostryg [31].

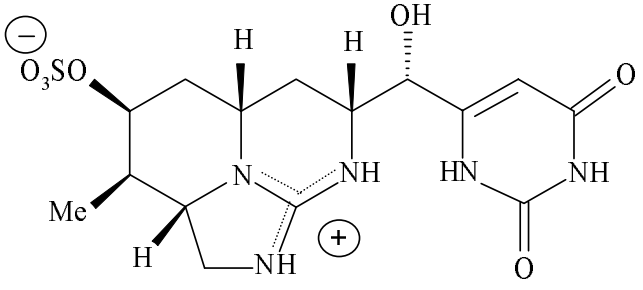
Niewątpliwą sensacją ostatnich lat była identyfikacja u cyjanobakterii nowej neurotoksyny: niebiałkowego aminokwasu *β-N*-metyloamino-L-alaniny (BMAA) [32] (Schemat 2). Związek ten po raz pierwszy wykryto w owocach sagowca [33, 34], a następnie u cyjanobakterii z rodzaju *Nostoc* żyjących w symbiozie z tą rośliną. Na wyspie Guam (Ocean Spokojny, Archipelag Mariański) owocami sagowca żywią się duże nietoperze z gatunku *Pteropus mariannus*, stanowiące przysmak w diecie ludu Chamorro zamieszkującego wyspę. Cox i in. [32] wykazali silną bioakumulację BMAA w łańcuchu pokarmowym. O ile wolnożyjące cyjanobakterie produkują około 0,3 $\mu g\ g^{-1}$ BMAA, stężenie tej toksyny w zewnętrznej warstwie nasion sagowca wynosi 1161 $\mu g\ g^{-1}$, a u nietoperzy 3556 $\mu g\ g^{-1}$. BMAA kumuluje się również w mózgu ludzi żywiących się nietoperzami i mączką z owoców sagowca. Oszacowano, iż w organizmie szczurów kumuluje się 90% wstrzykniętej toksyny [35], głównie w formie związanej z białkiem. Metabolizm białka prowadzi do stopniowego uwalniania BMAA, stąd związek ten zaliczono do tzw. „*slow toxins*". Przypuszcza się, iż BMAA może być przyczyną neurodegeneracyjnej choroby przypominającej objawami stwardnienie zanikowe boczne i chorobę Parkinsona (ang. *amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonian dementia complex*, ALS-PDC). Wśród ludu Chamorro choroba ta występuje 50–100 razy częściej niż w innych rejonach geograficznych.

W sumie BMAA znaleziono u 95% badanych rodzajów cyjanobakterii [36]. Nie można wykluczyć, że związek ten odpowiedzialny jest za neurotoksyczne właściwości morskich cyjanobakterii *Trichodesmium thiebautii* i *Trichodesmium erythraeum*. Według Cox i in. [36], tak powszechne występowanie BMAA u cyjanobakterii należących do różnych rzędów i rodzajów może wskazywać, iż synteza tego związku była wspólną cechą cyjanobakterii, która w procesie ewolucji zachowała się u większości organizmów.

1.3. CYTOTOKSYNY

Cylindrospermopsyna (CYN) jest cyklicznym guanidynowym alkaloidem o masie cząsteczkowej 415 Da (Schemat 3), wykazującym działanie cytotoksyczne oraz hepatotoksyczne i prawdopodobnie neurotoksyczne. Związek ten produkowany

jest głównie przez cyjanobakterie z gatunku *Cylindrospermopsis raciborskii*, występujące w wodach strefy tropikalnej i subtropikalnej Australii [2]. Cylindrospermopsynę zidentyfikowano również u *Aphanizomenon ovalisporum*, *Umezakia natans*, *Anabaena bergii* i *Raphidiopsis curvata* w wodach Japonii, Izraela, w wielu europejskich i amerykańskich jeziorach [11, 37]. Toksyna ta powoduje apoptozę komórek wątroby oraz hamuje syntezę białka; przypuszczalnie uszkadza również strukturę DNA i RNA i jest potencjalnym karcynogenem. Wartość parametru LD_{50} u myszy wynosi: 2,1 mg kg^{-1} po 24 godzinach lub 0,2 mg kg^{-1} po 5–6 dniach. Wykazano, iż czysty związek uszkadza wątrobę natomiast surowy ekstrakt z komórek cyjanobakterii wywołuje patologiczne zmiany również w nerkach, śledzionie, grasicy i sercu. Do poważnego wypadku zatrucia tą toksyną doszło w 1979 roku w Queensland, w Australii, gdzie u 140 dzieci oraz 10 dorosłych osób zaobserwowano dolegliwości gastryczne, bóle głowy, gorączkę, bolesne powiększenie wątroby [38]. W wodzie pitnej, z której korzystały poszkodowane osoby, stwierdzono obecność *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). Podanie myszom ekstraktu z wyizolowanego szczepu cyjanobakterii potwierdziło jego silnie hepatotoksyczne działanie. W grupie związków cytotoksycznych produkowanych przez cyjanobakterie są też: scytoficyna (*Scytonema pseudohofmanni*), cyjanobakterin (*Scytonema hofmanni*), hapalindol A (*Hapalosiphone fontinalis*), tubercidin (*Tolypothrix byssoidea*), akutificyna (*Oscillatoria acutissima*) oraz fiszerelin (*Fischerella muscicola*, *Scytonema mirabile*). Związki te wykazują działanie przeciwglonowe, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe [31].



Cylindrospermopsyna

Schemat 3

1.4. DERMATOTOKSYNY

Niektóre cyjanobakterie bentosowe z rodzaju *Lyngbya*, *Planktothrix* i *Schizothrix* produkują związki wywołujące stany zapalne skóry. Są to alkaloidy: lyngbiatoksyny (LA-A, -B i -C), aplysiatoksyny (AT) i debromoaplysiatoksyny (DAT); toksyny z grupy AT i DAT należą jednocześnie do silnych promotorów zmian nowotworowych oraz aktywatorów kinazy białkowej C. Morska cyjanobakteria *Lyngbya maiuscula* była przyczyną licznych przypadków chorób skóry u osób kąpiących się u wybrzeży Hawajów lub przebywających na plażach Okinawy [39]. Do zatruć może dojść również drogą pokarmową, po zjedzeniu wodorostów z rosnącymi na nich cyjanobakteriami. Na Madagaskarze do ostrego zatrucia doszło po zjedzeniu żółwia *Chelonia mydas*, w którego mięsie stwierdzono obecność LA. Toksyny produkowane przez *Lyngbya maiuscula* kumulują się w organizmach ryb; były też przyczyną istotnej redukcji populacji krewetek z gatunku *Penaeus stylirostris*.

1.5. LIPOPOLISACHARYDY

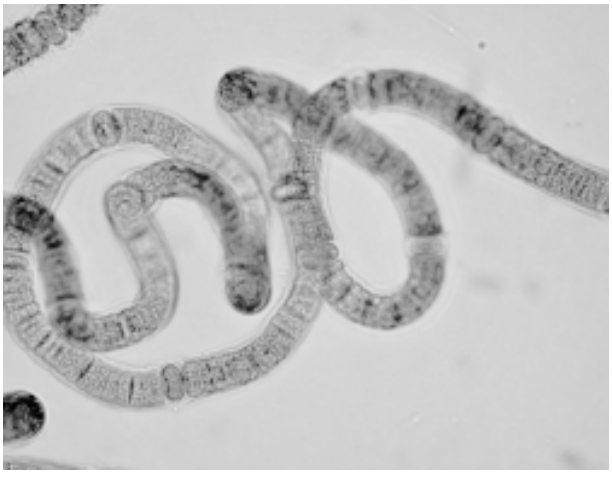
Lipopolisacharydowe endotoksyny (LPS) są składnikiem zewnętrznej warstwy ściany komórkowej gram-ujemnych bakterii; występują u wszystkich cyjanobakterii tworząc kompleksy z białkiem i fosfolipidami. W skład ich struktury wchodzi lipid A, oligosacharydowy rdzeń R oraz O-swoiste łańcuchy wielocukrowe. Kontakt z tymi związkami u ludzi i zwierząt może wywoływać stany gorączkowe, podrażnienia i reakcje alergiczne oraz choroby układu oddechowego. Best i in. [40] wykazali, iż związki te hamują aktywność S-transferazy glutationowej, która uczestniczy w detoksykacji ksenobiotyków. Lipopolisacharydy produkowane przez cyjanobakterie są 10-krotnie mniej toksyczne niż te produkowane przez takie bakterie, jak np. *Salmonella*. Endotoksyny zostały zidentyfikowane u chrookokalnych cyjanobakterii z rodzaju *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Microcystis* oraz u nitkowatych: *Anabaena*, *Oscillatoria* i *Schizothrix*. Choć w wodach objętych zakwitem wykryto wysokie stężenia lipopolisacharydów, same cyjanobakterie zawierały jedynie niewielkie ilości LPS. Przypuszcza się, że wykrywane endotoksyny pochodziły od gram-ujemnych bakterii współwystępujących w zakwicie [41].

2. NODULARYNA – TOKSYNA PRODUKOWANA PRZEZ *NODULARIA SPUMIGENA*

2.1. WYSTĘPOWANIE *NODULARIA SPUMIGENA*

Nodularia spumigena (gromada: *Cyanophyta*, klasa: *Hormogoniophyceae*, rząd: *Nostocales*, rodziny *Nostocaceae*) (Rys. 1) jest jedynym organizmem produkującym hepatotoksynę o nazwie nodularyna (NOD-R). W środowisku cyjanobakteria

ta występuje w postaci pojedynczych nici: prostych, powyginanych lub typowych dla Bałtyku form spiralnie skręconych. Masowe pojawienie się toksycznego gatunku *N. spumigena* w Zatoce Gdańskiej po raz pierwszy zanotowano w 1994 roku [42]. Wieloletnie badania wskazują na coraz częstszą dominację tego gatunku w fitoplanktonie Morza Bałtyckiego w okresie letnim [43–47]. Obecność *N. spumigena* i jej masowy rozwój obserwowano również u wybrzeży Australii [48–49], Nowej Zelandii [50], południowej Afryki [51], na obszarze Laguny Orielton u wybrzeży Tasmanii [52]. Zakwity *N. spumigena* występują także w słonawych zbiornikach śródlądowych, m.in. w jednym z największych jezior na terenie Stanów Zjednoczonych – Pyrmid Lake [53]. Niepokojący jest zasięg zakwitów *N. spumigena*, które w Morzu Bałtyckim mogą występować na powierzchni ponad 100 000 km^2 [54]. Zjawisko to w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie ekosystemów oraz na stan sanitarny wód przybrzeżnych.



Rysunek 1. *Nodularia spumigena* Mertens

2.2. STRUKTURA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NODULARYN

Po raz pierwszy nodularynę wyizolowano i zidentyfikowano w próbce fitoplanktonu pobranej podczas zakwitu *N. spumigena* w Nowej Zelandii [8]. U bałtyckich szczepów *N. spumigena* nodularyna NOD-R ([(6*E*)Adda^3]NOD) (Schemat 1) została zidentyfikowana przez Sivonen i in. [55] oraz Sandströma i in. [56].

Wartość LD_{50} dla nodurany w teście na myszach wynosi 50 µg kg^{-1} (przy dootrzewnowym podaniu). Choć w grupie mikrocystyn – strukturalnie podobnych związków – zidentyfikowano około 80 analogów, obecnie znamy zaledwie kilka naturalnie występujących nodularyn. W komórkach cyjanobakterii występują one w znacznie mniejszych ilościach niż NOD-R. Namikoshi i in. [57] oraz Rinehart i in. [9] dowiedli, iż *N. spumigena* z Jeziora Ellesmere w Nowej Zelandii produkuje pięć

analogów nodularyny: pochodną z resztą kwasu D-asparaginowego [D-Asp^1]NOD (LD_{50} = 75 μg kg^{-1}), analog bez grupy metylowej na węglu C_9 w reszcie Adda [DMAdda^3]NOD (LD_{50} = 150 μg kg^{-1}) oraz trzy nietoksyczne formy nodularyny: ester metylowy kwasu D-glutaminowego [Glu^4(OMe)]NOD, stereoizomer formy cyklicznej [6(Z)-Adda3]NOD oraz liniową formę NOD, która prawdopodobnie stanowi biogeniczny prekursor cyklicznego pentapeptydu. Te same formy nodularyny zidentyfikowano również u bałtyckich szczepów *N. spumigena* [58–59]. Dodatkowo, z komórek *N. spumigena* z Bałtyku wyizolowano i zidentyfikowano nodularynę z kwasem dehydromasłowym [dhb^5]NOD, estry metylowe kwasu D-asparaginowego [MeAsp^1(OMe)]NOD oraz pochodną toksyny z dodatkową grupą metylową w reszcie Adda, [MeAdda]NOD [59, Mazur-Marzec i in. dane niepublikowane]. Tabela 1 przedstawia ważniejsze jony powstałe w wyniku fragmentacji jonów $[M+H]^+$ poszczególnych analogów nodularyny. W Tabeli 2 zamieszczono wartości LD_{50} nodularyn produkowanych przez *N. spumigena*. Poza izomerami formy cyklicznej, w ekstraktach z komórek cyjanobakterii zebranych podczas zakwitu *N. spumigena* występowały izomery formy liniowej [Mazur-Marzec i in. dane niepublikowane]. Proces izomeryzacji NOD zachodzi pod wpływem działania promieniowania UV [60–63]. W próbkach cyjanobakterii z zakwitu ilość stereoizomeru [6(*Z*)-Adda^3]NOD formy cyklicznej stanowiła mniej niż 2% formy [6(*E*)-Adda^3]NOD, natomiast stereoizomery *Z* formy liniowej występowały w podobnym stężeniu co forma *E*. W środowisku naturalnym zmiana geometrii wiązania podwójnego C_6–C_7, a także C_4–C_5 w reszcie Adda, następuje w wyniku działania promieni słonecznych. Ze względu na mniejsze przeszkody steryczne, liniowe izomery *Z* nodularyny są zapewne trwalsze od cyklicznych analogów.

Tabela 1. Jony fragmentacyjne analogów nodularyny występujące w widmie masowym ISP-MS/CID

Analogi NOD / Skład jonowy	NOD-R	Liniowa NOD	[D-Asp^1] NOD	[DMAdda^3] NOD	[dhb^5] NOD	[MeAdda^3] NOD	[MeAsp^1 (OMe)] NOD	[Glu^4 (OMe)] NOD
$[M+H]^+$	825	843	811	811	811	839	839	839
$[M+2H-135]^+$	691	–	677	691	677	705	705	705
$[M-NH2-135]^+$	–	692	–	–	–	–	–	–
$[C_{11}H_{15}O$-Glu-Mdhb$]^+$	389	389	389	389	375	403	389	403
$[$Arg-Adda-Glu$+H]^+$	599	–	599	584	599	613	599	–
$[$Mdhb-MeAsp-Arg$+H]^+$	383	–	369	383	369	383	397	–
$[$Glu-Mdhb$+H]^+$	227	227	227	227	213	227	227	241
$[$Glu-Mdhb$+H-H_2O]^+$	209	–	209	209	195	209	209	223
$PhCH_2CH(OCH_3)$	135	135	135	121	135	135	135	135

Tabela 2. Zidentyfikowane analogi nodularyny i ich wartości dawek letalnych (LD_{50})

Nr	Nodularyna	LD_{50} [µg/kg]
1	[(6E) Adda^3] NOD (NOD-R)	50
2	[(6Z) Adda^3] NOD	>2000
3	NOD liniowa	>2250
4	Izomer NOD liniowej	?
5	[D-Asp^1] NOD	75
6	[DMAdda^3] NOD	150
7	[dhb^5] NOD	?
8	[MeAdda] NOD	?
9	[Glu^3(OMe)] NOD	>1200

U innych organizmów zidentyfikowano kolejne dwie nodularyny ze zmienionym aminokwasem w pozycji 2. *Nodularia* PCC 7804 (*Pasteur Culture Collection*), pochodząca z źródeł termalnych we Francji, syntezuje nodularynę z resztą homoargininy zamiast Arg [L-Har^2]NOD (LD_{50} = 75 µg kg^{-1}) [64–65]. Natomiast u morskiej gąbki *Theonella swinhoei* Gray, pochodzącej z okolic Papui Nowej Gwinei, wyizolowano motuporynę, w której strukturze, zamiast polarnej Arg, obecna jest hydrofobowa reszta Val [66]. Nie jest wyjaśnione, czy źródłem tego związku (NOD-V) są gąbki, czy też cyjanobakterie żyjące w symbiozie z gąbkami.

Spoof i in. [67] w ramach badań nad organotropizmem nodularyny, przeprowadzili redukcję toksyny za pomocą borowodorku sodu [^{3}H]$NaBH_4$. Produktem reakcji były dwa stereoizomery dihydronodularyny zawierające kwas 2-(metyloamino)masłowy: [D-MeAbu^5]NOD oraz [L-MeAbu^5]NOD.

Nodularyna, odmiennie niż mikrocystyna, nie tworzy wiązań kowalencyjnych z fosfatazami białkowymi [68]. Pomiędzy nodularyną i enzymami zachodzą jednak silne oddziaływania z udziałem fragmentu Adda-Glu [19], odpowiedzialnym za aktywność biologiczną związku.

2.3. WYSTĘPOWANIE I PRZEMIANY NODULARYNY W ŚRODOWISKU

Według Sivonen i in. [55], w okresie zakwitu *N. spumigena* w Bałtyku stężenie nodularyny w próbach fitoplanktonu wynosiło od 100 µg g^{-1} do około 2400 µg g^{-1} s.m. (suchej masy) (Tabela 3). Jedynie Kononen i in. [69] zanotowali w południowej części Zatoki Botnickiej stężenie nodularyny wynoszące aż 18100 µg g^{-1} s.m. (Tabela 3).

Tabela 3. Wartości stężeń nodularyny w suchej masie (s.m.) fitoplanktonu

Akwen	Rok	Zakres stężeń [μg g^{-1} s. m.]	Literatura
Morze Bałtyckie	1985–1987	< 100–2400	[55]
	1990–1991	300–18000	[69]
Zatoka Gdańska	2001	< 3520	[47]
	2002	< 919	
	2003	< 2857	
	2004	~3000	
Tasmania, Laguna Orielton	1992–1993	2000–3500	[52]

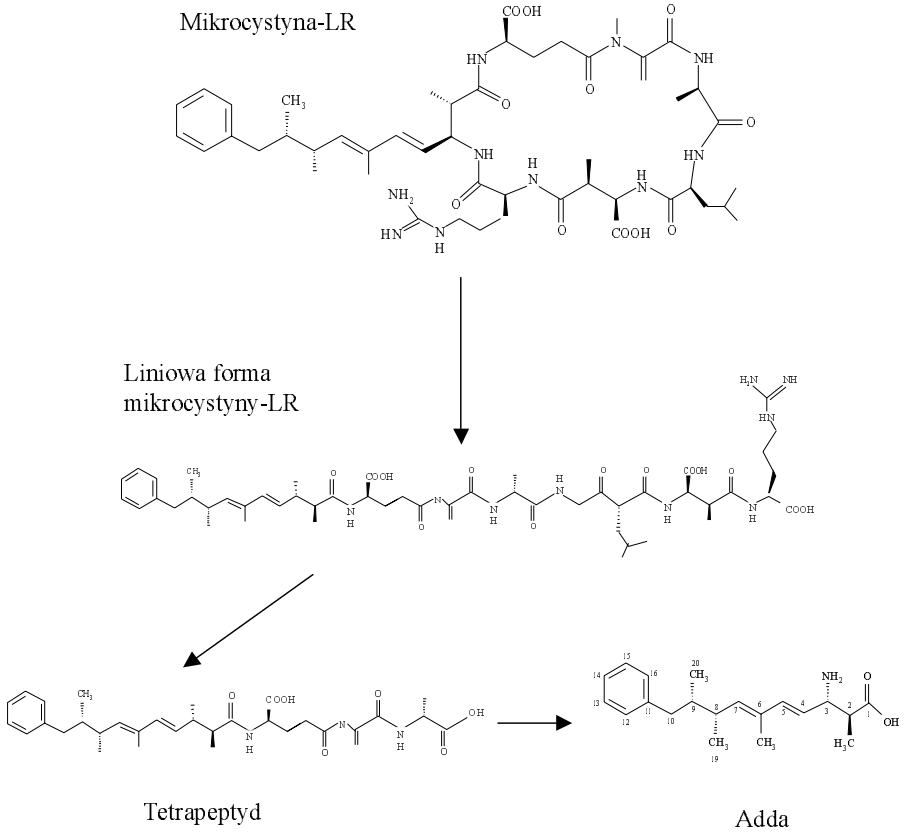
W wodzie stężenie rozpuszczonej nodularyny zawierało się najczęściej w przedziale od 0,01 do 95,0 μg dm^{-3} [69–70, 47]. W trakcie intensywnych zakwitów *N. spumigena* w Zatoce Gdańskiej stężenia nodularyny w sestonie (zawiesinie cząstek ożywionych i nieożywionych) osiągają wartości ponad 20 mg dm^{-3} i są równe stężeniu chlorofilu a [46–47]. Nodularyna, podobnie jak mikrocystyny, występuje głównie w komórkach cyjanobakterii; jedynie niewielka pula syntezowanego związku wydzielana jest do środowiska. Doświadczenia prowadzone na hodowlach *N. spumigena* wykazały, iż w logarytmicznej fazie wzrostu 80–90% toksyny znajduje się w komórce [71]. Stężenie rozpuszczonej toksyny w pożywce zwiększa się wraz ze starzeniem się hodowli. Podobnie jest w środowisku naturalnym. Na początku zakwitu notuje się jedynie niewielkie stężenie pozakomórkowej nodularyny w wodzie. Stężenie to znacznie wzrasta w okresie starzenia się zakwitu, gdyż wówczas komórki cyjanobakterii ulegają lizie, a ich zawartość, w tym nodularyna, uwalniana jest do środowiska. Uwalnianie toksyn do środowiska może być przyspieszone w wyniku działania środków chemicznych np. herbicydów (siarczan miedzi), stosowanych do usuwania zakwitu. W zbiornikach, w których zachodzi intensywne mieszanie mas wody na skutek działania wiatru lub prądów, stężenie toksyn szybko maleje. Natomiast w zbiornikach charakteryzujących się słabą wymianą wód (jeziora, zatoczki) toksyny mogą być obecne nawet przez kilka tygodni po zakwicie [72, 73]. Prawdopodobnie jest to wynikiem dużej trwałości hepatotoksyn cyjanobakterii. Według Twista i Codda [62], w warunkach laboratoryjnych stężenie czystej nodularyny w roztworze wodnym utrzymywało się na stałym poziomie przez 9 dni, niezależnie od rodzaju oświetlenia. W sterylnej wodzie morskiej, pozbawionej mikroorganizmów, po 21 dniach doświadczenia stężenie związku zmieniło się jedynie w niewielkim stopniu [74, Toruńska i in. dane niepublikowane]. Szybszy rozkład toksyny następował w roztworze wodnym zawierającym liofilizat lub ekstrakt z komórek *N. spumigena*; tempo degradacji w istotny sposób zależało od rodzaju stosowanego oświetlenia. Prawdopodobnie w obecności naturalnych składników komórki reakcja fotochemicznego rozpadu cząsteczki nodularyny ulega przyspieszeniu. Wpływ

promieniowania UV na mechanizm i prędkość przemian nodularyny i mikrocystyny w warunkach laboratoryjnych badali m.in. Tsuji i in. [61], Kaya i Sano [75], Liu i in. [76–77], Mazur-Marzec i in. [63], oraz Kull i in. [78]. Światło UV powoduje izomeryzacje [6(*E*)Adda] do [6(*Z*)Adda] i w konsekwencji, utratę aktywności biologicznej związków [61]. W wyniku ekspozycji roztworu MC-LR na działanie promieniowania o długości fali 254 nm (UV-C) uzyskano trzy produkty fotolizy; dwa z nich zidentyfikowano jako [6(*Z*)Adda^5]MC-LR oraz [4(*Z*)Adda^5]MC-LR. Trzecim produktem była prawdopodobnie [tricyklo-Adda^5]MC-LR [75] lub [4(*Z*),6(*Z*)Adda^5]MC-LR [60]. Naświetlanie wodnego roztworu nodularyny promieniami UV-B (280–315 nm) również prowadziło do otrzymania trzech produktów degradacji [63]. Analiza LC-MS/MS wykazała, iż wszystkie te produkty charakteryzowały się jednakową wartością *m/z* 825,4, która odpowiada jonowi molekularnemu $[M+H]^+$ nodularyny. Widma fragmentacyjne tych jonów zawierały charakterystyczne dla nodularyny jony o wartości *m/z* 781 $[M+H–NH_2–CO]^+$, 753 $[M+H–CO_2–CO]^+$, 674 $[M+H–135–NH_2]^+$, 389 $[C_{11}H_{15}O\text{-Glu-Mdhb}]^+$, 383 $[\text{Mdhb-MeAsp-Arg}^+H]^+$, 366 $[\text{Mdhb-MeAsp-Arg}^+H–NH_3]^+$, 253 $[\text{CO-Glu-Mdhb–H}]^+$, 227 $[\text{Glu-Mdhb+H}]^+$, 209 $[\text{Glu-Mdhb+H–H}_2O]^+$ i 135 $[PhCH_2CH(OCH_3)]$. Ponieważ główny produkt fotolizy hamował aktywność fosfatazy białkowej PP 1, można założyć, że był to związek toksyczny. Powstaje pytanie, czy uzdatnianie wody zawierającej peptydowe hepatotoksyny cyjanobakterii przez naświetlanie promieniami UV może być skuteczne. Shephard i in. [79] uważają, że przyspieszenie fotolizy mikrocystyn następuje w obecności dwutlenku tytanu TiO_2. Dodanie nadtlenku wodoru powoduje rozkład 99,6% mikrocystyny w ciągu 5 min [80]. Tak katalizowana reakcja prowadzi do szybkiej izomeryzacji układu dienowego w reszcie Adda oraz kolejno do podstawienia grup hydroksylowych i rozerwania wiązań C_4–C_5 i/lub C_6–C_7 [76–77].

Zauważono, iż stężenie nodularyny rozpuszczonej w wodzie zwykle jest znacznie mniejsze, niż wynikałoby to z koncentracji toksycznych organizmów oraz dużej trwałości toksyny. Prawdopodobnie ważną rolę w procesie rozkładu nodularyny i mikrocystyny odgrywają bakterie występujące naturalnie [81–84]. Mikroorganizmy te biorą udział w procesach mineralizacji materii organicznej w wodzie rzecznej i jeziornej [49, 85], w wodzie morskiej [74] oraz w osadach [86–87]. Bakterie często są przyczepione do powierzchni komórek cyjanobakterii zawieszonych w toni wodnej, mogą bytować pomiędzy filamentami, czy też w śluzie otaczającym kolonie. Różnorodne oddziaływania pomiędzy tymi mikroorganizmami (np. symbiotyczne, mutualistyczne) są ważnym obszarem współczesnych badań środowiskowych [88–89]. Przykładowo: bakterie mogą syntetyzować związki o działaniu algicydowym; wykazano, że niektóre szczepy zdolne są do lizy kolonii cyjanobakterii, dzięki uwalnianym substancjom o właściwościach lizozymu [90–91]. Według Shilo [92], proces ten jest bardzo szybki i zachodzi już po ok. 20 minutach po przyczepieniu bakterii do koloni cyjanobakterii z rodzaju *Nostoc*.

Większość badań nad biodegradacją toksyn cyjanobakterii dotyczy MC-LR [23, 72, 81–82, 86, 93–94, 95–96]. Tylko pojedyncze prace opisują biodegradacje pozostałych mikrocystyn [83–85, 97]. Nieliczne publikacje dotyczą również procesu biodegradacji nodularyny [49, 85, 97].

Działanie bakterii na cyjanotoksyny jest selektywne; nie wszystkie bakterie powodujące rozkład mikrocystyny są zdolne hydrolizować wiązania w cząsteczce nodularyny. Pewne szczepy *Sphingomonas*, które powodują hydrolizę wiązań Arg-Adda, Ala-Leu i Adda-Glu w cząsteczce MC-LR z utworzeniem struktury liniowej (100 razy mniej toksycznej), nie działały na te same wiązania w cząsteczce nodularyny [85, 97]. Jednym z zidentyfikowanych produktów pośrednich enzymatycznej degradacji MC-LR jest tetrapeptyd NH_2-Adda-Glu-Mdha-Ala-OH [81] (Schemat 4).

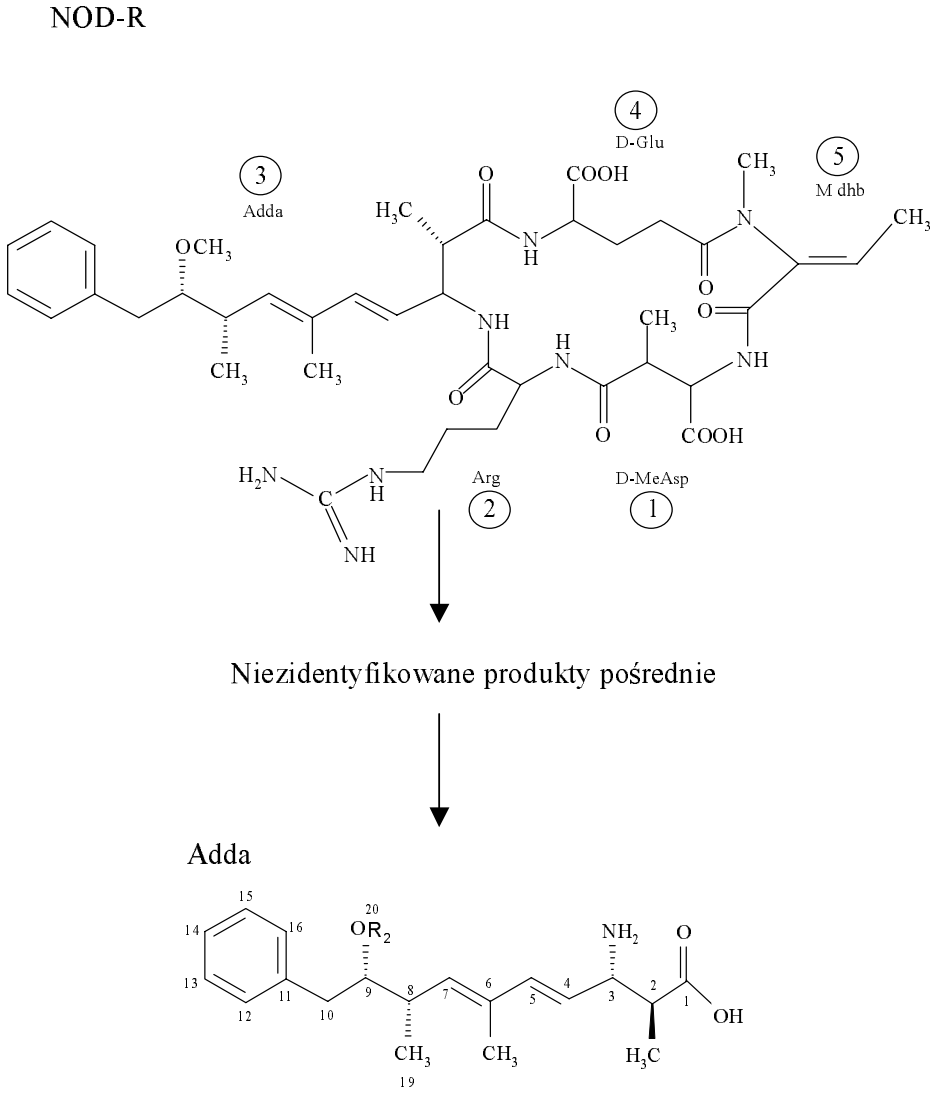


Schemat 4. Reakcja biodegradacji mikrocystyny-LR

Dalsze działania enzymów prowadzą do powstania mniejszych peptydów i aminokwasów, które nie zostały dotąd zidentyfikowane. Badano również proces degradacji mikrocystyn w osadzie w warunkach tlenowych i beztlenowych. W warunkach

beztlenowych rozkład toksyn może zostać przyspieszony w obecności azotanów lub glukozy [86]. W obecności tlenu rozkład MC-RR przez bakterie *Sphingomonas sp.* (CBA4), wyizolowane ze zbiornika San Roque (Argentyna), rozpoczynał się od demetylacji związku [98]. Natomiast produktem degradacji MC-LR przez bakterie z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, wyizolowane z jeziora w Japonii, był kwas (2S,3S,8S)-3-amino-2,6,8-trimetylo-10-fenyldeka-4(*E*),6(*E*)-dienowego (DMAdda) [96]. Obecność aminokwasu Adda bez grupy metylowej na weglu C_9 wykryto również w wątrobie myszy, którym podano MC-LR [99]. Analiza LC-MS/MS ekstraktów z osadu i omułka z Morza Bałtyckiego wykazała obecność [DMAdda^3]NOD w stężeniach porównywalnych do stężenia NOD [100]. W komórkach cyjanobakterii *N. spumigena* analog [DMAdda^3]NOD występuje jedynie w śladowych ilościach, znacznie mniejszych niż NOD. Autorzy publikacji wysunęli hipotezę, iż demetylacja może być jednym z pierwszych etapów rozkładu nodularyny w próbach środowiskowych i organizmach. Inne prace dowodzą, iż produktem enzymatycznej degradacji peptydowych hepatotoksyn cyjanobakterii jest aminokwas Adda, który jest związkiem nietoksycznym [81, 97]. Zbadano również produkt biodegradacji nodularyny, otrzymany w wyniku aktywności mikroorganizmów pochodzących z Morza Bałtyckiego. Związek ten był dimerem aminokwasu Adda i powodował hamowanie aktywności fosfatazy białkowej PP 1 [Toruńska i in., dane niepublikowane] (Schemat 5). Określenie struktury i toksyczności produktów mikrobiologicznej degradacji nodularyny wymaga dalszych badań.

Degradacja z udziałem mikroorganizmów może być skuteczną metodą usuwania cyjanobakteryjnych toksyn z wody. Tsuji i in. [101] oszacowali, że immobilizowane baterie z rodzaju *Sphingomonas*, pobrane z naturalnego środowiska, mają zdolność do rozkładu mikrocystyn w bioreaktorach. Co ważne: efektywność tego procesu utrzymuje się na poziomie 80% przez ponad 2 miesiące. Szczep MJ-PV zdolny do degradacji mikrocystyn został z zadowalającym skutkiem wykorzystany do usuwania toksyn drogą powolnej filtracji przez biologicznie aktywne filtry piaskowe [101].



Schemat 5. Reakcja biodegradacji NOD-R

Po zakwicie, jedynie mniej niż 10% cyjanobakterii ulega sedymentacji; znaczna część organizmów rozkłada się w kolumnie wody [70]. Jednak występowanie pustych komórek *N. spumigena* oraz śladowych ilości nodularyny (90 µg dm^{-3}) stwierdzono na głębokości 81 m, w powierzchniowej warstwie osadów z Zatoki Fińskiej. Dalsze badania potwierdziły obecność NOD w osadach z Zatoki Gdańskiej i Zatoki Fińskiej. W Zatoce Gdańskiej najwyższe stężenia tego pentapeptydu zmierzono w lipcu, w osadzie na głębokości 20 m (75 µg kg^{-1}). Śladowe ilości toksyny występowały również w materiale pochodzącym z Głębi Gdańskiej (99 m głębokości).

Obecność NOD w próbkach osadu zebranych w marcu, 6 miesięcy po zakwicie *N. spumigena* (2,3 μg kg^{-1}), potwierdza dużą trwałość związku. Analiza metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykazała, iż poza NOD, w próbkach osadu z Morza Bałtyckiego występowały dwa inne analogi toksyny: [DMAdda^3]NOD i w mniejszych stężeniach [dhb^5]NOD [100]. Morris i in. [103] wysunęli hipotezę, że w wiązaniu peptydowych toksyn cyjanobakterii z osadem uczestniczy hydrofobowa reszta Adda. Siła tego wiązania zależy od udziału frakcji drobnoziarnistej, zawierającej minerały ilaste, głównie kaolinit i montmorylonit, które silnie sorbują kwasy tłuszczowe. Jednak peptydy wykazują większą aktywność w procesach podepozycyjnych (zachodzących po ich sedymentacji), niż kwasy tłuszczowe i substancje humusowe [104]. Dowiedziono, że zawarte w cząsteczce nodularyny polarne aminokwasy (kwas asparaginowy i glutaminowy oraz arginina) mogą również uczestniczyć w wiązaniu toksyn w osadzie [105]. Sorpcja różnych związków jest zależna od składu granulometrycznego i mineralnego osadu oraz zawartości i struktury materii organicznej. Na intensywność tego procesu silnie wpływa również pH i zasolenie środowiska; zasadowe pH i niskie zasolenie wody powodowały spadek wydajności procesu sorpcji związków na osadzie [106]. W doświadczeniach laboratoryjnych wykazano, że gleby charakteryzujące się największą zawartością iłu i materii organicznej posiadają najwyższe współczynniki adsorpcji. Według teorii Grützmachera i in. [107] wraz ze wzrostem udziału frakcji gruboziarnistej w osadzie wydajność procesu sorpcji maleje. Teorię tą potwierdzili również Morris i in. [103] wykazując, iż największa ilość MC-LR wiąże się z osadem, który zawierał najwięcej frakcji najdrobniejszej. Cząsteczki gliny wiązały nawet 81% początkowej ilości toksyny rozpuszczonej w wodzie. Doświadczenia prowadzone z wykorzystaniem materiału pochodzącego z Zatoki Gdańskiej również wskazały na wydajniejszą sorpcję NOD w osadzie mulistym, w porównaniu z piaskiem drobnoziarnistym [Toruńska i in., dane niepublikowane].

W publikacji opisującej wykorzystanie filtrów piaskowych do usuwania cyjanotoksyn z wody Ho i in. [87] zwrócili uwagę na fakt, iż degradacja toksyn przez bakterie ma większe znaczenie niż ich sorpcja na osadzie piaszczystym.

Kluczową rolę w oddziaływaniu peptydów ze strukturą osadów przypisuje się frakcji organicznej [108, 109, 110]. Związanie peptydów w trójwymiarowej strukturze niereaktywnej materii organicznej, np. substancjach humusowych, może hamować rozkład tych związków i zwiększać ich okres półtrwania w środowisku morskim [111, 112]. Mechanizm procesów sorpcji NOD wymaga dalszych szczegółowych badań. Dostępne dane są nieliczne i dotyczą tylko doświadczeń laboratoryjnych, głównie z udziałem mikrocystyny. Rozpoznanie tych procesów jest ważne, gdyż obecność cyjanotoksyn stwierdzono w tkankach organizmów bentosowych. Wysoki stopień kumulacji NOD w miękkiej tkance omułka oraz jej toksyczność w testach na myszach wykazał Falconer i in. [113]. W związku z zaobserwowanym dużym stężeniem NOD, okresowo wprowadzano zakaz zbioru krewetek i małży w celach konsumpcyjnych [114]. U omułka *Mytilus edulis* i storni *Platichthys flesus*

żywiącej się omułkiem wykryto nodularynę nawet w okresie, gdy toksyczne cyjanobakterie występowały w niewielkich ilościach i nie tworzyły zakwitu [115, 100]. W próbkach pobranych z Zatoki Fińskiej średnie stężenie nodularyny w miękkiej tkance omułka (do 2150 ± 60 ng g^{-1} s.m.) było wyższe niż w wątrobie storni (do 399 ± 5 ng g^{-1} s.m.) [116]. Jednak różnice w stężeniu NOD w wątrobach pojedynczych ryb były znaczne i osiągały wartości przekraczające 2000 ng g^{-1} s.m. [117]. W tkance miękkiej omułka z Zatoki Gdańskiej najwyższe stężenia NOD zanotowano w trakcie zakwitu *N. spumigena*; wynosiły one od 62 ± 6 ng g^{-1} do 139 ± 13 ng g^{-1} s.m. [100]. W tym samym czasie średnie stężenie NOD w wątrobie storni z Zatoki Gdańskiej wynosiło 473 ± 15 ng g^{-1} s.m. [100]. W jelitach i gonadach ryb stężenie NOD było znacznie niższe (ok. 20 ng g^{-1} s.m.), a mięśnie zawierały jedynie śladowe ilości toksyny.

U większości organizmów roślinnych i zwierzęcych ksenobiotyki łączą się z glutationem w reakcji katalizowanej przez S-transferazę glutationową (sGST); powstały koniugat jest łatwiej wydalany z organizmu, a w przypadku hepatotoksyn cyjanobakterii jest również kilkakrotnie mniej toksyczny [118]. Wiegand i in. [119] dowiedli, iż taki mechanizm detoksykacji mikrocystyny występuje u ryb. Szybki spadek stężenia nodularyny w tkance miękkiej omułka po zakwicie cyjanobakterii [70] wskazuje na przystosowanie tego organizmu do biotransformacji toksyny. Sipiä i in. [116] stwierdzili obecność nodularyny (100–130 ng g^{-1} s.m.) u rogowca *Macoma balhtica* zebranego we wschodniej części Zatoki Fińskiej. Doświadczenia nie wykazały jednak, aby w organizmie rogowca tworzyły się koniugaty nodularyna–glutation; zmieniał się natomiast poziom acetylocholinoesterazy [120]. Wynik tych doświadczeń sugeruje, iż poza działaniem hepatotoksycznym, nodularyna może hamować też aktywność AChE i tym samym wywoływać pewne efekty neurotoksyczne. Wykazano, iż nodularyna kumuluje się również w organizmie ciernika *Gasterosteus aculeatus* (35–170 ng g^{-1} s.m.) i dorsza *Gadus morhua* (53 ng g^{-1} s.m.). Znacznie niższe stężenia nodularyny, zmierzone w wątrobie łososi (*Salmo salar* L.) i mięśniach śledzi (*Clupea harengus membras* L.) (2,5–6,5 ng g^{-1} s.m.) odławianych podczas szczególnie intensywnego zakwitu cyjanobakterii w 1997 roku, prawdopodobnie wynikają z innego sposobu odżywiania się tych ryb.

Cyjanobakterie mogą być wyżerane przez zooplankton np. wrotki, pierwotniaki, skorupiaki [121–123]. Większość źródeł literaturowych wskazuje, że mikroorganizmy te jednak rzadko stanowią pokarm planktonowych heterotrofów [124]. Toksyczna nodularyna może być pobierana przez zooplankton bezpośrednio z wody. Dowiedli tego Karjalainen i in. [125] w doświadczeniu na widłonogach *Acartia bifilosa* i *Eurytemora affinis* oraz orzęsku *Strombidium sulcatum*, hodowanych w wodzie morskiej z dodatkiem znakowanej radioaktywnie nodularyny. Kumulacja nodularyny w organizmach zooplanktonowych pozwala sądzić, iż są one istotnym ogniwem w transporcie tej toksyny do organizmów na wyższych poziomach troficznych.

Trudno dziś okreslić, jakie skutki może mieć kumulacja nawet małych ilości nodularyny w tkankach ryb, małży i innych organizmów wodnych. Istnieją doniesienia o masowym śnięciu ryb, związanym z obecnością zakwitu cyjanobakterii [126]. Należy jednak pamiętać, że redukcja populacji ryb podczas intensywnego zakwitu cyjanobakterii może być skutkiem działania innych czynników, takich jak wysokie pH lub niskie stężenie tlenu. Według Fladmarka i in. [127], nodularyna w stężeniu 200–400 nM (0,24–0,48 ng dm^{-3}) powodowała apoptozę hepatocytów łososia. W doświadczeniach *in vitro* hepatocyty łososia wykazywały większą wrażliwość na działanie nodularyny i kwasu okadainowego niż hepatocyty szczura. Wiklund i Bylund [128] zaobserwowali zmiany nowotworowe w komórkach wątroby bałtyckiej storni. Przypuszczalnie zmiany te mogły być zainicjowane działaniem takich hepatotoksyn jak nodularyna czy kwas okadainowy. W latach 1991 i 1992 w Zatoce Fińskiej zanotowano liczne przypadki śmierci fok i ptaków, prawdopodobnie związane z występowaniem toksycznych cyjanobakterii.

Prowadzone badania wskazują, iż poziom nodularyny w rybach jest dla człowieka bezpieczny. Według Światowej Organizacji Zdrowia, dla ludzi o wadze 50 kg codzienna konsumpcja porcji ryb i innych produktów zawierających nie więcej niż 2 µg MC-LR (40 ng kg^{-1} wagi ciała) nie stanowi zagrożenia zdrowia. Ponieważ nodularyna znacznie łatwiej przenika do hepatocytów niż MC-LR, istnieje prawdopodobieństwo, iż dla nodularyny te wartości stężeń są zawyżone.

Dotychczas nie odnotowano żadnych potwierdzonych przypadków zatrucia ludzi związanych z toksycznym zakwitem *N. spumigena*; opublikowano natomiast kilka doniesień o zatruciu zwierząt. Pierwsza naukowa publikacja na ten temat ukazała się w 1878 r. [129]. Opisany w niej incydent ostrego zatrucia i śmierci kilkuset zwierząt, głównie owiec, koni, bydła, psów i świń, miał miejsce w okolicach Jeziora Aleksandrina w południowej Australii, w okresie intensywnego zakwitu *N. spumigena*. Nad tym jeziorem oraz rzeką Murray w Australii do podobnych zdarzeń doszło kilkakrotnie: w latach 70. i 80. dziewiętnastego wieku oraz w latach 90. dwudziestego wieku. Liczne przypadki zatrucia i śmierci psów, kaczek krów korzystających z wody w rejonie toksycznego zakwitu *N. spumigena* zanotowano także w różnych rejonach Morza Bałtyckiego: u wybrzeży Niemiec, Szwecji, Finlandii i Danii [130–131]. Pierwsze objawy, typowe dla zatruć hepatotoksynami (biegunka i wymioty), pojawiały się u zwierząt kilka godzin po kontakcie z cyjanobakteriami. Śmierć następowała w ciągu 1–15 dni. Badania *post mortem* wykazywały w organizmie takie same zmiany jak u myszy, którym podano doustnie lub dootrzewnowo ekstrakt z komórek *N. spumigena* (powiększenie wątroby i krwotok wewnątrzwątrobowy, nekroza hepatocytów, odma płuc, uszkodzenie nerek). Wyliczono, iż zwierzę, które po kąpieli w gęstym kożuchu cyjanobakterii, liże swoją sierść może przełknąć ponad jeden gram toksycznych komórek *N. spumigena*. Tym samym, w jego organizmie znajdzie się około 40-krotnie większa ilość nodularyny, niż wynosi dawka śmiertelna tego związku dla myszy.

3. METODY ANALIZY CYJANOTOKSYN

Istnieje wiele metod biologicznych i fizykochemicznych stosowanych do wykrycia i identyfikacji toksyn cyjanobakterii w wodzie, osadzie i materiale biologicznym. Metody te różnią się pod względem selektywności i czułości; różny jest też stopień ich trudności, czaso- i pracochłonność oraz koszt. Wybór odpowiedniej procedury analitycznej zależy od badanego materiału oraz oczekiwanej informacji np. o toksyczności badanej próbki lub strukturze i stężeniu występujących w niej toksyn.

W metodach biologicznych wykorzystuje się hepatotoksyczne działanie nodularyny i fakt, iż w wątrobie organizmów eukariotycznych toksyna ta wiąże się z fosfatazami białkowymi PP 1 i PP 2A. Przez wiele lat testy na zwierzętach były jedyną metodą określenia toksyczności zakwitu [132]. Do organizmu zwierzęcia, najczęściej dootrzewnowo, wprowadza się 0,1–1,0 cm^3 lizatu z komórek cyjanobakterii rozpuszczonego w soli fizjologicznej. Toksyczność zakwitu określa się na podstawie wartości LD_{50}, czyli ilości suchej masy komórek cyjanobakterii, w przeliczeniu na kg wagi ciała zwierzęcia, która po określonym czasie działania powoduje śmierć 50% badanych osobników. Wysoka dawka hepatotoksyny wywołuje krwotok wewnątrzwątrobowy; śmierć myszy następuje w ciągu 1–3 godzin po podaniu. Myszy poddaje się również badaniom *post mortem*, ze szczególnym uwzględnieniem stanu wątroby i nerek. Ze względów etycznych oraz z powodu wysokiej wartości LOD (granica wykrywalności = 1 $\mu g\ cm^{-3}$), zastosowanie testów przeżywalnościowych na myszach jest ograniczone. W innych testach na toksyczność cyjanobakterii najczęściej wykorzystuje się bezkręgowce wodne (*Artemia salina*, *Daphnia sp.*, *Thamnocephalus platyurus*) oraz bakterie wykazujące bioluminescencję (*Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fisheri*) [133–134]. Niektóre z tych testów są dziś dostępne w postaci gotowych zestawów, co eliminuje problemy związane z hodowlą organizmów testowych i zapewnia ich odpowiednią jakość. Zastosowanie testów na żywych organizmach nie jest jednak powszechne, ponieważ charakteryzują się małą czułością i selektywnością.

Obecnie w analizie peptydowych hepatotoksyn cyjanobakterii powszechnie wykorzystywany jest test immunologiczny ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) oraz test enzymatyczny z zastosowaniem fosfataz białkowych PP 1 i PP 2A [24, 41, 135–136]. Zaletą tych testów jest duża czułość oraz możliwość szybkiej analizy większej ilości próbek. Z tego względu testy te znalazły zastosowanie w monitoringu środowiskowym oraz badaniach jakości wody pitnej, bez konieczności wstępnego przygotowania próbek. Test ELISA pozwala na oznaczenie całkowitego stężenia mikrocystyn i nodularyn w wodzie. Granica wykrywalności w testach z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych wynosi 0,2 $\mu g\ dm^{-3}$, natomiast w przypadku przeciwciał monoklonalnych 0,05 $\mu g\ dm^{-3}$. Powszechnie stosowane są gotowe zestawy testów z mikropłytkami, których dołki opłaszczone są przeciwciałami poliklonalnymi. Oznaczone stężenie związku może jednak odbiegać od rzeczywistego, ze względu na różne powinowactwo toksyn do używanych przeciwciał.

Mikrocystyny i nodularyny ze zmienioną strukturą lub konformacją reszty Adda, np. izomery [(6*Z*)Adda] lub analogi [DMAdda], nie wchodzą w reakcje krzyżowe ze stosowanymi przeciwciałami; również bardziej hydrofobowe mikrocystyny, w których w miejscu Arg występuje tryptofan lub fenyloalanina, wykazują słabe powinowactwo do przeciwciał specyficznych dla MC-LR.

Należy zaznaczyć, iż tworzone w organizmach koniugaty mikrocystyn z glutationem wiążą się przeciwciałami, podobnie jak wolne toksyny. Fakt ten ma istotne znaczenie w analizie całkowitego stężenia peptydowych cyjanotoksyn (wolnych i związanych z GSH) w tkankach organizmów. W teście hamowanie aktywności fosfataz białkowych określa się całkowitą toksycznością mikrocystyn i nodularyn w analizowanej próbce, przy granicy wykrywalności do 300 pg cm^{-3}. W obecności enzymu PP 1 lub PP 2A, zachodzi reakcja defosforylacji barwnego substratu – fosforanu *p*-nitrofenylu (*p*NPP). Peptydowe hepatotoksyny cyjanobakterii hamując aktywność PP, powodują zachowanie grupy fosforanowej w cząsteczce *p*NPP. Na aktywność fosfataz białkowych mają wpływ również inne związki, np. kwas okadainowy i tautomycyna. Ich obecność może być powodem uzyskania zawyżonej wartości stężenia toksyn w analizowanej próbce. Inną przyczyną błędu mogą być endogenne fosfatazy białkowe, które również powodują defosforylację substratu i, tym samym, zaniżają wartość stężenia toksyn. Nie wszystkie mikrocystyny hamują aktywność fosfataz w jednakowym stopniu. Mikrocystyny bez grupy metylowej w reszcie kwasu asparaginowego, [D-Asp^3]MC-LR i [D-Asp^3]MC-RR, są znacznie mniej aktywne [24, 41]. Fosfatazy białkowe PP 1 i PP 2A są również hamowane przez koniugaty mikrocystyn z GSH i Cys, jednak ich aktywność jest słabsza.

Choć testy biochemiczne są cennym narzędziem badań nad toksycznymi zakwitami cyjanobaktrii, ich niezbędnym dopełnieniem są metody chemiczne. Zastosowanie tych metod wymaga jednak wieloetapowej procedury zagęszczania i oczyszczania próbki. Pierwszym etapem analizy nodularyny zawartej w materiale biologicznym jest ekstrakcja związku do rozpuszczalnika; najczęściej metanolu lub jego wodnego roztworu [137–138], 5% kwasu octowego [139] lub mieszaniny woda:metanol:butanol (75:20:5) [140]. W przypadku analizy toksyn w roztworach wodnych, próbka poddana jest ekstrakcji do fazy stałej SPE [141]. Analiza toksyn w uzyskanych ekstraktach prowadzona jest metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC [142], najczęściej z zastosowaniem detektora fotodiodowego. Peptydowe hepatotoksyny cyjanobakterii, mikrocystyny i nodularyny, charakteryzują się widmem absorpcyjnym z maksimum przy długości fali λ_{max} = 238 nm. Gdy jednym z aminokwasów w cząsteczce MC jest tryptofan, dodatkowe maksimum absorpcji występuje przy 222 nm. Dużym utrudnieniem w stosowaniu metod chromatograficznych stanowi brak w sprzedaży wzorców większości toksyn produkowanych przez cyjanobakterie. Aby potwierdzić strukturę związku, niezbędne jest zastosowanie spektrometrii mas MS i spektroskopii NMR. W pierwszym etapie badań nad strukturą toksyn produkowanych przez cyjanobakterie stosowano głównie NMR [10, 143]. W metodzie tej do przeprowadzenia identyfikacji potrzeba jed-

nak dużych ilości (5 mg) czystego związku. Obecnie identyfikacja toksyn cyjanobakterii wykonywana jest przy użyciu chromatografu cieczowego, sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS); metoda ta pozwala na oznaczenie pikogramowych ilości toksyny nanoszonej na kolumnę chromatograficzną. Analiza składu próbki poprzedzona jest rozdziałem związków na kolumnie chromatograficznej, co umożliwia charakterystykę struktury toksyn zawartych w nieoczyszczonym ekstrakcie. Najczęściej stosowanymi metodami jonizacji cząsteczek toksyn jest bombardowanie szybkimi atomami (FAB) [9, 57, 144], rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) [145–146] lub desorpcja laserowa wspomagana matrycą (MALDI) [147]. Jedną z technik stosowanych w spektrometrii mas jest monitorowanie wybranych jonów typowych dla danego związku (SIR); technika ta pozwala na znaczne zwiększenie czułości detekcji. W analizie mikrocystyn i nodularyn z niezmienioną resztą Adda, jonem diagnostycznym jest jon o wartości *m/z* 135, który odpowiada fragmentowi [$PhCH_2CH(OCH_3)$] [148]. Opracowano również metodę analizy całkowitej ilości mikrocystyn i nodularyn w próbce [149–150]. Reszta Adda w cząsteczce wolnej toksyny lub toksyny związanej z białkiem zostaje utleniona do kwasu 2-metylo-3-metoksy-4-fenylomasłowego (MMPB). Powstały produkt reakcji może być następnie analizowany metodą GC-MS, HPLC z detektorem fluorescencyjnym lub LC-MS. Metoda ta znalazła zastosowanie w identyfikacji składników mieszanin o nieznanym składzie jakościowym.

PODZIĘKOWANIE

Praca była częściowo finansowana z grantu BW Uniwersytetu Gdańskiego (BW-1320-5-0080-6).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] T. Kuiper-Goodman, I.R. Falconer, J. Fitzgerald, [w:] *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, red. I. Chorus, J. Bartram, E. & F.N. Spon, London-New York, 1999, s. 41–111.

[2] I.R. Falconer, [w:] *Cyanobacterial toxins of drinking waters supplies*, CRC Press, London, 2005.

[3] G.A. Codd, S.G. Bell, K. Kaya, C.J. Ward, K.A. Beattie, J.S. Metcalf, Eur. J. Phycol., 1999, **34**, 405.

[4] I.R. Falconer, J. Bartram, I. Chorus I., T. Kuiper-Goodman, H. Utkilen, M. Burch, G.A. Codd, [w:] *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, red. I. Chorus, J. Bartram, E. & F.N. Spon, London-New York, 1999, s. 41–111.

[5] A.M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J.G. Burgess, P.C. Wright, Tetrahedron, 2001, **57**, 9347.

[6] B.A. Neilan, E. Dittmann, L. Rouhiainen, R.A. Bass, V. Schaub, K. Sivonen, T. Bomer, J. Bacterial., 1998, **181**, 4089.

[7] D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. Döhren, T. Börner, B.A. Neilan, Chem. Biol., 2000, **7**, 753.

[8] K.L. Rinehart, K. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C.E. Harris, M.H.G. Munro J.W. Blunt, P.E. Mulligan, V.R. Beasley, A.M. Dahlem, W.W. Carmichael, J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 8557.
[9] K.L. Reinehart, M. Namikoshi, B.W. Choi, J. Appl. Phycol., 1994, **6**, 159.
[10] D. P. Botes, A.A. Tuinman, P.L. Wessels, C.C. Viljoen, H. Kruger, D.H. Williams, S. Santikarn, E.J. Smith, S.J. Hammond, J. Chem. Soc. PerkinTrans., 1984, **1**, 2311.
[11] K. Sivonen, G. Jones, [w:] *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, red. I. Chorus, J. Bartram, E. & F.N. Spon, London-New York, 1999, s. 41–111.
[12] L. Shi, W.W. Carmichael, I. Miller, Arch. Microbiol., 1995, **163**, 7.
[13] L. Spoof, [w:] *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin*, red. J. Meriluoto, G.A. Codd, Abo, 2005, s. 1–149.
[14] M.T.C. Runnegar, R.G. Gerdes, I.R. Falconer, Toxicon, 1991, **29**, 43.
[15] I.R. Falconer, A.R. Humpage, Phycologia, 1996, **35**, 74.
[16] T. Ohta, E. Sueoka, N. Iida, A. Komori, M. Suganuma, R. Nishiwaki, M. Tatematsu, S.J. Kim, W.W. Carmichael, H. Fujiki, Cancer Res., 1994, **54**, 6402.
[17] C. Mackintosh, K.A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, G.A. Codd, FEBS Letters, 1990, **264**, 187.
[18] I.R. Falconer, M. Runnegar, T. Buckley, V. Heyn, P. Bradshaw, J. Am. Water Works, 1989, **81**, 1021.
[19] S. Yoshizawa, R. Matsushima, M.F. Watanabe, K.I. Harada, A. Ichihara, W.W. Carmichael, H. Fujiki, J.Cancer Res. Clin. Oncol., 1990, **116**, 609.
[20] A. Lankoff, A. Banasik, M. Nowak, Arch. Toxicol., 2002, **76**, 158.
[21] N. Bouaicha, I. Maatouk, Tox. Let., 2004, **148**, 53.
[22] J. Goldberg, H.B. Huang, Y.G. Kwon, P. Greengard, A.C. Nairn, J. Kuriyan, Nature, 995, **376**, 745.
[23] K.I. Harada, S. Imanishi, H. Kato, M. Mizuno, E. Ito, K. Tsuji, Toxicon, 2004, **44**, 107.
[24] J. An, W.W. Carmichael, Toxicon, 1994, **32**, 1495.
[25] F.H., Kondo, H. Matsumoto, S. Yamada, N. Ishikawa, E. Ito, S. Nagata, Y. Ueno, M. Suzuki, K.I. Harada, Chem. Res. Toxicol., 1996, **9**, 1355.
[26] J.P. Devlin, O.E. Edwards, P.R. Gorham, M.R. Hunter, R.K. Pike, B. Stavric, Canad. J. Chem., 1977, **55**, 1367.
[27] S. Haider, V. Naithani, P.N. Viswanathan, P. Kakkar, Chemosphere, 2003, **52**, 1.
[28] O.M. Skulberg, W.W. Carmichael, R.A. Anderson, S. Matsunaga, R.E. Moore, R. Skulberg, Environ. Toxicol. Chem. 1992, **11**, 321.
[29] F.M.B. Ferreira, J.M.F. Soler, M.L. Fidalgo, P. Fernandez-Vila, Toxicon, 2001, **39**, 757.
[30] A.R. Humpage, J. Rositano, A.H. Bretag, R. Brown, P.D. Baker, B.C. Nicholson, D.A. Steffensen, J. Mar. Freshwater Res., 1994, **45**, 761.
[31] C.S. Dow, U.K. Swoboda, [w:] *The ecology of cyanobacteria*, red. B.A. Whitton & M.Potts, Kluwer Academic Publishers, 2000, 613.
[32] P.A. Cox, S.A. Banack, S.J. Murch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, **100**, 13380
[33] A. Vega, A. Bell, Phytochemistry, 1967, **6**, 759.
[34] P. Spencer, P. Nunn, J. Hugon, A. Ludolph, D. Roy, Lancet, 1986, **1**, 965.
[35] M.W. Duncan, N.E. Villacreses, P.G. Pearson, L. Watt, S.I. Rapoport, I.J. Kopin, S.P. Markey, Q.R. Smith, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1991, **258**, 27.
[36] P.A. Cox, S.A. Banack, S.J. Murch, U. Rasmussen, G. Tien, R.R. Bidigare, J.S. Matclaf, L.F. Morrison, G.A. Codd, B. Bergman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, **102**, 5074.
[37] D.J. Griffiths, M.L. Saker, Environ. Toxicol., 2003, **18**, 78.
[38] A.R. Humpage, I.R. Falconer, Environ. Toxicol., 2003, **19**, 94.
[39] N.J.T. Osborne, P.M. Webb, G.R. Shaw, Environ. International, 2001, **27**, 381.

[40] J.H. Best, S. Pflugmacher, C. Wiegand, F.B. Eddy, J.S. Metcalf, G. Codd, Aquatic Toxicol, 2002, **60**, 223.
[41] J. Rapala, K. Lahti, L.A. Rasanen, A.L. Esala, S.I. Niemela, K.Sivonen, Wat. Res., 2002, **36**, 2627.
[42] M. Pliński, T. Jóźwiak, [w:] B.A. Whitton, M. Potts (red.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1996, 549.
[43] T.S. Bianchi, E. Engelhaupt, P. Westman, T. Andrén, C. Rolff, R. Elmgren, Limnol. Oceanogr., 2000, **45**, 716.
[44] T. Finni, K. Kononen, R. Olsonen, K. Wallström, Ambio, 2001, **30**, 172.
[45] L.J. Stal, P. Albertano, B. Bergman, K. von Bröcel, J.R. Gallon, P.K. Hayes, K. Sivonen, A.E. Walsby, Cont. Shelf Res., 2003, **23**, 1695.
[46] H. Mazur, M. Pliński, Oceanologia, 2003, **45**, 305.
[47] H. Mazur-Marzec, Oceanologia, 2006, **48**, 1.
[48] I.R. Falconer, Phycologia, 2001, **40**, 228.
[49] T. Heresztyn, B.C. Nicholson, Environ. Toxicol. Wat. Qual., 1997, **12**, 273.
[50] W.W. Carmichael, J.T. Eschedor, G.M.L. Patterson, R.E. Moore, Environ. Microbiol., 1988, **54**, 2257.
[51] W.R. Harding, N. Rowe, J.C. Wessels, K.A. Beattie, G.A. Codd, J. of the SAVA, 1995, **66**, 256.
[52] G.J. Jones, S.I. Blackburn, N.S.Parker, Australian J. of Marine Freshwater Res., 1994, **45**, 787.
[53] D.L. Galat, J.P., Verdin, L.L. Sims, Hydrobiol., 1990, **197**, 147.
[54] M. Hansson, SMHI - Swedish Meteorol. Hydrol. Inst. Rep. Hydrol., 2006, **82**, 38.
[55] K. Sivonen, K. Kononen, W.W. Carmichael, A.M. Dahlem, K.L. Rinehart, J. Kiviranta, I. Niemelä, Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 1990.
[56] A. Sandstrom, C.Glemarec, J.A.O. Meriluoto, J.E. Eriksson, Toxicon, 1990, **28**, 535.
[57] M. Namikoshi, B.W. Choi, R. Sakai, F. Sun, K.L. Rinehart, W.W. Carmichael, W.R. Evans, P. Cruz, M.H.G. Munro, J.W. Blunt, J. Org. Chem., 1994, **59**, 2349.
[58] K. Karlsson, V. Sipiä, H. Kankaanpää, J. Meriluoto J., J. Chromatogr. B., 2003, **784**, 243.
[59] H. Mazur-Marzec, J. Meriluoto, M. Pliński, J. Szafranek, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006, **20**, 2023.
[60] K. Tsuji, S. Nalto, F. Kondo, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Suzuki, K.I. Harada, Environ. Sci. Technol., 1994, **28**, 173.
[61] K. Tsuji, T. Watanuki, F. Kondo, M.F. Watanabe, S. Susuki, H. Uchida, K.I. Harada, Toxicon, 1995, **32**, 1619.
[62] H. Twist, G.A. Codd, FEMS Microbiol. Lett., 1997, **151**, 83.
[63] H. Mazur-Marzec, J. Meriluoto, M. Pliński, Chemosphere, 2006, **65**, 1388.
[64] K.A. Beattie, Phytochemistry, 2000, **54**, 57.
[65] K. Saito, A. Konno, H. Ishii, H. Saito, F. Nishida, T. Abe, Ch. Chen, Nat. Prod., 2001, **64**, 139.
[66] E.D. DeSilva, D.E. Williams, R.J., Andersen, H. Klix, C.F.B. Holmes, T.M. Allen, Tetrahedron Letters, 1992, **33**, 1561.
[67] L. Spoof, S. Klimova, A. Mikhailov, J.E. Eriksson, Toxicon, 2003, **41**, 153.
[68] A. Annila, J. Lehtimaki, K. Mattila, J.E. Eriksson, K. Sivonen, T. T. Rantala, T. Drakenberg, J. Biol. Chem., 1996, **271**, 16695.
[69] K. Kononen, K. Sivonen, J. Lehtimaki, *Toxicity of phytoplankton blooms in the Gulf of Finland and Gulf of Bothnia, Baltic Sea*, [w:] *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, T.J. Smayda & Y. Shimizu red., Elsevier Sciences Publishers B.V., 1992, 269.
[70] H.T. Kankaanpää, V.O. Sipiä, J.S. Kuparinen, J.L. Ott, W.W. Carmichael, Phycologia, 2001, **40**, 268.
[71] J. Lehtimäki, P. Moisander, K. Sivonen, K. Kononen K., Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**, 1647.

[72] G.J. Jones, P.T. Orr, Wat. Res., 1994, **28**, 871.
[73] K. Lahti, J. Rapala, M. Färdig, K. Niemelä, K. Sivonen, Wat. Res., 1997, **31**, 1005.
[74] H. Mazur, M. Pliński, Oceanologia, 2001, **43**, 329
[75] K. Kaya, T. Sano, Anal. Chim. Acta., 1997, **386**, 107.
[76] I. Liu, L.A. Lawton, P.K. Robertson, Environ. Sci. Technol., 2003, **37**, 3214.
[77] I. Liu, L.A. Lawton, D.W. Bahnemann, P.K.J. Robertson, Appl. Catal. B, 2005, **60**, 245.
[78] T.P.J. Kull, P.H. Backlund, K.M. Karlsson, J.A.O. Meriluoto, Environ. Sci. Technol., 2004, **38**, 6025.
[79] G.S. Shephard, S. Stockenstrom, D. De Villiers, W.J. Engelbrecht, E.W. Sydenham, G.F.S. Wessels, Toxicon, 1998, **36**, 1895.
[80] I. Liu, L.A. Lawton, B. Cornish, P.K.J. Robertson, J. Photoch. Photobio. A, 2002, **148**, 349.
[81] D.G. Bourne, G.J. Jones, R.L. Blakeley, A. Jones, A.P. Negri, P. Riddles P., Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**, 4086.
[82] I.T. Cousins, D.J. Bealing, H.A. James, A. Sutton, Wat.Res., 1996, **30**, 481.
[83] H.D. Park, Y. Sasakum Y, T. Maruyama, E. Yanagisawa, A. Hiraishi, K. Kato, Environ. Toxic., 2001, **16**, 337.
[84] K. Christoffersen, S. Lyck, A. Winding, Aquat. Microb. Ecol., 2002, **27**, 125.
[85] H. Ishii, M. Nishijima, T. Abe, Wat. Res., 2004, **38**, 2667.
[86] T. Holst, N.O.G. Jorgensen, C. Jorgensen, A. Johansen A., Wat. Res., 2003, **37**, 4748.
[87] L. Ho, T. Meyn, A. Keegan, D. Hoefel, J. Brookes, C.P. Saint, G. Newcombe, Wat. Res., 2006, **40**, 768.
[88] P.S. Salomon, S. Janson, E. Graneli, Harmful Algae, 2003, **2**, 261.
[89] A. Hangstrom, F. Azam, A. Andersson, J. Wikner, Mar. Ecol. Prog. Ser, 1988, **49**, 171.
[90] A.K. Sallal, Microbios., 1994, **77**, 57.
[91] M.P. Manage, Z. Kawabata, S. Nakano, Aquat. Microb. Ecol., 2000, **22**, 111.
[92] M. Shilo, J. Bacteriol., 1970, **104**, 453.
[93] D.G. Bourne, P. Riddles, G.J. Jones, W. Smith, R.L. Blakeley, Environ. Toxic., 2001, **16**, 523.
[94] P. Hyenstrand, T. Rohrlack, K.A. Beattie, J.F. Metcalf, G.A. Codd, K. Christoffersen,Wat. Res., 2003, **37**, 3299.
[95] T. Saito, K. Okano, H.D. Park, T. Itiyama, Y. Inamori, B. Neilan, B.P. Burns, N. Sugiura, FEMS Microbiol. Lett., 2003, **229**, 271.
[96] S. Takenaka, M.F. Watanabe, Chemosphere, 1997, **34**, 749.
[97] S. Imanishi, H. Kato, M. Mizuno, K. Tsuji, K. Harada, Chem. Res. Toxicol., 2005, **18**, 591.
[98] A. M. Valeria, E.J. Ricardo, S. Plugmacher, D.A. Wunderlin, Biodegradation, 2006, **17**, 447.
[99] S. Takenaka, Chemosphere, 1998, **36**, 2277.
[100] H. Mazur-Marzec, A. Tymińska, J. Szafranek, J. Kobos, Environ. Toxicol., 2007, **22**, 101–111.
[101] K. Tsuji, M. Asakawa, Y. Anzai, T. Humino, K. Harada, Chemosphere, 2006, **65**, 117.
[102] D.G. Bourne, R.I. Blakeley, P. Riddles, G.J. Jones, Wat.Res., 2006, **40**, 1294.
[103] R.J. Morris, D.E. Williams, H.A. Luu, C.F.B. Holmes, R.J. Andersen, S.E. Calvert, Toxicon, 2000, **38**, 303.
[104] S.M. Libes, [w:] *An introduction to marine biogeochemistry*, John Wiley and Sons, 1992.
[105] K. Tsuji, H. Masui, H. Uemura, Y. Mori, K. Harada, Toxicon, 2001, **39**, 687.
[106] M.J. Miller, M. M. Critchleym, J. Hutson, Fallowfield, Wat. Res., 2001, **35**, 1461.
[107] G. Grützmacher, G. Böttcher G, I. Chorus, H. Bartel, Toxicol., 2002, **17**, 386.
[108] F.J. Stevenson, Journal of Environmental Quality, 1972, **1**, 333.
[109] F. Worall, M. Fernandez-Perez, A.C. Johnson A.C., F. Flores Cesperedes, E. Gonzales Pradas E., J. Contam. Hydrol., 2001, **49**, 262.
[110] P.J. Dillon, M. Miller, A. Fallowfield, J. Hutson, J. Hydrol., 2002, **266**, 209.

[111] X Zang., J.D.H. van Heemst, K.J. Dria, P.G. Hatcher, Organic Geochemistry, 2000, **31**, 679.
[112] R.T. Nguyen, H.R. Harvey, Geochim. Cosmochim. Acta, 2001, **65**, 1467.
[113] I.R. Falconer, A. Choice, W. Hosja, Environ. Toxicol Water Qual, 1992, **7**, 119.
[114] P.G. Van Buynder, T. Oughtred, B. Kirkby, S. Phillips, G. Eaglesham, K. Thomas, M. Burch, Environ. Toxicol, 2001, **16**, 468.
[115] V.O. Sipiä, H. Kankaanpää, J. Flinkman, K. Lahti, J.A.O. Meriluoto, Environ. Toxicol., 2001, **16**, 330.
[116] V.O. Sipia, H.T. Kankaanpää, S. Pflugmacher, J. Flinkman, A. Furey, K.J. James, Ecotox. Environ. Safe., 2002, **53**, 305.
[117] H. Kankanpaa, A.K. Turnen, K. Karlsson, G. Bylund, J. Meriluoto, V. Sipia, Chemosphere, 2005, **59**, 1091.
[118] J.S. Metcalf, K.A. Beattie, S. Pflugmacher, G.A. Codd, FEMS Microbiol. Lett., 2000, **189**, 155.
[119] C. Wiegand, S. Pflugmacher, A. Oberemm, N. Meems, K.A. Beattie, C.E.W. Steinberg, G.A. Codd, Environ. Toxicol., 1999, **14**, 89.
[120] K.K. Lehtonen, H. Kankaanpää, S. Leiniö, V.O. Sipiä, S. Pflugmacher, E. Sandberg-Kilpi, Aquat. Toxicol., 2003, **64**, 461.
[121] J. Engström, M. Koski, M. Viitasalo, M. Reinikainen, S. Repka, K. Sivonen, J. Plankton Res., 2000, **22**, 1403.
[122] M. Viherluoto, H. Kuosa, J. Flinkman, M. Viitasalo, Mar. Biol., 2000, **136**, 553.
[123] P.J. Obersholter, A.M. Botha, T.E. Cloete, Harmful Algae, 2006, w druku.
[124] W. Lampert, Ver. Int. Verein. Limnol., 1981 b, **21**, 1436.
[125] M. Karialainen, M. Reinikainen, F. Lindvall, L. Spoof, J.A.O. Meriluoto, [w:] *Finish Institute of Marine Research*, Finland, Helsinki, 2005, 52.
[126] H.D. Rodger, T. Turnbull, C. Edwards, G.A. Codd, J. Fish Dis., 1994, **17**, 177.
[127] K.E. Fledmark, M. Serres, N. Larsen, T. Yasumoto, T. Aune, S. Doskeland, Toxicon, 1998, **36**, 1101.
[128] T. Wiklund, G. Bylund, BMB Publ., 1994, **15**, 49.
[129] G. Francis G., Nature, 1878, **18**, 11.
[130] L. Edler, S. Ferno, M.G. Lind, R. Lundberg, P.O. Nilsson, Ophelia, 1985, **24**, 103.
[131] S. Nehring, J. Plankton Res., 1993, **15**, 867.
[132] V.R. Beasley, A.M. Dahlem, W.O. Cook, W.M. Valentine, R.A. Lovell, S.B. Hooser, K.I. Harada, M. Suzuki, W.W. Carmichael, J.Vet.Diagn.Invest., 1989, **1**, 359.
[133] M. Tarczyńska, G. Nałęcz-Jawecki, M. Brzychcy, M. Zalewski, J. Sawicka, [w:] Persoone G, red., *New Microbiotests four routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic, New York, 2000, 527.
[134] B. Maršálek, L. Bláha, Environ. Toxicol., 2004, **19**, 310.
[135] F.S. Chu, X. Huang, R.D. Wei, W.W. Carmichael, Appl. Environ. Microbiol., 1989, **55**, 1928.
[136] C.J. Ward, K.A. Beattie, E.Y.C. Lee, G.A. Codd, FEMS Microbiol. Lett. 1997, **153**, 465.
[137] L.A. Lawton, C. Edwards, G.A. Codd, Analyst, 1994, **119**, 1525.
[138] J. Fastner, I. Flieger, U. Neumann, Water Res., 1998, **32**, 3177.
[139] K.I. Harada, K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahlem, V.R. Beasley, W.W. Carmichael, J. Chromatogr., 1988, **448**, 275.
[140] J.A.O. Meriluoto, J.E. Eriksson, J. Chromatogr., 1988, **438**, 93.
[141] S.M. Coyle, L.A. Lawton, Phycologia, 1996, **35**, 57.
[142] J.A.O. Meriluoto, Analyt. Chim. Acta, 1997, **352**, 277.
[143] T. Kusumi, M.F. Watanabe, K.I. Harada, W.W. Carmichael, H. Fujiki [wyd]: *Toxic Microcystis*, CRC Press, London, 1996, 149.

[144] F. Kondo, Y. Ikai, H. Oka, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Watanabe, K.I. Harada, M. Suzuki, Toxicon, 1992, **30**, 227.
[145] L. Zhang, X. Ping, Z. Yang, Talanta, 2004, **62**, 193.
[146] M. Maizels, W. Budde, Anal. Chem., 2004, **76**, 1342.
[147] M. Welker, J. Fastner, M. Erhard, H. Döhren, Environ. Toxicol., 2002, **17**, 367.
[148] C. Edwards, L.A. Lawton, K.A. Beattie, G.A. Codd, S. Pleasance, G.J. Dear, Rapid Commun. Mass Spectrom., 1993, **7**, 714.
[149] T. Sano, K. Nohara, F. Shiraishi, K. Kaya, J. Environ. Anal. Chem., 1992, **49**, 163.
[150] K. Kaya, T. Sano, Anal. Chim. Acta., 1999, **386**, 107.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 grudnia 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

ELEKTROGENEROWANA CHEMILUMINESCENCJA KOMPLEKSÓW LANTANOWCÓW(III) NA ELEKTRODZIE Al/Al_2O_3

ELECTROGENERATED CHEMILUMINESCENCE OF LANTHANIDE(III) COMPLEXES AT Al/Al_2O_3 ELECTRODE

Krzysztof Staninski, Stefan Lis

Zakład Ziem Rzadkich, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

Abstract
Wstęp
1. Elektrochemiluminescencja
2. Aparatura badawcza
3. Charakterystyka elektrody Al/Al_2O_3
4. Badanie kompleksów jonów Ln(III) na elektrodzie Al/Al_2O_3
5. ECL w układach z kompleksami dijądrowymi
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Krzysztof Staninski ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 1990 r. Pracę doktorską pt. „Zastosowanie jonów Eu(II)/Eu(III) jako sondy chemiluminescencyjnej w badaniach związków makrocyklicznych oraz układów biologicznych" obronił w 1997 r. Obecnie zatrudniony jest w Zakładzie Ziem Rzadkich Wydziału Chemii UAM w Poznaniu. Zainteresowania naukowe dr Krzysztofa Staninskiego skupiają się wokół zagadnień fizykochemicznych właściwości kompleksów lantanowców z podkreśleniem ich roli w elektrogenerowanej luminescencji w roztworach. Dotychczasowe badania naukowe związane były głównie z chemi- i elektrochemiluminescencją kompleksów Tb(III), Eu(III), Dy(III) i Sm(III) stanowiącymi sondy spektroskopowe, umożliwiające przeprowadzenia oceny niektórych zjawisk zachodzących w ligandach, takich jak koronandy, kryptandy, wybrane grupy porfiryn, zasady Schiffa i aromatyczne pochodne kwasów aminopolikarboksylowych. Dr Krzysztof Staninski jest współautorem 21 prac naukowych.

Stefan Lis jest profesorem zwyczajnym i kierownikiem Zakładu Ziem Rzadkich na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra uzyskał w 1976 r., doktora – 1986, dr habil. – 1995, prof. UAM – 1997, a tytuł profesora – w 2003 na Wydziale Chemii UAM.

Jego zainteresowania naukowe obejmują szeroko rozumianą fizykochemię nieorganiczną, analityczną i koordynacyjną oraz spektroskopię pierwiastków ziem rzadkich. W szczególności dotyczą badania właściwości emisyjnych (fotoluminescencja, chemiluminescencja i elektrochemiluminescencja) kompleksów (z różnorodnymi grupami ligandów organicznych i heteropolianionów skondensowanych) trójdodatnich jonów lantanowców, Ln(III), w roztworze, fazie stałej i materiałach kserożelowych. Badania te są wykorzystywane do określania koordynacji lantanowców, ustalania mechanizmów procesów fotofizycznych oraz w aplikacjach materiałowych i analitycznych.

Współpracuje naukowo z zagranicznymi grupami badawczymi w USA, Japonii, Niemczech, Belgii, Izraelu, Francji i Republice Czeskiej.

Jest autorem lub współautorem 124 prac naukowych, ogłoszonych prawie wyłącznie w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, 4 patentów oraz ponad 230 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Wygłosił 44 wykłady na konferencjach międzynarodowych lub na zaproszenie w naukowych ośrodkach zagranicznych.

ABSTRACT

The aim of this review is to evaluate the electrochemiluminescence (ECL), both, as a method of light emission in certain types of lanthanide complexes by generating species capable of forming excited states, and for its potential use in analytical applications. The electrogenerated ECL in aqueous electrolyte solutions containing organic compounds having structural fragments such as carbonyl groups and conjugated double bonds and an oxide covered aluminum electrode doped with Ln(III) is reported. This specific electrogenerated luminescence can be achieved by producing highly oxidizing and reducing species as: hydrated electrons, hydroxyl and sulfate radicals. Such strong reactants efficiently excite the complexed lanthanide(III) ions [mainly Tb(III) and Dy(III)] by ligand to metal energy transfer, LMET.

The experimental setup for ECL measurements (constructed in the Department of Rare Earths, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University) is introduced. The ECL generated with aluminium electrodes having chelated lanthanide(III) complexes-doped in their thin oxide coatings is studied following cathodic pulse polarization. The ECL mechanisms induced by hot-electrons leading to the production of light at or near the electrode surface by generating species capable of forming excited states of organic ligands are described.

Keywords: electrochemiluminescence, lanthanide complexes, energy transfer

Słowa kluczowe: elektrochemiluminescencja, kompleksy lantanowców, przeniesienie energii

WSTĘP

Spośród zjawisk świecenia ciał wywołanych innymi czynnikami niż podniesienie temperatury najważniejszą rolę odgrywają foto-, elektro- i chemiluminescencja. Różnice między nimi ograniczają się do sposobu generowania stanów wzbudzonych cząsteczek zdolnych do luminescencji.

W procesie fotoluminescencji pierwotnym źródłem energii są kwanty światła oddziaływujące z materią, zaś w pozostałych dwóch przypadkach jest to pole elektryczne lub specyficzna reakcja chemiczna. Typowa elektroluminescencja jest wynikiem rekombinacji nośników ładunków w półprzewodzących cienkich warstwach luminoforów, natomiast obraz chemicznie generowanej emisji jest bardziej złożony i wymaga spełnienia szeregu istotnych warunków. Wśród nich jest między innymi obecność w układzie reakcyjnym cząsteczek zdolnych do luminescencji, odpowiednio krótki czas wyzwolenia energii (10^{-12} s) oraz jej wartość (nie może być mniejsza niż suma entalpii reakcji i energii aktywacji).

Szczególne miejsce wśród chemicznych źródeł światła zajmują układy biologiczne, będące źródłem dostrzegalnego gołym okiem świecenia niektórych zwierząt i roślin, powstającego w reakcjach enzymatycznego utleniania specyficznych substratów tlenem cząsteczkowym w obecności enzymów.

Zastosowanie elektrycznej metody generowania reagentów w metodzie chemiluminescencji dało w efekcie znakomite narzędzie badawcze, łączące w sobie łatwość kontrolowania procesu z dużą czułością i efektywnością emisji. Różnorodność zastosowań elektrogenerowanej chemiluminescencji stawia tę metodę w szeregu najbardziej informatywnych metod badawczych, zarówno w sensie poznawczym, jak i aplikacyjnym.

1. ELEKTROCHEMILUMINESCENCJA

Zjawisko elektrogenerowanej chemiluminescencji (ECL) polega na emisji światła z powierzchni elektrod lub w bezpośrednim ich sąsiedztwie, wskutek rekombinacji elektrochemicznie generowanych, aktywnych produktów, tworzących się w wyniku reakcji redoks. Podstawą tych przemian są energetyczne procesy przeniesienia elektronu między reagentami, najczęściej aniono- i kationorodnikami $A^{\bullet-}$ i $D^{\bullet+}$, utworzenie stanu wzbudzonego oraz jego promienista dezaktywacja [1, 2]:

$$A + e^- \rightarrow A^{\bullet-}$$

$$D - e^- \rightarrow D^{\bullet+}$$

$$A^{\bullet-} + D^{\bullet+} \rightarrow A + D^*$$

$$D^* \rightarrow D + h\nu$$

Alternatywną metodą generowania ECL jest wprowadzenie do układu koreaktantów, takich jak szczawiany lub nadtlenodisiarczany, które ulegając elektrodowym procesom redoks, są źródłem silnych utleniaczy lub reduktorów biorących udział w procesach wzbudzania cząsteczek luminoforów obecnych w roztworze:

$$A + e^- \rightarrow A^{\bullet-}$$

$$S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\bullet-}$$

$$A^{\bullet-} + SO_4^{\bullet-} \rightarrow A^* + SO_4^{2-}$$

$$A^* \rightarrow A + h\nu$$

Rodniki siarczanowe są szczególnie korzystne w roztworach wodnych, wykazują bowiem niską reaktywność w stosunku do wody ($k(SO_4^{\bullet-} + H_2O) < 60\ dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$). Niezależnie od badań koncentrujących się na mechanizmie i naturze ECL, szczególnie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i kompleksów metali, metoda ta znalazła liczne zastosowania analityczne jako wyjątkowo czuła i selektywna [3–6].

W stosunku do metod fotoluminescencyjnych, brak wzbudzającego źródła światła znacznie upraszcza procedurę pomiarową i ogranicza niezbędne instrumentarium, co z kolei czyni ją bardziej atrakcyjną pod względem ekonomicznym.

Wzbudzenie elektrochemiczne emisji światła pomaga w dużym stopniu w kontroli przebiegu procesu, a możliwość regulacji przyłożonego potencjału umożliwia zwiększenie selektywności danej metody.

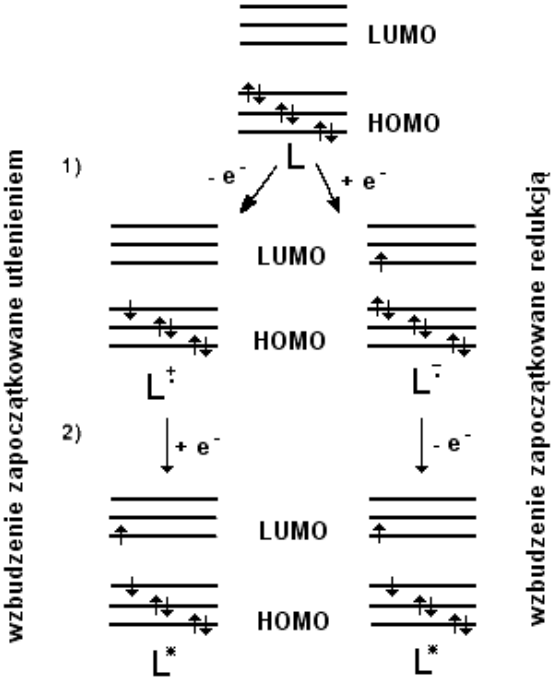
Kompleksy jonów metali, a w zwłaszcza kompleks $Ru(bpy)_3^{2+}$, odegrały znaczącą rolę w osiągnięciu przez elektrochemiluminescencję statusu jednej z najbardziej znaczących technik analitycznych, a także w badaniach farmakologicznych, diagnostyce klinicznej oraz ochronie środowiska [1, 7, 8]. Niebagatelne znaczenie aplikacyjne znajdują również szeroko zakrojone badania ECL kompleksów osmu [9], irydu [10, 11] i renu, między innymi ze względu na wysoką wydajność emisji oraz dużą stabilność i trwałość fotochemiczną.

Specyficzne właściwości koordynacyjne i spektroskopowe kompleksów jonów lantanowców(III) [12–14], takie jak: wysokie wydajności kwantowe luminescencji roztworów wodnych niektórych chelatów lantanowców, stosunkowo długie czasy życia ich stanów wzbudzonych oraz charakterystyczne, wąskie pasma emisji stanowią o atrakcyjności tych związków w badaniach elektroluminescencyjnych. Pierwsze badania ECL podwójnych i potrójnych kompleksów jonów Eu(III) [15, 16] wykazały możliwość pośredniego wzbudzania jonu centralnego na drodze elektrochemicznej.

ECL w klasycznym układzie niereaktywnych elektrod metalicznych, w roztworach zawierających kompleksy lantanowców przebiega inaczej niż w przypadku kompleksów metali przejściowych i jest efektem wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia energii od wzbudzonego elektrochemicznie liganda do jonu Ln(III). Jed-

nak intensywność emisji w takich układach jest o kilka rzędów niższa niż w układach np. z $Ru(bpy)_3^{2+}$, co poważnie ogranicza ich zastosowanie w celach analitycznych [17].

Elektrochemiczne wzbudzenie liganda (lub kompleksu), zależnie od jego natury i warunków eksperymentu, może przebiegać na drodze utleniania–redukcji lub redukcji–utlenienia (Rys. 1). Jednoelektronowe reakcje redoks mogą generować takie same stany wzbudzone, jakie zapewnia fotowzbudzenie cząsteczki, jonu lub kompleksu. W procesie utlenienia–redukcji elektron jest w pierwszej kolejności usuwany z najwyżej obsadzonego orbitalu molekularnego związku (lub odpowiednio z obsadzonego poziomu jonu metalu). Jeżeli poziomy energetyczne najniższego nieobsadzonego orbitalu formy utlenionej cząsteczki i reduktora są odpowiednio dopasowane, elektron może być wprowadzony na najniższy, nieobsadzony orbital (LUMO), co powoduje utworzenie produktu w stanie wzbudzonym. Analogicznie, na drodze redukcji–utlenienia, właściwości utleniacza w etapie drugim decydują o powstaniu produktu w stanie podstawowym lub wzbudzonym.



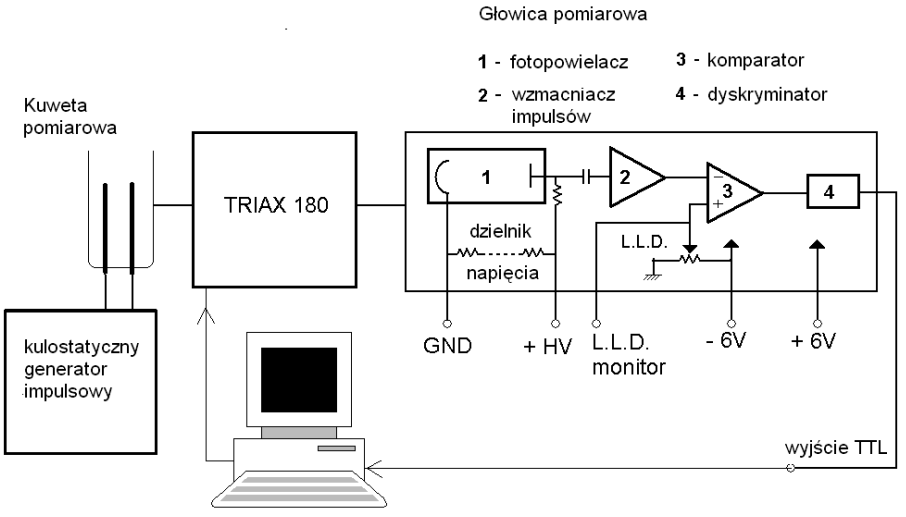
Rysunek 1. Schemat poziomów energetycznych luminoforu L wzbudzanego w procesie utleniania–redukcji i redukcji–utlenienia

W dalszym etapie relaksacja stanów wzbudzonych cząsteczki organicznej przebiega analogicznie jak w przypadku klasycznej fotoluminescencji, tzn. poprzez dezaktywację stanów singletowych lub trypletowych, jak również przez promieniste

lub bezpromieniste przekazanie energii do centrum emisyjnego w kompleksach jonów metali.

2. APARATURA BADAWCZA

W badaniach elektrogenerowanej chemiluminescencji wykorzystano układ pomiarowy w całości skonstruowany w Zakładzie Ziem Rzadkich Wydziału Chemii UAM (Rys. 2) [18].



Rysunek 2. Zestaw pomiarowy do detekcji ECL pracujący metodą zliczania pojedynczych fotonów

Zestaw ten ma budowę modułową, umożliwiającą prowadzenie badań chemiluminescencji i elektroluminescencji zarówno w ciele stałym, jak i w roztworze. Kwarcowa kuweta pomiarowa, umieszczona w światłoszczelnej komorze pomiarowej przed szczeliną wejściową monochromatora, jest w przypadku badań ECL połączona z kulostatycznym generatorem impulsów prostokątnych o pełnej regulacji ich kształtu i przebiegu w zakresie częstotliwości 1–90 Hz, i amplitudy 1–70 V. Monochromator TRIAX 180, umożliwia rejestrowanie widm emisyjnych o rozdzielczości do 0,1 nm w zakresie 190–800 nm (uwzględniając czułość modułu detekcyjnego). Detekcja i obróbka sygnałów pomiarowych odbywa się przy użyciu standardowej karty licznikowej zamontowanej w komputerze PC.

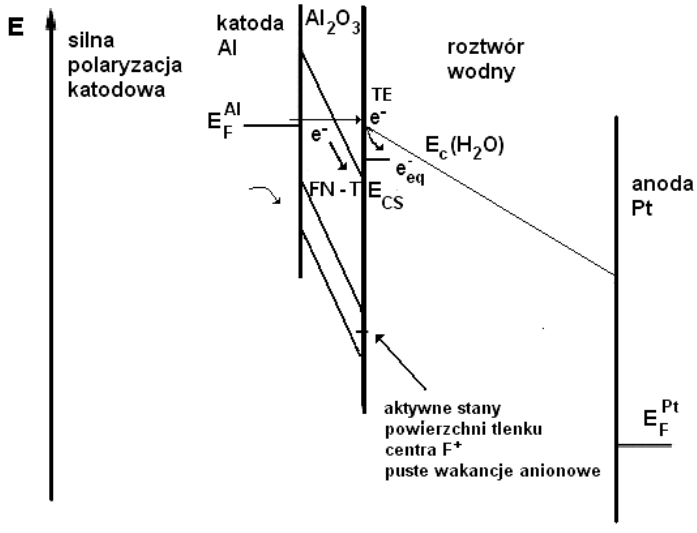
Układ generowania ECL pracuje w systemie dwuelektrodowym, w którym katodą (elektrodą czynną) jest stacjonarna elektroda glinowa (Al: 99,999%), pokryta naturalną warstwą tlenku, a anodą drut platynowy o średnicy 0,2 mm.

Do testowania optymalnych warunków pracy elektrody glinowej wybrano luminol, będący łatwo utlenialnym reagentem o dużej wydajności kwantowej chemiluminescencji. Pomiar ECL przeprowadzony w roztworach o różnych wartościach pH wykazał dużą stabilność wskazań i jednocześnie wysokie natężenie emisji w obszarze pH 5–9. W roztworach bardziej zasadowych i mocno kwaśnych następuje zniszczenie warstwy Al_2O_3.

3. CHARAKTERYSTYKA ELEKTRODY Al/Al_2O_3

Powierzchnia aluminium w standardowych warunkach pokryta jest naturalną 2–4 nm warstwą tlenku, której grubość można sukcesywnie zwiększać poprzez anodyzację w wodnych roztworach elektrolitów.

Pierwszą fazą katodowej elektrochemiluminescencji jest tunelowa emisja „gorących" elektronów do warstwy przyelektrodowej [19]. Cienki film tlenku glinu, przy podaniu impulsu napięciowego o dużej amplitudzie, powoduje wytworzenie silnego pola elektrycznego w warstwie tlenku i umożliwia podniesienie poziomu Fermiego glinu powyżej poziomu pasma przewodzenia wody (Rys. 3).



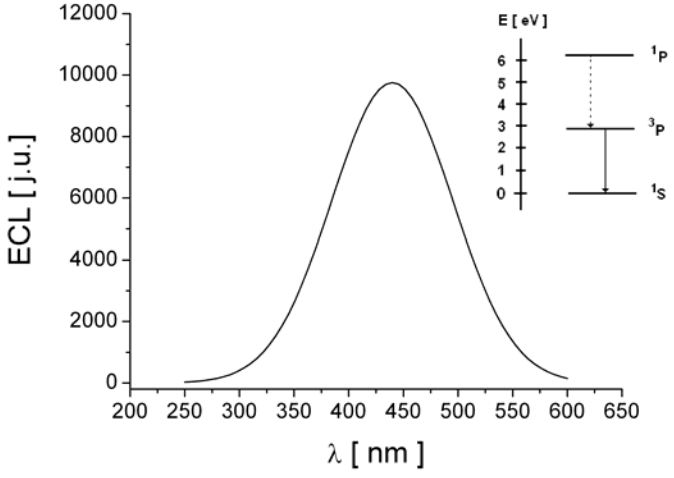
Rysunek 3. Schemat energetyczny emisji elektronów w warunkach katodowej polaryzacji o dużej amplitudzie (10–70V); TE – emisja tunelowa, FN-T – tunelowanie w/g mechanizmu Fowler-Nordheima, E_{CS} – poziom pasma przewodzenia tlenku (zależny od rodzaju roztworu i warunków polaryzacji), E_C – poziom pasma przewodzenia wody, E_F – poziomy Fermiego [19]

Gdy pole elektryczne osiągnie wartość progową, przy której zachodzi emisja tunelowa, elektrony są emitowane przez warstwę tlenku balistycznie, to znaczy bez znaczących strat energii (przy grubości warstwy Al_2O_3 4–6 nm).

W przypadku grubszych warstw Al_2O_3, emisja elektronów do pasma przewodzenia tlenku jest zdominowana przez mechanizm Fowler-Nordheima. Część emitowanych elektronów traci energię w niesprężystych zderzeniach, osiągając dolny poziom pasma przewodzenia na granicy tlenek/elektrolit, skąd może być emitowana do roztworu lub pułapkowana w podpoziomach energetycznych tlenku glinu, ulegając przejściom promienistym [20, 21].

W omawianych warunkach silnej polaryzacji katodowej łatwo może dojść do przebicia elektrycznego warstwy tlenku [22]. Jednak środowisko wodne oraz obecność silnych utleniaczy powodują szybkie utlenienie odsłoniętej powierzchni w czasie pomiędzy kolejnymi impulsami katodowymi.

Obsadzenie stanu wzbudzonego ^1P w F-centrum tlenku glinu powoduje jego bezpromienistą dezaktywację do stanu ^3P, a następnie przejście promieniste – do stanu podstawowego ^1S (Rys. 4).



Rysunek 4. Widmo katodowej ECL elektrody Al/Al_2O_3 w wodnym roztworze $K_2S_2O_8$ przy pH 7,5, amplituda 20V, ładunek: 30 μC · impuls^{-1}, częstotliwość: 40 Hz

Obecny w roztworze koreaktant (nadtlenodisiarczan potasu) uczestniczy w procesach utleniania centrów F, ulegając uprzednio rozpadowi rodnikowemu pod wpływem solwatowanych elektronów, zgodnie z równaniami [26]:

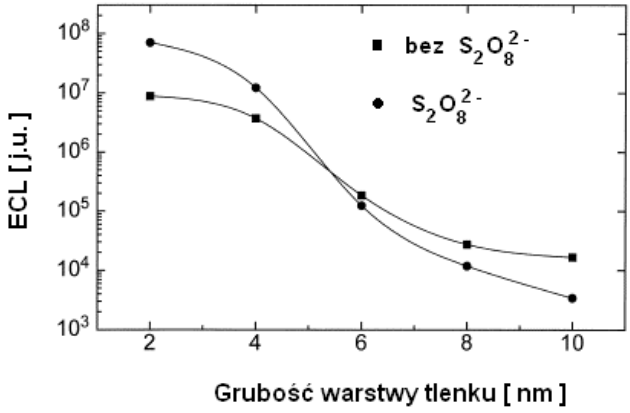
$$e^- \rightarrow e^-_{aq}$$

$$e^-_{aq} + S_2O_8^{2-} \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\bullet -} \qquad (k = 1{,}2 \cdot 10^{10}\ l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$$

$$F^+ + e^- \rightarrow F^*(^1P) \qquad F^*(^1P) \rightarrow F^*(^3P)$$

$$F^*(^3P) \rightarrow F(^1S) + h\nu \qquad SO_4^{\bullet -} + F \rightarrow F^+ + SO_4^{2-}$$

Badania zależności natężenia ECL od grubości warstwy tlenku wykazały znaczny jego spadek ze wzrostem grubości Al_2O_3 (Rys. 5) [20]. Ponadto, korzystny wpływ jonów $S_2O_8^{2-}$ na natężenie emisji zaznacza się tylko w przypadku cieńszych warstw tlenku.



Rysunek 5. Wpływ grubości warstwy tlenku glinu na ECL kompleksu terbu(III) w obecności i przy braku jonu nadtlenodisiarczanowego

Pomiary ECL z udziałem jonów $S_2O_8^{2-}$, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, nie potwierdziły wcześniejszych wyników badań nad procesami rodnikowymi w układach, w których obserwowano emisję dimoli tlenu singletowego na elektrodzie platynowej [23–25]. Obecne w widmie pasmo dla $\lambda_{max} \sim 400$ nm (Rys. 4) nie odpowiada naturze pasm $\Delta(O_2)_2$. Nie występują też w tym przypadku charakterystyczne dla roztworów, emisyjne pasma dimoli tlenu singletowego, odpowiadające przejściom:

$$^1\Delta_g\,^1\Delta_g(1,0) \rightarrow {}^3\Sigma_g^-{}^3\Sigma_g^-(0,0), \text{ dla } \lambda = 578 \text{ nm}$$

oraz

$$^1\Delta_g\,^1\Delta_g(0,0) \rightarrow {}^3\Sigma_g^-{}^3\Sigma_g^-(0,0), \text{ dla } \lambda = 633 \text{ nm}.$$

Nie oznacza to jednak, że reakcje rodnikowe, zwłaszcza w natlenionych roztworach, nie generują form aktywnego tlenu. Natomiast wydajność emisji dimoli $(O_2)_2$, szczególnie w układach wodnych, jest znikomo mała, a w warunkach przeprowadzonego eksperymentu jest wręcz nierejestrowalna i nie ma wpływu na dominujący rodzaj emisji z powierzchni elektrody glinowej.

4. BADANIA KOMPLEKSÓW JONÓW Ln(III) NA ELEKTRODZIE Al/Al_2O_3

Badania nad katodowo generowaną luminescencją jonów lantanowców na elekrodzie glinowej zapoczątkowano prawie dziesięć lat temu [26]. Wykazano, że wygaszanie emisji elektrody glinowej przez poszczególne hydratowane jony Ln(III) zachodzi z różną wydajnością. W przypadku jonów Eu(III), Sm(III) i Yb(III) odmienne właściwości tłumienia emisji wynikały z reakcji redukcji, którym jony te ulegały na elektrodzie glinowej:

$$Ln^{3+} + e^- \rightarrow Ln^{2+}$$

ze stałymi szybkości drugiego rzędu, o wartościach równych $6{,}5 \cdot 10^{10}\ l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, $4{,}3 \cdot 10^{10}\ l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ i $2{,}0 \cdot 10^{10}\ l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, odpowiednio dla jonów europu, iterbu i samaru. W całej serii jonów lantanowców o właściwościach emisyjnych tylko dla jonów Tb(III) zaobserwowano charakterystyczną emisję, pochodzącą od przejść $^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ [26], jako skutek przekazania energii z poziomu ^1P (6,1 eV), a zwłaszcza ^3P(3.0 eV), na poziomy 4f75d (5.6 eV) i 4f (5D4, 2.5 eV).

Przeniesienie energii ze stanów $^3\Pi\Pi^*$ ligandów aromatycznych do poziomów emisyjnych jonów lantanowców powoduje znaczne podwyższenie ich emisji. Ten typ sensybilizacji jest szczególnie dobrze poznany dla kompleksów Tb(III) i Eu(III), ponieważ wiele różnych grup ligandów wykazuje energię stanów trypletowych zbliżoną do poziomów emisyjnych tych jonów [27–32]. Użycie kompleksów lantanowców w roli emiterów ECL prowadzono więc równolegle z badaniami nad możliwością wzbudzania cząsteczek organicznych zawierających fragmenty aromatyczne w procesie utlenienia–redukcji na katodzie glinowej [33–38].

Wykazano, że injekcja „gorących" elektronów do wodnych roztworów kompleksów lantanowców prowadzi do uzyskania wydajnej emisji jonów Ln(III). Szczególnie intensywnie badano kompleksy terbu, ponieważ emisyjny czas życia poziomu wzbudzonego jonu Tb(III) w kompleksach chelatowych mieści się w granicach 1,7–2,4 ms i może być z powodzeniem użyty do czasowo-rozdzielczych technik badawczych ECL [39–41]. Czasowo-rozdzielcza ECL zapewnia bardzo korzystny stosunek sygnału do szumu i pozwala osiągnąć podobną czułość detekcji jak w przypadku fotoluminescencji chelatów Ln(III). Autorzy prac [42, 43] zaproponowali mechanizm wzbudzenia chelatów terbu pokazany na poniższym schemacie:

$$Tb(III) - L + Ox^* \rightarrow Tb(III) - L_{ox} + Ox^-$$

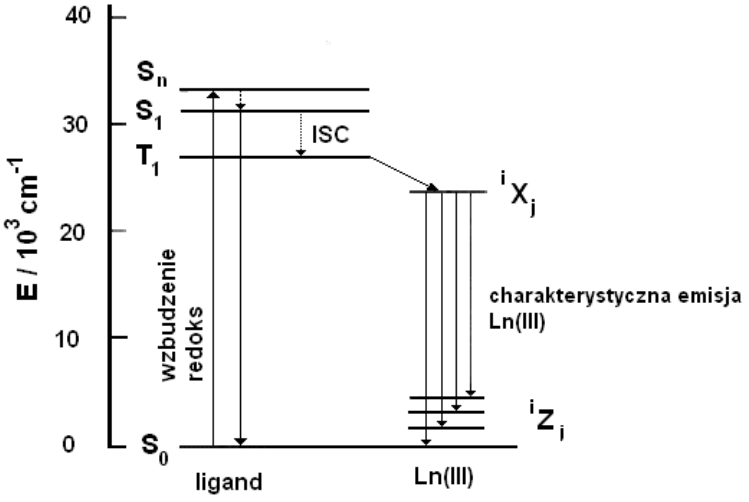
$$Tb(III) - L_{ox} + e^-_{aq} \rightarrow Tb(III) - {}^1L^*$$

$$Tb(III) - {}^1L^* \rightarrow Tb(III) - {}^3L^*$$

$$^*Tb(III) - L \rightarrow Tb(III) - L + h\nu,$$

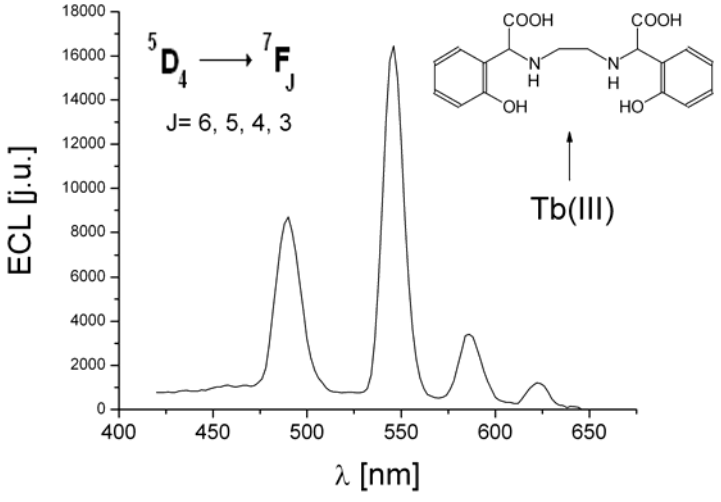
gdzie L – jest ligandem a Ox^* rodnikiem hydroksylowym lub siarczanowym.

Schemat procesu wewnątrzcząsteczkowego transferu energii pokazano na Rys. 6.



Rysunek 6. Schemat przekazu energii do jonu lantanowca w procesie wzbudzenia na drodze redukcji–utlenienia lub utlenienia-redukcji kompleksującego liganda

Przykładowe widmo emisji oraz strukturę liganda tworzącego z jonami Tb(III) wydajny układ ECL przedstawiono na Rys. 7 [18].



Rysunek 7. Katodowo generowana ECL kompleksu Tb(III) z kwasem etylenodiamino DL-*o*-hydroksy-fenylooctowym na elektrodzie Al/Al_2O_3.
Stężenie kompleksu = 10^{-5} mol · dm^{-3}, impulsy: amplituda 20 V, częstotliwość 50 Hz, ładunek: 50 μC · $impuls^{-1}$

Elektrochemiluminescencja kompleksów europu wykazuje dużo niższą wydajność niż w przypadku kompleksów terbu. Wynika to z faktu, że choć ich właściwości luminescencyjne są zbliżone, to ich właściwości redoks są znacząco odmienne. Jon Tb(III) jest wyjątkowo trudny do jednoelektronowej redukcji lub utlenienia: E_0 (Tb(III)/Tb(II))= – 3,7 V oraz E_0 (Tb(IV)/Tb(III)) = + 3,1 V, zaś jon Eu(III), choć jest trudny do utlenienia: E_0 (Eu(IV) / Eu(III)) = 6,4 V, łatwo ulega redukcji: E_0 (Eu(III)/ Eu(II)) = – 0,35 V [12]. W związku z tym łatwo jest redukowany na katodzie glinowej przez e^-_{aq} lub zredukowane formy liganda. Wzbudzanie jonów Eu(III) poprzez inicjalizowaną redukcję liganda jest mało prawdopodobne. W tym przypadku, właściwa wydaje się droga utlenienia–redukcji, przebiegająca według schematu [44]:

$$\mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L} + \mathrm{SO}_4^{\bullet-} \rightarrow \mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L}_{\mathrm{OX}} + \mathrm{SO}_4^{2-}$$

$$\mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L}_{\mathrm{OX}} + e^-_{aq} \rightarrow \mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L}^{1\ \mathrm{lub}\ 3}$$

W przypadku wzbudzenia liganda do stanu singletowego, następuje przejście międzysystemowe i przeniesienie energii na poziom rezonansowy $^5D_0$ jonu europu przy 2,1 eV, który ulega promienistej dezaktywacji $^4D_0 \rightarrow {}^7F_J$:

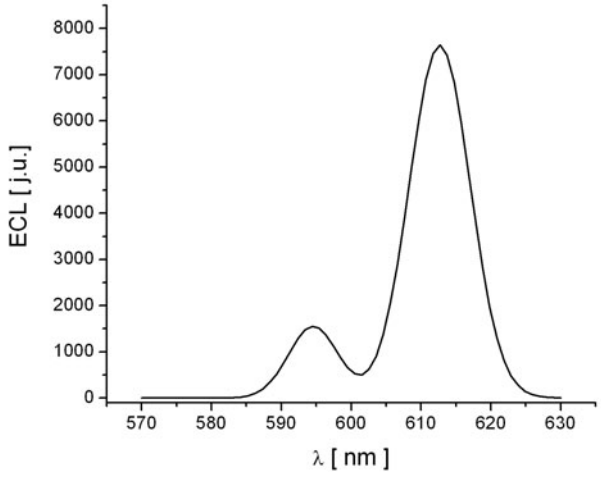
$$\mathrm{Eu(III)} - {}^1\mathrm{L}^* \rightarrow \mathrm{Eu(III)} - {}^3\mathrm{L}^*$$

$$\mathrm{Eu(III)} - {}^3\mathrm{L}^* \rightarrow {}^*\mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L}$$

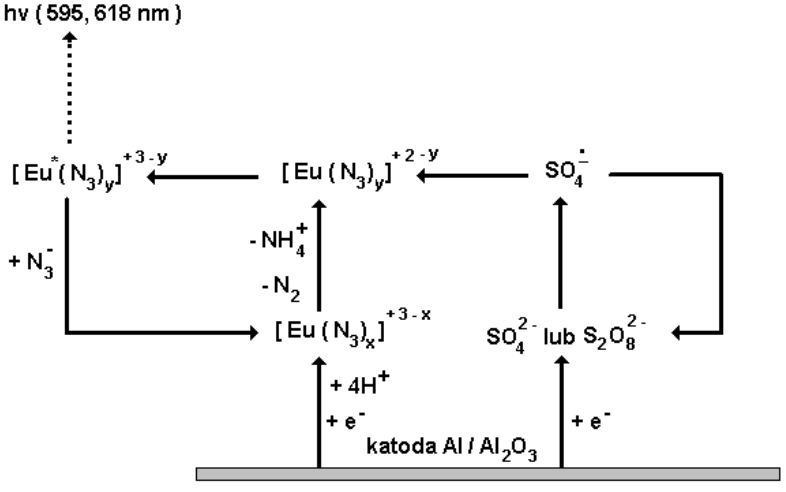
$${}^*\mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L} \rightarrow \mathrm{Eu(III)} - \mathrm{L} + h\nu$$

Szczególnym przypadkiem jest układ zawierający kompleks azydkowy europu. Jest to pierwszy kompleks lantanowca z ligandem nieorganicznym, który w warunkach katodowej polaryzacji elektrody glinowej w roztworze wodnym wykazuje emisję z poziomu $^5D_0$ (Rys. 8).

Autorzy wcześniejszych doniesień o foto- i elektrogenerowanej redukcji jonów metali d i f-elektronowych [45, 46] zaproponowali mechanizm procesów zachodzących w układzie: katodowo polaryzowana elektroda $Al/Al_2O_3–S_2O_8^{2-}–Eu(III)–N_3^-$ (Rys. 9).



Rysunek 8. Dwa najbardziej intensywne pasma emisyjne $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ i $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ w widmie ECL układu Eu(III)-N_3^- w roztworze Na_2SO_4 (0,1 mol · dm^3) na elektrodzie Al/Al_2O_3, impulsy: amplituda 40V, częstotliwość 30Hz, ładunek 90 μC · impuls^{-1}



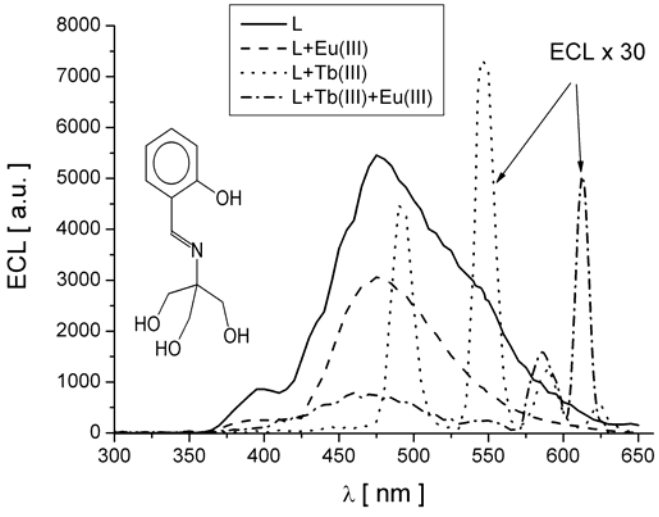
Rysunek 9. Schemat elektroredukcji i wzbudzenia azydkowego kompleksu europu(III) przy katodowo polaryzowanej elektrodzie glinowej w roztworze wodnym

Specyfika powierzchni elektrody tlenkowej w warunkach polaryzacji katodowej pozwala na domieszkowanie powierzchni elektrody jonami lantanowców. Wykazano dotychczas możliwość trwałego wiązania jonów Tb(III) i Dy(III) z elektrodą aluminiową oraz uzyskiwanie z jej powierzchni emisji charakterystycznej dla poszczególnych jonów [43]. Badania z użyciem czasowo rozdzielczej ECL domieszkowanej elektrody glinowej wykazały istnienie ok. 4 cząsteczek wody w wewnętrznej sferze koordynacyjnej jonu terbu [19]. Wskazuje to na częściowe związanie jonu

lantanowca ze strukturą uwodnionego tlenku glinu. Wyniki badań emisji z użyciem domieszkowanej elektrody jonami Tb(III) i Dy(III) w roztworze zawierającym wyłącznie $S_2O_8^{2-}$ wykazywały natężenie ECL, które silnie wzrastało po dodaniu liganda chelatującego [18]. Oznacza to, że proces emisji jonów lantanowców w takim układzie jest sumą luminescencji: jonów adsorbowanych w warstwie Al_2O_3 oraz w obszarze przyelektrodowym. W analogicznych warunkach nie zaobserwowano ECL dla jonu Gd(III). Wysoko położony poziom emisyjny jonu gadolinu $^6P_{7/2}$ (3,98 eV) uniemożliwia wzbudzenie go wskutek transferu energii z poziomu trypletowego liganda ani też na drodze zmiany stopnia utlenienia tego jonu (E_0 (Gd^{4+}/Gd^{3+}) = 7,9 V, E_0 (Gd^{3+}/Gd^{2+})), co równocześnie wyklucza istotną rolę transferu ze stanów singletowych liganda.

5. ECL W UKŁADACH Z KOMPLEKSAMI DIJĄDROWYMI

Badania strukturalne ujawniły możliwość tworzenia się kompleksów homodijądrowych i hetorodijądrowych z udziałem chelatującego, sześciodentnego liganda: 2,6-bis[*N*,*N*-bis(karboksymetylo)aminometylo]-4-benzoilofenolu oraz Y(III), Dy(III) i Sm(III) w środowisku wodnym [47, 48]. Katodowo generowana ECL na elektrodzie glinowej tego typu kompleksów [49] wykazała wyższe (o około 1 rząd wielkości) natężenie emisji w układach heterodijądrowych typu: L-Y(III)-Ln(III)-L w porównaniu z układami homodijądrowymi. Analogiczne zjawisko podwyższania ECL w układach z dwoma centrami emisji zaobserwowano w układach Eu(III)-Tb(III) – zasada Schiffa (Rys. 10).



Rysunek 10. Widmo ECL układu o składzie: Eu(III), Tb(III), 2-salicyli-denoamino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol, generowane na katodowo polaryzowanej elektrodzie Al/Al_2O_3 w wodzie. Amplituda impulsu: 40 V, częstotliwość 20 Hz, ładunek: 50 μC · impuls^{-1}

W układzie tym energia wzbudzonego liganda rozkłada się na dwa centra emisyjne – jony terbu i europu [50]. Jak widać, osiągnięcie poziomu emisyjnego $^5D_0$ jonu Eu(III) jest możliwe tylko w obecności jonów Tb(III), ponadto stosunek natężeń pasm dla $\lambda = 594$ nm i 618 nm wskazuje, że zarówno wzbudzenie, jak i emisja zachodzą w obrębie kompleksu w procesie zewnątrz- lub wewnątrzcząsteczkowego przekazania energii. Analogiczny proces przeniesienia energii zaobserwowano już wcześniej [51], w badaniach luminescencji kompleksów europu i terbu z kwasem asparaginowym.

Obecnie znana jest jeszcze stosunkowo mała liczba prac obejmujących dane eksperymentalne ECL dla układów lantanowców, jednak należy sądzić, że prace uwzględniające ważność czynników geometrycznych w kompleksie, a zwłaszcza wzajemne odległości donora i akceptora, stanowić będą przedmiot dalszych zainteresowań w badaniach nad kompleksami lantanowców.

PODSUMOWANIE

Zjawisko elektrogenerowanej luminescencji na katodzie glinowej, oparte w swych założeniach o wysokoenergetyczne reakcje z przeniesieniem elektronu, w szczególny sposób łączy ze sobą zarówno klasyczną chemiluminescencję, jak i elektroluminescencję w ciele stałym. Procesy na granicy metal/półprzewodnik/elektrolit, w warunkach silnego pola elektrycznego, są dopiero sukcesywnie poznawane, a ich potencjalne znaczenie aplikacyjne w zakresie analityki już jest doceniane i wykorzystywane. Zastosowanie lantanowców w tej dziedzinie elektrochemii jest bardzo pożądane, ze względu: z jednej strony na już wspomniane specyficzne właściwości redoks, z drugiej – na znaczną „czułość" spektroskopową, uwzględniającą zmiany w ich sferze koordynacji. Można więc oczekiwać wprowadzenia nowej jakości w badaniach tworzenia się i degradacji nanostruktur tlenkowych na powierzchni tego typu elektrod w procesie ECL i wprowadzenia interpretacji ilościowej w ustalaniu mechanizmów zachodzących tam przemian.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] L.R. Faulkner, A. J. Bard, [w:] *Electroanalytical Chemistry*, A.J. Bard Ed., Marcel Dekker, New York 1977, vol 10, 1–95.
[2] M.M. Richter, Chem. Rev., 2004, **104**, 3003.
[3] L.R. Faulkner, A.J. Bard, J. Electroanal. Chem., 1977, **10**, 1.
[4] L.J. Kricka, P.E. Stanley, Luminescence, 1999, **14**, 107.
[5] A.W. Knight, Trends Anal. Chem., 1999, **18**, 47.
[6] R.G. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Levis, Anal. Chim. Acta, 1999, **378**, 1.
[7] *Electrogenerated Chemiluminescence*, A.J. Bard, Ed. Marcell Dekker, New York, 2004.
[8] M. Zhou, G.P. Robertson, J. Rooverst, Inorg. Chem., 2005, **44**, 8317.
[9] D. Bruce, M.M. Richter, Ana. Chem., 2002, **74**, 3157.

[10] A. Kapturkiewicz, T.-Ming Chen, I.R. Laskar, J. Nowacki, Electrochem. Commun., 2004, **6**, 827.
[11] A. Kapturkiewicz, P. Szrebowaty, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2002, 3219.
[12] W.T. Carnall, [w:] *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, K.A. Gschneider, L.R. Eyring, Eds, Vol. 3. Chapt. 24, North Holland, Amsterdam 1979.
[13] P. Gawryszewska, J. Sokolnicki, J. Legendziewicz, Coord. Chem. Rev., 2005, **249**, 2489.
[14] J. Legendziewicz, J. Sokolnicki, Wiad. Chem., 2004, **125**.
[15] R.E. Hemingway, S.-M. Park, A.J. Bard, J. Am. Chem. Soc., 1975, **95**, 200.
[16] M.M. Richter, A.J. Bard, Anal. Chem., 1996, **68**, 2641.
[17] S.-I. Chen, F. Ding, Y. Liu, H-C. Zhao, Spectrochimica Acta, A, 2006, **64**, 130.
[18] K. Staninski, S. Lis, D. Komar, Electrochemistry Comm. 2006, **8**, 1071.
[19] S. Kulmala, A. Kulmala, M. Helin, I. Hyppänen, Anal. Chim. Acta, 1998, **359**, 71.
[20] S. Kulmala, A. Kulmala, T. Ala-Kleme, J. Pihlaja, Anal. Chim. Acta, 1998, **367**, 17.
[21] S. Kulmala, T. Ala-Kleme, H. Joela, A. Kulmala, J. Radioanal. Nucl. Chem., 1998, **232**, 91.
[22] N. Klein, M. Albert, J. Appl. Phys. 1982, **53**, 5840.
[23] O.V. Reshetnyak, E.P. Koval'chuk, Electrochimica Acta, 1998, **43**, 465.
[24] O.V. Reshetnyak, E.P. Koval'chuk, P. Skurski, J. Rak, J. Błażejowski, J. Luminescence, 2003, **105**, 27.
[25] E.P. Koval'chuk, O.V. Reshetnyak, A.O. Chernyak, Ya.S. Kovalyshyn, Electrochimica Acta, 1999, **44**, 4079.
[26] A. Hakanen, E. Laine, M. Latva, T. Ala-Kleme, K. Haapakka, J. All. Compd., 1998, **275–277**, 476.
[27] S. Lis, J. All. Compd., 2002, **341**, 45.
[28] H.F. Brito, O.L. Malta, J.F.S. Menezes, J. All. Compd., 2000, **336**, 303.
[29] F.C.J.M. van Veggel, M.P. Oude Wolbers, D.N. Reinhoudt, J. Phys. Chem. A, 1998, **102**, 3060.
[30] R.D. Archer, H. Chen, Inorg. Chem., 1998, **37**, 2089.
[31] P. Gawryszewska, L. Jerzykiewicz, M. Pietraszkiewicz, J. Legendziewicz, J.P. Riedl, Inorg. Chem., 2000, **39**, 5365.
[32] O.L. Malta, J. Legendziewicz, E. Huskowska, I. Torowska-Tyrk, R.Q. Albuquerque, C. de Mello Donega, F.R.G. e Silva, J. All. Compd., 2001, **323–324**, 654.
[33] P. Canty, L. Väre, M. Häkansson, A.-M. Spehar, D. Papkovsky, T. Ala-Kleme, J. Kankare, S. Kulmala, Anal. Chim. Acta, 2002, **453**, 269.
[34] S. Kulmala, C. Matachescu, A. Kulmala, D. Papovsky, M. Häkansson, H. Ketamo, P. Canty, Anal. Chim. Acta, 2002, **453**, 253.
[35] J. Legendziewicz, J. All. Compd., 2000, **300–301**, 71.
[36] Q. Jiang, A.-M. Spehar, M. Häkansson, J. Suomi, T. Ala-Kleme, S. Kulmala, Electrochimica Acta, 2006, **51**, 2706.
[37] M. Helin, Q. Jiang, H. Ketamo, M. Häkansson, A.-M. Spehar, S. Kulmala, T. Ala-Kleme, Electrochimica Acta, 2005, **51**, 725.
[38] P. Laakso, H. Anttila, V. Kairisto, J. Eskola, S. Kulmala, T. Ala-Kleme, 2005, **541**, 85.
[39] J. Kankare, K. Fälden, S. Kulmala, K. Haapakka, Anal. Chim. Acta, 1992, **256**, 17.
[40] S. Kulmala, K. Haapakka, J. All. Compd., 1995, **225**, 502.
[41] M. Häkansson, M. Helin, M. Putkonen, Q. Jiang, M. Kotiranta, J. Suomi, A.J. Niskanen, T. Ala-Kleme, S. Kulmala, Anal. Chim. Acta, 2005, **541**, 137.
[42] S. Kulmala, T. Ala-Kleme, M. Latva, K. Loikas, H. Takalo, J. Fluoresc., 1998, **8**, 59.
[43] S. Kulmala, J. Suomi, Anal. Chim. Acta, 2003, **500**, 21.
[44] Q. Jiang, M. Häkansson, A.-M. Spehar, J. Ahonen, T. Ala-Kleme, S. Kulmala, Anal. Chim. Acta, 2006, **558**, 302.
[45] R. Jurczakowski, M. Orlik, J. Electroanal. Chem., 2005, **574**, 311.
[46] H. Kunkely, A. Vogler, Inorg. Chem. Commun., 2005, **8**, 117.

[47] M. Latva, S. Kulmala, K. Haapakka, Inorg. Chim. Acta, 1996, **247**, 209.
[48] M. Latva, P. Mäkinen, S. Kulmala, K. Haapakka, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1996, **92**, 3321.
[49] T. Ala-Kleme, K. Haapakka, M. Latwa, J. All. Compd., 1998, **275–277**, 911.
[50] K. Staninski, S. Lis, J. All. Compd., przyjęta do druku.
[51] H.G. Brittain, Inorg. Chem., 1979, **18**, 1740.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 stycznia 2007

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 3-4
PL ISSN 0043-5104

INFORMACJE

INFORMACJA REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną kontynuuje inicjatywę podjętą na konferencji Dziekanów Wydziałów Chemicznych, która odbyła się w lutym 2007 roku w Poznaniu.

Zgodnie z tą inicjatywą poszczególne ośrodki chemiczne (przede wszystkim uczelniane) w Polsce mogą publikować w „Wiadomościach Chemicznych” informacje o swojej działalności.

Politechnika Wrocławska

Studia Doktoranckie na Wydziale Chemicznym

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej ogłasza nabór na czteroletnie stacjonarne **STUDIA DOKTORANCKIE** w roku akademickim 2007/2008, w następujących dyscyplinach:

- **CHEMIA**, w tym specjalność **BIOTECHNOLOGIA**
- **INŻYNIERIA CHEMICZNA**
- **TECHNOLOGIA CHEMICZNA**, w tym **INŻYNIERIA MATERIAŁOWA**

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

Zgłoszenia wraz z wymaganymi dokumentami należy składać w Dziale Nauczania Politechniki Wrocławskiej (Wybrzeże Wyspiańskiego 27, budynek A1, pokój 153) w dniach od 7 do 29 maja bieżącego roku.
Przewidywany termin rozmów kwalifikacyjnych: 18 - 20 czerwca.

Kandydaci zakwalifikowani na studia, którzy uzyskają wysoką lokatę w postępowaniu rekrutacyjnym, mogą otrzymać stypendium doktoranckie. Ponadto, zgodnie z Regulaminem Studiów Doktoranckich, doktoranci mogą ubiegać się o stypendia socjalne i naukowe.
Dodatkowe informacje o rekrutacji, w tym o potencjalnych promotorach, można uzyskać na stronach internetowych Studium Doktoranckiego Politechniki Wrocławskiej (http://www.doktoranci.pwr.wroc.pl) i Wydziału Chemicznego (http://www.ch.pwr.wroc.pl).

WYDZIAŁ CHEMII UNIWERSYTETU WROCŁAWSKIEGO
zaprasza na bezpłatne kursy:

NOWOCZESNY PRACOWNIK LABORATORIUM

Szkolenie jest finansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (75%) oraz budżetu państwa (25%), realizowane pod nadzorem Dolnośląskiego Wojewódzkiego Urzędu Pracy w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego w punkcie:

Priorytet 2 Wzmocnienie rozwoju zasobów ludzkich w regionach
Działanie 2.1. Rozwój umiejętności powiązany z potrzebami regionalnego rynku pracy i możliwości kształcenia ustawicznego w regionie.

Celem szkoleń jest aktualizacja wiedzy w zakresie nowoczesnych metod analitycznych, przygotowanie metody pomiarowej do walidacji, projektowanie systemów bezpieczeństwa w laboratorium chemicznym.
Program szkoleń obejmuje 52 godziny zajęć w formie wykładów, warsztatów i laboratoriów.
Podczas szkoleń istnieje możliwość uzyskania certyfikatów biegłości analitycznej.

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

Dodatkowe informacje znajdują się na stronie internetowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego www.chem.uni.wroc.pl/METFIZ/kursy/index.html oraz pod numerem telefonu 071/37 57 210