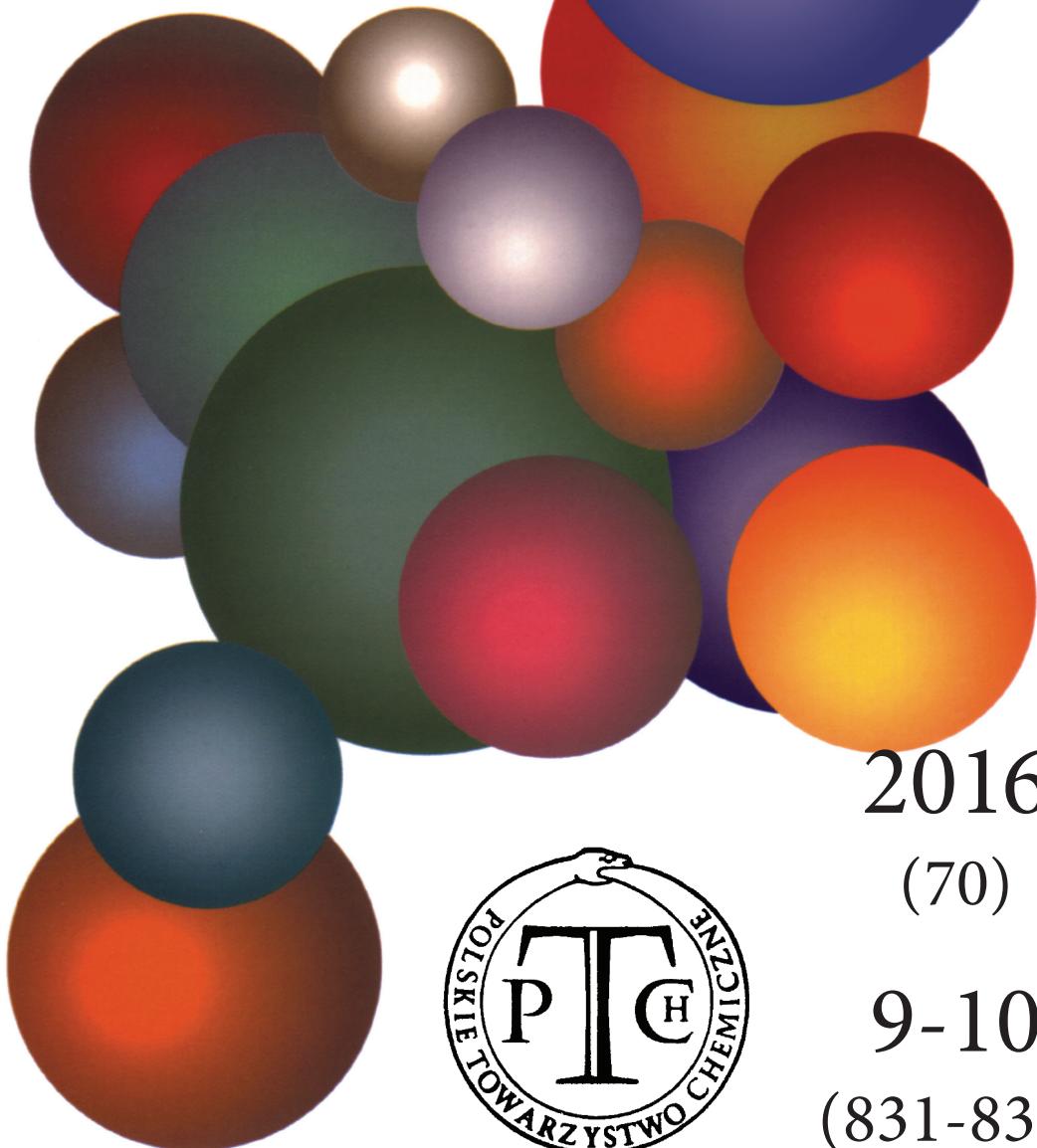


# WIADOMOŚCI *chemiczne*



2016

(70)

9-10

(831-832)

# **CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

Publikacja dotowana przez MNiSW

## **RADA REDAKCYJNA**

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,  
BOGUSŁAW BUSZEWSKI (PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GÓRECKI, MIĘTEK JARONIEC,  
ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,  
KAZIMIERZ M. PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI, MAREK POTRZEBOWSKI,  
SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ W. SOKALSKI,  
ARTUR P. TERZYK

## **KOMITET REDAKCYJNY**

MARCIN DRĄG, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI, LUDWIK KOMOROWSKI,  
WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

## **REDAKTOR NACZELNY**

ZDZISŁAW LATAJKA

## **SEKRETARZ REDAKCJI**

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN  
BARBARA LATKO (FINANSE)  
KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:  
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06  
e-mail: wchem@wchuwr.pl

## **INTERNET**

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)  
<http://wwwdbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2016  
pISSN 0043-5104  
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w listopadzie 2016

Przygotowanie do druku i druk:  
Firma Wydawnicza K2, e-mail: [k2@druk-k2.pl](mailto:k2@druk-k2.pl)

## NOWI CZŁONKOWIE RADY REDAKCYJNEJ

Z olbrzymią przyjemnością informuję, że decyzją Przewodniczącego prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego skład Rady Redakcyjnej „Wiadomości Chemicznych” został poszerzony o następujących uczonych:

prof. dr hab. Tadeusz Górecki

Departament of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Kanada

prof. Mietek Jaroniec

Departament of Chemistry and Biochemistry, Kent State University, Kent, OH 44242, USA

prof. Krzysztof Matyjaszewski

Center for Macromolecular Engineering, Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA 15213, USA

prof. Sławomir Rubinsztajn

General Electric Global Research, Kiskuyua, NY 12309, USA

W imieniu Komitetu Redakcyjnego Panom Profesorom życzę owocnej pracy na rzecz naszego czasopisma.

*prof. dr hab. Zdzisław Latajka  
Redaktor Naczelny*

---

---

## ZMIANY W SKŁADZIE KOMITETU REDAKCYJNEGO

W imieniu swoim oraz Przewodniczącego Rady Redakcyjnej prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego pragnę wyrazić słowa podziękowania za długoletnią aktywność w pracach Komitetu Redakcyjnego prof. dr hab. Jerzemu P. Hawrankowi, prof. dr hab. inż. Mirosławowi Soroce oraz prof. dr hab. Marii Suszyńskiej. Dzięki niezwykłemu zaangażowaniu Państwa Profesorów obecnie możemy obserwować wysoki poziom naukowy czasopisma.

Jednocześnie z olbrzymią przyjemnością witamy w składzie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr hab. Marcina Drąga (Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej), prof. dr hab. Leszka Kępińskiego (Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu), prof. dr hab. Witolda Rybę-Romanowskiego (Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu) i prof. dr hab. inż. Kazimierę Wilk (Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej).

Nowym członkom Komitetu Redakcyjnego życzę sukcesów w pracy na rzecz dalszego rozwoju naszego czasopisma.

*prof. dr hab. Zdzisław Latajka  
Redaktor Naczelny*

# W POSZUKIWANIU UKŁADU OKRESOWEGO DLA MATERII W SKALI NANO

## IN QUEST OF PERIODIC TABLE FOR MATTER IN NANOSCALE

**Maria Cieślak-Golonka**

*Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławskiego,  
Wybrzeże Wyspińskiego 27, 50-300 Wrocław  
e-mail: maria.golonka@pwr.edu.pl*

---

*Profesorowi Antoniemu Grodzickiemu z okazji 80. rocznicy urodzin*

---

### Abstract

### Wprowadzenie

1. Tradycyjny układ okresowy
  2. Od piko- do nanoperiodyczności
    - 2.1. Superatomy naśladują pierwiastki układu Mendelejewa. Liczne atomów i elektronów
    - 2.2. Parametry krytyczne superatomów
    - 2.3. Budowa powłokowa klasterów. Model Jellium. Liczby magiczne
    - 2.4. Reaktywność superatomów
  3. Próby klasyfikacji superatomów
    - 3.1. Klastery specjalne (wyjątkowe, proste)
    - 3.2. Superatomy ogólne (uogólnione, złożone)
    - 3.3. Superatomy twarde i miękkie
  4. „Mapa drogowa” dla nowego układu okresowego (Tomalia i Khanna)
- Zamiast zakończenia  
Piśmiennictwo cytowane
-

**prof. dr hab. Maria Cieślak-Golonka** absolwentka Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (1966) jest emerytowanym profesorem Politechniki Wrocławskiej. W 1974 roku pod kierunkiem profesora Adama Bardeckiego obroniła doktorat na temat chemii koordynacyjnej wolframu. Tematyka jej rozprawy habilitacyjnej (1993) dotyczyła właściwości fizykochemicznych sześciowartościowego chromu. Jest autorką i współautorką ponad 100 publikacji oraz jednego podręcznika pt „Wstęp do Chemicznej Koordynacyjnej” wydanego przez PWN (I-wyd, 2010, II-wyd, 2013). Przetłumaczyła także książkę Erica Scerri „Periodic Table. Its Story and Significance” wydaną w 2013 roku przez Oficynę Wydawniczą Politechniki Wrocławskiej.

## ABSTRACT

The purpose of this article was a presentation of the state of the art in the search of the periodic system for matter in nanoscale. It was preceded by a history of the discovery of traditional periodic table of the elements just to bring out the possible analogies to help in the analysis. Finally, the „road map” by Tomalia and Khanna [D.A. Tomalia, S.N. Khanna, Chem. Rev., 2016, **116**, 2705] leading to a future periodic system unifying nanoscience was presented.

**Keywords:** periodic table, precursors and discoveres, matter in nanoscale, road map, clusters, hard matter, soft matter

**Slowa kluczowe:** układ okresowy pierwiastków, prekursorzy i odkrywcy, nanomateria, mapa drogowa, klastery, twarda materia, miękka materia

---

## WPROWADZENIE

Prawo okresowości, którego odkrycie należy do najważniejszych osiągnięć w chemii, głosi, że właściwości chemiczne i fizyczne pierwiastków zmieniają się w systematyczny i przewidywalny sposób, kiedy ułoży się je według wzrastającej liczby atomowej. Wynika stąd, że okresowość – jako prawo przyrody – jest naturalną cechą Wszechświata. Najdobjitniej można ją wyrazić w formie układu okresowego, który przedstawia w sposób uporządkowany fundamentalne zależności pomiędzy pierwiastkami. Jednak szybko rozwijająca się nauka o obiektach nanometrycznych także pilnie potrzebuje konsolidacji wokół jakiejś „ikony”, paradygmatu – po to, żeby nie stała się jedynie zbiorem danych rosnących w sposób lawinowy i chaotyczny, ale żeby miała pełny walor naukowy. Poszukuje się więc dla niej układu okresowego, który, podobnie jak tradycyjny układ okresowy, będzie miał atrybut przewidywalności. Materiałem budulcowym w skali nanometrycznej są formy złożone z kilku, kilkunastu aż do kilkuset atomów, które nazwano sztucznymi atomami albo superaatomami. Ten dobrze zdefiniowany zbiór zachowuje się czasem jak system tradycyjnych atomów, przejawiając również właściwości kolektywne.

Aby zbudować nowy układ okresowy, pomocne może być sięgnięcie do genezy powstawania „klasycznego” układu i informacji, które ze sobą niesie.

### 1. TRADYCYJNY UKŁAD OKRESOWY

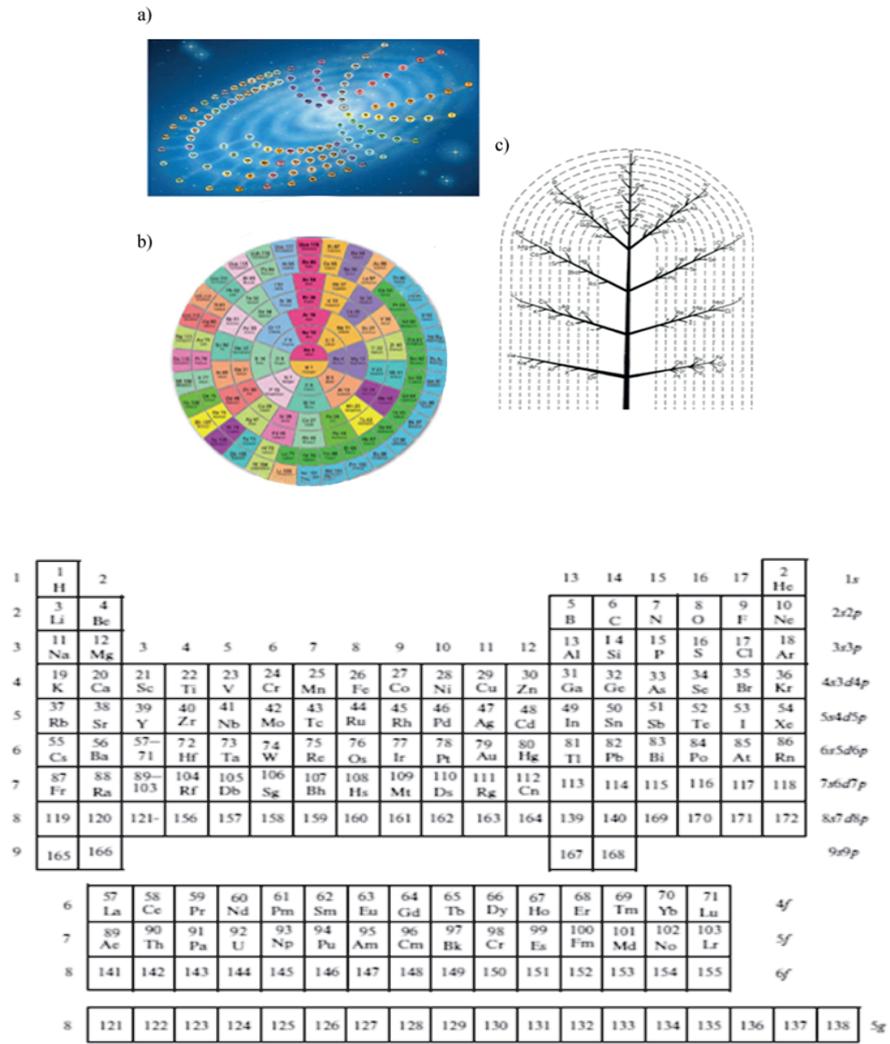
Istnieje wiele form graficznych ilustrujących prawo okresowości. Spośród różnych sposobów prezentacji tego prawa najpopularniejszym jest dwuwymiarowa tablica.

Należy podkreślić, że od powstania pełnego układu okresowego, czyli od prawie 150 lat, korzyści czerpie z niego nie tylko chemia czy fizyka, ale także inne nauki, jak na przykład kosmologia, biologia, medycyna czy geologia. Konsoliduje on zarówno całą wiedzę przyrodniczą, jak i nauki stosowane; znane są tablice mineralogów, biologów, a nawet artystów.

Co więcej, układ okresowy stał się inspiracją nie tylko dla przyrodników, ale został przejęty także przez popkulturę, co świadczy o jego atrakcyjności nie tylko naukowej. Znane są piosenki, wiersze a także różnego rodzaju gadżety związane z układem okresowym (Rys. 3).

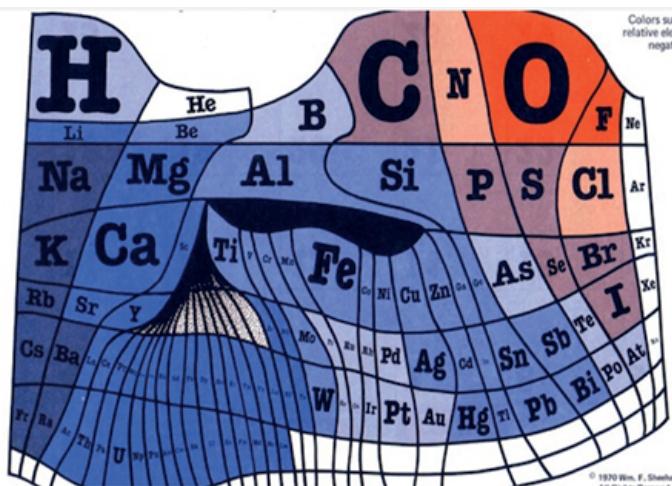
Obecnie jedynie „wybrzeże południowe” tablicy układu okresowego opartego na liczbie porządkowej jako fundamencie jest dostępne dla nowych pierwiastków (Rys. 1d). Znanych jest 118 pierwiastków zajmujących 7 okresów; 90 z nich jest trwałych i stanowi podstawę funkcjonowania zarówno świata biologicznego, jak i aktywności człowieka (np. materiały). Ostatnie zsyntezowane i nazwane pierwiastki to: nihonium (Nh, Z = 113), flerow (Fl, Z = 114), moscovium (Mc, Z = 115), liwermor (Lv, Z = 116), tennessine (Ts, Z = 117) i oganesson (Og, Z = 118). Przewiduje się, że następny, czyli ósmy okres oprócz atomów pierwiastków o podpowłokach elektro-

nowych s, p i d, będzie posiadał również pierwiastki 6f, a także po raz pierwszy takie, które będą rozbudowywały podpowłokę 5g (Rys. 1d).



Rysunek 1. Przykłady form graficznych przedstawiających prawo okresowości: a) galaktyka chemiczna, b) tarcza, c) drzewo, d) tabela

Figure 1. Examples of graphic forms illustrating the periodic law: a) chemical galaxy, b) target, c) tree, d) table



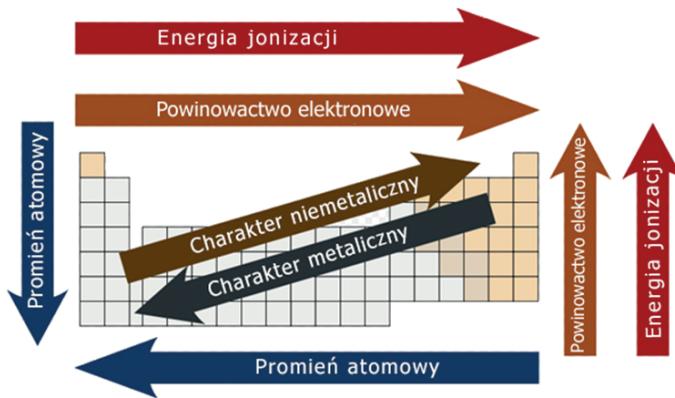
Rysunek 2. Tablica geologów. Obszar zajmowany przez pierwiastek odpowiada jego zawartości na powierzchni Ziemi [1]. Efekt przypomina architekturę Gaudiego

Figure 2. Table of geologists. The area of an element is equivalent to its content in the surface of the earth [1]. The effect resembles Gaudi architecture



Rysunek 3. Przykłady obecności tablicy pierwiastków w popkulturze  
Figure 3. Examples of periodic table in popular culture

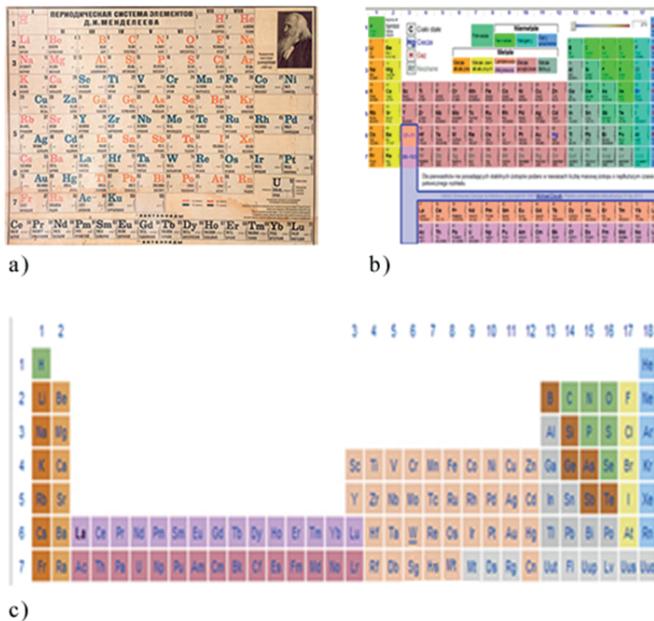
Przewidywalność jest najważniejszym atrybutem układu okresowego. To znaczy, że znając położenie pierwiastka w układzie okresowym i tendencje zmian w grupach i okresach, możemy określić jego właściwości (Rys. 4).



Rysunek 4. Zmiany różnych wielkości fizycznych i chemicznych w grupach i okresach układu Mendelejewa. Strzałki wskazują kierunki wzrostu

Figure 4. Changes of various physical and chemical data in groups and periods of Mendeleev's system. Arrows point to the growth direction

Znane są trzy główne formy tablic układu okresowego (Rys. 5): krótka, średnio-długa oraz dłuża. Każda z nich ma swoje zalety, ale również ograniczenia. Najstarsza, czyli tzw. tablica krótka, pamiętająca czasy odkrywców, ułożona według podziału na grupy i podgrupy, używana była do niedawna prawie wyłącznie, ale i dziś jest stosowana przez fizyków.

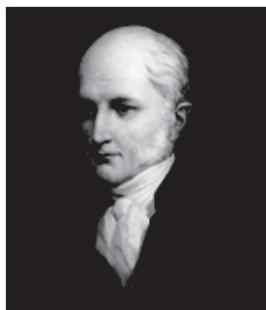


Rysunek 5. Trzy podstawowe formy tablicy układu okresowego: a) krótka, b) średnio-długa, c) dłuża

Figure 5. Three basic forms of the periodic table: a) short, b) medium-long, c) long

Obecnie najpopularniejsza wśród chemików jest tzw. forma średniodługa (Rys. 5b).

Uważa się, że układ okresowy, którego pełna forma powstawała przez 10 lat (1860–1870), ma przynajmniej trzech prekursorów tego odkrycia i sześciu niezależnych odkrywców [2]. Pierwszym z nich był angielski lekarz William Prout, autor hipotezy, że masy atomowe pierwiastków są wielokrotnością masy atomu wodoru.



William Prout



Johann Döbereiner



Leopold Gmelin

Rysunek 6. Prekursorzy układu okresowego  
Figure 6. Precursors of the periodic system

Mimo iż ta hipoteza nie została przyjęta entuzjastycznie przez świat naukowy, to dzięki niej zaczęto bardzo dokładnie wyznaczać masy atomowe pierwiastków, żeby móc ją potwierdzić (lub jej zaprzeczyć). Innego ważnego odkrycia dokonał w latach dwudziestych XIX wieku niemiecki chemik Johann Döbereiner, który zauważył, że niektóre pierwiastki (na przykład Li, Na, K albo Cl, Br, I) tworzą tzw. triady, czyli układy, w których masa pierwiastka środkowego równa się średniej arytmetycznej dwóch sąsiednich. Co więcej, dotyczyło to także wielu innych właściwości; pierwiastek środkowy miał cechy pośrednie pomiędzy dwoma pozostałymi. Ostatni z prekursorów to Leopold Gmelin, który również poszukiwał triad i znalazł ich więcej, gdyż zbadał właściwości znacznie większej ilości pierwiastków aniżeli Döbereiner [2].



Alexandre De Chancourtois



John Newlands



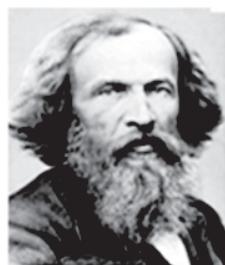
William Olding



Gustavus Hinrichs



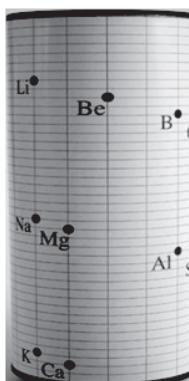
Julius Lothar Meyer



Dmitri Mendelejew

Rysunek 7. Odkrywcy układu okresowego  
Figure 7. Discoverers of the periodic system

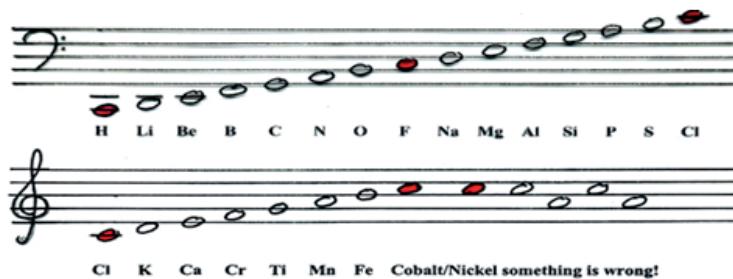
Jako pierwszy prawo okresowości odkrył francuski geolog, Alexandre de Chancourtois (Rys. 7). Ułożył on pierwiastki według wzrastającej masy atomowej w postać tzw. śrub tellurycznej w taki sposób, że te o podobnych właściwościach leżały na prostej (Rys. 8). Niestety, swoje odkrycie opublikował w czasopiśmie geologicznym, które czytało niewielu uczonych o innych specjalnościach, a ponadto wydawca nie zamieścił w artykule rysunku ze względu na problemy z jego reprodukcją. Z tych powodów niewielu pamięta o tym, że pierwszym odkrywcą układu okresowego był Alexandre de Chancourtois.



Rysunek 8. Śruba telluryczna de Chancourtois

Figure 8. Telluric Screw by de Chancourtois

Kolejnym uczonym zajmującym się okresowością właściwości pierwiastków był Anglik, John Newlands. Zaobserwował on, że pierwiastki można ułożyć w taki sposób, że co ósmy ma podobne właściwości. Jak wiemy, jest to prawdziwe w dwóch okresach: drugim i trzecim. W analogii do muzyki nazwał to odkrycie prawem oktaw. Ze względu na fakt, że nie był on zbyt dobrze znany w ówczesnym świecie naukowym, zignorowano tę informację, ironicznie sugerując ułożenie pierwiastków alfabetycznie.



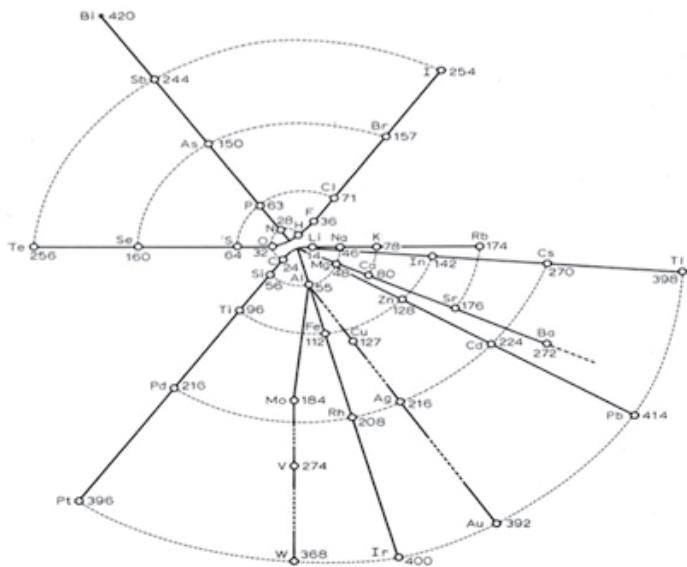
Rysunek 9. Prawo oktaw Newlandsa

Figure 9. The law of octaves by Newlands

Anglik William Olding zaważył w swojej tablicy aż 57 pierwiastków i pozostawił kilka pustych miejsc dla pierwiastków jeszcze nieodkrytych. Jak wiadomo, to ostatnio przypisuje się najczęściej jedynie Mendelejewowi [2].

Wśród odkrywców prawa okresowości niewątpliwie najbardziej ekstrawagancką wyobraźnią odznaczał się Gustavus Hinrichs, Duńczyk mieszkający w Stanach Zjednoczonych [2]. Ułożył on pierwiastki tworzące dzisiejsze grupy na prostych w postaci szprych koła. Należy podkreślić, że już Hinrichs zauważył, że chociaż tellur jest cięższy od jodu, należy ze względu na właściwości umieścić go

wśród tlenowców. Jednak to przedstawienie pierwiastków również przypisuje się Mendelejewowi.



Rysunek 10. Układ okresowy Hinrichsa  
Figure 10. Periodic system by Hinrichs

Kolejnym odkrywcą był niemiecki chemik, Julius Lothar Meyer. Jego tablica bardzo przypomina układ Dymitra Mendelejewa, a pojawienie się obu układów dzieliło jedynie kilka miesięcy. Lothar Meyer oparł analizę pierwiastków na właściwościach fizykochemicznych, takich jak na przykład, objętość atomowa (iloraz masy i gęstości) czy temperatura topnienia. Pierwiastki podobne układały się na krzywych w miejscach ekstremalnych. Lothar Meyer pozostawił w swojej tablicy również puste miejsca dla pierwiastków nieodkrytych oraz zmienił położenie teluru i jodu.

Dlaczego wobec tego pamiętamy przede wszystkim układ okresowy jako dzieło Mendelejewa, ostatniego z odkrywców? Jak zauważył Eric Scerri, amerykański historyk i filozof chemii, układ okresowy, który zaproponował w 1869 roku Dymitr Mendelejew, miał największe znaczenie, gdyż wyróżniał się spośród pozostałych swoją głębią. Mendelejew nadał mu podstawy filozoficzne, nawiązując do pojęcia pierwiastka podanego przez Arystotelesa. Według tego ostatniego istota pierwiastków była abstrakcyjna. U Mendelejewa istota pierwiastka nie ulegała zatarciu nawet w jego połączeniach z innymi pierwiastkami a znakiem, „odciskiem” materialnym danego pierwiastka w związku była jego masa. Tak więc w HgO nie ma rtęci, bo jest to związek dwóch pierwiastków, ale pozostaje istota rtęci (pierwiastek abstrakcyjny, nieobserwowałny). Śladem materialnym jest masa atomowa rtęci w tym związku. Rozważania nad abstrakcyjnością pierwiastków były dla Mendelejewa ważniejsze

od dowodów eksperymentalnych, gdyż pozwoliły mu bez wahania uznać, że układ okresowy dotyczy pierwiastków abstrakcyjnych, a zatem można na przykład postawić tellur przed jodem.

Dzisiejszy układ oparty na liczbie porządkowej jako podstawie systematyki wyjaśnia m.in. przyczynę umieszczenia telluru przed jodem i kobaltu przed niklem. Jednak aby to się dokonało, potrzeba było wiele sukcesów fizyki i chemii z końca XIX i początku XX wieku, takich jak m.in. odkrycie elektronu czy złożoności (podzielności) atomu, izotopów, powstanie teorii kwantowej atomu oraz zakazu Pauliego. Do tej pory nie ma jednak zgody pomiędzy fizykami a chemikami m.in. w sprawie umieszczenia wodoru i helu. Wodór tworzy jony jednododatnie – tak jak litowce, ale i jednoujemne – jak chlorowce. Były również propozycje umieszczenia wodoru nad węglem ze względu na podobne (w połowie) zapełnienie powłoki. Hel ze względu na konfigurację  $1s^2$  jest dla fizyków berylowcem (Rys. 11), co jest nie do przyjęcia dla chemików, gdyż jest to pierwiastek o właściwościach gazu szlachetnego. Z tego powodu często wybiera się dla tych pierwiastków miejsce ponad zwartą częścią układu.

The image shows Janet's left-step periodic table. The table is organized into vertical columns. Hydrogen (H) is placed in the first column, and helium (He) is placed in the second column. The remaining elements are arranged in groups corresponding to the alkali metals (Li, Be) and the alkaline earth metals (B, C, N, O, F, Ne, Na, Mg). The table continues with groups of transition metals (Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Kr, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Cs, Ba) and the lanthanides (La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr, Rf, Db, Sg, Bh, Hs, Mt, Ds, Rg, Cu, Nu, Fl, Mc, Lv, Ts, Og).

Rysunek 11. Lewostopniowa tablica Janeta z umieszczonymi wodorem i helem w grupach odpowiednio litowców i berylowców

Figure 11. Left-step table by Janet with hydrogen and helium in the alkali metal and alkaline earth metal groups, respectively

Innym przykładem dyskusji nad umiejscowieniem pierwiastków w układzie okresowym jest grupa trzecia, w której w większości tablic kolejność jest zgodna z zaleceniami UPAC, czyli Sc, Y, La, Ac. Jednak, jak się okazuje, lutet (Lu) i lorens (Lr) posiadają konfigurację elektronową  $nf^{14}nd^1ns^2$ , czyli są *de facto* pierwiastkami d-elektronowymi. Jeśli konsekwentnie układ okresowy jest ułożony według konfiguracji elektronowej, lutet i lorens powinny być umieszczone w grupie trzeciej układu jako cięższe analogi skandu i itru. Fragment długiej formy tablicy oraz tablicę średnioługą z prawidłowym umieszczeniem pierwiastków grupy trzeciej podano na Rysunku 12.

Periodic table																		
Periodic table with correctly placed elements for scandium group																		
1	1 H 1.008	2	3 Li 6.94	4 Be 9.0122	5 B 10.81	6 C 12.011	7 N 14.007	8 O 15.999	9 F 16.998	10 Ne 20.18	11 Na 22.990	12 Mg 24.305	13 Al 26.982	14 Si 28.085	15 P 30.974	16 S 32.06	17 Cl 35.45	18 Ar 39.94
4	19 K 39.098	20 Ca 40.078	21 Sc 44.956	22 Ti 47.867	23 V 50.942	24 Cr 51.996	25 Mn 54.938	26 Fe 55.845	27 Co 58.933	28 Ni 58.693	29 Cu 63.546	30 Zn 65.38	31 Ga 69.723	32 Ge 72.63	33 As 74.922	34 Se 78.96	35 Br 79.904	36 Kr 83.79
5	37 Rb 85.468	38 Sr 87.62	39 Y 88.90	40 Zr 91.224	41 Nb 92.906	42 Mo 95.96	43 Tc [97.91]	44 Ru 101.07	45 Rh 102.91	46 Pd 106.42	47 Ag 107.87	48 Cd 112.41	49 In 114.82	50 Sn 118.71	51 Sb 121.76	52 Te 127.60	53 I 126.90	54 Xe 131.2
6	55 Cs 132.91	56 Ba 137.33	71 Lu 174.97	72 Hf 178.49	73 Ta 180.95	74 W 183.84	75 Re 186.21	76 Os 190.23	77 Ir 192.22	78 Pt 195.08	79 Au 196.97	80 Hg 200.59	81 Tl 204.38	82 Pb 207.2	83 Bi 208.98	84 Po [208.98]	85 At [209.99]	86 Rn [222.0]
7	87 Fr [223.02]	88 Ra [226.03]	103 Lr [262.11]	104 Rf [265.12]	105 Db [268.13]	106 Sg [271.13]	107 Bh [270]	108 Hs [277.15]	109 Mt [276.15]	110 Ds [281.16]	111 Rg [280.16]	112 Cn [285.17]	113 Uut [284.18]	114 Fl [289.19]	115 Uup [288.19]	116 Lv [293]	117 Uus [294]	118 Uuo [294]
*Lanthanoids																		
**Actinoids																		
	57 La 138.91	58 Ce 140.12	59 Pr 140.91	60 Nd 144.24	61 Pm [144.91]	62 Sm 150.36	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.93	66 Dy 162.50	67 Ho 164.93	68 Er 167.26	69 Tm 168.93	70 Yb 173.05				
	89 Ac [227.03]	90 Th [230.04]	91 Pa [231.04]	92 U [232.03]	93 Np [237.03]	94 Pu [244.06]	95 Am [245.03]	96 Cm [247.07]	97 Bk [247.07]	98 Cf [254.06]	99 Es [262.08]	100 Fm [267.10]	101 Md [268.10]	102 No [280.10]				

Rysunek 12. Forma średniołudga tablicy układu okresowego z prawidłowo umieszczonymi pierwiastkami grupy skandowców

Figure 12. Medium-long form of periodic table with correctly placed elements for scandium group

Czy wobec tego istnieje idealny układ okresowy akceptowany przez wszystkich? Jeśli prawo okresowości istnieje i wyraża się w obiektywnym usytuowaniu pierwiastków, to powinna być jedna klasyfikacja periodyczna. Jak dotąd takiej nie znaleziono, choć badania układu nadal trwają.

## 2. OD PIKO- DO NANOPERIODYCZNOŚCI

Utworzenie „starego” układu było efektem pracy wielu uczonych. Powstawał on stopniowo w ciągu kilkudziesięciu lat, przede wszystkim dzięki badaczom, których nazywamy dzisiaj prekursorami (Prout, Döbereiner, Gmelin) oraz sześciu rzeczywistym odkrywców (Chancourtois, Newlands, Olding, Hinrichs, Lothar Meyer i Mendelejew) [2]. Chociaż minęło prawie 150 lat od jego powstania, dyskusja nad tradycyjnym układem okresowym wciąż trwa. Jednocześnie istnieje świadomość potrzeby uporządkowania lawinowo rosnącej ilości nowo zsyntezowanych form nanometrycznych ( $10^{-9}$  m). Obiekty te, chociaż powstałe z atomów, czyli form pikometrycznych ( $10^{-12}$  m), różnią się znacząco od nich właściwościami. Fullereny są dobrzym przykładem, że klastery węglowe to rzeczywiście coś innego niż diament czy grafit. Stąd niezbędne jest znalezienie nowego paradygmatu, czyli zbioru pojęć tworzących podstawy nauki dla form o rozmiarach nano. Będzie on uporządkowanym sposobem widzenia świata w skali nanometrycznej podobnie jak tablica

Mendelejewa dla wielkości atomowych. Taki paradygmat pozwoliłby działać celowo przez projektowanie związków dla konkretnych potrzeb.

W ostatnich dziesięcioleciach duży postęp nastąpił w dziedzinie nauki o klastercach, czyli grupach atomów o wielkościach nano połączonych bezpośrednio ze sobą i tworzących pewną formę zamkniętą materii (nazwę „klaster” zaproponował wybitny chemik amerykański, Albert Cotton). Czy istnieje szansa na układ określony dla takich klasterek, przewidujący a priori ich właściwości? Jak go poszukiwać i czy historia odkrycia układu okresowego dla atomów pierwiastków może nam w tym pomóc?

## 2.1. SUPERATOMY NAŚLADUJĄ PIERWIASTKI UKŁADU MENDELEJEWIA. LICZENIE ATOMÓW I ELEKTRONÓW

Za pierwszy krok w tym kierunku można uznać fascynujące odkrycie podobieństwa właściwości pewnych klasterek do atomów pierwiastków tradycyjnej tablicy. Klaster zsyntezowany przez człowieka posiadający cechy atomów pierwiastków klasycznego układu okresowego, czyli mający właściwość ich naśladowania, nazwany został sztucznym atomem bądź superatorem. Nazwę tą zaproponowali Castleman i Khanna [3]. Superatomi to jednostkowe bloki budulcowe poszukiwanego nowego układu okresowego, podobnie jak atomy to bloki budulcowe pierwiastków tablicy Mendelejewa. Naśladowanie właściwości tradycyjnych atomów oznacza, że musi istnieć hierarchia przekazu informacji od poziomu pikoskali do nanoskali i dalej, czyli: jądro → poziom atomowy (elektrony) → cząsteczka → skala subnano → nano → mikro → makro.

Otrzymano już klastery o właściwościach helowców, chlorowców, berylowców czy litowców (tab. 1). To, co było marzeniem alchemików, czyli transformacje pierwiastków, realizowane jest we współczesnych laboratoriach.

Tabela 1. Przykłady cząsteczek dwuatomowych oraz klasterek naśladujących właściwości pojedynczych atomów, jonów i prostych związków

Table 1. Examples of the diatomic molecules and clusters mimicking properties of single atoms, ions and simple compounds

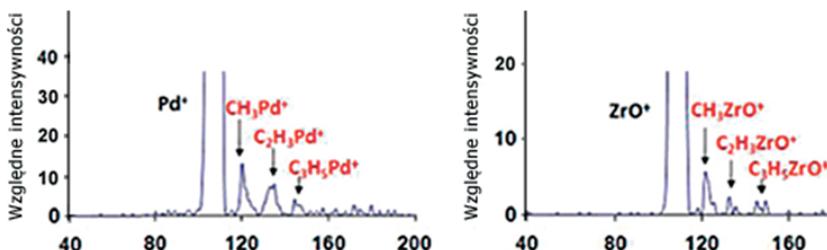
Forma dwuatomowa	Naśladowany atom (jon)	Klaster	Naśladowany atom (jon, grupa)
ZrO	Pd	Al <sub>7</sub> C <sup>-</sup>	SiC
ZrO <sup>+</sup>	Pd <sup>+</sup>	Al <sub>7</sub> O <sup>-</sup>	CO
ZrO <sup>-</sup>	Pd <sup>-</sup>	VNa <sub>8</sub>	Mn
WC	Pt	VNa <sub>7</sub> <sup>-</sup>	Mn
WC <sup>-</sup>	Pt <sup>-</sup>	Al <sub>14</sub>	berylowce
TiO <sup>-</sup>	Ni <sup>-</sup>	Al <sub>13</sub>	chlorowce
MoC <sup>-</sup>	Ru <sup>-</sup>	Al <sub>13</sub> <sup>-</sup>	gazy szlachetne

Forma dwuatomowa	Naśladowany atom (jon)	Klaster	Naśladowany atom (jon, grupa)
		$\text{Ag}_8^-$	metale alkaliczne
		$\text{Cu}_8^-$	metale alkaliczne

Jak się okazało, w poszukiwaniu układu okresowego dla świata nano, podobnie jak to miało miejsce w klasycznym układzie, ważne są małe kroki. Jednym z nich było znalezienie korelacji właściwości pomiędzy izoelektronowym atomem pierwiastka i cząsteczką innego pierwiastka (Tab. 1). Badania widm fotoelektronowych ujemnie naładowanych metali  $\text{Ni}^-$ ,  $\text{Pd}^-$ ,  $\text{Pt}^-$  oraz izoelektronowych form cząsteczek dwuatomowych wykazały, że cząsteczki otrzymywane w plazmie mogą naśladować atomy pierwiastków. Przez wnioskową analizę widm fotoelektronowych autorzy rozszerzyli ten wniosek na superatomy (klastery) [4].

Dwuatomowe cząsteczki  $\text{ZrO}$ ,  $\text{WC}$ ,  $\text{TiO}$  czy  $\text{MoC}$  są izowalencyjne odpowiednio z  $\text{Pd}$ ,  $\text{Pt}$ ,  $\text{Ni}$  i  $\text{Ru}$  (Tab. 1). Na przykład okazało się, że ilość energii potrzebna do usunięcia elektronu z  $\text{TiO}$ , związku o sumarycznej liczbie 10 elektronów walencyjnych (4 elektryny tytanu + 6 elektronów tlenu), jest taka sama jak ilość potrzebna do usunięcia elektronu z atomu niklu, który posiada również 10 elektronów walencyjnych (8 elektryny d i 2 elektryny s).

Kolejnym przykładem efektu naśladowania cech pierwiastków przez izowalencyjne formy dwuatomowe jest reakcja palladu oraz  $\text{ZrO}$  z propanem [5].



Rysunek 13. Fragment rysunku widm spektrometrii mas kationu palladowego i tlenku cyrkonu powstały w reakcjach z propanem. Oprac. na podstawie [5]

Figure 13. A fragment of the image of the mass spectrometry spectra of a palladium cation and zirconium oxide formed in situ in the reaction of propane; the drawing based on [5]

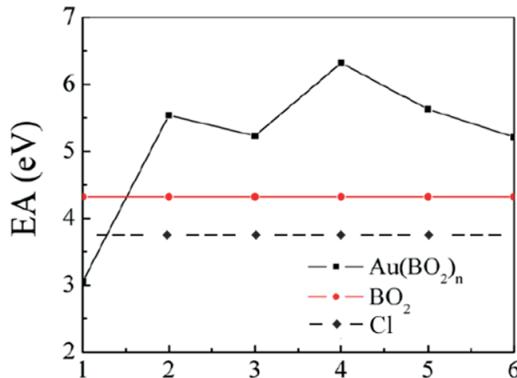
Powstałe formy  $\text{ZrO}^+$  i  $\text{Pd}^+$  utworzone *in situ* w fazie gazowej (mieszanina tlenu i helu) z odparowanego metalicznego cyrkonu i palladu reagują z propanem dając podobne widmo masowe. To sugeruje podobieństwo struktur elektronowych i właściwości katalitycznych [5]. Cyrkon ma konfigurację  $[\text{Kr}] 5s^2 4d^2$ , a pallad  $[\text{Kr}] 5s^2 4d^8$ . Temu pierwszemu brakuje do konfiguracji powłoki walencyjnej palladu 6 elektronów. Wprowadzenie w miejsce cyrkonu tlenku cyrkonu  $\text{ZrO}$  (konf. tlenu  $[\text{He}] 2s^2 2p^4$ ), dostarcza brakujące 6 elektronów. W ten sposób zastąpimy pallad znacznie (500-krotnie) tańszym związkiem (naturalnie przy założeniu, że odpowiedni klaster złożony z  $\text{ZrO}$  rzeczywiście będzie naśladował pallad). Patrząc na

tradycyjny układ okresowy, można przewidzieć, jaka kombinacja atomów (elektronów) w klasterze będzie naśladować inne atomy pierwiastków. W ten sposób można zrobić krok w kierunku „przewidywalności”, czyli najważniejszego atrybutu starego układu. Obliczając ilości elektronów, można będzie zaprojektować klaster o konkretnych właściwościach pierwiastka z tablicy Mendelejewa przez wybór jego wielkości, składu i ładunku.

Jak wspomniano, licząc elektrony walencyjne, można przewidzieć, jakie ich kombinacje dadzą klaster o wybranych właściwościach. Platyna jest bardzo droga, a my jeździmy samochodami z katalizatorami platynowymi, które przyspieszają reakcje toksycznych spalin samochodowych ( $\text{CO}$ ,  $\text{C}_x\text{H}_y$  czy  $\text{NO}_x$ ) do produktów mniej uciążliwych dla środowiska ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  czy  $\text{H}_2\text{O}$ ). Gdyby zamiast platyny można było zastosować klaster węgliku wolframu (Tab. 1), oszczędności byłyby znaczne.

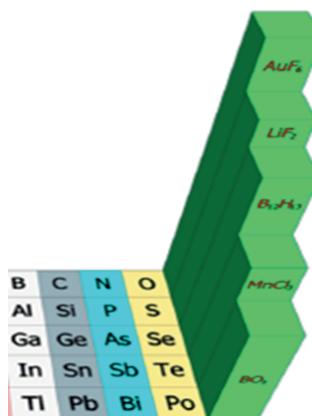
Metodą spektroskopii fotoelektronowej stwierdzono, że ilość energii wymagana do usunięcia elektronów z wspomnianej wcześniej cząsteczki  $\text{TiO}$  jest taka sama jak ta wymagana dla izowalencyjnego  $\text{Ni}$ . To samo dotyczy  $\text{ZrO}$  i  $\text{Pd}$ ,  $\text{WC}$  i  $\text{Pt}$ . Tak więc przyszłe formy klasterowe złożone z  $\text{TiO}$ ,  $\text{ZrO}$  i  $\text{WC}$  powinny być superatomami naśladującymi „tradycyjne” pierwiastki – odpowiednio  $\text{Ni}$ ,  $\text{Pd}$  i  $\text{Pt}$ , czyli ich mimetykami. Jak wspomniano, odkrycie naśladowania właściwości tradycyjnych pierwiastków przez superatome może w przyszłości prowadzić do znacznie tańszych materiałów mających wielorakie zastosowanie, np. jako nowe źródła energii, bardziej efektywne metody usuwania zanieczyszczeń środowiska czy jako katalizatory. Jak wykazano, klastery będą mogły zastępować bardzo drogie, a potrzebne pierwiastki tradycyjnego układu okresowego. Ta współczesna alchemia reprezentuje bardzo praktyczną ideę ekonomiczną, czyli zastąpienie drogiego materiału tanim.

Inną formą obliczania ilości elektronów w tradycyjnych atomach, prowadzącą do otrzymywania trwałych układów, jest funkcjonująca w nauce reguła oktetu [6]. Głosi ona, że atomy łączą się w związki w ten sposób, żeby każdy z nich dysponował 8 elektronami na ostatniej powłoce. W efekcie każdy z nich, na przykład  $\text{NaCl}$  o budowie jonowej ( $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ), przybiera konfigurację gazu szlachetnego, którego – jak wiadomo – cechuje wyjątkowa trwałość. W ostatniej dekadzie okazało się, że można otrzymać superchlorowce, na przykład  $\text{NaCl}_2^-$  o powinowactwie elektronowym silniejszym niż chlор ( $\text{Cl}^- = 3,7 \text{ J/mol}$ ), jeden z najbardziej elektroujemnych pierwiastków. Co więcej, przez zamianę sodu na metal przejściowy, a chlorku na  $\text{H}$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{CN}$  otrzymuje się formy chemiczne o jeszcze silniejszym powinowactwie elektronowym, np.  $\text{MnO}_4^-$ . Jak widać (Rys. 14), istnieją superhalogeny niezawierające metalu ani halogenków, na przykład  $\text{BO}_2^-$  (powinowactwo elektronowe 4,3 J/mol). Dodając jon metalu np. złota do superchlorowca  $\text{BO}_2^-$  otrzymuje się  $\text{Au}(\text{BO}_2)_n^-$ , czyli hiperhalogeny, formy nawet bardziej elektroujemne niż superhalogeny (Rys. 14).



Rysunek 14. Powinowactwo elektronowe [J/mol] hiperhalogenu  $\text{Au}(\text{BO}_2)_n$  jako funkcja n. Dla porównania pokazano również powinowactwo superhalogenu ( $\text{BO}_2$ ) oraz halogenu (Cl). Oprac. na podstawie [6]  
 Figure 14. Electronic affinity [J/mole] of  $[\text{Au}(\text{BO}_2)_n]$  hyperhalogen as a function of n. Affinity of ( $\text{BO}_2$ ) superhalogen, and (Cl) halogen were shown for comparison. Based on [6]

Tak więc do rodzin superchlorowców mogą dołączyć klastery, których wzory chemiczne niewiele mają wspólnego z pierwiastkami grupy 17 (Rys. 14).



Rysunek 15. Fragment tablicy Mendelejewa z grupą superhalogenów. Oprac. na podstawie [6]  
 Figure 15. Fragment of the Mendeleev table with a group of superhalogen. Based on [6]

Innym przykładem, w których obowiązuje obliczanie elektronów, jest tzw. reguła 18 elektronów. Według niej układy zawierające w sumie 18 elektronów walencyjnych są trwałe. Reguła ta zwana regułą gazu szlachetnego, sprawdza się przede wszystkim dla karbonylków metali, na przykład  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  i związków metalloc organicznych, czego przykładem jest  $\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_6)_2$ . Obowiązuje ona również w pewnych klastercach, na przykład  $\text{TaAu}_{12}$ ,  $\text{WAu}_{12}$ ,  $\text{WSi}_{12}$ ,  $\text{CrSi}_{12}$  czy w formach powstałych poprzez zamknięcie metalu przejściowego w klastercze np.  $\text{Ti@Si}_{16}$ . Klastery krzemowe i germanowe zawierające metale przejściowe mogą znaleźć zastosowanie w elektronice.

W przewidywaniu struktur klasterów z niedoborem elektronów, takich jak borany, ale również glinowodory, znalazły zastosowanie reguły Wade'a-Mingosa [7]. Reguły te pozwalają przewidywać strukturę klastera przez obliczanie elektronów wiązań w jego „szkielecie” [7]. Na przykład  $\text{Al}_4\text{H}_6$  – glinowodór spełniający te reguły tworzy bardzo trwały klaster i podejmowane są próby zastosowania tego związku jako materiału do przechowania wodoru [6].

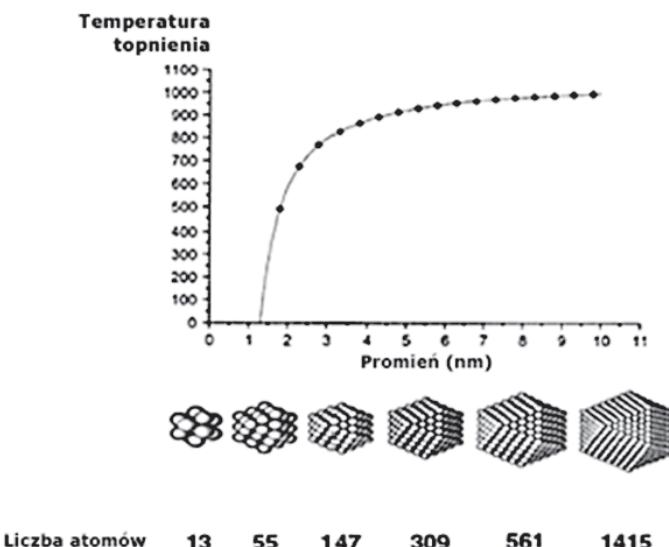
## 2.2. PARAMETRY KRYTYCZNE SUPERATOMÓW

Poszukiwanie nowego układu okresowego wiąże się ze znalezieniem tzw. parametrów krytycznych (zmiennych) określających superatomy. Na podstawie obszernego materiału doświadczalnego stwierdzono, że właściwości klastera zależą od sześciu zmiennych. Są to: 1) rozmiar, 2) kształt, 3) chemia powierzchni, 4) sztywność/giętkość, 5) architektura, 6) skład chemiczny [8].

Znaczy to, że właściwości klastera zmieniają się okresowo i są zależne od powyższych parametrów. Ponadto należy pamiętać, że klastery mają więcej parametrów zmiennych niż atomy, gdyż mają dwie skale długości: wewnętrzklasterową i międzyklasterową.

Tak więc superatomy jako znacznie bardziej skomplikowane układy niż atomy skali pikometrycznej mogą wykazywać zaskakujące właściwości. Przykładowo małe klastery złota z zewnętrzna warstwą metalu związaną z glutationem  $[\text{Au}_{25}(\text{GSH})_{18}]$  wykazują interesujące właściwości emisyjne [9]. Być może najbardziej spektakularną cechą takich klasterów jest ta, że właściwości materiałów zależą od ich rozmiarów w nanoskali. Na przykład temperatura topnienia, fluorescencja, przewodnictwo elektryczne, magnetyzm czy reaktywność są funkcjami wielkości form nano.

Przykładem zależności właściwości od wielkości klastera jest temperatura topnienia klasterów złota (Rys. 16).

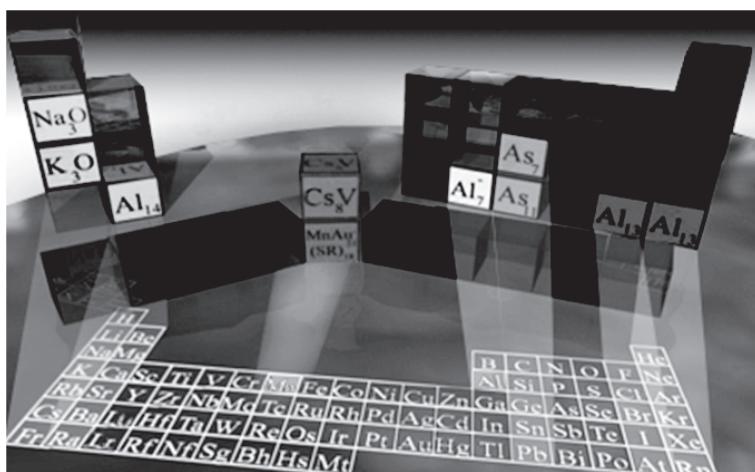


Rysunek 16. Temperatury topnienia klasterów złota jako funkcja ich wielkości. Oprac. na podstawie [8]  
Figure 16. Melting temperature of gold clusters as a function of their size. Based on [8]

Jak można zauważyć, w małych klasterach złota zależności są wyraźniej zaznaczane. Od wielkości klastera złota zależy również cytotoxiczność – inna ważna właściwość materii. Jest ona duża dla małych klasterów złota, niewielka albo żadna dla klasterów większych [10]. W tym miejscu warto zacytować słowa A.S. Eddingtona: „Sądziliśmy, że skoro znamy jeden, znamy i dwa, ponieważ jeden i jeden to dwa. Teraz widzimy, że musimy dowiedzieć się wiele na temat »i«”.

Reasumując, zaobserwowano, że materia w skali nanometrycznej może powieść zachowania atomów pierwiastków tradycyjnego układu okresowego, co doprowadziło do przyjęcia wniosku, że istnieje hierarchia informacji przekazywana począwszy od jądra atomowego przez powłoki elektronowe atomów aż do układów nanometrycznych i (prawdopodobnie) wyżej [8].

Wydawało się, że dobrym pomysłem ilustrującym owo naśladownictwo będzie utworzenie trzeciego wymiaru tablicy układu okresowego, w którym nowa oś będzie zawierać odpowiednie klastery (Rys. 15 i 17).



Rysunek 17. Układ okresowy, w którym trzeci wymiar ilustruje mimetyczne właściwości kластерów w stosunku do tradycyjnych atomów pierwiastków

Figure 17. The periodic table in which the third dimension illustrates the mimetic properties of clusters towards traditional elements

Ponadto oprócz naśladowania właściwości znalezione sześć parametrów zmiennych (krytycznych) określających formy nano. Wiąże się to z faktem, że w klastercach, oprócz ich wewnętrznej budowy (konfiguracje elektronowe poszczególnych atomów), istnieją również oddziaływanie międzyatomowe.

### 2.3. BUDOWA POWŁOKOWA KLASTERÓW. MODEL JELLIUM. LICZBY MAGICZNE

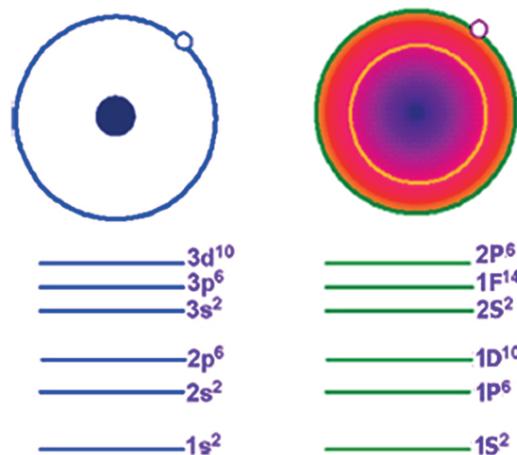
Kolejnym ważnym krokiem prowadzącym do konstrukcji układu okresowego dla form nanometrycznych jest obserwacja, że w analogii do powłok jądrowych czy elektronowych w atomach również klastery posiadają budowę powłokową. Jak można zauważyć, materia organizuje się w pewnym porządku, przez tworzenie tzw. bloków budulcowych – w przypadku materii subatomowej są to nukleony (protony i neutrony), natomiast w atomach organizacja przebiega przez dodanie kolejnych elektronów w powłoce aż do jej wypełnienia.

Atomy, czyli bloki budulcowe chemii ciała stałego, wpisują się w tradycyjny układ okresowy ilustrujący prawo okresowości. Klastery można uznać za formę pośrednią pomiędzy atomami a materiałem makroskopowym [8]. Jak się okazało, trwałość superatomów jest zróżnicowana. Pewne klastery są trwalsze, mniej reaktywne, trudniejsze do utlenienia niż inne klastery.

Okazuje się również, że podobnie jak dla skali atomowej, klastrom, czyli blokom budulcowym nanoskali, można przypisać tzw. liczby magiczne atomów czy elektronów. Jak wiadomo, liczby magiczne nukleonów w jądrze atomowym to **2, 8, 28, 50, 82, 126**, a elektronów w powłokach to **2, 10, 18, 36, 54**. Jak stwierdzono,

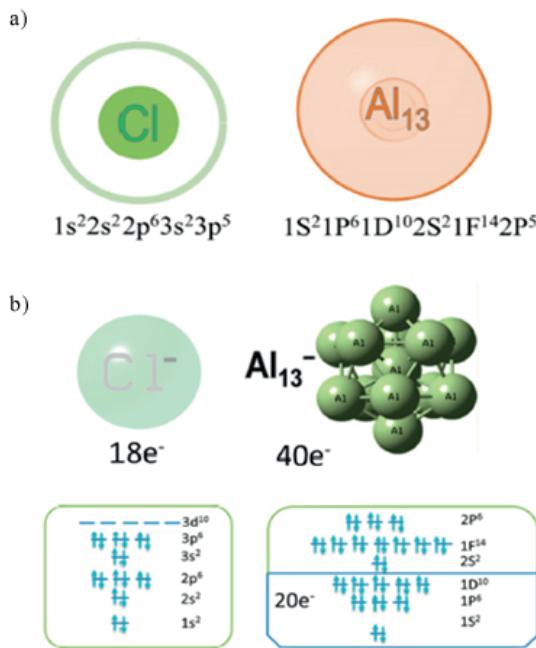
klastery o liczbach magicznych atomów i/lub elektronów **2, 8, 18, 20, 40...** posiadają wyjątkową trwałość [11]. Liczby te odpowiadają zamkniętym powłokom klastera. Tak więc „klastery magiczne” powstają przez wypełnienie powłok elektronowych, atomowych lub jednych i drugich w danym klasterze. W zrozumieniu właściwości klasterów pomogła obserwacja klasterów glinu. Okazało się, że klaster złożony z 13 atomów glinu ( $\text{Al}_{13}$  = ilość elektronów walencyjnych:  $13 \times 3 = 39$ ) był reaktywny w stosunku do tlenu, natomiast klaster  $\text{Al}_{13}^-$  (liczba elektronów 40) był niereaktywny. Liczba elektronów walencyjnych jest więc ważną wskazówką w przewidywaniu trwałości klastera.

W celu opisu klasterów pod kątem wyjaśnienia ich zróżnicowanych właściwości Knight i współpracownicy [12] zaproponowali tzw. model „jellium” (żelka). Model ten dobrze opisuje właściwości małych klasterów złożonych z 2–100 atomów. Na podstawie tego modelu udało się wyjaśnić i zrozumieć wiele czynników, które rządzą właściwościami klasterów. W modelu „jellium” ładunek dodatni jonów jest równomiernie rozłożony, tzn. wykazuje jednakową gęstość, a elektrony obsadzają orbitale w kolejności podanej na Rysunku 18. Reguła „jellium” głosi, że warunkiem zwiększonej trwałości klastera są zamknięte powłoki elektronowe (liczby magiczne). Reguła ta bazująca na modelu „jellium”, potwierdzona zarówno eksperymentalnie, jak i teoretycznie, dotyczy fazy gazowej małych klasterów. Ponadto zakłada istnienie sferycznych powłok elektronowych (Rys. 18).



Rysunek 18. Kolejność powłok w atomie (a) i klasterze (b) wg modelu „jellium”. Oprac. na podstawie [3]  
Figure 18. The order of shells in an atom (a) and cluster (b) according to the „jellium” model. Based on [3]

Przykładem funkcjonowania modelu „jellium” jest porównanie chloru oraz jonu chlorkowego z klasterami odpowiednio  $\text{Al}_{13}$  oraz  $\text{Al}_{13}^-$  (Rys. 19).

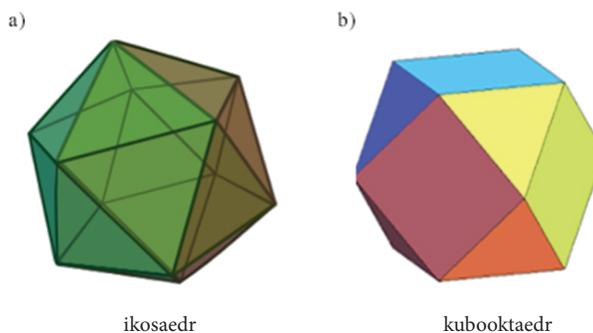


Rysunek 19. a) Atom chloru (17 elektronów) i naśladujący jego właściwości klaster glinu  $\text{Al}_{13}$  (39 elektronów) oba o konfiguracji  $s^2p^5$ ; b) bardzo trwałe formy chemiczne: jon chlorkowy  $\text{Cl}^-$  i anion klastera glinu  $\text{Al}_{13}^-$  o liczbach magicznych elektronów odpowiednio  $\text{Cl}^-$  (18-konfiguracja argonu) oraz klastera (39 elektronów + 1). Oprac. na podstawie [13]

Figure 19. a) Chlorine atom (17 electrons) and mimicking its properties aluminium cluster  $\text{Al}_{13}$  (39 electrons) both of  $s^2p^5$  configuration; b) very stable chemical forms: chlorine anion  $\text{Cl}^-$  (18-argon atom configuration) and magic aluminium cluster anion (39 + 1 electrons). Based on [13]

Zatem w modelu „jellium” („żelka”) – podobnie jak w przypadku atomu pierwiastka w tablicy Mendelejewa – nawiązuje się do konfiguracji i powłok elektronowych. Już od początku XX wieku wiadomo, że atom każdego pierwiastka ma unikatowy zestaw składników jądra (protonów i neutronów) oraz elektronów. Na zasadzie analogii przewiduje się, że każdy nanomateriał będzie miał swój zbiór parametrów krytycznych , a pewne układy o liczbachmagicznych elektronów i/lub atomów będą trwalsze od innych.

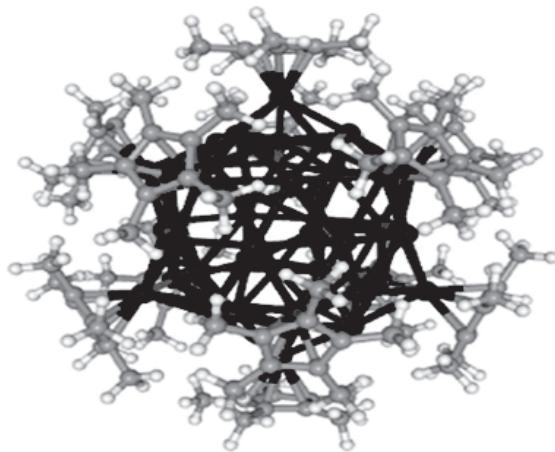
Jak wspomniano wcześniej, model ten funkcjonuje dla małych klasterów. Dla dużych klasterów (1500–22 000) preferowany jest opis budowy związków modelem rdzeń-powłoka o symetrii ikosaedru i kubooktaedru (Rys. 20, zobacz także Rys. 16 ).



Rysunek 20. Budowa dużych klasterów nie opisywanych modelem „jellium”

Figure 20. Structure of large clusters not described with „jellium” model

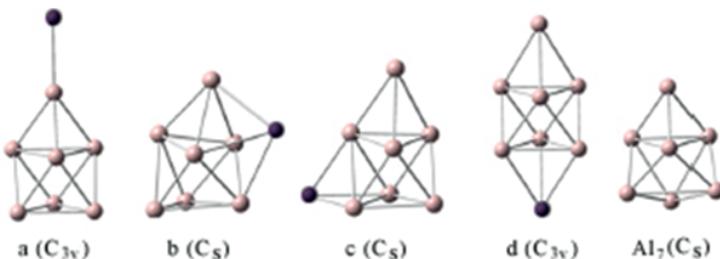
Świadczy to o tym, że wraz ze wzrostem klastera kolejny dodany atom powoduje dynamiczne zmiany prowadzące w efekcie do transformacji strukturalnej. Okazuje się, że klastery mogą być również stabilizowane przez ligandy (vide infra). Zależy to zarówno od liczby ligandów, jak i wielkości rdzenia metalicznego klastera. Może zdarzyć się również tak, że jeśli liczba elektronów walencyjnych nie odpowiada zamkniętej powłoce elektronowej, to część elektronów może być zużyta do tworzenia wiązań kowalencyjnych z ligandem i w ten sposób całość będzie miała magiczną liczbę elektronów. Na przykład w klasterze  $\text{Al}_{50}\text{Cp}^*_{12}$  (gdzie  $\text{Cp}^*_{12}$  pentametylocyclopentadienyl) (Rys. 21) tylko 38 atomów glinu tworzy rdzeń, a zewnętrzna powłoka złożona jest z 12 atomów glinu związkanych z ligandem organicznym. Tak więc  $\text{Al}_{50}\text{Cp}^*_{12} = \text{Al}_{38}(\text{AlCp}^*)_{12}$  [14].

Rysunek 21. Struktura klastera  $\text{Al}_{50}\text{Cp}^*_{12}$ . Oprac. na podstawie [14]Figure 21. Structure of  $\text{Al}_{50}\text{Cp}^*_{12}$  cluster ( $\text{Cp}^*$ – cyclopentadienyl). Based on [14]

Ilość elektronów glinu w całym klasterze  $\text{Al}_{50}\text{Cp}^{+}$  ( $38 \times 3 + 12 \times 2 = 138$ ) jest liczbą magiczną. Także w innych klasterach np.  $\text{Al}_n\text{H}_m$  wartości n i m mogą się zmieniać aż do osiągnięcia trwałych układów. Jak podano wcześniej, większą trwałość klasterom zapewniają ligandy. Te „pokryte” ligandami klastery w większości przypadków zachowują strukturę taką jak w fazie gazowej. Ogólnie rzecz ujmując, wspólną cechą tych modeli jest zależność trwałości od liczb magicznych elektronów, atomów bądź jednych i drugich.

#### 2.4. REAKTYWNOŚĆ SUPERATOMÓW

Su w 2013 roku badał teoretycznie serię superatomów o wzorze ogólnym  $[\text{Al}_n\text{X}]^{0/-}$ , gdzie X oznaczało kolejno badane wszystkie halogenki [15]. Natomiast Huang wraz z innymi [16], analizując układ  $\text{Al}_7$ , odkrył, że można zsyntezować związki z pierwszą grupą pierwiastków klasycznego układu okresowego o wzorze ogólnym  $\text{MAl}_7$  (M-Li, Na, K). Okazuje się, że wiązanie M-Al jest silne i ma charakter wiązania kowalencyjnego. Znaleziono, że najtrwalszy jest klaster  $\text{NaAl}_7$ , gdyż inne mają tendencję do polimeryzacji. Ponadto stwierdzono, że  $\text{NaAl}_7$  jest dobrym kandydatem na materiał w optyce nieliniowej.  $\text{Al}_7$  posiada konfigurację  $1S^21P^61D^{10}2S^22P^1$ . W związkach  $\text{MAl}_7$  najbardziej zewnętrzny elektron s potasowca może być przeniesiony do klastera. Przez umieszczanie metalu alkalicznego w różnych miejscach zbadano geometrię  $\text{MAl}_7$ , i otrzymano kilka wariantów geometrycznych (Rys. 22).



Rysunek 22. Modele struktur obliczonych teoretycznie dla układów  $\text{MAl}_7$  (M- metal alkaliczny) (a-d) oraz dla porównania klaster  $\text{Al}_7$ . Ciemna kula przedstawia metal alkaliczny. Oprac. na podstawie ref. [16]  
Figure 22. Models of calculated  $\text{MAl}_7$  (M-alkali metal) structures (a-d).  $\text{Al}_7$  cluster for comparison. Dark ball represents alkali metal. Based on [16])

Wprawdzie różnice energetyczne tych wielościanów są niewielkie, jednak autorzy wybrali model a) jako najbardziej prawdopodobny. Wynika to stąd, że chociaż klastery glinowe mają tendencję do agregacji, to spośród pokazanych na Rysunku 22 najmniejszą taką tendencję wykazuje  $\text{NaAl}_7$ . Poczynione obliczenia wykazały, że spośród badanych litowców orbital 3s sodu jest najbardziej podobny energetycznie do  $\text{Al}_7$ , co prowadzi do ich lepszego nakładania, a przez to mniejszej agregacji klasterów. Co więcej, stwierdzono, że pierwsza hiperpolaryzowalność  $\beta_0$  (wartość współczynnika beta zero) jest najwyższa dla  $\text{NaAl}_7$ , co wskazuje, że  $\text{NaAl}_7$  może być

blokiem budulcowym do konstrukcji materiałów w optyce nieliniowej. Związki te są trwałe w temperaturze do 300 K.

Łatwo zauważyc, że podobnie jak w chemii atomów, które tworzą cząsteczki, tak i klastery reagują ze sobą, dając cząsteczki superatomowe. Co więcej, w analogii do tradycyjnych atomów reaktywność superatomów jest oparta na zdolności delokalizacji elektronów i tworzeniu tzw. orbitali superatomowych. Kolejność ich zapełniania wygląda następująco:  $1S^2, 1P^6, 1D^{10}, 2S^2, 1F^{14} \dots$

Zbadano, że klastery superalkaliczne  $[Cu_8]^-$  i  $[Ag_8]^-$ , naśladujące alkalia (Cu i Ag mają konfigurację  $d^{10}4s^1$  czyli podobnie jak litowce posiadają jeden elektron więcej niż zamknięta powłoka), reagują w fazie gazowej z chlorem według mechanizmu harpunowego, czyli przerzucając elektron na chlor i tworząc inny klasterek:



Reasumując, fascynujące w klastercach jest to, że posiadając pewien określony skład chemiczny, zachowują się jak tradycyjne atomy pikoskali. W takim przypadku ich właściwości fizykochemiczne, chemia powierzchni i liczby magiczne mogą naśladować różne grupy tradycyjnego układu okresowego, np. gazy szlachetne, metale alkaliczne, metale ziem alkalicznych, halogeny, fosfor. Należy dodać, że podobne właściwości zauważono dla określonych związków organicznych, na przykład nanodendrymerów (*vide infra*).

Jak to bywa w nauce, zaprojektowane metodami teoretycznymi i zrealizowane eksperymentalnie klastery spowodowały powstanie nowych pytań. Na przykład jak można wkomponować klastery naśladujące chlorowce w tradycyjny dwuwymiarowy układ okresowy, gdy jest ich znacznie więcej od tych ostatnich. Nie wiemy ponadto, gdzie w hierarchii superatomów postawić fulleren  $C_{60}$ . Jaki atom z klasycznego układu on naśladuje? W stanie stałym fullereny są słabo powiązane, tak jak gazy szlachetne, ale w przeciwnieństwie do tych ostatnich – są reaktywne.

### 3. PRÓBY KLASYFIKACJI SUPERATOMÓW

Jedną z pierwszych prób uporządkowania lawinowo rosnącej liczby zsyntezowanych superatomów jest ich podział na **specjalne** oraz **ogólne** [13], co można określić również jako superatomy proste i złożone. Superatomy specjalne (proste) są to trwałe klastery metaliczne opisywane modelem „jellium”. Superatomy ogólne (złożone) to te dotowane niemetalem lub stabilizowane ligandem.

#### 3.1. KLASTERY SPECJALNE (WYJĄTKOWE, PROSTE)

Superatomy specjalne to klastery atomów metali, które w zależności od liczby elektronów walencyjnych naśladują poszczególne grupy tradycyjnego układu okresowego: 1. superatomowe gazy szlachetne (gr. 18); 2. superhalogeny (gr. 17); 3. super-

alkalia (gr. 1); 4. supermetale ziem alkalicznych (gr. 2); 5. superatomy magnetyczne – grupy pierwiastków przejściowych.

Klastery specjalne naśladujące grupę 18 (gazy szlachetne) to na przykład, wspomniane wcześniej formy klasterowe glinu  $\text{Al}_{13}$  ( $13 \times 3 + 1$ ) o zamkniętej powłoce i liczbie magicznej 40, dobrze opisywane modelem jellium. Gazy szlachetne są naśladowane również przez klastery heterometaliczne na przykład te o liczbie magicznej 20:  $\text{Al}_5\text{Mg}_2$  ( $5 \times 3 + 2 \times 2 + 1$ ) i  $\text{Al}_5\text{Bi}$  ( $5 \times 3 + 5$ ).

Superatomy, posiadające jeden elektron więcej niż ma zamknięta powłoka, nazywają się superalkaliami. Na przykład  $\text{M}_3\text{O}$  (gdzie  $\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}; 3 \times 1 + 6$ ) mają właściwości metali alkalicznych. Klastery  $\text{M}_3\text{O}$  posiadają 9 elektronów walencyjnych na orbitalach:  $1\text{S}^2 1\text{P}^2 1\text{P}^4 2\text{S}^1$ , czyli tak jak w alkaliach znajduje się tu „nadmiarowy” elektron na podpowłoce s. Jak wspomniano, także klastery  $\text{Cu}_8^-$  czy  $\text{Ag}_8^-$  (konfiguracja  $\text{Cu} [\text{Ar}]3\text{d}^{10}4\text{s}^1$ , a  $\text{Ag} [\text{Kr}]4\text{d}^{10}5\text{s}^1; 1 \times 8 + 1$ ) naśladują właściwości litowców.

Przykładem klastera naśladującego metale ziem alkalicznych jest  $\text{Al}_{14}$  ( $14 \times 3 = 42$ ). Preferuje on +2 stopień utlenienia (liczbę elektronów glinu 40) czyli także „magiczną”.

Do kategorii superatomów specjalnych należą również superatomy magnetyczne. Są to układy heterometaliczne zawierające we wzorze przynajmniej jeden atom metalu przejściowego. Można je również opisać w analogii do struktury elektronowej izolowanych atomów zarówno tej nisko- jak i wysokospinowej [8, 18].

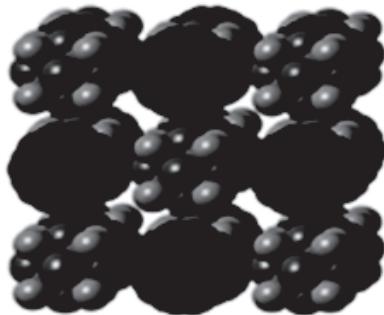
Stwierdzono, że klastery o wzorach  $\text{Na}_8\text{V}$ ,  $(\text{Cs}_8\text{V})$  i odpowiednio  $\text{VNa}_7^-$  ( $\text{VCs}_7^-$ ) są mimetyczne z manganem.

### 3.2. SUPERATOMY OGÓLNE (UOGÓLNIONE, ZŁOŻONE)

Do tej kategorii należą klastery metal-niemetal, metal-ligand oraz wspomniane wcześniej klastery izowalencyjne. Mogą one naśladować zarówno pierwiastek, jak i związek chemiczny (tab. 1). Na przykład klaster  $\text{Al}_7\text{C}$  naśladuje  $\text{SiC}$ , a  $\text{Al}_7\text{O}$  –  $\text{CO}$ . Przykładami klasterek uogólnionych jest również rodzina  $\text{Al}_n\text{H}_m$  [13] czy  $\text{Ti}_8\text{C}_{12}$ . Ogólnie, grupa  $\text{M}_8\text{C}_{12}$  posiada strukturę dodekaedru (dwunastościanu). Formy te mają niski potencjał jonizacji, tak charakterystyczny dla metali alkalicznych. Ich trwałość jest wzmacniona dużą różnicą pomiędzy poziomami elektronowymi HOMO-LUMO oraz niskim powinowactwem elektronowym. Ponadto często zewnętrzną powierzchnię klastera tworzą formy kompleksowe M-L (Rys. 21). Szczególnie dużo przykładów tej stabilizacji znaleźć można dla klasterek złota, gdzie warstwę zewnętrzną stanowią kompleksy złota z pochodnymi tioli, np.  $[\text{Au}_{38}(\text{SR})_{24}]$ ,  $[\text{Au}_{204}(\text{SR})_{20}]$  [9, 19].

Wśród klasterek ogólnych spotyka się również bardziej skomplikowane przypadki, gdy zamiast pojedynczego atomu wprowadzona jest do sieci cała grupa atomów, np. klaster  $[\text{Ni}_9\text{Te}_6(\text{PEt}_3)_8][\text{C}_{60}]$ ,  $\text{PEt}_3$ -trietyllofosfina. Klaster ten krystalizuje w sieci typu  $\text{NaCl}$ , w którym  $\text{C}_{60}$  przyjmuje rolę akceptora elektronu. Część „katio-

nowa”, bogata w elektryny, ma rozmiary i kształty porównywalne z fulerenem (anio-nem; Rys. 23) [19, 20]. Są to znane materiały stosowane w elektronice.



Rysunek 23. Budowa klastera molekularnego  $[\text{Ni}_9\text{Te}_6(\text{PEt}_3)_8][\text{C}_{60}]$ , ( $\text{PEt}_3$  trójetylofosfina). Oprac. na podstawie [20]

Figure 23. Structure of  $[\text{Ni}_9\text{Te}_6(\text{PEt}_3)_8][\text{C}_{60}]$ , ( $\text{PEt}_3$  triethylphosphine) molecular crystal. Based on [20]

Związki tego typu są dobrymi przewodnikami elektryczności. Co więcej, zmieniając część kationową, można stopniowo modyfikować ich właściwości elektryczne i magnetyczne i w ten sposób dostosowywać je do założonych celów.

Tak więc rodzina superatomów powiększa się i powstają nowe o coraz bardziej skomplikowanych wzorach. Jak wspomniano wcześniej, nowe klastery być może zastąpią cenne, rzadkie metale, np. pallad. Inną ważną ścieżką zastosowań są materiały do optyki nieliniowej, która z kolei ma ogromne zastosowanie w elektronice. (Optyka nieliniowa to dział optyki obejmujący zjawiska spowodowane działaniami fal o natężeniu znacznie przekraczającym typowe źródła. Inaczej niż w optyce liniowej, tu właściwości optyczne ośrodka zależą od natężenia padającego światła. Efektem tego zjawiska jest np. generacja drugiej harmonicznej czy nieliniowa zmiana współczynnika załamania światła).

### 3.3. SUPERATOMY TWARDE I MIĘKKIE

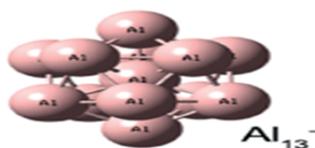
Tradycyjny układ okresowy obejmuje materię atomów, czyli jej bloków budulcowych. Poszukiwany układ okresowy dotyczy nanomateriałów, w którym blokami są klastery. Same zbudowane z atomów tworzą trzeci wymiar tablicy Mendelejewa (Rys. 17). Jednakże z powodu dynamicznie rosnącego świata klasterek trudno jest fizycznie „upakować” je ponad powierzchnią tablicy. Ponadto wszystkie rysunki pokazują jedynie fakt, że klastery naśladują pierwiastki starego układu. Jest to bardzo ważna cecha klasterek, ale nie jedyna.

Być może najbardziej interesując jest to, że, budując nowy układ okresowy, można będzie również przewidywać właściwości, a właśnie przewidywalność jest najważniejszym atrybutem starego układu okresowego.

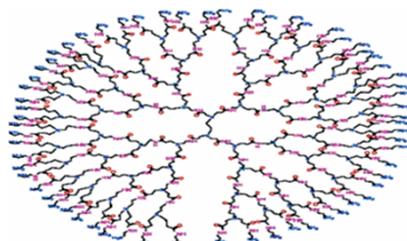
Czy można będzie zbudować podobny układ okresowy, czyli „konstrukcję” opartą na nanomateriałach systematyzującą wiedzę dotyczącą obiektów o rozmiarach nano?

W tym celu nanomateriała podzielona została na dwa rodzaje: twardą, czyli złożoną z pierwiastków tradycyjnego układu okresowego, fulereny i nanorurki, oraz miękką, czyli związki organiczne [8].

a)



b)



Rysunek 24. Przykłady materii twardej T (klaster glinu) i miękkiej M (dendrymer). Oba rodzaje posiadają określone właściwości wynikające z 6 parametrów krytycznych

Figure 24. Examples of hard (aluminium cluster) and soft (dendrimer) matter. Both exhibit defined properties emerging from 6 critical parameters

Z kolei materię twardą i miękką podzielono na kategorie, czyli dyskretnie (tzn. nieciągłe) zbiory zawierające klastery o podobnych właściwościach. Podziału tego dokonano według takich kryteriów, jak: dobrze zdefiniowana struktura i stochiometria, właściwości naśladowania atomów i okresowość występujących cech. Aktualnie znanych jest 12 takich zbiorów (kategorii), po sześć dla materii twardej i miękkiej, ale w miarę rozwoju nanonauki będzie ich przybywać [21]. Z grupy twardych superatomów (T) najdokładniej zbadane zostały następujących kategorie:

1. Klastery metali o właściwościach gazów szlachetnych i halogenów, metali alkalicznych oraz metali ziem alkalicznych.
2. Nanokryształy halkogenidów, czyli siarczków, selenków i tellurków metali.
3. Nanokryształy tlenków metali o właściwościach metali alkalicznych.
4. Nanocząstki krzemionki,  $\text{SiO}_2$ .
5. Fulereny.
6. Nanorurki.

Wymieniona twarda materia ma już znaczące zastosowanie. Na przykład klastery metali o wielkościach nano mogą służyć jako supermagnesy, katalizatory

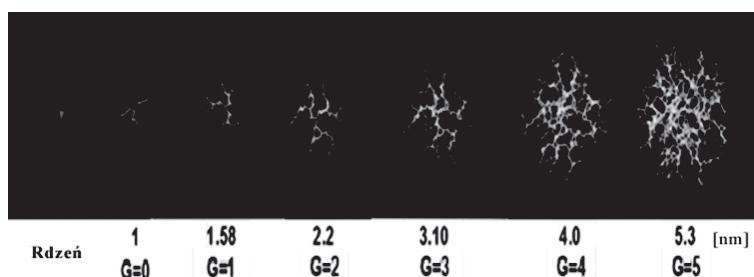
w fotonice oraz terapii fotodynamicznej. Chalkogenidy oraz tlenki metali wykorzystywane są jako materiały fluorescencyjne,  $\text{SiO}_2$  w teranostyce, a fulereny i nanorurki odpowiednio do zamykania (enkapsulacji) leków, w teranostyce i w elektronice [8] (teranostyka to kombinacja słów „terapia” i „diagnostyka”, czyli zintegrowany system, który diagnozuje, leczy i monitoruje).

Znamy także sześć kategorii materii miękkiej (M):

1. Dendrymery.
2. Nanolateksy.
3. Micelle polimerowe.
4. Białka.
5. Powłoki białkowe wirusa.
6. Kwasy nukleinowe.

Wszystkie znane kategorie superatomów miękkich mają szerokie zastosowanie. Na przykład dendrymery stosowane są w enkapsulacji leków, obrazowaniu, katalizie, fotonice. Polimery nanolateksowe i miclele polimerowe stosuje się w nanomedycynie, białka i powłoki białkowe wirusa do zamykania leków w nanomedycynie i katalizie, a kwasy nukleinowe do terapii genowej.

Spośród materii miękkiej najlepiej zbadane zostały dendrymery (łac. *dendron* – drzewo). To polimery o regularnej, rozgałęzionej budowie, zbudowane z przyłączanych sekwencyjnie merów (Rys. 24b). Dendrymer to twór symetryczny organizujący się wokół tzw rdzenia czyli pojedynczej grupy oraz powłoki wewnętrznej i powierzchniowej (Rys. 25). Makrocząsteczki w formie dendrymeru posiadają strukturę rdzeń–powłoka, złożoną z monomerów (generacji).



Rysunek 25. Powstawanie kolejnych generacji (G od 0 do 5) w dendrymerze

Figure 25. The formation of the subsequent generations (G from 0 to 5) in dendrimer

Teoretycznie można przewidzieć wielkość a więc i masę dendrymeru. Ta ostatnia podwaja się przy powstawaniu kolejnej generacji. Dendrymery są zarówno elastyczne, jak i sztywne. Ich właściwości zmieniają się okresowo i są funkcją danej generacji. Czasem uważa się je za sztuczne białka. Już teraz stosuje się dendrymery w biomedycynie. Można zobaczyć analogię pomiędzy pikoskalową powłoką elektronową atomu i nanoskalowymi powłokami monomerów (generacje). Wypełnianie powłoki monomerowej w dendrymerze następuje tak samo, jak powłoki elektronowej w atomie. W obu przypadkach do całkowitego wypełnienia potrzeba elektro-

nów dla materii twardej (T) lub monomerów dla materii miękkiej (M) o liczbach odpowiadających liczbom magicznym. Dendrymery o niewypełnionej powłoce zewnętrznej są, podobnie jak tradycyjne atomy reaktywne, w przeciwnieństwie do tych z wypełnioną powłoką zewnętrzną. W efekcie podobnie jak zbudowano klasyczny układ okresowy dla pierwiastków oparty na liczbie porządkowej i okresach, tak można zbudować układ okresowy dendrymerowy oparty na generacjach (powłokach monomerowych), od których zależą właściwości danego dendrymeru (lepkosć, gęstość, powierzchnia etc.). Liczby atomowe, liczby elektronów i masy atomowe pierwiastków można odnieść do liczby dendrymeru, liczby jednostek monomerycznych i masy cząsteczkowej dendrymeru.

Z tego wynika, że dendrymery to superatomi naśladujące tradycyjne atomy. Należą do grupy **miękkich superatomów**, gdyż posiadają architekturę podobną do atomów tzn: rdzeń, powłoki oraz liczby magiczne do przewidywania wypełnienia poszczególnych powłok. Podobnie jak twarde superatomi także podlegają kontroli wymienionych 6 parametrów krytycznych. Co najciekawsze, mogą służyć jako wzorzec (templat) do otrzymania twardych superatomów (nanoklasterów metali), dla utworzenia zbioru „atom do atomu” [8,22]. Czyli miękki superatom jest matrycą (wzorcem) dla utworzenia twardego superatoma! [23]. Zamknięcie (enkapsulacja) soli metalu przez dendrymer i redukcja jonu metalu w jego wnętrzu daje zerowartościowe nanoklastery metali [8].

Tak więc podział twardych superatomów na kategorie, na podstawie ich podobieństwa do tradycyjnych pierwiastków (superhalogeny, supergazy szlachetne itd.), ma swoją analogię w miękkich superatomach [8].

#### 4. „MAPA DROGOWA” DLA NOWEGO UKŁADU OKRESOWEGO (TOMALIA I KHANNA)

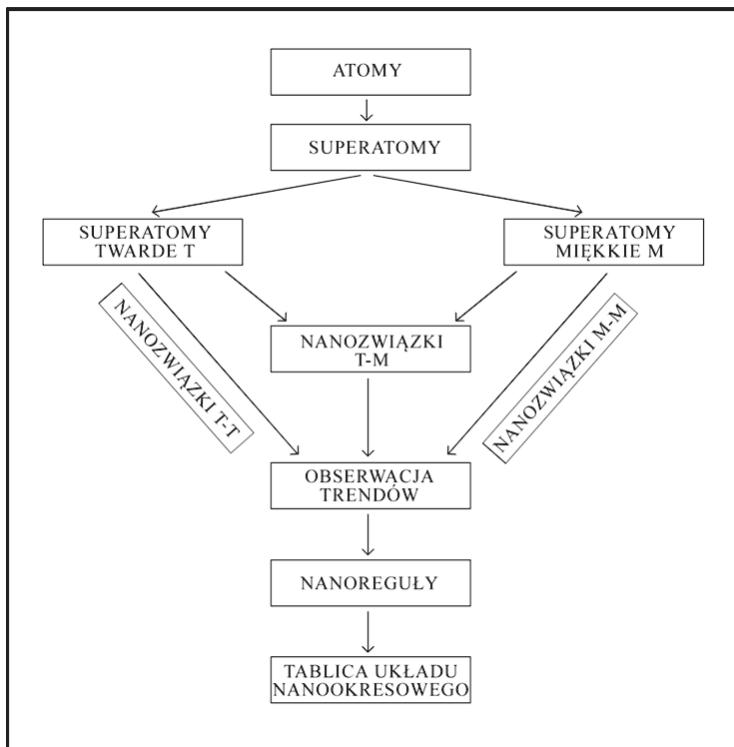
Z podanych kategorii twardych i miękkich superatomów można utworzyć trzy biblioteki w kombinacji reagentów twardy-twardy, twardy-miękki i miękki-miękki [8]. Dla wielu z tych kombinacji otrzymano już nowe formy (nanozwiązki) o dobrze zdefiniowanych stochiometriach, a bogactwo materiału eksperymentalnego pozwoliło ustalić pewne trendy we właściwościach tych form. Takie efekty pozwoliły w oparciu o znalezione reguły ustalić również „nanoperiodyczność” tych właściwości zarówno dla miękkich, jak i twardych nanopierwiastków i ich związków. Percec i in. [24] podali jako pierwsi przykład tablic nanoperiodycznych, które mogą służyć do przewidywania form dendrymerów, powstałych z nanopierwiastków typu pierwszego materii miękkiej, bazując na ich rozmiarach, kształtach i chemii powierzchni.

Reasumując: utworzono 12 kategorii form nano (superatomów), które podzielono na 6 twardych i 6 miękkich. Z nanopierwiastków powstają związki typu twardy-twardy, twardy-miękki i miękki-miękki. Bazując na znalezionych dyskretnych cechach nanopierwiastków i ich związków, zaobserwowano pewne trendy we właściwościach. Efektem jest pierwsza tablica Percea, na podstawie której można

przewidzieć struktury powstały dendrymerów dla pewnych dendronów w oparciu o ich rozmiar, kształt i chemię powierzchni. Przewidywania te wykazują dokładność 85–93% [8].

Tak więc wychodząc z tradycyjnego układu okresowego, idąc dalej przez kategorie nanopierwiastków, tworzone są nanozwiązkę. Następnie badane są trendy w ich właściwościach, z których wyprowadzono pewne reguły i w ten sposób umiejscowione zostają w konkretnym miejscu budowanej tablicy. Prawdopodobnie aby wszystko ogarnąć, należy zbudować więcej niż jedną tablicę. Przeto stoi przed nami zadanie, które wymaga sporego nakładu pracy. Widać już zarysy całej konstrukcji, ale do końca jeszcze długa droga. Wydaje się, że najważniejsze to wśród wielu form zauważać główne trendy i sformułować reguły.

Na podstawie wiedzy, która aktualnie istnieje, skonstruowano „mapę” powstawania układu okresowego dla nanomaterii [8].



Rysunek 26. „Mapa drogowa” prowadząca do konstrukcji przyszłego układu okresowego dla materii w skali nano, wersja uproszczona. Oprac. na podstawie [8]

Figure 26. „Road map” leading to construction of the future periodic system for matter in nanoscale, simplified version [8]

Na przedstawionym rysunku łatwo zauważać, że droga do powstania układu okresowego dla form nano jest jeszcze daleka. Podobnie jak to ma miejsce w klas-

sycznym układzie okresowym, który jak wykazano wcześniej, mimo 150-letniej historii nie jest jeszcze poznany do końca i w tym przypadku widać, jak daleko jesteśmy od celu. Co więcej, pomimo tego wielkiego zadania, które stoi przed nami, już zaczyna wyłaniać się kolejne – związane z tzw. metamateriałami [8]. Metamateriały, formy o wielkości rządu  $10^{-7}$  m nie występują w świecie naturalnym i wykazują specyficzne właściwości. W metamateriałach rolę atomów przejmują tzw. metakomórki. W materiałach tradycyjnych oddziaływanie atomów z polami elektrycznym i magnetycznym jak również z fotonami jest zależne od ich składu chemicznego, natomiast efekty oddziaływań metaatomów z promieniowaniem elektromagnetycznym nie mają związku z ich składem chemicznym. Ponadto metamateriały wykazują ujemny współczynnik załamania światła. Zaobserwowano, że pewne klastery złota (ok. 100 nm) mogą zachowywać się jak metaatomy. Wydaje się, że superatomy mogą stać się prekursorami (blokami budulcowymi) dla metaatomów.

## ZAMIAST ZAKOŃCZENIA

Potrzeba badań nad konstrukcją układu okresowego dla skali nano wynika z tych samych przesłanek, które towarzyszyły odkrywcom pierwszego układu okresowego – czyli poszukiwanie, poznawanie, wprowadzanie elementów porządku i próby konsolidacji zgromadzonej wiedzy prowadzące również do jej wykorzystania w praktyce. Zwięźle ujął to współczesny badacz kanadyjski, Fernando Dufour, który stwierdził: „Układ okresowy to ziarno piasku Archimedesa. Zrozumieć ziarno, to zrozumieć Wszechświat”. Wprawdzie nowy układ dotyczyć będzie materii wytwarzanej przez człowieka, ale niewątpliwie będzie on również jej „ziarnem piasku Archimedesa”. Do konstrukcji układu dla klasterek potrzebnych jest wiele nowych przykładów form powstałych z materiałów typu: twardy–twardy, miękki–miękki oraz twardy–miękki. Problem w tym, że wciąż poszukuje się sprawnych technik syntezy klasterek, gdzie projektowanie oddolne (teoretyczne, *bottom-up*) spotka się z „odgórną” syntezą w fazie gazowej, a następnie w stałej (*top-down*). Tak właśnie zsyntezowano fulereny, gdy makroskopowe ilości C<sub>60</sub> powstały w gazie obojętnym o niskim ciśnieniu po odparowaniu w łuku elektrycznym grafitu i dodaniu rozpuszczalnika. Wydaje się, że, jak pisze Puru Jena [6], synergia pomiędzy metodami teoretycznymi a eksperymentem powinna dać nam trwałe klastery, a wraz z nimi nowe materiały potrzebne do budowy nanoukładu okresowego. Aktualnie powstają już układy okresowe dla konkretnych kategorii materii nanometrycznej (np. dendrymerów), ale nie można wykluczyć powstania w przyszłości jednego układu.

Istnieje przekonanie, że stan wiedzy na temat przyszłego układu okresowego dla form o rozmiarach nano sytuuje dzisiejszą naukę na etapie triad Döbereinera, czyli kilkadziesiąt lat przed powstaniem pełnego układu okresowego. Niemniej przedstawione w niniejszej pracy kroki, włącznie z wytyczoną mapą drogową, pozwalają patrzeć z (ostrożnym) optymizmem na zadanie, które przed nami stoi.

## PODZIĘKOWANIA

Bardzo dziękuję pani mgr Hannie Chodak za opracowanie rysunków. Wdzięczna jestem dr Janowi Staroście za przeczytanie pracy oraz istotne uwagi. Składam serdeczne podziękowania recenzentom pracy za ich wnikliwą analizę tekstu i cenny komentarz. Dziękuję również autorom cytowanych publikacji, tak interesujących, że stały się inspiracją do powstania niniejszej pracy.

## PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] W.F. Sheehan, Chemistry, 1976, **49** (3), 17.
- [2] E. Scerri, *Układ okresowy, historia i znaczenie*, tłum. M. Cieślak-Golonka, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2013.
- [3] A.W. Castleman Jr, S.N. Khanna, J. Phys. Chem. C, 2009, **113**, 2664.
- [4] S.J. Peppernick, K.D. Gunaratne, A.W. Castleman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, **107**, 975.
- [5] E.C. Tyo, A.W. Castleman, A.C. Reber, S.N. Khanna, J. Phys. Chem. C, 2011, **115**, 16797.
- [6] P. Jena, J. Phys. Chem. Let., 2013, **4**, 1432.
- [7] M. Cieślak-Golonka, J. Starosta, M. Wasielewski, *Wstęp do chemii koordynacyjnej*, PWN, Warszawa 2010, II wydanie, 2013.
- [8] D.A. Tomalia, S.N. Khanna, Chem. Rev., 2016, **116**, 2705.
- [9] R. Ho-Wu, S. Hei Yau, T. Goodson, III, ACS Nano, 2016, **10**, 562.
- [10] W. Jahnens-Decent, U. Simon, Nanomedicine (London), 2008, **3**, 601.
- [11] D.L. Feldheim, C.A. Foss, *Metal nanoparticles: synthesis, characterization and applications*, CRC press, 2002, str. 76.
- [12] W.D. Knight, K. Clemenger, W.A. de Heer, W.A Saunders, M.Y Chou, M.L. Cohen, Phys. Rev. Lett., 1984, **52**, 2141.
- [13] Z. Luo, A.W. Castleman, Acc. Chem. Res., 2014, **47**, 2931
- [14] P.A. Claybourne, Eur. J. Inorg. Chem., 2011, 2649.
- [15] W.M. Xiao, N,N, Ma, T.Y. Ma, T. Zhang, L.K. Yan, Z.M. Su, J. Chin. Univ., 2013, **34**, 2184
- [16] S. Huang, K. Liao, B. Peng, Q. Luo, Inorg. Chem., 2016, **55**, 4421.
- [17] Z. Luo, C. Berkdemir, J.C. Smith, A.W. Castleman, Chem. Phys. Let., 2013, **582**, 24.
- [18] E. Roduner, Ch. Jensen, Magnetochemistry, 2015, **1**, 28.
- [19] M. Zhu, H. Qian, R. Jin, J. Phys. Chem. Lett., 2010, **1(6)**, 1003.
- [20] X. Roy, C.-H. Lee, A.C. Crowter, C.L. Schenck, T. Besara, R.A. Lalancette, T. Siegrist, P.W. Stephens, L.E. Brus, P. Kim, M.L. Steigerwald, C. Nuckolls, Science, 2013, **341**, 157.
- [21] D.A. Tomalia, J. Part. Res., 2009, **11**, 1251.
- [22] L.M. Bronstein, Z.B Shifrina, Chem. Rev., 2011, **111**, 5301.
- [23] K. Yamamoto, T. Imaoka, Acc. Chem. Res., 2014, **47**, 1127.
- [24] B.M. Rosen, D.A. Wilson, M. Peterca, B. Won, C. Huang, L.R. Lipski, X. Zeng, C. Ungar, P.A. Heiney, V. Percec, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 17500.



# SKRĘTY ZWROTNE W PEPTYDACH I BIAŁKACH. MIMETYKI SKRĘTÓW ZWROTNYCH. CZĘŚĆ 1

REVERSE TURNS IN PEPTIDES AND PROTEINS.  
REVERSE TURNS MIMETICS. PART 1

**Maria Owińska**

*Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków  
e-mail: owinska@agh.edu.pl*

---

## Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Rodzaje skrótów zwrotnych
2. Skręty zwrotne typu  $\gamma$
3. Skręty zwrotne typu  $\beta$
4. Skręty zwrotne typu  $\alpha$
5. Skręty zwrotne typu  $\pi$

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

---



**Dr Maria Owińska** – absolwentka Wydziału Chemiczno-Metallurgicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego. Stopień doktora w zakresie nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2013 roku, przedstawiając rozprawę doktorską pt. „Analiza konformacyjna amidowych pochodnych wybranych laktamów i aminokwasów naturalnych – potencjalnych bloków budulcowych peptydomimetyków”. Obecnie pracuje jako asystent na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki na Akademii Górnictwo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Zajmuje się tematyką łączącą zagadnienia z dziedziny chemii krzemu oraz typowej syntezy organicznej. Badania, które obecnie prowadzi dotyczą otrzymywania i zastosowania funkcjonalizowanych usieciowanych polisiloksanów.

## ABSTRACT

The secondary structure of the proteins can be divided into  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and reverse turns. A reverse turn is defined as a site where a polypeptide chain reverses its overall direction. It leads the chain to fold back on itself by almost 180°. Another condition for defining this motif is the amount of amino acid residues involved in forming the turn that can not be greater than six and polypeptide chain in this region can not be in helical conformation [1]. Turns are classified as:  $\gamma$ -turn,  $\beta$ -turn,  $\alpha$ -turn and  $\pi$ -turn, which are formed by 3-, 4-, 5- and 6- amino acid residues, respectively. Turns defined as “closed” are stabilized by intramolecular hydrogen bonds between the main chain carbonyl group from the first residue and the main chain amide group from the last residue in the turn. This results in formation of 7-, 10-, 13- and 16-membered pseudo-rings, respectively (Fig. 1, Fig. 2). The other group of turns also stabilized by hydrogen bond, but conversely between the main chain amide group of the first residue and the carbonyl group of the last residue, are  $\delta$ -turn (2-residues, 8-membered pseudo-ring) and  $\epsilon$ -turn (3-residues, 11-membered pseudo-ring) (Fig. 2) [10–13]. These are seldom found in proteins. Turns are considered irregular structures due to the lack of clearly defined torsion angle preferences. Because of that, each of the turn types can be further divided into several different subtypes (Table 1, 2 and 3) [1, 15, 31]. The “open” type structures are not stabilized by hydrogen bonds, but  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$  distance between the first and the last residue in main chain is up to 10 Å [10]. As turns can be found mostly on the surface of the proteins they play the important role in folding processes, thus enabling the formation of the tertiary structure [2]. The turns are also responsible for the interactions between proteins, recognition processes and ligand-receptor interactions [3–8]. In the following article, the classification and characterization of the turn types is described. The particular attention was given to the  $\gamma$  and  $\beta$  turns, as these are most commonly found in proteins structure.

**Keywords:** reverse turn, hydrogen bond, conformation, dihedral angle

**Słowa kluczowe:** skręt zwrotny, wiązanie wodorowe, konformacja, kąt dwuścienny

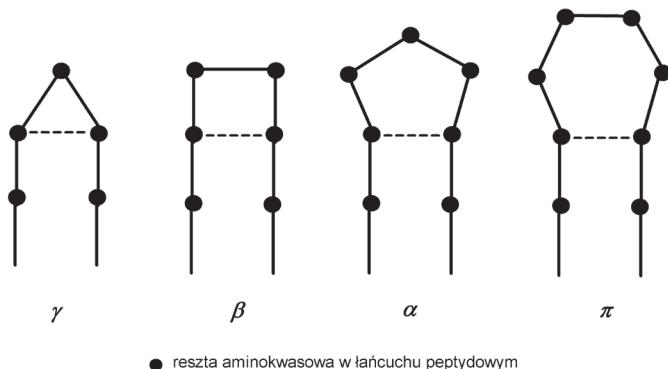
---

## WPROWADZENIE

Skręty zwrotne, obok  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -harmonijki, należą do trzech głównych elementów struktury drugorzędowej białek. Skrót zwrotny jest definiowany jako fragment łańcucha polipeptydowego, w którym łańcuch ten zakręca o  $180^\circ$  tym samym zmieniając swój kierunek. Liczba aminokwasów zaangażowanych w tworzenie skrętu nie może przekraczać sześciu, a łańcuch peptydowy nie może mieć, w tym fragmencie, budowy helikalnej [1]. Ze względu na fakt, iż skręty zwykle występują na powierzchni struktur białkowych pełnią one dużą rolę w procesach fałdowania umożliwiając, między innymi powstawanie struktury trzeciorządowej białka [2]. Skręty są także odpowiedzialne za oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami peptydów, procesy rozpoznawania cząsteczkowego i oddziaływanie typu ligand-receptor [3–8]. W poniższym artykule przedstawiona zostanie klasyfikacja i charakterystyka poszczególnych typów skrętów zwrotnych ze szczególnym uwzględnieniem skrętów  $\gamma$  i  $\beta$ , które najczęściej występują w strukturach peptydów.

### 1. RODZAJE SKRĘTÓW ZWROTNYCH

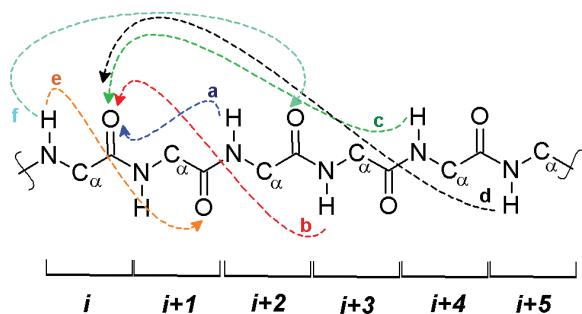
W zależności od liczby reszt aminokwasowych wchodzących w skład struktury zwrotnej wyróżnia się cztery podstawowe typy skrętów. Najmniejszym elementem są  $\gamma$ -skręty zbudowane z trzech reszt aminokwasowych, następnie w kolejności wymienić należy skręty  $\beta$  zbudowane z czterech,  $\alpha$  z pięciu i  $\pi$  z sześciu reszt aminokwasowych (Rys. 1) [9].



Rysunek 1. Schematy struktur zwrotnych występujących w łańcuchach polipeptydowych  
 Figure 1. Schematic structure of reverse turns in polypeptide chains

Skręty zwrotne w peptydach bardzo często stabilizowane są poprzez wewnętrzcząsteczkowe wiązania wodorowe tworzące się pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej pierwszej reszty aminokwasowej (fragment  $i$ ) oraz atomami wodoru z grup amidowych kolejnych reszt aminokwasowych (fragment  $i+n$ , gdzie  $n = 1–5$ ) (Rys. 2). W wyniku stabilizacji skrętów poprzez wiązania wewnętrzcząsteczkowe

tworzą się pseudopierścienie kolejno: siedmioczłonowe dla skrętów  $\gamma$ , dziesięcioczłonowe dla  $\beta$ , trzynastoczłonowe dla  $\alpha$  i szesnastoczłonowe dla  $\pi$ . Skręty zwrotne stabilizowane wiązaniami wodorowymi nazywany „zamkniętymi”. W strukturach zwrotnych „otwartych” nie występuje stabilizacja poprzez wewnętrzczasteczkowe oddziaływanie a podstawą ich wyróżnienia jest odległość pomiędzy atomem węgla ( $C\alpha(i)$ ) w pierwnej reszcie aminokwasowej ( $i$ ) a atomem węgla ( $C\alpha(i+n)$ ) ostatniej tworzącej skręt reszty ( $i+n$ ) w łańcuchu peptydowym. Odległość ta powinna być mniejsza niż 10 Å [10].



- a: skrót  $\gamma$ :  $NH(i+2) \longrightarrow CO(i)$       e: skrót  $\delta$ :  $NH(i) \longrightarrow CO(i+1)$
- b: skrót  $\beta$ :  $NH(i+3) \longrightarrow CO(i)$       f: skrót  $\varepsilon$ :  $NH(i) \longrightarrow CO(i+2)$
- c: skrót  $\alpha$ :  $NH(i+4) \longrightarrow CO(i)$
- d: skrót  $\pi$ :  $NH(i+5) \longrightarrow CO(i)$

Rysunek 2. Typy skrętów zwrotnych z zaznaczonymi kierunkami tworzenia wewnętrzczasteczkowych wiązań wodorowych

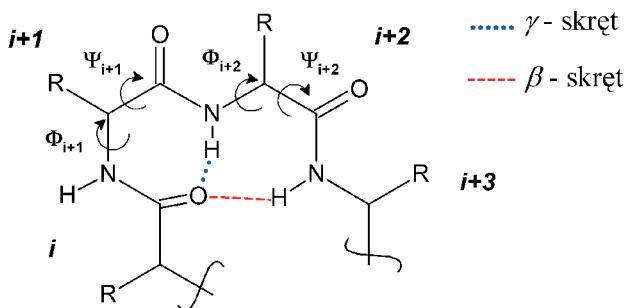
Figure 2. Types of reverse turns with selected orientations of forming intramolecular hydrogen bonds

Odrębną rodzinę skrętów zwrotnych, bardzo rzadko obserwowaną w peptydach, stanowią skręty, w których stabilizujące wiązanie wodorowe tworzy się pomiędzy atomem wodoru grupy amidowej we fragmencie  $i$ , a atomem tlenu grupy karbonylowej w kolejnym fragmencie łańcucha:  $i+1$  dla  $\delta$ -skrętu (dwie reszty aminokwasowe, osmiooczłonowy pseudopierścien) oraz  $i+2$  dla  $\varepsilon$ -skrętu (trzy reszty aminokwasowe, jedenastoczłonowy pseudopierścien) (Rys. 2) [10, 11]. Obecność  $\delta$ -skrętów w strukturze peptydów została zaobserwowania, między innymi w 1988 roku w strukturze krystalicznej cyklicznego pentapeptydu cyclo(Gly-L-Pro-D-Phe-L-Ala-L-Pro) [12], a także potwierdzona w badaniach konformacyjnych tripeptydu zawierającego *cis*-prolinę przeprowadzonych przez Nagarajama [13]. Skręty zwrotne to struktury nieregularne, dlatego też każdy z ich typów podzielony jest dodatkowo na szereg podtypów, za główne kryterium podziału biorąc wartości odpowiednich kątów torsyjnych w resztach aminokwasowych tworzących dany skrót oraz odległość pomiędzy atomami. Do najczęściej występujących skrętów w strukturach

peptydów zalicza się skręty typu  $\gamma$  i  $\beta$ . Są to także najlepiej poznane, obok  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -harmonijki, elementy struktury drugorzędowej peptydów.

## 2. SKRĘTY ZWROTNE TYPU $\gamma$

Skręty  $\gamma$  zbudowane są z trzech reszt aminokwasowych (Rys. 3). Zbliżenie się w przestrzeni atomu tlenu grupy karbonylowej fragmentu  $i$  oraz atomu wodoru z grupy amidowej fragmentu  $i+2$ , pozwala na utworzenie wewnętrzczasteczkowego wiązania wodorowego, które stabilizuje powstały skrót zwrotny. Skutkiem utworzenia wiązania jest powstanie pseudopierścienia siedmioczłonowego. Charakterystyki  $\gamma$ -skrętów w oparciu o wartości kątów torsyjnych ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) jako pierwsi dokonali w swojej pracy z 1972 roku Némethy i Printz [14].



Rysunek 3. Struktury  $\gamma$  i  $\beta$ -skrętu stabilizowane poprzez wewnętrzczasteczkowe wiązania wodorowe  
Figure 3. Structures of  $\gamma$  and  $\beta$ -turns stabilized by intramolecular hydrogen bonds

Istnieją dwa typy  $\gamma$ -skrętów: klasyczny i odwrócony [15]. Różnice między nimi wynikają z konformacji łańcucha peptydowego. W klasycznym  $\gamma$ -skręcie wartość kąta dwuściennego  $\Phi_{i+1}$  zawiera się w zakresie od  $70^\circ$  do  $85^\circ$  a wartość kąta  $\Psi_{i+1}$  w zakresie  $-60^\circ$  do  $-70^\circ$ , co powoduje, że podstawnik R we fragmencie  $i+1$  znajduje się na pozycji aksjalnej w utworzonym pseudopierścieniu (Tab. 1). Odwrócony  $\gamma$ -skręt charakteryzuje się wartością kąta  $\Phi_{i+1}$  od  $-70^\circ$  do  $-85^\circ$  oraz kątem  $\Psi_{i+1}$  w zakresie  $60^\circ$  do  $70^\circ$ , co prowadzi do ekwatorialnej orientacji podstawnika R we fragmencie  $i+1$ .

Tabela 1. Wartości kątów torsyjnych charakterystyczne dla skrętów zwrotnych typu  $\gamma$  [15]  
Table 1. The geometric parameters of  $\gamma$ -turn types [15]

	Klasyczny skręt $\gamma$	Odwrócony skręt $\gamma$
$\Phi_{i+1}$	$70^\circ$ do $85^\circ$	$-70^\circ$ do $-85^\circ$
$\Psi_{i+1}$	$-60^\circ$ do $-70^\circ$	$60^\circ$ do $70^\circ$

	Klasyczny skręt $\gamma$	Odwrócony skręt $\gamma$
podstawnik R na pozycji $\alpha_{i+1}$		

### 3. SKRĘTY ZWROTNE TYPU $\beta$

Najczęściej występującymi i najlepiej poznanymi elementami umożliwiającymi zwrot w łańcuchach polipeptydowych są skręty  $\beta$ . Tworzą je cztery kolejne reszty aminokwasowe zdefiniowane na pozycjach  $i, i+1, i+2, i+3$  (Rys. 3). Odległość pomiędzy atomami węgla  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$  nie przekracza wartości 7,0 Å, a łańcuch polipeptydowy na tym odcinku nie jest w ułożeniu heliakalnym [16]. Jako pierwszy opisał i sklasyfikował skręty typu  $\beta$  Venkatachalam w 1968 roku [17]. Rozpoznane przez niego struktury drugorzędowe były stabilizowane wiązaniami wodorowymi utworzonymi pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej we fragmencie i oraz protonem amidowym we fragmencie  $i+3$ , co pozwoliło na utworzenie pseudopierścienia dziesięcioczłonowego. Jak zostało później zauważone i opisane, mogą istnieć także skręty zwrotne typu „otwartego”. Około 25% wszystkich skrętów zwrotnych typu  $\beta$ , w badanych przez Lewisa i współpracowników peptydach, należy do tego rodzaju struktur [18].

Skręty zwrotne typu  $\beta$  dzielimy na kilka grup ze względu na różne wartości kątów torsyjnych  $\Phi_{i+1}, \Psi_{i+1}, \Phi_{i+2}, \Psi_{i+2}$  uwzględniając także odległości pomiędzy atomem  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$ . Ilość grup i kryteria klasyfikacji zmieniały się, począwszy od klasyfikacji dokonanej przez Venkatachalamą [17] dzielącej skręty na sześć grup: I, II, III oraz ich lustrzane odbicia I', II', III', poprzez prace Lewisa [18], w których rozszerza on ilość grup do dziesięciu (I, I', II, II', III, III', IV, V, VI, VII), kończąc na pracy Richardsona z 1981 roku, w której zredukował on ilość grup do siedmiu (I, I', II, II', VIa, VIb, IV) zauważając, że struktury definiowane jako skręty III oraz VII mają budowę tożsamą z 310-helisą [19]. W 1988 roku Wilmot i Thornton wprowadzili nową klasę  $\beta$  skrętów, klasę VIII. Obecnie uznaje się podział, sprecyzowany w 1994 roku przez Hutchinsona i Thorntoną, na dziewięć grup: I, I', II, II', IV, VIa1, VIa2, VIb oraz VIII [1, 20–22]. W poniższej tabeli (Tab. 2) znajdują się wartości kątów dwuściennych oraz odległości pomiędzy atomami  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$  charakteryzujące każdą z wyszczególnionych grup skrętów typu  $\beta$ .

Tabela 2. Kryteria podziału skrętów zwrotnych typu  $\beta$  [1]  
Table 2. The geometric parameters of  $\beta$ -turn types [1]

Typ	Wartości kątów dwuściennych [°]				Odległość pomiędzy $C\alpha(i)$ i $C\alpha(i+3)$ [ $\text{\AA}$ ]
	$\Phi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\Phi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$	
I	-60	-30	-90	0	4,6
I'	60	30	90	9	4,6
II	-60	120	80	0	4,6
II'	60	120	-80	0	4,6
IV	-61	10	-53	17	7,2
VIIa1	-60	120	-90	0	3,4 (8,8)
VIIa2	-120	120	-60	0	3,7 (8,5)
VIIb	-135	135	-75	160	6,0 (9,8)
VIII	-60	-30	-120	120	6,3

Warunki strukturalne określone dla skrętów typu I, I', II, II' i VIII są zgodne z ogólną definicją skrętu  $\beta$ . Odstępstwa są widoczne dla pozostałych typów skrętów (wartości odległości pomiędzy atomami węgla w pozycjach  $\alpha$  wzięte w nawiasy w Tabeli 2). Zauważono, że jedynie, gdy na pozycji  $i+2$  w łańcuchu peptydowym znajduje się prolina odległość  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+3)$  jest mniejsza niż 7  $\text{\AA}$ , w innych przypadkach odległość znacznie odbiega od tej zdefiniowanej. Dla skrętów należących do typu IV odległość ta jest nieznacznie przekroczena.

Ze względu na fakt, iż skręty zwrotne występują na powierzchni struktur białkowych i mają bezpośredni kontakt z rozpuszczalnikiem, w którym białko się znajduje, istnieje preferencja co do rodzaju aminokwasów wchodzących w skład skrętów. W przypadku  $\beta$  skrętów budują je częściej aminokwasy posiadające hydrofilowe łańcuchy boczne. Przeanalizowanie 205 łańcuchów białkowych przez Hutchinsona i Thornton, pod kątem występowania w ich strukturze skrętów zwrotnych, pozwoliło na stwierdzenie, że do najczęściej występujących w tym elemencie strukturalnym aminokwasów należą: asparagina, kwas asparaginowy, prolina oraz glicyna [20–22]. Częstość występowania konkretnych aminokwasów na odpowiednich pozycjach w łańcuchu znacznie różni się w obrebie poszczególnych grup skrętów  $\beta$ .

W grupie I, na pozycji i istnieje bardzo silna preferencja. Faworyzowane są aminokwasy posiadające łańcuchy boczne mogące tworzyć wiązania wodorowe dodatkowo stabilizujące strukturę skrętu, należą do nich: asparagina, kwas asparaginowy, cysteina i seryna. Do często występujących na tej pozycji aminokwasów zalicza się także histydynę oraz prolinę. Prolina występuje natomiast najczęściej na drugiej pozycji,  $i+1$ , ze względu na ograniczenie wartości kąta  $\Phi$  do -60°. Również kwas glutaminowy oraz seryna często pojawiają się na tej pozycji. Tworzące się wiązanie wodorowe z udziałem ich łańcuchów bocznych stabilizuje kąt  $\Phi$ . Na pozycji  $i+2$  preferowane są: asparagina, kwas asparaginowy, seryna i treonina, a na  $i+3$  najczęściej występującym aminokwasem jest glicyna.

W typie II skrótów nie obserwuje się silnej preferencji do zajmowania przez aminokwasy pozycji *i*. Często występują tu proлина oraz tyrozyna, ale jak dotąd nie wyjaśniono przyczyn tego faktu. Silna preferencja występuje natomiast przy zajmowaniu kolejnej pozycji, *i+1*, i tu najczęściej pojawia się proлина (z tych samych względów co w skręcie typu I) oraz lizyna. Pozycja *i+2* jest zdominowana przez glicynę i asparaginę, a we fragmencie *i+3* najczęściej występującymi aminokwasami są: cysteina, seryna, lizyna.

W skrętach typu VIII na pierwszej pozycji najczęściej obserwuje się prolinę oraz glicynę. Tak jak w typie I, proлина najczęściej zajmuje również pozycję *i+1*. Kwas asparaginowy i asparagina najczęściej występują na pozycji *i+2*, ze względu na fakt tworzenia się wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu w łańcuchu bocznym aminokwasu a atomem wodoru z łańcucha głównego znajdującego się zaraz za strukturą skrętu, na pozycji *i+4* [23]. Wiązanie wodorowe może także powstawać z udziałem protonu grupy amidowej reszty *i+3*. Co ciekawe wykazano, że na tej pozycji faworyzowane są bardziej hydrofobowe aminokwasy takie jak: fenyloalanina, walina oraz izoleucyna [24, 25]. Na *i+3* najczęściej występującym aminokwasem jest proolina.

Tyrozyna, rzadziej walina i izoleucyna są preferowane na pierwszej pozycji w skręcie typu I'. Kolejna pozycja zdominowana jest przez cztery aminokwasy: asparaginę, kwas asparaginowy, glicynę oraz histydynę. Glicyna jest także najczęściej występującym aminokwasem na pozycji *i+2*. Pozycja *i+3* najczęściej zajmowana jest przez lizynę. Skręty  $\beta$  typu I' wraz z II' często wchodzą w skład większego elementu strukturalnego jakim są tzw. struktury spinki do włosów [26]. Dla tych drugich podobnie jak dla I' preferencja zajmowania pozycji w łańcuchu jest następująca: na pozycji *i* – tyrozyna oraz walina, *i+1* – glicyna, *i+2* – asparagina, seryna, kwas asparaginowy, fragment *i+3* pozostaje bez wyraźnych preferencji.

Pozostałe grupy skrótów  $\beta$  występują bardzo rzadko w strukturach białek, dla tego nie ustalono dla nich preferencji co do ich budowy [20–22].

Jedynie 42% skrótów  $\beta$  występuje niezależnie, częściej związane są w tzw. skręty wielokrotne, w których skrót ma co najmniej jeden aminokwas wspólny z następnym skrętem. Skręty podwójne, zbudowane z pięciu reszt aminokwasowych, są najczęściej występującymi strukturami w białkach. Skręty zostają utworzone pomiędzy pierwszym i czwartym aminokwasem oraz pomiędzy drugim i piątym. Najczęściej występującymi kombinacjami są połączenia skrótów I' z IV (występuje przykładowo w strukturze proteazy asparaginianowej [27]), I z I (tworzy strukturę „zaburzonej 310 helisy” w białku Bence'a-Jonesa [28]) oraz bardzo rzadko występujący typ VIa z IV (w strukturze erytrokruropyny [29]). Skręty wielokrotne zbudowane z większej liczby  $\beta$ -skrótów występują o wiele rzadziej [21, 22].

#### 4. SKRĘTY ZWROTNE TYPU $\alpha$

Wśród skrętów  $\alpha$  należy wyróżnić ich dwa główne rodzaje. Jeden rodzaj występuje w strukturze  $\alpha$ -helisy. Idealna  $\alpha$ -helisa zbudowana jest z powtarzających się skrętów, nazwanych klasycznymi lub „ $\alpha$ -helikalnymi  $\alpha$  skrętami”. Na każdy skrót przypada 3,6 reszt aminokwasowych, kąty torsyjne w łańcuchu peptydowym wynoszą około  $\Phi = -58^\circ$ ,  $\Psi = -47^\circ$ . Struktura helisy, stabilizowana jest dzięki wiązaniom wodorowym tworzącym się pomiędzy amidowym atomem wodoru we fragmencie  $i+4$  oraz atomem tlenu grupy karbonylowej we fragmencie  $i$  [30]. Ze względu na fakt, że około 30% białek globularnych posiada strukturę helikalną, tego typu skręty występują często w strukturze drugorzędowej peptydów.

Znacznie mniej spotykana w peptydach jest rodziną skrętów zwrotnych  $\alpha$  izolowanych, nie przyjmujących konformacji charakterystycznej dla  $\alpha$  helisy. Skręty te zbudowane są z pięciu aminokwasów a do ich opisu i charakterystyki służą wartości sześciu kątów torsyjnych:  $\Phi_{i+1}$ ,  $\Psi_{i+1}$ ,  $\Phi_{i+2}$ ,  $\Psi_{i+2}$ ,  $\Phi_{i+3}$ ,  $\Psi_{i+3}$ . Tak jak w przypadkach wcześniej opisanych typów skrętów zwrotnych, odległość pomiędzy atomami węgla  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+4)$  nie powinna przekraczać 7,0 Å. W dziewięciu, wyróżnionych przez Pavona i współpracowników, typach skrętów  $\alpha$  odległość ta jest mniejsza niż 7,0 Å, a ponadto odległość pomiędzy atomem O( $i$ ) i N( $i+4$ ) jest mniejsza niż 3,5 Å, co umożliwia tworzenie wewnętrzczasteczkowego wiązania wodorowego i powstanie pseudopierścienia trzynastoczłonowego (Tab. 3). Tak jak w przypadku  $\beta$ -skrętów, istnieją  $\alpha$ -skręty, które nie są stabilizowane wiązaniem wodorowym. Przedstawione i scharakteryzowane w tabeli 3, rodzaje izolowanych skrętów  $\alpha$  zostały znalezione na podstawie analizy 190 struktur białkowych (łącznie 221 łańcuchów polipeptydowych) wziętych z bazy PDB (baza danych zawierająca informacje o strukturze przestrzennej białek i kwasów nukleinowych, ang. *Protein Data Bank*) [31].

Stwierdzono, że ogromna większość  $\alpha$ -skrętów izolowanych, tworzy się w łańcuchach peptydowych, w którym wszystkie wiązania peptydowe, wchodzące w skład skrętu zwrotnego, posiadają konfigurację trans. Skręty te ze względu na swoją budowę (konformację łańcucha peptydowego) zostały podzielone na cztery grupy, przy czym kolejne cztery grupy stanowią ich odbicia lustrzane. Typ I- $\alpha_{YZ}$  i typ II- $\alpha_{YZ}$  (Y = R, L; Z = S, U) odpowiadają w przybliżeniu powtarzającemu się motywowi strukturalnemu w helisie prawo- (R) lub lewoskrętnej (L). Symbole S i U w opisie skrętu oznaczają kolejno skrót w kształcie śruby (ang. *screw-like*) i skrót w kształcie litry U (ang. *U like*). Dziewiąty wyróżniony typ skrętów to I- $\alpha_C$ , który odpowiada grupie struktur posiadających jedno wiązanie peptydowe, konkretnie wiązanie pomiędzy  $i+1$  oraz  $i+2$  aminokwasem, o konfiguracji cis. Łańcuch peptydowy we fragmencie tego skrętu biegnie zgodnie z ruchem wskazówek zegara i przyjmuje kształt śrubowy. Charakterystyczną cechą tego typu skrętu jest występowanie proliny na pozycji  $i+2$ .

Tabela 3. Kryteria podziału skrętów zwrotnych typu  $\alpha$  [31]  
Table 3. The geometric parameters of  $\alpha$ -turn types [31]

Typ	Wartości kątów dwuściennych [ $^{\circ}$ ]						Odległość pomiędzy $C\alpha(i)$ i $C\alpha(i+4)$ [ $\text{\AA}$ ]	Odległość pomiędzy $O(i)$ i $N(i+4)$ [ $\text{\AA}$ ]
	$\Phi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\Phi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$	$\Phi_{i+3}$	$\Psi_{i+3}$		
I- $\alpha_{RS}$	-60	-29	-72	-29	-96	-20	5,81	2,64
I- $\alpha_{LS}$	48	42	67	33	70	32	6,31	2,91
II- $\alpha_{RS}$	-59	129	88	-16	-91	-32	6,26	3,24
II- $\alpha_{LS}$	53	-137	-95	81	57	38	5,13	2,78
I- $\alpha_{RU}$	59	-157	-67	-29	-68	-39	3,99	2,66
I- $\alpha_{LU}$	-61	158	64	37	62	39	4,00	2,73
II- $\alpha_{RU}$	54	39	67	-5	-125	-34	3,02	1,91
II- $\alpha_{LU}$	-65	-20	-90	16	86	37	3,92	3,08
I- $\alpha_C$	-103	143	-85	2	-54	-39	3,96	1,50

Analiza częstości występowania konkretnych aminokwasów naturalnych w strukturach skrętów zwrotnych wykazała dużą preferencję do występowania proliny na pozycji  $i+1$ , kwasu glutaminowego na pozycji  $i+2$  oraz cysteiny, treoniny i kwasu glutaminowego na pozycji  $i+3$ . Prolina natomiast nigdy nie występowała jako czwarty aminokwas w skręcie  $\alpha$  [31]. Jak podkreślają autorzy pracy z 1996 roku przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej mającej wskazać dystrybucję aminokwasów na poszczególnych pozycjach w skręcie typu  $\alpha$ , nie była możliwa ze względu na niewielką liczbę tego typu struktur w białkach. Późniejsze badania statystyczne, przeprowadzone w 2004 roku, na znacznie większej liczbie białek (531 białek, 555 łańcuchów polipeptydowych), potwierdziły preferencje występowania proliny na drugiej pozycji skrętu co dodatkowo przyczynia się do tworzenia wewnętrzczasteczkowego wiązania wodorowego [32].

Wewnątrz dużego skrętu typu  $\alpha$  bardzo często obserwuje się tworzenie mniejszych struktur stabilizowanych wewnętrzczasteczkowymi wiązaniami. Należą do nich przede wszystkim skręty  $\beta$  (typu I, II i III oraz ich odbicia lustrzane) i rzadziej skręty  $\gamma$ . Przykładowo typ II- $\alpha$ LS zawiera w sobie strukturę odpowiadającą skrętowi  $\gamma$  odwróconemu z wartościami odpowiednich kątów  $\Phi = -95^{\circ}$  i  $\Psi = 81^{\circ}$  pomiędzy fragmentem  $i+1$  oraz  $i+3$  [31]. Badania prowadzone na większej bazie peptydów wykazały, że 38% skrętów  $\alpha$  przyjmuje konformacje, które umożliwiają dodatkowe oddziaływanie wewnętrzczasteczkowe skutkujące powstaniem mniejszych (bardziej ciasnych) skrętów zwrotnych w obrębie ich struktury [32].

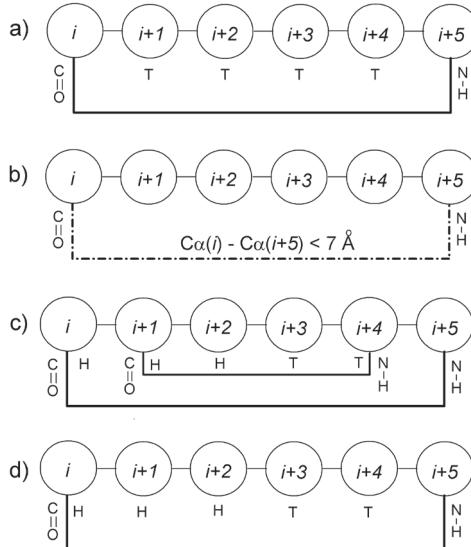
Odrębne zagadnienie stanowi konkurencyjne tworzenie się skrętów  $\alpha$  i skrętów  $\beta$  w białkach. Tej tematyce zostało poświeconych wiele prac, przede wszystkim te dotyczące analizy konformacyjnej peptydów bazujące na obliczeniach kwantowo-mechanicznych i analizie statystycznej [33–35]. Schreiber wraz ze współpracownikami przeprowadzili bardzo dokładną analizę konformacyjną modelowych pepty-

dów (łańcuch jednego peptydu zbudowany z glicyny, drugiego z alaniny) opierając się na obliczeniach teoretycznych z wykorzystaniem metody ab initio MO (teoria orbitali molekularnych, ang. *Molecular Orbitals*) i DFT (teoria funkcjonału gęstości, ang. *Density Functional Theory*) [35]. Wyniki wskazały na większą tendencję do tworzenia się podwójnych skrętów zwrotnych typu  $\beta$  niż do tworzenia skrętów  $\alpha$ . Ponadto w niewielkiej liczbie znalezionych konformerów zauważono tworzenie się, stabilizującego skrętu  $\alpha$ , wiązania wodorowego pomiędzy aminokwasem  $i$  oraz  $i+4$ .

## 5. SKRĘTY ZWROTNE TYPU $\pi$

Na skręt zwrotny typu  $\pi$  składa się sześć kolejnych aminokwasów, a stabilizujące je wiązanie wodorowe tworzy się pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej we fragmencie  $i$  oraz atomem wodoru grupy amidowej we fragmencie  $i+5$ . Jako pierwszy skręt tego typu został zaobserwowany przez Watsona w strukturze krystalicznej mioglobiny [36]. W 1980 roku, Schellman zauważył, że  $\alpha$ -helisy na C-końcach są często zakończone charakterystycznym motywem, na który składają się dwa wiązania wodorowe utworzone pomiędzy fragmentami  $i - i+5$  oraz  $i+1 - i+4$ , przy czym aminokwas na pozycji piątej ( $i+4$ ) występuje w konformacji charakterystycznej dla lewoskrętnej  $\alpha$  helisy ( $\alpha_L$ ) [37]. Strukturę tą nazwano motywem Schellmana lub „spinaczem do papieru” [38]. Jak wykazały późniejsze badania, prawoskrętne  $\alpha$  helisy generalnie zakończone są skrętami zwrotnymi typu  $\pi$ , w których aminokwas na pozycji piątej przyjmuje konformację  $\alpha_L$ . Tym aminokwasem najczęściej jest glicyna lub rzadko asparagina [39, 40].

W pierwszych pracach poświęconych  $\pi$ -skrętom rozpoznawano je dzięki występowaniu charakterystycznego wiązania wodorowego stabilizującego całą strukturę oraz opisywano je na podstawie konformacji aminokwasu na pozycji  $i+4$  w skręcie [41]. Desgupta, w kompleksowej pracy z 2008 roku, podjął się klasyfikacji i usystematyzowania wiedzy na temat budowy skrętów  $\pi$  [42]. Podzielił on skręty na dwa główne rodzaje:  $\pi$ -skręty stabilizowane wiązaniem wodorowym ( **$\pi$ -HB**) oraz te, w których nie ma takich oddziaływań ( **$\pi$ -NHB**) (Rys. 4). Dodatkowo zauważył, że skręty mogą występować jako układy izolowane lub wchodzić w skład większych struktur drugorzędowych. Skręty, które znajdują się na zakończeniach  $\alpha$  helisy tworzą motyw Schellmana (**SCH**) (Rys. 4c i 4d). Typowy motyw Schellmana, widoczny na Rysunku 4c, posiada dwa wewnętrzczasteczkowe wiązania wodorowe: jedno charakterystyczne dla skrętu  $\pi$ , drugie dla skrętu  $\beta$  (**SCH<sub>β</sub>**). Do rzadko występujących systemów należy motyw Schellmana bez wewnętrznego, dodatkowego wiązania wodorowego, a tym samym bez skrętu  $\beta$  (**SCH<sub>+</sub>**) (Rys. 4d).



Rysunek 4. Schematy różnych typów skrętów zwrotnych  $\pi$ : a) izolowany  $\pi$ -skręt ( $\pi$ -HB), wszystkie aminokwasy od  $i$  do  $i+5$  uczestniczą w tworzeniu skrętu zwrotnego (T); b)  $\pi$ -skręt niestabilizowany wiązaniem wodorowym ( $\pi$ -NHB); c) typowy motyw Schellmana ( $SCH_{\alpha\beta}$ ) z dodatkowym wiązaniem wodorowym pomiędzy drugim i piątym aminokwasem w strukturze; aminokwasy na pozycjach od  $i$  do  $i+2$  posiadają konformację charakterystyczną dla  $\alpha$ -helisy (H); d) motyw Schellmana bez wiązania wodorowego stabilizującego skręt zwrotny typu  $\beta$  ( $SCH_{\beta}$ ) [42]

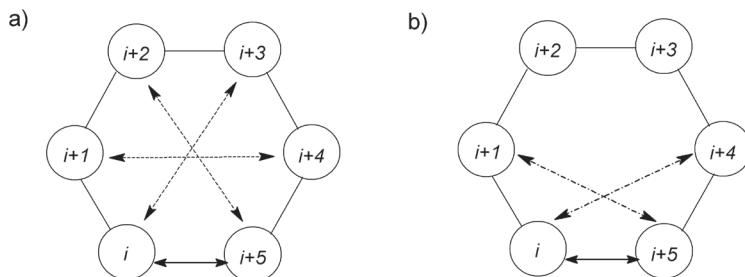
Figure 4. Schematic representations of different types of  $\pi$ -turns: a) isolated  $\pi$ -turn ( $\pi$ -HB), with  $i$  to  $i+5$  residues in turn (T); b) non-hydrogen bonded  $\pi$ -turn ( $\pi$ -NHB); c) typical Schellman motif ( $SCH_{\alpha\beta}$ ) with additional hydrogen bond linking  $i+1$  and  $i+4$  positions,  $i$  to  $i+2$  position are in helical conformation (H); d) Schellman motif without additional hydrogen bond stabilized  $\beta$ -turn ( $SCH_{\beta}$ ) [42]

Autorzy pracy z 2008 roku, korzystając z programu DSSP (algorytm służący do przewidywania obecności wiązań wodorowych w strukturach peptydowych [43], ang. *Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) przeanalizowali, pod kątem występowania skrętów  $\pi$ , struktury kilku tysięcy białek, korzystając z ich koordynat atomowych zebranych w bazie PDB. Na podstawie analizy konformacyjnej poszczególnych aminokwasów, w zależności od wartościach kątów torsyjnych  $\Phi$  i  $\Psi$  oraz odległości pomiędzy atomami  $C\alpha(i)$  i  $C\alpha(i+5)$ , dokonali oni podziału typów skrętów  $\pi$  na liczne podtypy [42].

Przeprowadzona analiza częstości występowania aminokwasów w strukturach skrętów zwrotnych wykazała dużą preferencję do występowania proliny na pozycji  $i+1$  zarówno w  $\pi$ -HB jak i  $\pi$ -NHB. W skręcie  $\pi$ -NHB na danej pozycji często występują także: asparagina, kwas asparaginowy, seryna i treonina, a na pozycji  $i+3$  preferowane są prolina oraz glicyna. Glicyna jest najczęściej występującym aminokwasem na pozycji  $i+4$  w obu typach opisywanych skrętów ze względu na przyjmowaną konformację charakterystyczną dla lewoskrętnej helisy [42].

Skrót  $\pi$  jest najdłuższym z wyróżnionych skrętów zwrotnych. Składa się na niego sześć reszt aminokwasowych, cztery z nich stanowią środkowy fragment

skrętu. To powoduje, że wewnątrz skrętu może dochodzić do wielu oddziaływań, które skutkują powstaniem mniejszych układów drugorzędowych, najczęściej skrętów typu  $\beta$  oraz  $\alpha$ . Na Rysunku 5 przedstawiono schematycznie wszystkie możliwe wiązania wodorowe, które mogą dodatkowo utworzyć się wewnątrz skrętu typu  $\pi$ .



Rysunek 5. Schemat wiązań wodorowych, które mogą utworzyć się wewnątrz skrętu  $\pi$ -HB; a) wiązania stabilizujące  $\beta$ -skręty b)  $\alpha$ -skręty [42]

Figure 5. Schematic representation of hydrogen bonds inside  $\pi$ -HB turns encompassing multiple a)  $\beta$ - and b)  $\alpha$ -turns [42]

## PODSUMOWANIE

Skręty zwrotne są najmniejszymi elementami struktury drugorzędowej białek. Obok  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -harmonijki to skręty typu  $\beta$  i  $\gamma$  najczęściej występują w białkach. Ich rola w wielu procesach biologicznych i fizjologicznych, jest bardzo duża co związane jest z faktem, iż występują one na powierzchniach struktur białkowych. Ze względu na rolę jaką pełnią skręty zwrotne, naukowcy z wielu dziedzin (chemicy, biolodzy, biochemicy i lekarze) zaczęli je badać i opisywać. Ważne stało się nie tylko zbadanie samych skrętów zwrotnych i ich dokładnej roli, ale także poznanie możliwości naśladowania ich budowy i funkcji. W artykule – jego pierwszej części, przedstawiona została charakterystyka poszczególnych rodzajów skrętów zwrotnych ze szczególnym uwzględnieniem ich budowy. Druga część artykułu poświęcona zostanie omówieniu zagadnień związanych z naśladowaniem budowy, konformacji struktur zwrotnych przez ich mimetyki.

## PODZIĘKOWANIE

Serdeczne podziękowania dla Pani dr hab. Barbary Rys za pomoc, cenne uwagi merytoryczne oraz wsparcie udzielone podczas powstawania tej publikacji.

## PIŚMIENNICYWO CYTOWANE

- [1] K.C. Chou, Anal. Biochem., 2000, **286**, 1.
- [2] A.M.C Marcelino, L.M. Giersch, Biopolymers, 2008, **89**, 380.

- [3] G.D. Rose, L.M. Giersch, J.A. Smith, *Adv. Protein Chem.*, 1985, **37**, 1.
- [4] G. Müller, G. Hessler, H.Y. Decornez, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 894.
- [5] R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. DeGrado, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3219.
- [6] E. Vass, M. Hollósi, F. Besson, R. Buchet, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 1917.
- [7] P. Prabakaran, J. Gan, Y.O. Wu, M.Y. Zhang, D.S. Dimitrov, X. Ji, *J. Mol. Biol.*, 2006, **357**, 82.
- [8] C. Toniolo, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1980, **9**, 1.
- [9] S. Chatterjee, R.S. Roy, P. Balaram, *J.R. Soc. Interface*, 2007, **4**, 587.
- [10] O. Koch, G. Klebe, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2009, **74**, 353.
- [11] C. Toniolo, *Crit. Rev. Biochem.*, 1980, **9**, 1.
- [12] A.N. Stroup, A.L. Rockwell, A.L. Rheingold, L.M. Giersch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 5157.
- [13] H.A. Nagarajaram, P.K.C. Paul, K. Ramanarayanan, K.V. Soman, C. Ramakrishnan, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1992, **40**, 383.
- [14] G. Némethy, M.P. Printz, *Macromolecules*, 1972, **5**, 755.
- [15] S.J. Stachel, H. Hu, Q.N. Van, A.J. Shaka, D.L. Van Vranken, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, **6**, 1439.
- [16] K. Guruprasad, S. Shukla, *J. Peptide. Res.*, 2003, **61**, 159.
- [17] C.M. Venkatachalam, *Biopolymers*, 1968, **6**, 1425.
- [18] P.N. Lewis, F.A. Momany, H.A. Scherag, *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, **303**, 211.
- [19] J.S. Richardson, *Adv. Protein Chem.*, 1981, **34**, 167.
- [20] E.G. Hutchinson, J.M. Thornton, *Protein Science*, 1994, **3**, 2207.
- [21] K. Guruprasad, M.S. Prasad, G.R. Kumar, *J. Peptide. Res.*, 2000, **56**, 250.
- [22] K. Guruprasad, M.S. Prasad, G.R. Kumar, *J. Peptide. Res.*, 2001, **57**, 292.
- [23] D.C. Rees, M. Lewis, W.N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.*, 1983, **168**, 367.
- [24] P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Biochemistry*, 1974, **13**, 211.
- [25] P.Y. Chou, G.D. Fasman, *J. Mol. Biol.*, 1977, **115**, 135.
- [26] B.L. Sibanda, J.M. Thornton, *Nature*, 1985, **316**, 170.
- [27] B. Veerapandian, J.B. Cooper, M.A. Sali, T.L. Blundell, *J. Mol. Biol.*, 1991, **216**, 1017.
- [28] W. Furey Junior, B.C. Wang, C.S. Yoo, M. Sax, *J. Mol. Biol.*, 1983, **167**, 661.
- [29] W. Steigemann, E. Weber, *J. Mol. Biol.*, 1979, **127**, 309.
- [30] D.J. Barlow, J.M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1988, **201**, 601.
- [31] V. Pavone, G. Geata, A. Lombardi, F. Nastri, O. Maglio, *Biopolymers*, 1996, **38**, 705.
- [32] B. Desgupta, L. Pal, G. Basu, P. Chakrabarti, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2004, **55**, 305.
- [33] H. Kaur, G.P.S. Raghava, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2004, **55**, 83.
- [34] Y. Wang, Z. Xue, J. Xu, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2006, **65**, 49.
- [35] A. Schreiber, P. Schramm, H.J. Hofmann, *J. Mol. Model.* 2011, **11**, 1393.
- [36] H.C. Watson, *Progr. Stereochem.*, 1969, **4**, 299.
- [37] C. Schellman, *Protein Folding*, R. Jaenicke (Red.), Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam 1980, str. 53.
- [38] E.J. Milner-White, *J. Mol. Biol.*, 1988, **199**, 503.
- [39] K. Gunasekaran, H.A. Nagarajaram, C. Ramakrishnan, P. Balaram, *J. Mol. Biol.* 1998, **275**, 917.
- [40] S. Datta, N. Shamala, A. Banerjee, A. Pramanik, S. Bhattacharjya, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9246.
- [41] K.R. Rajashankar, S. Ramakumar, *Protein Sci.*, 1996, **5**, 932.
- [42] B. Desgupta, P. Chakrabarti, *BMC Structural Biology*, 2008, **8**, 39.
- [43] W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers*, 1983, **22**, 2577.



# AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA ZWIĄZEKÓW ACETYLENOWYCH POCHODZENIA NATURALNEGO

## BIOLOGICAL ACTIVITY OF ACETYLENE COMPOUNDS OF NATURAL ORIGIN

Monika Kadelka-Tomanek<sup>1</sup>, Elwira Chrobak<sup>1</sup>,  
Ewa Bębenek<sup>1</sup>, Agnieszka Lubczyńska<sup>1</sup>,  
Szymon Siudak<sup>2</sup>, Anna Wójcik<sup>2</sup>,  
Agnieszka Otulakowska<sup>1</sup>, Stanisław Boryczka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu,  
Katedra i Zakład Chemii Organicznej,  
<sup>2</sup> Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu,  
Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej  
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec  
e-mail: mkadela@sum.edu.pl

---

### Abstract

### Wstęp

1. Związki peptydowe
  2. Związki aromatyczne
  3. Antybiotyki enodiynowe
  4. Sterole
  5. Karotenoidy
  6. Związki poliacetylenowe
- Podsumowanie
- Piśmiennictwo cytowane
- 
-

**Mgr inż. Monika Kadela-Tomanek** ukończyła studia na kierunkach: chemia (2008) oraz biotechnologia (2009) na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Od 2009 r. pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Jej zainteresowania naukowe dotyczą syntezy, analizy struktury oraz oceny aktywności biologicznej acetylenowych pochodnych 5,8-chinolinodionów oraz betuliny.

**Dr Elwira Chrobak** ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach (1986). W latach 1987–1996 pracowała w Katedrze Chemii i Analizy Leków, a od 1996 roku w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2005 roku. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 4,4-ditlenku 1,2,4-chinotiadiazyny, a także otrzymywaniem oraz analizą struktury i aktywności biologicznej związków uzyskiwanych na drodze modyfikacji chemicznej naturalnego triterpenu – betuliny.

**Dr Ewa Bębenek** ukończyła studia na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (1996). Od 1996 r. pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. W 2005 r. uzyskała stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych. Realizowane przez nią badania naukowe związane są z syntezą związków pochodzenia naturalnego w grupie triterpenów pentacyklicznych typu lupanu.

**Mgr Agnieszka Lubczyńska** ukończyła studia licencjackie na kierunku kosmetologia na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu a następnie kontynuowała naukę na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, uzyskując tytuł magistra. Obecnie jest studentką II roku studiów doktoranckich.

**Szymon Siudak** jest studentem V roku na kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Swoją pracę magisterską zrealizowała w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej w zakresie syntezy i oceny aktywności biologicznej pochodnych betuliny.

**Mgr Anna Wójcik** ukończyła studia na kierunku Farmacja na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. W 2014 r. zrealizowała swoją pracę magisterską w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej obejmującą syntezę i ocenę aktywności cytotoksycznej acetylenowych pochodnych 5,8-chinolinodionu.

**Mgr inż. Agnieszka Otulakowska** ukończyła studia na kierunku chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach (2013). Od października 2013 r. pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

**Prof. dr hab. n. farm. Stanisław Boryczka** absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej (1973). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskał na Uniwersytecie Śląskim (1990), a doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych w specjalności chemia leków na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (2003). W 2014 roku otrzymał tytuł naukowy Profesora nadany przez Prezydenta RP. Odbył staż w Laboratoire de Synthèse et Electrochimie Organique na Université Catholique de L’Ouest (1993–1994) w Angers. Od 1980 r. pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Jego zainteresowania naukowe koncentrują się na poszukiwaniu nowych związków biologicznie aktywnych, głównie acetylenowych pochodnych chinoliny o działaniu przeciwnowotworowym, badaniu właściwości fizykochemicznych oraz zależności pomiędzy strukturą a działaniem cytotoksycznym.

## ABSTRACT

The natural acetylenic products containing at least one a carbon-carbon triple bond, are important class of compounds widely distributed in the environment. Development of spectroscopic techniques and methods for the isolation of metabolites allowed the extraction of natural acetylenic compounds. The most of these substances have been obtained from marine organisms, such as: cyanobacteria, algae and sponges. The next source of metabolites are herbal plants, which were used in the Chinese traditional medicine. A many of them show interesting biological activity. The first isolated natural compound possessing an acetylenic unit was dehydro-matricaria ester, which was obtained from rhizome European goldenrod (*Solidago virgaurea*). To present day have been found and researched more than 2000 natural acetylenic metabolites.

Due to the chemical structure, natural acetylenic compounds were divided into six groups: peptides, aromatic compounds, enediyne antibiotics, sterols, carotenoids, and poliacetylenic compounds .

This article focuses natural acetylenic substances, which exhibit interesting biological properties, particularly anticancer ones. The review presents many of such metabolites, including fatty alcohols, ketones, acids, ethers, and carotenoids.

**Keywords:** natural products, acetylenic derivatives, cytotoxicity

**Słowa kluczowe:** produkty naturalne, pochodne acetylenowe, cytotsyczność

---

## WSTĘP

Acetylenowe związki pochodzenia naturalnego są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Substancje te są głównie produktami metabolizmu organizmów morskich: mięczaków, osłonic, glonów, mikroalg i gąbek. Wyodrębniono je także z bakterii glebowych, mchów, porostów, grzybów oraz z różnych części morfotycznych roślin, takich jak: korzenie, liście lub nasiona. Metabolity zawierające wiążanie potrójne charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej obejmującym działanie: przeciwbakteryjne przeciwnowotworowe, przeciwpierwotniakowe oraz przeciwgrzybicze [1, 2].

Najprostszy związek organiczny zawierający wiążanie potrójne, etyn, został otrzymany przez Edmunda Davy w 1836 roku. Jednak jego strukturę chemiczną oraz właściwości jako pierwszy opisał francuski chemik Marcellin Berthelot w 1860 roku. On także wprowadził nazwę acetylen [3].

W 1826 roku z kłączów nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea*) wyizolowano ester metylowy kwasu dehydrorumiankowego **1**, pierwszy naturalny związek acetylenowy, który zawiera trzy wiązania potrójne [4]. Francuski badacz Léon-Albert Arnaud w 1892 roku z nasion żółtej śliwki (*Ximenia americana*) wyodrębnił kolejną pochodną, kwas tarirynowy **2**.



Stwierdzono, że związek **2** działa przeciwgrzybiczko w stosunku do drożdżaka *Candida albicans*, dla którego wartość IC<sub>50</sub> wynosi 1,04 µg/ml, ale nie wykazuje działania przeciwnowotworowego wobec ludzkich linii komórek nowotworowych, takich jak komórki: piersi (BT-549), gruczolakoraka jajnika (SK-OV-3) oraz czerniaka (SK-MEL) [5].

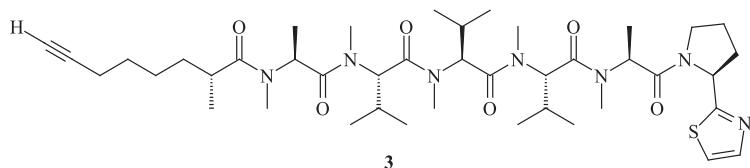
W latach 1960–1980 wraz z rozwojem technik spektroskopowych oraz metod izolacji metabolitów nastąpił przełom w badaniach naturalnych związków acetylenowych. Do dnia dzisiejszego opisano ponad 2000 metabolitów zawierających, co najmniej jedno wiążanie potrójne. Ze względu na budowę chemiczną naturalne związki acetylenowe podzielono na sześć grup [1, 2, 6, 7]: związki peptydowe, związki aromatyczne, antybiotyki enodiynowe, sterole, karotenoidy i związki poliacetylenowe.

### 1. ZWIĄZKI PEPTYDOWE

Acetylenowe związki peptydowe, wytwarzane głównie przez sinice *Lyngbya majuscula*, ze względu na różnice w strukturze chemicznej podzielono na dwie podgrupy. Pierwszą stanowią lipopeptydy o budowie liniowej, które zawierają w swojej

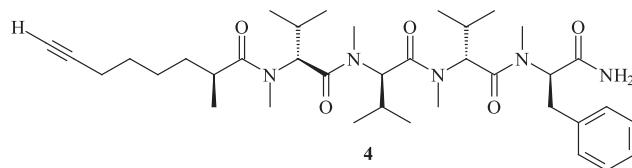
strukturze naturalne aminokwasy połączone z łańcuchami kwasów tłuszczyowych posiadających wiązanie potrójne. Do drugiej należą depsipeptydy posiadające cykliczny pierścień zbudowany z reszt aminokwasów oraz kwasów hydroksykarboksylowych, w tym kwasów hydroksyacetylenowych [1].

Przedstawicielem lipopeptydów jest apramid G 3 wyodrębniony z sinic *Lyngbya majuscula* występujących u wybrzeży Apra Harbor na wyspie Guam [1, 6].

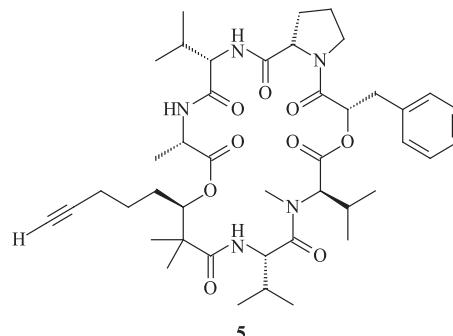


Pochodna **3** charakteryzuje się wysoką cytotoksycznością wobec komórek ludzkich nowotworów jamy ustnej (KB) oraz gruczolakoraka okrężnicy (LoVo), dla których wartości  $IC_{50}$  wynoszą odpowiednio 33 ng/ml oraz 11 ng/ml [1, 6, 8].

Z tego samego rodzaju sinic zebranych na plaży Boca del Drago w Panamie uzyskano dragonamid **4**, wykazujący działanie przeciwnowotworowe wobec linii ludzkich komórek nowotworów płuc (A549), gruczolakoraka okrężnicy (HT-29), czerniaka (SK-MEL-28) oraz mysiej białaczki (P338) [6, 9].



Jednym z pierwszych związków depsipeptydowych był kulolid **5**, wyodrębniony w 1996 roku ze ślimaków *Phlinopsis speciosa*. W jego strukturze oprócz reszt aminokwasów występują amidy kwasów L-2-hydroksy-3-fenylopropionowego oraz R-2,2-dimetylo-3-hydroksy-7-oktynowego [10].

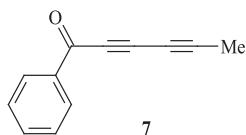


Pochodna **5** wykazuje działanie przeciwnowotworowe wobec linii komórek mysich białaczek P338 oraz L-1210, dla których wartości  $ID_{50}$  wynoszą odpowiednio 2,1  $\mu$ g/ml i 0,7  $\mu$ g/ml [10].

Do depsipeptydów należy również pitipeptolid A **6**, otrzymany z sinic *Lyngbya majuscula* żyjących w jaskiniach Piti Bomb Holes w archipelagu Guam [11]. Związek **6** posiada niską aktywność cytotsyczna wobec komórek raka jelita grubego LoVo, wykazuje jednak wysokie działanie przeciwbakteryjne oraz stymuluje działanie elastazy, enzymu hydrolizującego wiążanie peptydowe [1, 6].

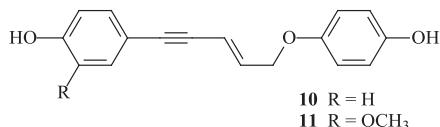
## 2. ZWIĄZKI AROMATYCZNE

Aromatyczne związki acetylenowe są produktami metabolizmu wtórnego, typowego dla roślin wyższych, grzybów i bakterii. W swojej strukturze zawierają jeden lub kilka pierścieni aromatycznych oraz sprzężony układ wiązań potrójnych. Do tej grupy należy kapilina **7**, wyizolowana z bylicy włosowatej (*Artemisia capillaris*) w 1956 roku.

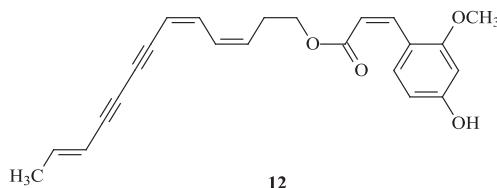


Wykazano, że pochodna acetylenowa **7** działa przeciwgrzybiczo, przeciwzapalnie oraz posiada właściwości hamujące aktywność rakotwórczego wirusa Epsteina-Barr [6, 12]. Dodatkowo kapilina **7** zapobiega apoptozie hepatocytów wywołanej przez transformujący czynnik wzrostu TGF-beta 1. Dowiedzono, że związek **7** w stężeniach w zakresie 1–10 µM wykazuje aktywność cytotsyczną wobec ludzkich linii komórek nowotworów trzustki (MIA), krtani (HEp-2), płuc (A549) oraz gruczolakraka jelita grubego (HT-29) [13]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego kapiliny **7** polega na zahamowaniu cyklu komórkowego pomiędzy fazą G2 a fazą M, w wyniku czego nie zachodzi proces mitozy a komórka jest kierowana na drogę apoptozy [13].

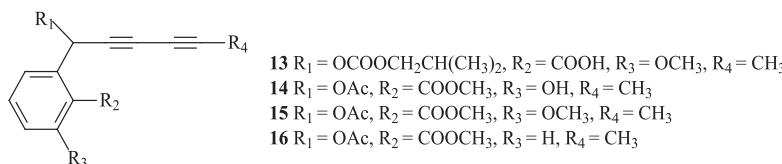
W chińskiej oraz koreańskiej medycynie ludowej jako lek przeciwgorączkowy i przeciwzapalny, od ponad 2000 lat wykorzystywana jest bulwa korzeniowa *Asparagus cochinchinensis* [6, 14]. Z bulwy tej wyizolowano dwie pochodne acetylenowe: asparenydiol **10** oraz 3-metoksyasprenydiol **11**, które wykazują aktywność cytotsyczną wobec ludzkiej linii komórek nowotworu jamy ustnej (KB), raka jelita grubego (Col-2), raka prostaty (LNCaP) oraz komórek strukturalnych śródblonka naczyniowego (HUVEC), dla których wartości IC<sub>50</sub> mieszczą się w zakresie 4–20 µg/ml [6, 15].



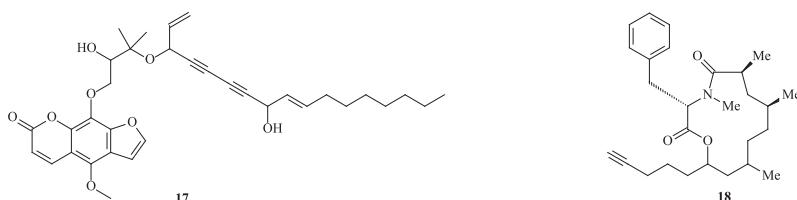
Jedną z roślin wykorzystywanych w chińskiej i japońskiej medycynie ludowej jest *Atractylodes lancea*, której kłącze stosowano w leczeniu zaburzeń gastrycznych m.in. dyspepsji funkcjonalnej [6, 16]. Wyizolowana z tego kłącza pochodna **12** powoduje zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za proces zapalny. Wartości IC<sub>50</sub> oznaczone wobec 5-lipooksygenazy oraz cyklooksygenazy-1 wynosiły odpowiednio 3,4 μM oraz 1,1 μM [6].



Właściwości przeciwnowotworowe oraz przeciwdrobnoustrojowe wykazują ekstrakty pochodzące z siedmiu gatunków złocenia krzewiastego (*Argyranthemum frutescens*). Z korzenia tej rośliny wyizolowano cztery acetylenowe pochodne **13–16**, które wykazują aktywność przeciwnowotworową. Wartości IC<sub>50</sub> dla związków **14** i **16** wobec linii komórek HeLa i HEp-2 mieścią się w zakresie 18–30 μg/ml. Natomiast związek **15** charakteryzuje się znaczącą aktywnością przeciwbakterijną wobec bakterii Gram-dodatnich oraz umiarkowanym wpływem na bakterie Gram-ujemne [6, 17].



Z korzeni dzięgielu *Angelica japonica* wyizolowano kilka acetylenowych związków aromatycznych wykazujących szerokie spektrum działania biologicznego, takie jak: przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, a także hepa-to- oraz nefroprotekcyjne. Chloroformowy ekstrakt uzyskany z wysuszonych korzeni dzięgielu posiada wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek linii gruczołolakoraka żołądka (MK-1), która jest związana z występowaniem w roślinie furanokumarynowych pochodnych falkarindiolu – japoangelolów A-D [6, 18].



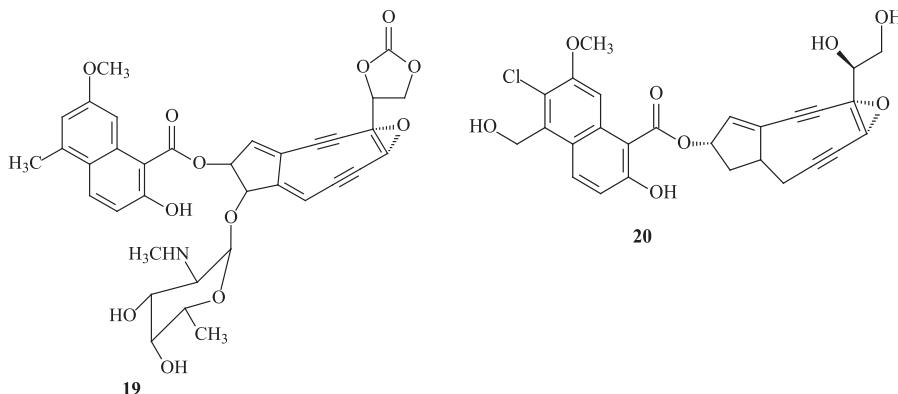
Najbardziej aktywnym jest japoangelol B **17**, który wykazuje także działanie wobec komórek nowotworów szyjki macicy (HeLa) oraz skóry (B16F10) [6].

Bogatym źródłem acetylenowych pochodnych o charakterze aromatycznym jest nie tylko królestwo roślin, ale także prymitywne zwierzęta wodne. Z gąbek rodzaju *Spongia sp.* występujących w wodach Południowego Pacyfiku w okolicach wysp Vanuatu wyodrębniono makrolidowy 13-członowy związek o nazwie spongidepsyna **18**, który wykazuje właściwości cytotoksyczne wobec linii mysich komórek włókniakomiesaka (WEHI-164) oraz linii makrofagów mysich J774.A1 o wartościach  $IC_{50}$  mieszczących się w zakresie od 0,42–0,56  $\mu\text{M}$  [6, 19].

### 3. ANTYBIOTYKI ENODIYNOWE

Antybiotyki enodiynowe należą do jednych z najsilniej działających związków przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych. Niezwykłe właściwości biologiczne tych związków wynikają z obecności w ich strukturze chemicznej wysoce nienasyconego pierścienia makrocyclicznego zawierającego dwa wiązania potrójne oraz jedno wiązanie podwójne w układzie sprzężonym [20]. Ze względu na wielkość pierścienia makrocyclicznego antybiotyki podzielono na dwie podgrupy: posiadające 9- i 10-członowy pierścień enodiynowy.

Ziązki zawierające 9-członowy pierścień w temperaturze pokojowej ulegają samorzutnej cykloaromatyzacji, z tego powodu przeważnie połączone są z częścią białkową (apoproteiną), która stabilizuje antybiotyk. Do tej podgrupy związków należy neokarcynostatyna, pierwszy antybiotykenodiynowy wyizolowany z szczepu bakterii *Streptomyces carzinostaticus*, występujący jako kompleks o składzie 1:1 chromofor **19** z apoproteiną [21]. Obydwa fragmenty neokarcynostatyny są połączone ze sobą niekowalencyjnym oddziaływaniami i można je łatwo oddzielić od siebie poprzez ekstrakcję [22, 23]. Część chromoforowa odpowiada za właściwości przeciwnowotworowe, natomiast apoproteina jest zdolna do rozkładu histonów na krótkie peptydy i w ten sposób ułatwia dostęp chromoforu do łańcucha DNA [22].



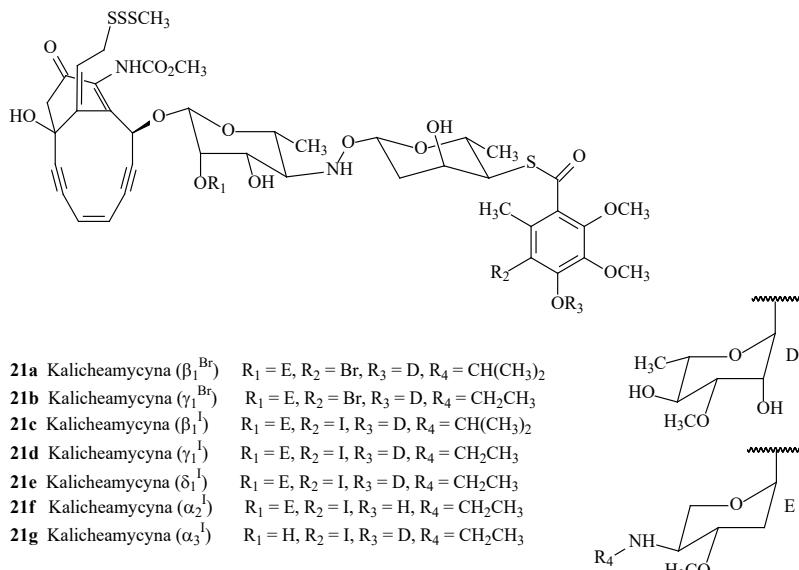
Neokarcynostatyna wykazuje wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich, dla których wartości MIC mieszczą się w przedziale 5–32  $\mu\text{g}/$

ml. Antybiotyk charakteryzuje się również wysokim działaniem cytotoksycznym wobec komórek wątrobiaka złośliwego oraz białaczek. Wartość  $IC_{50}$  *in vitro* dla neokarcynostatyny wobec mysiej linii komórek czerniaka (B16) wynosi 1,1 µg/ml [24]. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że dawka 0,8–3,2 mg/kg powoduje zahamowanie wzrostu komórek mysiej białaczki o 30–80%, przy 100% przeżywalności myszy. Niestety badania kliniczne nad wprowadzeniem antybiotyku do leczenia nowotworu zakończyły się na drugiej fazie ze względu na liczne skutki uboczne terapii [25].

Związek o nazwie N1999A2 20 zawiera 9-członowy pierścień makrocycliczny, ale jako jedyny w tej grupie pochodnych nie jest związany z apoproteiną [6, 26]. Pochodna 20 różni się od neokarcynostatyny brakiem reszty cukrowej oraz wykazuje wyższą stabilność w roztworach wodnych. Podobnie jak pozostałe antybiotyki enodiynowe charakteryzuje się silnym działaniem przeciwnowotworowym oraz przeciwbakteryjnym. Wyznaczone dla niego wartości  $IC_{50}$  wobec różnych linii komórek nowotworowych mieszczą się w zakresie  $10^{-3}$  nM– $10$  nM [26].

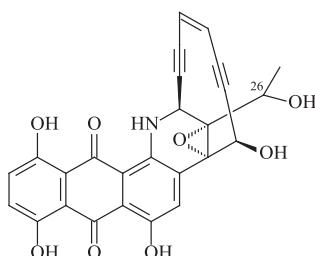
Do grupy antybiotyków enodiynowych zawierających 10-członowy pierścień makrocycliczny należy siedem rodzin związków. Nie zawierają one w swojej budowie apoproteiny oraz są bardziej stabilne w roztworze wodnym niż pochodne 9-członowe [22].

Do najważniejszych antybiotyków tej grupy zalicza się rodzinę kalicheamycyn 21a–b, które zostały wyizolowane z bakterii glebowych *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*. Dodanie jodku sodu do pożywki bakteryjnej umożliwiło otrzymanie jodowych pochodnych kalicheamcyyny 21c–21g, które w pozycji R2 zamiast atomu bromu zawierają atom jodu [27]. Charakterystycznym elementem budowy związków 21a–g jest bicykliczny układ, który jest połączony z metylotrisulfidem za pomocą linkera zawierającego wiązanie podwójne [28, 29].



Kalicheamycyny **21a-g** w stężeniach poniżej 31 pg/ml wykazują bardzo silne działanie wobec bakterii Gram-dodatnich [30]. Ponadto w testach *in vivo* stwierdzono, że dawka 0,5–1,5 mg/kg powoduje zahamowanie rozwoju mysich linii komórek białaczki P388 i L1210 [22].

Antybiotyki enodiynowe ze względu na wysoką aktywność przeciwnowotworową oraz przeciwbakteryjną wciąż budzą duże zainteresowanie naukowców. W ostatnich latach otrzymano wiele syntetycznych pochodnych zawierających enodiynowy pierścień makrocycliczny. W 2005 roku z pałeczek *Cladonia uncialis* pozyskano nowy antybiotyk zawierający 9-członowy pierścień makrocycliczny uncialamycynę **22** [31].



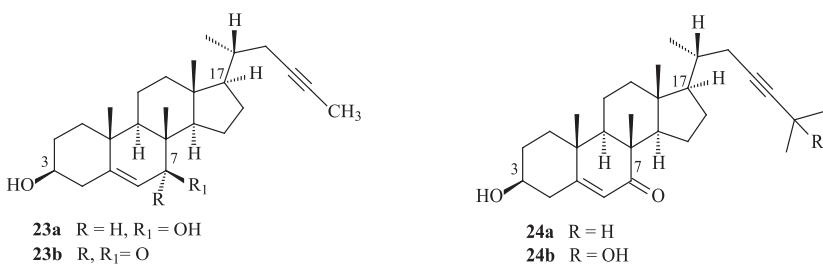
22

Związek **22** zawiera w swojej strukturze dwa aktywne biologicznie układy: pierścień enodiynowy oraz układ antracyklinowy. Niestety ze względu na niską wydajność izolacji do tej pory nie oznaczono konfiguracji absolutnej atomu węgla C-26. Uncialamycyna **22** wykazuje wysoką aktywność *in vitro* wobec bakterii *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Burkholderia cepacia*, natomiast nie jest aktywna wobec drożdży [32].

#### 4. STEROLE

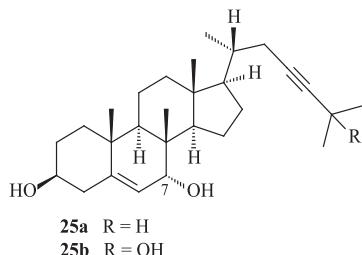
Sterolami nazywamy wszystkie związki zawierające skondensowany układ czterech pierścieni oraz grupę hydroksylową w pozycji C-3. Z tkanek roślin i zwierząt pozyskano kilkaset różnych steroli, w tym kilkadziesiąt pochodnych acetylenowych.

Bogatym źródłem sterolowych związków acetylenowych są gąbki *Gellius sp.*, z których wyodrębniono m.in. gelliusterole A-D 23-24 [33].



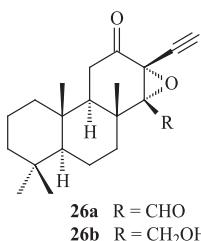
Gelliusterole A-B **23a-b** przy atomie węgla C-17 zawierają podstawnik 1-metylo-3-pentynowy, natomiast w pozycji C-7 odpowiednio grupę hydroksylową lub karbonylową. W gelliusterolu C **24a** i gelliusterolu D **24b** w pozycji C-17 znajduje się odpowiednio podstawnik 1,5-dimetylo-3-heksynowy lub 1,5-dimetylo-5-hydroksy-3-heksynowy. Wszystkie steroidowe pochodne **23a-b** i **24a-b** wykazują aktywność cytotskyczną wobec ludzkich linii komórek nowotworów płuc (A549), gruczola-koraka jelita (HT-29), czerniaka (SK-MEL-28), raka prostaty (DU-145) oraz mysiej białaczki (P388). Najwyższą aktywność wobec linii HT-29 posiada gelliusterol C **24a** ( $IC_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$  [6, 33]).

Ze szczezu bakterii *Cladosporium colocasiae* wyizolowano dwa acetylenowe sterole **25a-b**, które różnią się od gelliusteroli **24a-b** obecnością przy atomie węgla C-7 grupy hydroksylowej zamiast grupy karbonylowej [34].



Stwierdzono, że związek **25a** wobec bakterii laseczki siennej (*Bacillus subtilis*) wykazuje ponad 2,5-krotnie wyższą aktywność od ciprofloksacyny, natomiast pochodna **25b** nie działa przeciwbakteryjnie. Obydwa związki **25a** i **25b** wykazują aktywność antyproliferacyjną wobec ludzkich linii komórek nowotworów piersi (SK-BR-3), trzustki (PANC-1) oraz białaczki promielocytarnej (HL-60) [34].

Eskobaryny A i B **26a-b** pozyskano z korzenia *Calliandra californica*, wiecznie zielonego drzewa rosnącego w Baja Kalifornia w Meksyku [7].

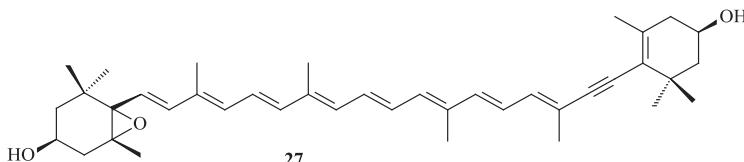


Wartość MIC wobec bakterii Gram-dodatnich *Mycobacterium tuberculosis* otrzymana dla eskobaryny **26a** jest osiem razy niższa od wartości oznaczonej dla ryfampicyny. Związki **26a-b** charakteryzują się także wysoką aktywnością przeciwnowotworową wobec ludzkich linii nowotworów: jelita (HCT-15), piersi (MCF-7), białaczki (K-562 CML), centralnego systemu nerwowego (U-251 Glio) oraz prostaty (PC-3) [7, 35].

## 5. KAROTENOIDY

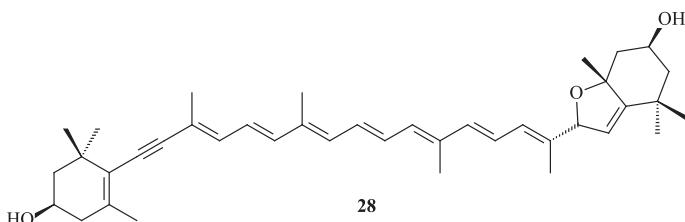
Karotenoidy stanowią grupę wtórnnych metabolitów wytwarzanych głównie przez skorupiaki morskie oraz glony. Związki te zbudowane są z jednostek izoprenowych i zawierają w swojej strukturze 40 atomów węgla, ich najważniejszą rolą jest nadawanie barwy organizmom w których występują, co umożliwia wabienie lub obronę przed promieniowaniem UV.

Z wiciowca *Euglena gracilis* pozyskano diadinoksantynę A **27**, która działa jako pigment i nadaje planktonowi złoto-brązowy kolor [7, 36]. Ten sam związek występuje w znacznych ilościach w koralowcach *Acropora japonica* oraz małżach *Tridacna squamosa* [37].

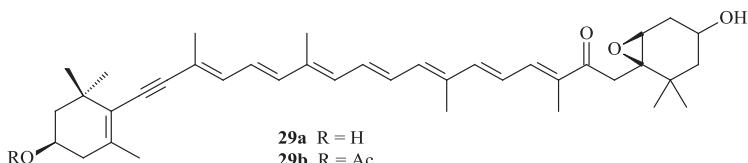


Pochodna **27** uczestniczy w szlaku metabolicznym chroniąc mikroorganizmy przed fotodestrukcją w wyniku nadmiernego naświetlania komórek [36].

Działanie przeciwnowotworowe wobec linii komórek nowotworowych raka szyjki macicy (HeLa) stwierdzono dla diadinochromu A **28**, wyizolowanego ze słodkowodnych alg *Peridinium bipes* [1, 6].



Halocynotiaksantyna **29a** i jej acetylowa pochodna **29b** występuje w żachwach *Halocynthia roretzi*, a także w wielu rodzajach małż oraz ostryg [7].



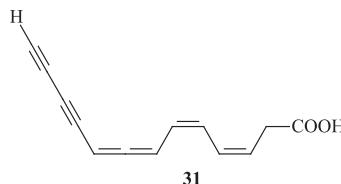
Związek **29b** wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkich komórek białaczki promielocytarnej (HL-60) oraz nerwiaka (GOTO), powoduje również zahamowanie produkcji tkankowego antygenu polipeptydowego (tPA) będącego markerem proliferujących komórek nabłonka [7].

Z gąbek morskich *Prianos osiros*, żyjących w Morzu Śródziemnym w okolicach Pompejów, wyizolowano acetylenowy karotenoid **30**. Związek ten wykazuje wysoką aktywność wobec linii komórek nowotworu okrężnicy (HCT-116), dla którego wartość IC<sub>50</sub> wynosi 4,38 µg/ml [1, 6].

## 6. ZWIĄZKI POLIACETYLENOWE

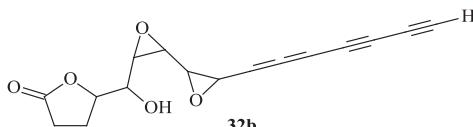
Ze względu na dużą różnorodność strukturalną, związki poliacetylenowe stanowią najliczniejszą grupę naturalnych acetylenowych pochodnych. Zalicza się tu związki z takimi grupami funkcyjnymi jak grupa karboksylowa, hydroksylowa, aldehydowa i ketonowa oraz pochodne zawierające pierścienie epoksydowe. Związki poliacetylenowe pozyskuje się głównie z bakterii, grzybów, alg oraz korzeni, liści i nasion roślin [4].

Jednym z pierwszych opisanych związków poliacetylenowych o charakterze kwasu karboksylowego jest mykomycyna **31** wyizolowana w 1950 roku z promienowców (*Actinomyces*) z rodzaju *Nocardia acidophilus*.



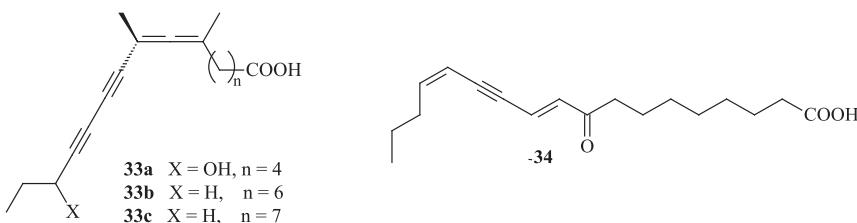
Pochodna **31** wykazuje właściwości tuberkulostatyczne, a także działa na komórki pierwotnego nowotworu wątrobowokomórkowego [2].

Dwa acetylenowe antybiotyki cepacyna A **32a** i cepacyna B **32b** pozyskane z Gram-ujemnych bakterii *Pseudomonas cepacia* zawierają w swojej strukturze pierścień epoksydowy, który w reakcjach enzymatycznych ulegają przekształceniu w grupę hydroksylową [6].



Pochodne **32a-b** charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną wobec bakterii gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), jednak związek **32b** wykazuje 4-krotnie wyższą aktywność od kepacyny A **32a**. Wartości MIC oznaczone dla pochodnej **32b** wobec bakterii Gram-ujemnych mieścią się w przedziale 0,1–50 µg/ml [7].

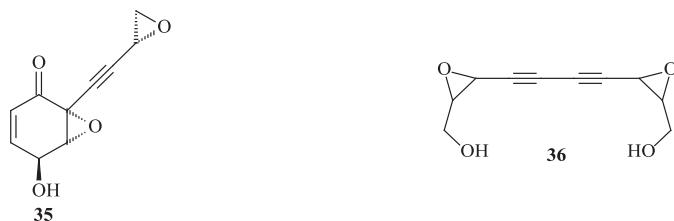
Poliacetylenowe kwasy pozyskano również z wielu gatunków grzybów. Z grzybów workowych z rodzaju *Phoma sp.* wyizolowano kwasy fomallenowe A-C **33a-c**, które hamują działanie białka Fab, występującego w organizmach prokariotycznych i uczestniczącego w biosyntezie kwasów tłuszczowych [38, 39]. W grupie badanych pochodnych **33a-c** najwyższym działaniem przeciwbakteryjnym charakteryzuje się kwas **33c**, który w stężeniu 0,77 µg/ml powoduje zahamowanie wzrostu 50% bakterii *Staphylococcus aureus*. Natomiast związki **33a-b** wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec metycylinopornych szczepów *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* [38, 39].



Kwas (10E,14Z)-9-oksooktadeka-10,14-dien-12-ynowy **34** pozyskano z popularnej kurki, czyli pieprznika jadalnego *Cantharellus cibarius*. Wykazano, że jest on agonistą receptora PPAR $\gamma$ , który odpowiada za proces różnicowania komórek tłuszczowych oraz wpływa na metabolizm glukozy. Dodatkowo pochodna **34** wpływa na zmniejszenie ekspresji genów kodujących karboksykinazę fosfoenolpirogromianową oraz glukozo-6-fosfatazę. Wyznaczona wartość EC<sub>50</sub> wobec genu kodującego receptor PPAR $\gamma$  wynosi 1,88 µM [2, 40].

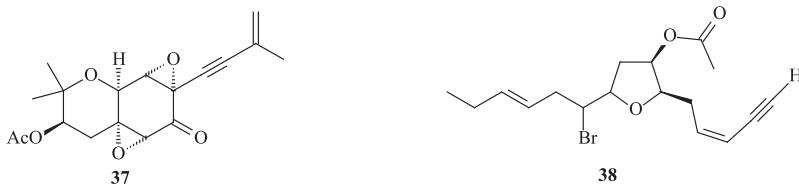
Z występujących w Chinach grzybów jadalnych z rodzaju *Hexagonia speciosa* wyizolowano spekiosyn B **35** o znacznej aktywności wobec ludzkich linii komórek

nowotworowych, takich jak: piersi (MCF-7), okrężnicy (SW480), białaczki promielocytarnej (HL-60) oraz wątrobiaka (SMMC-7721). Pochodna 35 wykazuje najwyższe działanie wobec komórek HL-60 i SMMC-7721 o wartościach  $IC_{50}$  wynoszących odpowiednio  $0,23 \mu\text{M}$  i  $0,70 \mu\text{M}$  [2].



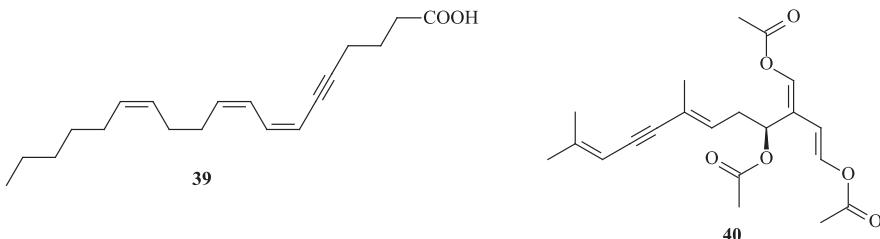
W 1992 roku z grzybów *Hydnum repandum* otrzymano repandiol 36, związek zawierający dwa pierścienie epoksydowe i wykazujący wysoką aktywność wobec wielu linii komórek nowotworowych, takich jak: mysia białaczka (P388), mysie nowotwór okrężnicy (Colon 26) oraz gruczolakorak jelita grubego (DLD-1), dla których wartości współczynnika  $ID_{50}$  wynoszą odpowiednio  $1,88 \mu\text{g/ml}$ ,  $0,30 \mu\text{g/ml}$  i  $0,66 \mu\text{g/ml}$  [4, 6, 40].

Oksirapentyna A 37 wyizolowana z grzybów *Beauveria feline* posiada wysoką aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworu: piersi (T-47D) oraz czerniaków SK-Mel-5 i SK-Mel-28, dla których wartości  $IC_{50}$  wynoszą odpowiednio  $25 \mu\text{M}$ ,  $19 \mu\text{M}$  i  $17 \mu\text{M}$ . Ważną właściwością pochodnej 37 jest brak działania toksycznego wobec mysich komórek śledziony CD-1 ( $IC_{50} = 120 \mu\text{M}$ ). Oksirapentyna A 37 ogranicza wzrost bakterii z rodzaju *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. W badaniach *in vivo* (model mysii) związek 37 w dawce  $6,25 \text{ mg/kg}$  powoduje śmierć 50% bakterii *Streptococcus faecalis* [2].



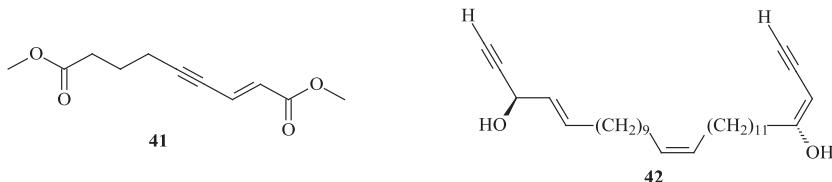
Bogatym źródłem związków acetylenowych są czerwone algi (*Laurencia obtusa*) produkujące ponad 200 wtórnych metabolitów zawierających co najmniej jedno wiązanie potrójne. Pochodne te posiadają szerokie spektrum działania biologicznego obejmującego aktywność antyproliferacyjną, przeciwbakteryjną, przeciwwiirusową, przeciwgrzybiczą, przeciwmalaryczną oraz antyoksydacyjną. Przykładem acetylenowego związku wyizolowanego z alg zawierającego cykliczny układ eterowy jest *trans*-kumausyna 38 [1].

Z alg z gatunku *Liagora farinosa* otrzymano kwas oktadek-5-yne-7Z,9Z,12Z-trienowy **39**, który jest nie tylko toksyczny dla ryb raf koralowych *Eupomacentrus leucostictus*, ale również wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie aktywności cyklooksogenazy [41].

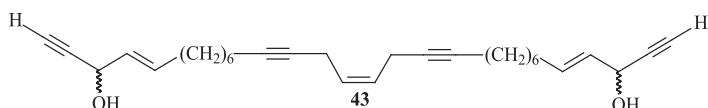


Algii *Caulerpa taxifolia*, występujące w Morzu Śródziemnym, Oceanie Indyjskim oraz Morzu Karaibskim wytwarzają kaulerpenynę **40**, o wysokim działaniu przeciwnowotworowym wobec linii komórek nerwiaka mózgu (SK-N-SH) [1, 42].

Ważną grupę organizmów morskich stanowią gąbki, które wytwarzają najczęściej wtórnego metabolitów spośród wszystkich bezkręgowców [41]. Z gatunku *Xestospongia testudinaria* żyjącego w Chinach pozyskano ksesotospongineę **41**, która charakteryzuje się niską cytotoxycznością wobec ludzkich linii komórek nowotworowych żołądka (BGC-823), wątroby (Bel-7402), nabłonka jamy ustnej (KB) oraz białaczki promielocytarnej (HL-60) [41].



Z gąbek *Strongylophora durissima* (*Petrosia sp.*) wydzielono związek poliacytylenowy **42**, wykazujący silną cytotoxyczność wobec linii ludzkich komórek raka żołądka (NUGC) [6]. Z tego samego rodzaju gąbek pozyskano również dideoksypetrosynol A **43** [43].

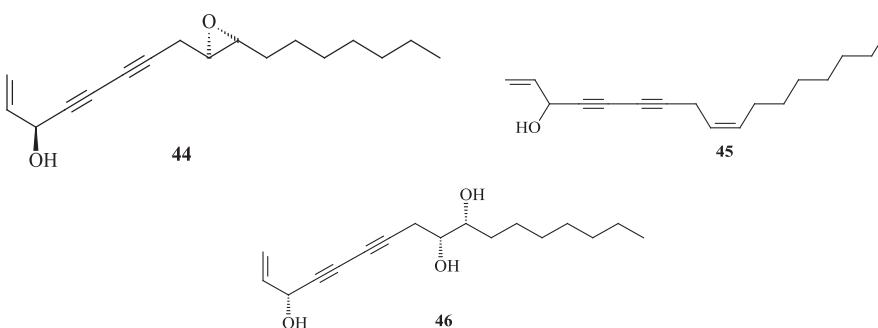


Wykazuje on cytotoxyczność wobec linii komórek nowotworu płuc (A549), jajnika (SK-OV-3), ośrodkowego układu nerwowego (XF498), okrężnicy (HCT15) oraz czerniaka (SK-MEL-2) [6]. Zaobserwowało również zahamowanie wzrostu komórek ludzkiej białaczki (U937). Mechanizm działania pochodnej **43** polega na aktywacji kaspazy-3 i kaspazy-9 oraz zwiększeniu ekspresji proapoptycznego białka Bax. Wykazano również spadek stężenia mRNA dla cyklooksygenazy 2 (COX-2), jednocześnie nie obserwując istotnych zmian poziomu mRNA dla cyklooksyge-

nazy 1 (COX-1). Obniżenie ekspresji genu COX-2 jest czynnikiem powodującym zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych. Ponadto wykazano, że związek **43** zmniejsza aktywność telomerazy oraz ekspresję genu telomerazy odwrotnej transkryptazy (hTERT). Obserwowane efekty były ściśle związane z zastosowaną dawką [43].

Jednym z najważniejszych źródeł związków acetylenowych jest korzeń żeń-szenia, który od ponad 4000 lat jest wykorzystywany w chińskiej medycynie ludowej jako panaceum na różne dolegliwości. W badaniach wykazano, że ekstrakt z korzenia żeń-szenia powoduje zahamowanie wzrostu komórek mysiej białaczki (L5178 Y), mysiego mięsaka (Sarcoma 180) oraz ludzkich komórek nowotworu płuc (A498) i nerki (Caki-1). Ponadto surowy ekstrakt wykazuje wyższą aktywność od *cis*-platyny i 5-fluorouracylu [2, 4, 6, 7].

Wysoka aktywność ekstraktu żeń-szenia związana jest z występowaniem w nim takich związków jak: panaksydol **44**, falkarinol **45** oraz falkarinodiol **46**, których zawartość w suchej masie wynosi odpowiednio: 297 µg/g, 250 µg/g i 320 µg/g. Bogatym źródłem poliacetylenowych związków **44-46** są również korzeń marchwi, piepruszki, selera oraz natka pietruszki [6].



Pochodne **44-46** charakteryzują się wysoką aktywnością cytotoxiczną wobec linii komórek nowotworowych, takich jak: szyjki macicy (HeLa), białaczki (L-1210), piersi (MCF7) oraz pęcherza moczowego (T24). W grupie badanych związków najwyższe działanie wykazuje panaksydol **44**, dla którego wartość IC<sub>50</sub> wobec komórek mysiej białaczki (L-1210) wynosi 0,19 µM. Ważną właściwością związków jest niska toksyczność wobec wielu typów prawidłowych komórek [6]. Aktywność związków **44-46** względem linii gruczolakoraka żołądka (MK-1) układa się w następującym porządku: **44** > **45** > **46** [44]. Przypuszcza się, że mechanizm działania pochodnych **44-45** polega na indukcji apoptozy zależnej od katalitycznego rozpadu kinazy proteinowej C delta (PKCδ), aktywacji kaspazy-3 oraz degradacji polimerazy poli(ADP – rybozy) [6, 45]. Dodatkowo związek **45** wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie 5-lipoooksygenazy, dwóch izoform 12-lipoooksygenazy oraz 15-lipoooksygenazy, mając jednocześnie niewielki wpływ na aktywność cyklooksygenazy. Badania prowadzone na szczurach dowodzą, że dieta

bogata w produkty zawierające falkarinol **45** opóźnia rozwój przednowotworowych zmian w jelcie grubym [6, 46].

## PODSUMOWANIE

Poszukiwanie nowych substancji leczniczych często związane jest z wykorzystaniem związków pochodzenia naturalnego o udokumentowanej, wysokiej aktywności biologicznej. Pochodne acetylenowe zawierające w swojej strukturze wiązanie potrójne węgiel-węgiel stanowią obiekt zainteresowania badaczy na całym świecie. Związki tego typu są wytwarzane, jako metabolity wtórne przez organizmy żywne takie jak: bakterie, grzyby, rośliny wyższe oraz organizmy morskie.

W przedstawionej pracy omówiono jedynie kilkadziesiąt pochodnych acetylenowych, które charakteryzują się zróżnicowaną strukturą chemiczną. Substancje te wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej obejmującej działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze.

## PODZIĘKOWANIE

Praca wykonana w ramach badań statutowych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-2-008/N/6/N).

## PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] V.M. Dembitsky, D.O. Levitsky, T.A. Gloriozovac, V.V. Poroikovc, Nat. Prod. Commun., 2006, **1**, 773.
- [2] D.V. Kuklev, A.J. Domb, V.M. Dembitsky, Phytomed., 2013, **20**, 1145.
- [3] S. Miller, *Acetylene: its properties, manufacture, and uses*, New York: Academic Press Inc., 1965.
- [4] R.E. Minto, B.J. Blacklock, Prog. Lipid Res., 2008, **47**, 233.
- [5] Y.-C. Li, M. Jacob, H. ElSohly, G. Nagle, T. Smillie, L. Walker, A. Clark, J. Nat. Prod., 2003, **66**, 1132.
- [6] A. Siddiq, V. Dembitsky, Anti. Canc. Agents. Med. Chem., 2008, **8**, 132.
- [7] D.V. Kuklev, V.M. Dembitsky, Prog. Lipid Res., 2014, **56**, 67.
- [8] P.G. Williams, W.J. Yoshida, R.E. Moore, V.J. Paul, J. Nat. Prod., 2004, **67**, 49.
- [9] J.I. Jiménez, P.J. Scheuer, J. Nat. Prod., 2000, **64**, 200.
- [10] M.T. Reese, N.K. Gulavita, Y. Nakao, M.T. Hamann, W.Y. Yoshida, S.J. Coval, P.J. Scheuer, J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 11081.
- [11] H. Luesch, R. Pangilinan, W.Y. Yoshida, R.E. Moore, V.J. Paul, J. Nat. Prod., 2001, **64**, 304.
- [12] B.W. Nash, D.A. Thomas, W.K. Warburton, T.D. Williams, J. Chem. Soc., 1965, **46**, 2983.
- [13] L.C. Whelan, M.F. Ryan, Anticancer Res., 2004, **24**, 2281.
- [14] N.B. Samad, T. Debnath, A. Hasnat, M. Pervin, H. Kim, J.E. Jo, S.R. Park, B.O. Lim, J. Food Biochem., 2014, **38**, 83.
- [15] H.J. Zhang, K. Sydara, G.T. Tan, C. Ma, B. Southavong, D.D. Soejarto, J.M. Pezzuto, H.H. Fong, J. Nat. Prod., 2004, **67**, 194.

- [16] Y. Nakai, T. Kido, K. Hashimoto, Y. Kase, I. Sakakibara, M. Higuchi, H. Sasaki, *J. Ethnopharmacol.*, 2003, **84**, 51.
- [17] A.G. Gonzalez, R. Estevez-Reyes, A. Estevez-Braun, A.G. Ravelo, I.A. Jimenez, I.L. Bazzocchi, M.A. Aguilar, L. Moujir, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 963.
- [18] K. Furumi, T. Fujioka, H. Fuji, H. Okabe, Y. Nakano, H. Matsunaga, M. Katano, M. Mori, M.K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 93.
- [19] A. Grassia, I. Bruno, C. Debitus, S. Marzocco, A. Pinto, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 6257.
- [20] J.W. Grissom, G.U. Gunawardena, D. Klingberg, D. Huang, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 6453.
- [21] N. Ishida, K. Miyazaki, K. Kumagai, M. Rikimaru, *J. Antibiot.*, 1965, **18**, 68.
- [22] S. Boryczka, W. Mól, A. Jowsa, *Wiad. Chem.*, 2007, **61**, 445.
- [23] K. Edo, M. Mizugaki, Y. Koide, H. Seto, K. Furihata, N. Ōtake, N. Ishida, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 331.
- [24] M. Hanada, H. Ohkuma, T. Yonemoto, K. Tomita, M. Ohbayashi, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi, H. Kawaguchi, S. Forenza, *J. Antibiot.*, 1991, **44**, 403.
- [25] G. Falkson, D. Von Hoff, D. Klaassen, H. Du Plessis, C.F. Van Der Merwe, A.M. Van Der Merwe, P.P. Carbone, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1980, **4**, 33.
- [26] N. Miyagawa, D. Sasaki, M. Matsuoka, M. Imanishi, T. Ando, Y. Sugiura, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2003, **306**, 87.
- [27] M.D. Lee, J.K. Manning, D.R. Williams, N.A. Kuck, R.T. Testa, D.B. Borders, *J. Antibiot.*, 1989, **42**, 1070.
- [28] J. Golik, B. Krishnan, T.W. Doyle, G. Van Duyne, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 6049.
- [29] J. Golik, H. Wong, D.M. Vyas, T.W. Doyle, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 2497.
- [30] W.M. Maiese, M.P. Lechevalier, H.A. Lechevalier, J. Korshalla, N. Kuck, A. Fantini, M.J. Wildey, J. Thomas, M. Greenstein, *J. Antibiot.*, 1989, **42**, 558.
- [31] J. Davies, H. Wang, T. Taylor, K. Warabi, X.-H. Huang, J. Andersen, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5233.
- [32] S. Desrat, P. Van de Weghe, *Org. Lett.*, 2009, **74**, 6728.
- [33] W.A. Gallimore, M. Kelly, P.J. Scheuer, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 741.
- [34] D.-Z. Liua, B.-W. Liangb, X.-F. Lic, Z.-Y. Yuc, *Steroids*, 2014, **87**, 35.
- [35] R. Encarnación-Dimayuga, J. Agúndez-Espinoza, A. García, G. Delgado, G. Molina-Salinas, S. Said-Fernandez, *Planta Med.*, 2006, **72**, 757.
- [36] D.V. Heelis, W. Kernick, G.O. Phillips, K. Davies, *Arch. Microbiol.*, 1979, **121**, 207.
- [37] T. Maoka, N. Akimoto, M. Tsushima, S. Komemushi, T. Mezaki, F. Iwase, Y. Takahashi, N. Sameshima, M. Mori, Y. Sakagami, *Mar. Drugs*, 2011, **9**, 1419.
- [38] K. Young, H. Jayasuriya, J.G. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, V. Brown-Driver, R. Yamamoto, L.L. Silver, Y. Zheng, J.I. Ventura, J. Sigmund, S. Ha, A. Basilio, F. Vicente, J. Tormo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 519.
- [39] Y.-J. Jian, C.-J. Tang, Y. Wu, *J. Chem. Org.*, 2007, **72**, 4851.
- [40] A. Takahashi, T. Endo, S. Nozoe, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40**, 3181.
- [41] F.Z. Zhou, M. Menna, Y.S. Cai, Y.W. Guo, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 1543.
- [42] P. Barbier, S. Guise, P. Huitorel, P. Amade, D. Pesando, C. Briand, V. Peyrot, *Life Sci.*, 2001, **70**, 415.
- [43] C. Park, J.H. Jung, N.D. Kim, Y.H. Choi, *Int. J. Oncol.*, 2007, **30**, 291.
- [44] L.P. Christensen, K. Brandt, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2006, **41**, 683.
- [45] Z. Yan, R. Yang, Y. Jiang, Z. Yang, J. Yang, Q. Zhao, Y. Lu, *Molecules*, 2011, **16**, 5561.
- [46] M. Kobaek-Larsen, L.P. Christensen, W. Vach, J. Ritskes-Hoitinga, B.K., *J. Agric. Food. Chem.*, 2005, **53**, 1823.

- [47] L. Wang, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, M. Blunder, X. Liu, C. Malainer, T. Blazevic, S. Schwaiger, J.M. Rollinger, E.H. Heiss, D. Schuster, B. Kopp, R. Bauer, H. Stuppner, V.M. Dirsch, A.G. Atanasov, *Biochem. Pharmacol.*, 2014, **92**, 73.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 sierpnia 2016

# CHROMATOGRAFICZNA ANALIZA ZWIĄZKÓW BUDUJĄCYCH KWASY NUKLEINOWE

## CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS CONSTITUENTS

Sylwia Studzińska, Rafał Rola, Filip Łobodziński,  
Katarzyna Krzemieńska

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemiczny,  
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizyki,  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń,  
e-mail: kowalska@chem.umk.pl

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Chromatografia cieczowa w analizie nukleozydów
2. Zastosowanie chromatografii cieczowej do oznaczania nukleotydów
3. Analiza jakościowa i ilościowa oligonukleotydów syntetycznych
4. Nowe kierunki badań chromatograficznych związków budujących kwasy nukleinowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

---

**mgr Katarzyna Krzemińska**, doktorantka na Wydziale Chemii UMK od 2014 r. W pracy naukowej zajmuje się syntezą nowego typu faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej.

**mgr Filip Łobodziński**, absolwent Wydziału Chemii UMK. W 2015 r. uzyskał tytuł magistra za pracę poświęconą wykorzystaniu chromatografii oddziaływań hydrofilowych w analizie oligonukleotydów.

**mgr Rafał Rola**, absolwent Wydziału Chemii UMK. W 2015 r. uzyskał tytuł magistra za pracę obejmującą badanie *in vitro* metabolizmu oligonukleotydów antysenownych z zastosowaniem chromatografii par jonowych.

**dr hab. Sylwia Studzińska**, stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2009 r. za pracę nad wpływem cieczy jonowych na środowisko oraz ich chromatograficzną analizą. Pracę wykonała w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydziału Chemii, UMK w Toruniu pod kierunkiem prof. Bogusława Buszewskiego. Praca została nagrodzona w ogólnopolskim konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej w 2010 r. Stypendystka Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, laureatka prestiżowego stypendium naukowego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców oraz Komisji Analizy Chromatograficznej KChA PAN dla młodych pracowników nauki w dziedzinie metod rozdzielania. Od 2014 roku jest adiunktem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, gdzie prowadzi badania nad chromatograficzną analizą i metabolizmem związków budujących kwasy nukleinowe. W 2016 roku uzyskała tytuł doktora habilitowanego za cykl prac poświęcony tym badaniom.

## ABSTRACT

Understanding the characteristics, role and structure of nucleic acids allowed to answer questions about the disease processes. Today, nucleic acids and their constituents are tools, which are used by molecular biology in medicine and biotechnology. Antisense and gene therapy are intensively developing methods for possible treating or preventing disease. They use short fragments of DNA or RNA - oligonucleotides to silence the genes expression. They are not the only ones that allow analytical chemists to obtain information about the state of our body. Determination of modified nucleoside allows detection of cancer, while analysis of nucleotides allows the estimation of strengthening the immune system.

There is a great need of sensitive, selective and precise methods of separation of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides and their qualitative and quantitative analysis. Consequently liquid chromatography (LC) is the most commonly used for analysis of nucleic acid constituents. The most widely used modes of LC include Ion Exchange Chromatography (IEC) and Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP HPLC). Both techniques have their advantages and disadvantages in the analysis of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides. In the case of IEC it is necessary to use high concentrations of the salt in the mobile phase or concentration gradients, which considerably limits the possibility of using MS detection. RP HPLC can be coupled with MS detection but only when volatile salts are mobile phase components. On the other hand there is a significant problem is the lack of sufficient selectivity for the most polar nucleosides and nucleotides. RP HPLC MS is still most often used in the determination of nucleosides and nucleotides, due to its high sensitivity and a comprehensive qualitative analysis.

Another system used for the HPLC analysis of oligonucleotides is Ion Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (IP RP HPLC). These compounds can not be analyzed by RP HPLC due to their high polarity. The advantage of IP RP HPLC is selectivity, achieved by a suitable choice of mobile phase composition and the possibility of using MS. A disadvantage of IP RP HPLC in the analysis of oligonucleotides is however lower sensitivity compared to RP HPLC.

During the last few years Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) was applied for the separation of mixtures of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides extracted from a biological or food samples. The presented results demonstrate the usefulness of this method, however, the resolving power is limited due to the asymmetric peak shape. On the other hand proper selection of the mobile and stationary phase can lead to a high selectivity in the analysis of the most polar nucleosides, nucleotides and oligonucleotides, which can not be separated by RP HPLC.

**Keywords:** nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, liquid chromatography, sensitivity, selectivity

**Słowa kluczowe:** nukleozydy, nukleotydy, oligonukleotydy, chromatografia cieczowa, czułość, selektywność

## WPROWADZENIE

Kwasy nukleinowe to związki pełniące funkcję źródła informacji o budowie i cechach każdego organizmu żywego [1]. Stanowią one polimery, zbudowane z mniejszych cząstek (monomerów), jakimi są nukleotydy. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmów niezbędne są nie tylko kwasy nukleinowe, ale również związki, które wchodzą w ich skład, takie jak oligonukleotydy, nukleotydy i nukleozydy [1]. Obecnie wszystkie z wymienionych grup związków stanowią ważne narzędzia, którymi posługuje się biologia molekularna – przede wszystkim w medycynie. Bada się m.in. stężenie nukleozydów w moczu, nukleotydów w mleku matki, płynie mózgowo-rdzeniowym, żywności, oraz zawartość oligonukleotydów lub małocząsteczkowych kwasów nukleinowych w osoczu [2–9].

Nukleozydy to cząsteczki składające się z cukru (rybozy lub deoksrybozy) oraz zasady azotowej (purynowej lub pirymidynowej). W kwasach nukleinowych do zasad purynowych należą: adenina (A) oraz guanina (G), natomiast do pirymidynowych: tymina (T), cytozyna (C) i uracyl (U). Odgrywają one bardzo ważną rolę, gdyż są prekursorami nukleotydów, biorących udział w przenoszeniu informacji genetycznej. Nukleozydy są także cząsteczkami sygnalowymi i neuromodulatorami [1, 9].

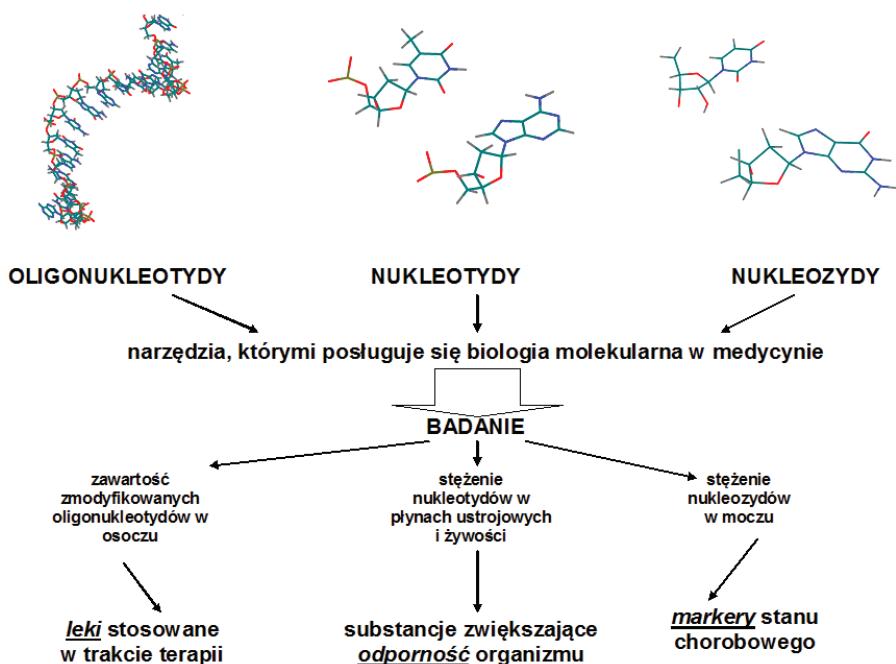
Transportujący kwas rybonukleinowy (tRNA) zawiera wiele zmodyfikowanych nukleozydów, które powstają w czasie potranskryptcyjnej obróbki enzymatycznej prekursorowego tRNA. Są to głównie analogi urydyny (rybotymidyna, dihydrourydyna, czy pseudourydyna) i adenozyny (np. inozyna, 1-metyloinozyna, 7-metyloadenozyna) [1, 4, 9–12]. Modyfikacje nukleozydów mogą przyjmować charakter prosty (np. redukcja, utlenianie, metylacja) lub złożony, w wyniku którego powstają między innymi nukleozydy hiperzmodyfikowane [4, 10–12]. Zmodyfikowane nukleozydy uwalniane są z tRNA w wyniku hydrolytycznej aktywności fosfataz i rybonukleaz. Związki te nie mogą być włączone do powtórznej syntezy RNA, z tego względu krążą z krwią i trafiają do moczu, z którym są wydalane z organizmu. Wykazano, że poziom stężenia potranskryptcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w moczu jest użytecznym parametrem w badaniu zmian RNA i metabolizmu białek. Zostały one uznane za markery chorób nowotworowych [10–12].

Ważne funkcje w organizmie pełnią także nukleotydy, które są estrami kwasu fosforowego i nukleozydu. Są one monomerami kwasów nukleinowych i biorą udział w przekazywaniu informacji genetycznej [1, 9]. Pełnią ponadto kluczową rolę w procesach syntezy fosfolipidów, białek i węglowodanów. Adenozyno-5'-trifosforan (ATP) jest nośnikiem energii niezbędnej do przebiegu większości procesów przebiegających w komórce [1, 9]. Z kolei cykliczne fosfodiestyry uczestniczą w szlakach przekazywania sygnałów. Nukleotydy biorą także pośrednio udział w regulacji metabolizmu [1]. Ich obecność oraz poziom stężenia musi być monitorowany dla takich celów jak m. in.: ocena stanu układu sercowo-naczyniowego, oznaczanie biomarkerów stresu oksydacyjnego, badanie mikroorganizmów, analiza żywności, suplementacji diety, mleka matek karmiących oraz płynu mózgowo-rdzeniowego.

[13–17]. Udowodniono ponadto, iż nukleotydy mają działanie immunostymulujące, poprawiające pracę i wydolność układu odpornościowego [18,19].

Poszczególne nukleotydy połączone ze sobą wiązaniem 3'-5' fosfodiestrowymi tworzą cząsteczki oligonukleotydów. Stanowią one zatem krótkie, jednociwowe fragmenty kwasu nukleinowego [1, 9]. W komórce występują zwykle w postaci krótkich cząsteczek RNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów (np. mikroRNA) lub są półproduktyami rozkładu dużych cząsteczek kwasów nukleinowych [1]. Oligonukleotydy naturalnie występujące w organizmie mają zdolność do tworzenia dupleksów zarówno z cząsteczką DNA (właściwości antygenowe), jak i RNA (właściwości antysensowne). Są one jednak trawione przez enzymy z grupy nukleaz [1, 7, 9]. Z tego względu syntezowane są oligonukleotydy o zmodyfikowanej strukturze, składające się z 12-20 jednostek nukleotydowych. Związki te zdolne są do wiązania się z określonym fragmentem DNA, RNA, a nawet z białkami [2, 3, 7]. Sekwencja zasad azotowych w oligonukleotydzie jest komplementarna do sekwencji sensownej DNA lub mRNA, dlatego też związki te są nazywane oligonukleotydami antysensownymi. Hamują one procesy transkrypcji i translacji poprzez komplementarne łączenie z fragmentami kwasów nukleinowych. Dzięki temu stały się efektywnym narzędziem w regulacji ekspresji określonego genu [2, 3, 7, 8]. Modyfikacje strukturalne oligonukleotydów antysensownych mają na celu zwiększenie ich biodostępności, odporności na działanie nukleaz, powinowactwa do wybranych biomolekuł [20]. Zdolność do hamowania ekspresji genów jest powodem ich wykorzystywania w leczeniu wielu chorób. Ponad 40 z nich znajduje się w różnych fazach badań klinicznych, a 3 zostały już wprowadzone na rynek [2, 3, 21, 22]. Niezbędna jest obecnie kontrola poziomu stężeń zmodyfikowanych oligonukleotydów lub ich metabolitów w osoczu.

Podsumowując należy stwierdzić, że związki budujące kwasy nukleinowe są albo markerami stanu chorobowego (nukleozydy), albo substancjami zwiększającymi odporność organizmu (nukleotydy), bądź też lekami, które mają ten organizm przed chorobą bronić (oligonukleotydy) (Rys. 1). Możliwość monitorowania zmian chorobowych, zachodzących w organizmie poprzez oznaczenie nukleozydów, jak również terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów powoduje, iż niezbędne staje się ich oznaczanie w różnego typu matrycach. Prowadzi to do poszukiwania nowych metod analizy. Powinny one charakteryzować się krótkim czasem analizy, selektywnością, czułością i powtarzalnością. W analizie związków budujących kwasy nukleinowe powszechnie stosowane są techniki separacyjne, a zwłaszcza chromatografia cieczowa [2, 8, 12].



Rysunek 1. Struktura i rola związków budujących kwasy nukleinowe w organizmie

Figure 1. Structure and function of nucleic acids components

## 1. CHROMATOGRAFIA CIECZOWOWA W ANALIZIE NUKLEOZYDÓW

Współcześnie poszukuje się nowych metod analizy nukleozydów, które umożliwiają pełną i szybką kontrolę zmian nowotworowych zachodzących w organizmie. Obecnie jako metody analizy nukleozydów wykorzystywane są chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC), chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC), strefowa elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), micelarna elektroforeza kapilarna (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC), elektrochromatografia kapilarna (ang. *Capillary Electrochromatography*, CEC). Najpowszechniej wykorzystywana jest jednak wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych (ang. *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP HPLC), jonywymienna (ang. *Ion Exchange Chromatography*, IEC), oddziałująca hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) oraz par jonowych (ang. *Ion Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, IP RP HPLC).

Chromatografia cieczowa pozwala na precyzyjną i szybką analizę nukleozydów. W porównaniu z GC charakteryzuje ją szybkość i prostota przygotowania próbki,

zwłaszcza w kontekście derywatyzacji [23]. Odpowiedni dobór fazy stacjonarnej i ruchomej powoduje, że HPLC stanowi doskonały układ do rutynowych oznaczeń jakościowych i ilościowych [24]. Dokonując zmiany siły elucyjnej, pH fazy ruchomej oraz temperatury kolumny możliwe jest selektywne rozdzielenie zmodyfikowanych nukleozydów w stosunkowo krótkim czasie [23, 24].

Pierwszą próbę oznaczenia potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w moczu za pomocą RP HPLC podjął w 1975 r. Gehrke i współpr. [25]. Z powodzeniem zidentyfikowali oni nukleozydy w próbkach moczu osób zdrowych i chorych na raka.

W swoich badaniach Seidel, Liebich i in. [26, 27] wykorzystali RP HPLC do oznaczenia zmodyfikowanych nukleozydów jako markerów chorób nowotworowych w moczu kilkudziesięciu osób. Udowodniono, iż w przypadku próbek pobranych od osób chorujących na nowotwór stężenie zmodyfikowanych nukleozydów jest podwyższone w porównaniu do ich stężenia w moczu osób zdrowych [26, 27].

Stężenie nukleozydów w moczu jest zależne od zmian fizjologicznych zachodzących w organizmie. W celu wyeliminowania substancji przeszkadzających znajdujących się w próbkach moczu, podczas analizy chromatograficznej stosowana może być dwuwymiarowa chromatografia cieczowa [28]. Próbka moczu jest wstrzykiwana bezpośrednio do pierwszej kolumny (pre-kolumny) i przepłukiwana eluentem o wyższym pH (5 mM roztwór octanu amonu o pH = 7,5). Podczas tego procesu składniki przeszkadzające zostają usunięte z próbki, ponieważ wyższe pH zwiększa oddziaływanie polarnych analitów z wypełnieniem kolumny chromatograficznej. Pozostałe składniki próbki są wymywane z pierwszej kolumny eluentem o niższym pH (np. mieszaniną 5 mM roztwór octanu amonu pH = 4,5 i metanolu) do kolumny analyticalcznej, w której zachodzi właściwa analiza próbki moczu. Dzięki zastosowaniu takiego rozwiązania, które jest proste i szybkie, zbędne jest zatężanie i oczyszczanie próbki [28].

Oznaczanie ilościowe i jakościowe zmodyfikowanych nukleozydów w próbkach biologicznych, takich jak mocz i osocze, jest najczęściej wykonywane przy użyciu RP-HPLC z detekcją UV [29]. W przypadku analiz próbek złożonych ta metoda detekcji okazuje się niewystarczająca, zwłaszcza do analizy jakościowej podczas np. koelucji kilku nukleozydów. Sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS) pozwala na kompleksową analizę złożonej matrycy biologicznej [29]. Ten sposób detekcji zapewnia uzyskanie informacji na temat mas cząsteczkowych poszczególnych składników, co nie jest możliwe przy użyciu detekcji UV. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja kolejnych modyfikacji nukleozydów [29].

Metody te cechuje dobra rozdzielcość względem analizowanych związków, która jest jednak niższa w porównaniu do wyników uzyskiwanych przy użyciu ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).

Zhao i in. [30] oznaczyli nukleozydy za pomocą HPLC oraz UHPLC w układzie faz odwróconych. Jako detekcję stosowano spektrometrię mas. Analizy prowadzono w takich samych warunkach (poza kolumną chromatograficzną), co umożliwiło porównanie obu metod. W rezultacie zastosowanie UHPLC doprowadziło do rozdzielenia 92 nukleozydów, w przeciwieństwie do 70 związków rozdzielonych za pomocą konwencjonalnej chromatografii cieczowej. UHPLC umożliwiła wykrycie 11000 związków, zaś HPLC – tylko 8000. Stosowanie pierwszej z technik w analizie zmodyfikowanych nukleozydów cechuje wyższa sprawność, czułość oraz trzykrotnie krótszy czas analizy [30].

UHPLC MS stosowano także w analizie 8-oksoguanozyny i 8-okso-2'-deoksyguanozyny w próbkach moczu [31]. Związki te odgrywają kluczową rolę w oksydacyjnych uszkodzeniach DNA. Zastosowanie UHPLC pozwoliło na opracowanie szybkiej i precyzyjnej metody o granicy wykrywalności równej 1 nM. Zastosowanie elucji gradientowej pozwoliło na rozdzielenie i oznaczenie kilkunastu nukleozydów w czasie poniżej 10 minut w układzie faz odwróconych przy zastosowaniu fazy ruchomej, w skład której wchodził bufor fosforanowy [31].

Technika IP RP HPLC również umożliwia badanie próbek pobranych z dolnych dróg moczowych w celu oceny zmian stężenia nukleotydów i nukleozydów [32]. Faza ruchoma w układzie IP RP HPLC wzbogacona jest w odczynnik do tworzenia par jonowych. Mechanizm retencji jest wówczas złożony: odczynnik do tworzenia pary jonowej oddziałuje zarówno ze składnikami badanej próbki (dzięki temu mają one większe powinowactwo do hydrofobowej fazy stacjonarnej), jak również ulega dynamicznej adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej [33]. Anality są wówczas zatrzymywane na dynamicznie zmodyfikowanej powierzchni wypełnienia kolumny.

Guanozyna i adenozyna mają bardzo polarny charakter, przez co są zatrzymywane na powierzchni niepolarnych faz stacjonarnych w niewielkim stopniu lub w ogóle. Z tego względu w skład fazy ruchomej wchodzą bufory o pH ok. 6. Dzięki temu nukleozydy nie posiadają ładunku, co skutkuje zwiększeniem ich retencji. Jednakże dochodzi do niekorzystnego oddziaływanego między analizowanymi nukleozydami, a resztkowymi silanolami, co prowadzi do pogorszenia symetrii pików. Dodatek do fazy ruchomej odczynnika tworzącego pary jonowe np. wodorosiarczanu tetrabutyloamonowego powoduje redukcję tego efektu. Podczas jednej analizy w układzie IP RP HPLC trwającej 20 minut można rozdzielić, zidentyfikować i oznaczyć stężenia 12 związków (nukleozydów, mono-, di-, i trifosforanów nukleozydów). Udowodniono, że czasy retencji nukleozydów ulegają redukcji po zastosowaniu m.in. trietyloaminy TEA jako dodatku do fazy ruchomej w stosunku do wykorzystywanej wcześniej identycznej fazy ruchomej bez TEA. Spowodowane jest to adsorcją odczynnika do tworzenia par jonowych na powierzchni fazy stacjonarnej, co zmienia jej właściwości [34].

Zmodyfikowane potranskrypcyjnie nukleozydy są rozdzielane i oznaczane także za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofilowych [35]. Wykorzystywane są kolumny wypełnione polarnymi fazami stacjonarnymi, jak np. polihydroksyetyloaspartamidem. Fazę ruchomą stanowią zazwyczaj mieszaniny octanu lub mrów-

czanu amonu oraz acetonitrylu. Wykorzystanie HILIC pozwala na pełne rozdzielenie mieszanin nukleozydów i ich oznaczenie w próbkach moczu, jednakże metoda ta ma swoje ograniczenia: może być stosowana tylko do oznaczania nukleozydów, które są bardzo dobrze rozpuszczalne w acetonitrylu, a czas niezbędny do rozdzielenia mieszanin wieloskładnikowych jest zazwyczaj dłuższy niż w przypadku RP HPLC [35].

## 2. ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ DO OZNACZANIA NUKLEOTYDÓW

Nukleotydy analizowane są z wykorzystaniem trzech różnych typów chromatografii cieczowej: normalnego układu faz (ang. *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*, NP HPLC), RP HPLC, IEC oraz IP RP HPLC.

Zastosowanie NP-HPLC pozwala na rozdzielenie nukleotydów z wykorzystaniem fazy stacjonarnej m.in. na bazie żelu krzemionkowego. Mogą to być m.in. grupy wodorkowe, cząsteczki kwasu undecylenowego, grupy cyjanopropylowe, aminopropylowe [36, 37]. O uzyskaniu pełnego rozdzielenia analizowanych nukleotydów decyduje odpowiedni dobór fazy ruchomej, która odgrywa w tym przypadku zasadnicze znaczenie, zwłaszcza w kwestii odpowiedniego pH i siły jonowej. Wykorzystanie układu NP HPLC umożliwia uzyskanie powtarzalnych wyników, choć czasy analiz są zazwyczaj długie [37].

W przypadku odwróconego układu faz składnikami fazy ruchomej są także bufory o odpowiednim stężeniu i pH. Najpowszechniej stosowanymi wypełnieniami kolumn chromatograficznych są oktadecylowe fazy stacjonarne, choć wykorzystywane są także niekonwencjonalne kolumny [38]. Dzięki właściwie dobranym parametrom fazy ruchomej, nukleotydy tracą swój ładunek elektryczny, wskutek czego oddziałują z niepolarną fazą związaną. Dla monofosforanów nukleotydów uzyskiwane są wyższe wartości współczynników retencji w porównaniu do di- lub trifosforanów. Jest to efekt dominujących oddziaływań hydrofobowych między analitem, a fazą stacjonarną w RP HPLC. Jednocześnie oddziaływanie puryn z powierzchnią wypełnienia kolumny jest bardziej efektywne w porównaniu do pirymidyn [38].

RP HPLC stosowana jest do rozdzielania i oznaczania 5'-monofosforanów nukleozydów w suplementach diety, mleku zmodyfikowanym dla niemowląt, płynie mózgowo-rdzeniowym, ekstraktach z ziół, itp. [14, 17, 39, 40]. Fazę ruchomą stanowi mieszanina acetonitrylu lub metanolu z odpowiednim buforem. W przypadku detekcji UV-Vis stosowany jest zazwyczaj bufor fosforanowy, natomiast sprzężenie RP HPLC z detekcją MS wymaga wykorzystania mrówczanu lub octanu amonu ze względu na ich lotność. Im niższe pH buforu, tym nukleotydy posiadają niższy ładunek, wówczas ich retencja jest mniejsza. Z tego względu warunki analizy są dobrane tak, aby pH mieściło się w granicach 5–6, w którym analizowane związki mają ładunek obojętny i efektywniej oddziałują z niepolarną fazą stacjonarną. Wraz ze wzrastającą siłą jonową soli, wchodzącej w skład fazy ruchomej analizowane związki

są szybciej wymywane z kolumny. Temperatura kolumny ma wpływ zarówno na wartości współczynników retencji, jak i na rozdzielczość: wraz z jej wzrostem obydwa parametry ulegają zmniejszeniu [15, 41]. Stosowanie odwróconego układu faz umożliwia opracowanie metod cechujących się wysoką czułością, rozdzielczością i odtwarzalnością [15, 17, 41]. Obecnie jednak większe znaczenie w oznaczaniu nukleotydów ma chromatografia par jonowych, niż RP HPLC.

Dzięki zastosowaniu IP RP HPLC osiągane są niższe wartości współczynników retencji i wyższa rozdzielczość mieszanin nukleotydów w porównaniu do RP HPLC. Użycie jonów magnezu jako przeciwionów w fazie ruchomej umożliwia rozdzielenie piętnastu nukleotydów w ekstraktach z linii komórkowych [42]. Możliwa jest także separacja nukleotydów oraz kompleksów nukleotyd – cukier w czasie trwania jednej analizy, z zachowaniem wysokiej czułości i odtwarzalności w analogicznej matrycy [43].

Wykorzystanie sprzężenia IP RP HPLC z detekcją MS pozwala na czującą analizę nukleotydów, przy czym należy stosować lotne odczynniki do tworzenia par jonowych, np. di- lub trialkiloaminy [44]. Dzięki IP RP HPLC można analizować nukleotydy z dobrą selektywnością, rozdzielczością i sprawnością. Zaletą tej metody, w porównaniu do odwróconego układu faz, jest możliwość łatwego rozdzielenia nukleotydów z wykorzystaniem hydrofobowych faz stacjonarnych [45]. Technika ta jest często stosowana do oznaczania nukleotydów w produktach nabiałowych [46], dietetycznych [47], alkoholach [48], krwi, komórkach ziarnistych mózgówka [49], a także w komórkach białaczkowych [50].

W analizie omawianej grupy związków wykorzystywana jest także chromatografia jonowymienna, ze względu na ładunek obecny w strukturze tych związków. Rozdzielane i oznaczane są zarówno rybonukleotydy, jak i deoksyrybonukleotydy. Wykorzystanie odpowiednich kolumn anionowymiennych umożliwia separację wspomnianych związków w czasie krótszym niż 20 minut [51]. Eluentami są zazwyczaj sole nieorganiczne, jak np. mieszanina wodorotlenku sodu z fosforanem sodu, fosforan potasu, chloran (VII) sodu oraz mieszaniny wodorotlenku sodu z octanem sodu, itp. Zmiana udziału procentowego poszczególnych składników fazy ruchomej, stężenia soli lub jej pH, wpływa na jonizację i retencję nukleotydów. Przykładem zmian selektywności pod wpływem zmian dokonywanych w pH fazy ruchomej jest stosowanie buforu fosforanowego ( $\text{pH}=2,8$ ), w przypadku którego dwa monofosforany spośród czterech analizowanych nukleotydów (CMP, AMP, UMP, GMP) występują w formie sprotobowanej. Z tego względu ich współczynniki retencji są mniejsze, a rozdzielenie 4 składników próbki jest pełne [51].

Rozdzielenie nukleotydów prowadzi się przy użyciu polimerowych faz stacjonarnych, zmodyfikowanych grupami anionowymiennymi (drugo- lub trzeciorzędowe aminy) lub też wypełnień spreparowanych na bazie żelu krzemionkowego [51, 52]. Do głównych zalet IC należą: szeroki zakres stosowalności, selektywność, powtarzalność (<2%), jednakże zasadniczą wadą jest ograniczona możliwość wykorzystania detekcji MS [51, 52].

### 3. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA OLIGONUKLEOTYDÓW SYNTETYCZNYCH

Ze względu na terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów, a zwłaszcza ich zmodyfikowanych pochodnych niezbędne są metody ich oznaczania. W tym celu wykorzystywana jest chromatografia cieczowa: w układzie faz odwróconych, jonowymieniąca, par jonowych oraz oddziałująca hydrofilowych.

IEC jest odpowiednią techniką do analizy wielokrotnie zjonizowanych oligonukleotydów, a w szczególności do ich oczyszczania oraz badań nad modyfikacjami i kinetyką. W ten sposób uzyskuje się rozdzielenie na podstawie różnic w długościach badanych związków, co związane jest z liczbą naładowanych grup fosforanowych [7]. W przypadku analizy oligonukleotydów za pomocą chromatografii jonowej mechanizm retencji opiera się na wymianie anionów. Typowy skład faz ruchomych stosowanych w analizie oligonukleotydów zawiera chlorek i nadchloran sodu w buforze Tris lub bufory fosforanowe o pH oraz sile elucji zależnej od rodzaju badanej próbki i fazy stacjonarnej [2]. Zdolność wymiany jonowej w oddzielaniu oligonukleotydów od innych polarnych cząstek, wchodzących w skład analizowanych próbek (np. pochodzenia biologicznego), oraz wysoka tolerancja dla soli, powoduje że IEC pełni ważną rolę w badaniach nad modyfikacjami, oczyszczaniem i badaniem kinetyki oligonukleotydów [2].

Najczęściej wykorzystywane fazy stacjonarne syntezowane są na bazie nośników polimerowych. Synteza tego typu wypełnień polega głównie na rodnikowej kopolimeryzacji metakrylanu glicydu i dimetakrylanu etylenu lub diwinylobenzenu. Grupy epoksydowe modyfikowane są dietyloaminą [53]. Wypełnienia te są z powodzeniem stosowane do rozdzielenia mieszanin homooligonukleotydów o różnej ilości nukleotydów w sekwencji. Cechuje je wysoka stabilność, a także uzyskiwanie czasów analiz w zakresie od 10–20 minut dla 15-sto składnikowych mieszanin [53].

Wykorzystanie silnych anionowymieniaczy w analizie oligonukleotydów daje możliwość kontroli ich struktury drugorzędowej [54]. Wypełnienia na bazie metakrylanu w znacznym stopniu wpływają na zminimalizowanie oddziaływań hydrofobowych oligonukleotydu z powierzchnią fazy stacjonarnej. Retencja tej grupy związków zależy jednak także od pH i składu fazy ruchomej. Wykazano, że wzrost wartości pH eluentu powoduje wzrost wartości współczynników retencji, zwłaszcza w zakresie pH od 9 do 11. Dochodzi wówczas do jonizacji tautomerycznego atomu tlenu w strukturze guaniny i timidyny [55].

Użyteczną alternatywą dla chromatografii jonowymienianej stanowi IP RP HPLC. W tym przypadku różnice w wartościach współczynników retencji oligonukleotydów są konsekwencją różnej sekwencji, tzn. różnego udziału zasad azotowych w poszczególnych związkach. Jest to związane z odmienną hydrofobowością puryn i pirymidyn. Utrata adeniny lub tyminy, związków bardziej hydrofobowych, skutkuje niższymi wartościami współczynnika retencji, niż utrata cytozyny lub guaniny [56]. W analizie oligonukleotydów stosowane są głównie następujące czynniki do

tworzenia par jonowych: octan trietyloaminy (TEAA), octan heksyloaminy (HAA), octan diizopropyloaminy, 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2- propanol (HFIP) w mieszaninie z trietyloaminą, dimetylobutyloamina czy też heksyloamina, a także inne lotne aminy [2]. Dużą rolę przy doborze warunków do procesu rozdzielenia, pełni rodzaj i stężenie odczynnika do tworzenia par jonowych. Im wyższe stężenie, tym wyższa retencja. Stężenie to powinno być jednocześnie na tyle niskie, aby odczynnik ten nie tłumił sygnałów z MS. Najczęściej stosowaną fazą stacjonarną jest wypełnienie na bazie żelu krzemionkowego modyfikowane grupami oktadecylowymi oraz kopolimery styrenu i diwinylbenzenu (w postaci cienkiego filmu lub monolitów) [2]. Sorbent wykorzystywany do syntezy fazy stacjonarnej powinien być nieporowaty, powierzchniowo porowy lub o małej średnicy ziaren. Jest to związane z wolną dyfuzją wielkoząsteczkowych oligonukleotydów do wnętrza porów, która przyczynia się do poszerzenia pików [57].

W pierwszych próbach rozdzielania kwasów nukleinowych i ich pochodnych wykorzystywano dodatek TEAA [2]. Wyniki tych analiz wykazywały dobrą efektywność procesu rozdzielania, pomimo wysokiego stężenia TEAA sięgającego 100 mM. Najpopularniejszą obecnie fazą ruchomą stosowaną w rozdzielaniu oligonukleotydów za pomocą IP RP HPLC są mieszaniny HFIP z lotnymi aminami i metanolem [2]. Dodatek HFIP powoduje obniżenie rozpuszczalności amin w fazie ruchomej, co w konsekwencji zwiększa efektywność ich adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej [2]. Tym samym retencja oligonukleotydów jest wyższa w porównaniu do faz ruchomych, w skład których wchodzą octany amin [2].

Badano wpływ różnych odczynników do tworzenia par jonowych na retencję oligonukleotydów [58]. Wykazano, że octany amin (np. octan heksyloaminy) powodują uzyskanie wyższej rozdzielczości mieszanin hetero- i homooligonukleoptydów w porównaniu do mieszanin HFIP i odpowiednich amin. Przeciwny efekt obserwowany jest w kontekście czułości oznaczeń za pomocą IP RP HPLC MS. W tym wypadku fazy ruchome, w skład których wchodzi HFIP umożliwiają uzyskanie niższych wartości granic wykrywalności i oznaczalności [58].

Liu i in. [59] zastosowali IP RP HPLC sprzężoną z MS w analizie zanieczyszczeń syntetycznego 13-merowego oligonukleotydu tiofosforanowego, którego końce 3' i 5' zostały zmodyfikowane grupami lipofilowymi. Testowano wpływ typu wypełnienia kolumny chromatograficznej (butylowe, oktylowe, oktadecylowe), odczynników do tworzenia par jonowych (TEAA, HFIP/TEA, octan dietyloaminy) i temperatury na retencję oligonukleotydów. Najwyższą sprawność rozdzielenia uzyskano w przypadku fazy stacjonarnej modyfikowanej grupami butylowymi, co miało związek z modyfikacją oligonukleotydów grupami hydrofobowymi. Zastosowanie mieszaniny TEA/HFIP pozwoliło na uzyskanie pełnego rozdzielenia oligonukleotydów od jego zanieczyszczeń. Metoda ta okazała się skuteczniejszą techniką analizy oligonukleotydów i ich zanieczyszczeń niż chromatografia jonowymienna [59].

W analizie oligonukleotydów coraz popularniejszą techniką staje się UHPLC, przy czym badania wykonywane są w trybie IP RP UHPLC [60]. Metoda ta była stosowana m.in. do analizy 20-merowego 2'-O-metylo-fosforotorianu, który zawierał

3% zanieczyszczeń. Uzyskano skrócenie czasu do 6 minut (20 minut dla HPLC) oraz zmniejszenie zużycia rozpuszczalników ze względu na różnice w prędkości przepływu (z 0,75 ml/min do 0,2 ml/min). Jednocześnie tylko dla UHPLC możliwe było pełne oddzielenie związku macierzystego od jego zanieczyszczeń [60].

Polarny charakter oligonukleotydów umożliwia ich analizę za pomocą układu HILIC. Alpert i in. [61] jako pierwszy wykorzystał ten układ faz w badaniu fragmentów kwasów nukleinowych. Podjął próbę rozdzielenia mieszaniny oligomerów tymidynowych o różnej długości sekwencji. Fazą stacjonarną był żel krzemionkowy modyfikowany poli(2-hydroksyetyloaspartamidem), podczas gdy fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i fosforanu trietyloaminy. Retencja oligonukleotydów zwiększała się wraz z rosnącą ilością nukleotydów w sekwencji, przy czym dla homooligonukleotydów adeninowych uzyskiwano trzykrotnie wyższe wartości współczynnika retencji niż dla homooligonukleotydów tymidynowych, co jest związane z różnicami polarności. Wykazano także, że retencja w przypadku HILIC jest zależna od siły jonowej stosowanego eluentu [61].

Z tego względu testowano wpływ rodzaju buforu wchodzącego w skład fazy ruchomej na wyniki analiz oligonukleotydów w układzie HILIC. Wyniki prowadzonych badań dowiodły, że użycie roztworów soli poprawia rozdzielenie tych związków, dzięki zwiększeniu symetrii pików [62]. Porównano trzy lotne bufory stosowane w badaniu oligonukleotydów za pomocą układu HILIC i detekcji MS. Były to 100 mM mrówczan amonu (pH 3,5), 100 mM octan amonu (pH 5,8) oraz 100 mM wodorowęglan amonu (pH 7,6). Zastosowanie octanu amonu pozwoliło na uzyskanie symetrycznych pików w porównaniu z wodorowęglanem amonu. Wykorzystanie faz ruchomych, w skład których wchodził mrówczan amonu prowadziło z kolei do uzyskiwania dużych wartości współczynników retencji w przeciwieństwie do pozostałych dwóch soli. Mimo to, najlepsze wyniki rozdzielania mieszanin oligonukleotydów uzyskiwano w przypadku octanu amonu o stężeniu 10 mM [62].

Dokonywano także prób rozdzielenia heterooligonukleotydów oraz ich zanieczyszczeń, różniących się typem zasady azotowej w danej pozycji sekwencji. Zastosowanie układu HILIC pozwoliło na rozdzielenie związku bazowego od oligonukleotydu z dodatkową zasadą: C lub G na końcu 3'. Nie uzyskano natomiast rozdzielenia oligonukleotydów, w których sekwencji w miejsce końcowych nukleotydów C lub G wprowadzone zostały mniej hydrofilowe A lub T. Prawdopodobnie można tego dokonać przez zwiększenie temperatury kolumny, co wykazał Oefner. Wykazano, iż oligonukleotydy zawierające zróżnicowany udział procentowy A, T, C i G w sekwencji z różną siłą oddziałującą z powierzchnią polarnych faz stacjonarnych, ze względu na różnice hydrofilowości zasad azotowych [62].

Easter i in. [63] jako pierwsi zastosowali HILIC sprzężoną ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) w analizie homooligonukleotydów. Jako fazy ruchome testowano ponownie mieszaniny acetonitrylu z mrówczanem lub octanem amonu lub propionianem sodu. Zastosowanie mrówczanu amonu nie umożliwiał uzy-

skania pełnego rozdzielenia związków, natomiast dla pozostałych dwóch buforów były one porównywalne. Do badań wykorzystano ponownie roztwór octanu amonu o pH 5,8. Analiza oligonukleotydów za pomocą ICP-MS umożliwia czułą detekcję fosforu obecnego w wiązaniach fosfodiestrowych oligonukleotydów. Z tego względu wraz ze wzrostem ilości nukleotydów, budujących dany oligonukleotyd wartości granic oznaczalności małe. Granice wykrywalności odpowiadały natomiast kilku nanogramom w próbce [63].

Poza jonizacją w plazmie wykorzystywana jest także jonizacja za pomocą elektrorozpraszania, którą także zastosowano w analizie oligonukleotydów tiofosforanowych w układzie HILIC. Testowano dwie komercyjnie dostępne kolumny na bazie żelu krzemionkowego, których powierzchnia pokryta była grupami amidowymi lub diolowymi. Analizy prowadzono z wykorzystaniem fazy ruchomej w skład której wchodził acetonitryl oraz octan amonu. Metoda pozwoliła na rozdzielenie badanych związków, a także na ich czułą analizę (50 nM). Obserwowano jednak tworzenie się adduktów sodowych i z tego względu stosowano tryb monitorowania wybranych jonów. Sprzężenie HILIC-MS znajduje zastosowanie do zweryfikowania obecności tych związków w małej jedności próbki z dużą czułością [64].

Możliwości analityczne układu HILIC i IP RP HPLC w analizie oligonukleotydów wykorzystał w swoich badaniach Li i współpr. [65]. Zastosowali oni dwuwymiarową chromatografię cieczową, przy czym w pierwszym wymiarze wykorzystano HILIC, a w drugim IP RP HPLC. Badano wpływ modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, pH, siły jonowej na retencję 27 homooligonukleotydów o sekwenacji zbudowanej z od 2 do 10 nukleotydów. W wyniku analizy udało się rozdzielić wszystkie składniki próbek z selektywnością wyższą niż w przypadku stosowania tylko jednego z tych układów chromatografii cieczowej [65].

Analiza oligonukleotydów ma szczególne znaczenie, jeśli analizowane są związki zmodyfikowane. Modyfikacje te dokonywane są zarówno w obrębie grupy fosforanowej, cząsteczek cukrów lub samych zasad pirymidynowych lub purynowych. Zmiany strukturalne syntetycznych oligonukleotydów mają na celu zwiększenie ich hydrofobowości i odporności na działanie enzymów. Z tego powodu znajdują one zastosowanie w terapii genowej lub antysensownej. Testowanie tego typu związków jako potencjalnych leków niesie ze sobą konieczność badania m.in. produktów ich metabolizmu.

Rozdzielenie chemicznie zmodyfikowanych oligonukleotydów od ich metabolitów, w warunkach *in vitro*, możliwe jest dzięki zastosowaniu IP RP HPLC sprzążonego z detekcją MS. Przeprowadzono m.in. inkubację 21-nukleotydowego oligonukleotydu w roztworze 3'-egzonukleazy, po czym rozdzielano i oznaczano jakościowo i ilościowo uzyskane metabolity. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 400 mM HFIP/16,3 mM TEA o pH = 7,9 oraz metanolu. Fazą stacjonarną był żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C18) [57]. Udowodniono, iż detekcja UV jest bardziej czuła i odpowiednia do ilościowej analizy metabolitów o krótszych sekwencjach, w przeciwieństwie do oligonukleotydów zbudowanych

z wielu monomerów nukleotydowych. W przypadku tych cząsteczek wyższą czułość uzyskiwano dla detekcji MS. Jest to konsekwencja wpływu czynnika do tworzenia par jonowych oraz jego stężenia na proces jonizacji [57].

Wykorzystanie IP RP HPLC oraz tandemowej spektrometrii mas (ang. *Tandem Mass Spectrometry, MS/MS*) z jonizacją przez elektrorozpraszczenie umożliwiło identyfikację metabolitów syntetycznych, zmodyfikowanych oligonukleotydów w warunkach *in vivo* [66]. Fazę ruchomą stanowił HFIP o stężeniu 400 mM i taka ilość TEA, aby pH wyniosło 7,0. Analizę jakościową przeprowadzono za pomocą MS/MS. Jony macierzyste wybrano na podstawie intensywności sygnałów, natomiast spośród 13 jonów fragmentacyjnych, 8 przypisano do końca 3', a 5 do końca 5' oligonukleotydu. Potwierdziło to udział 5'-endonukleazy w procesie biotransformacji, chociaż jej aktywność jest mniejsza niż egzonukleazy [66].

Dai i in. [67] wykorzystali IP RP HPLC MS/MS do analiz osocza osób, którym podawano lek na bazie oligonukleotydu G3139. Jako fazę ruchomą wykorzystano standardowo mieszaninę HFIP/TEA oraz metanolu, a fazę stacjonarną było konwencjonalne wypełnienie oktadecylowe. Metabolit M1 powstał w wyniku usunięcia nukleotydu tymidynowego, który znajduje się zarówno na końcu 3', jak i 5' sekwencji oligonukleotydu. Wykorzystanie MS/MS pozwoliło na potwierdzenie, że hydroliza wiązania fosfodiestrowego zaszła od końca 3'. Informacje na temat zasad, z których zbudowane są poszczególne metabolity, uzyskano na podstawie mas cząsteczkowych, które wyznaczono po zastosowaniu dekonwolucji. Charakterystyka metabolitów była możliwa, dzięki bardzo dokładnym pomiarom ( $\pm 0,009\%$ ) masy cząsteczkowej [67].

W trakcie badań nad metabolizmem (*in vitro* i *in vivo*) oligonukleotydów zmodyfikowanych wykorzystano szereg próbek biologicznych, w tym roztwory egzonukleaz, osocze, moczu, homogenat mysiej wątroby/nerki oraz mikrosomy wyekstrahowane z ludzkiej wątroby [56, 67]. Analizy chromatograficzne próbek z powodzeniem prowadzono z wykorzystaniem IP RP HPLC MS/MS oraz wcześniej stosowanymi fazami ruchomymi i stacjonarnymi. We wszystkich wymienionych matrycach wykryto związki krótsze o N-nukleotydów poczynając od końca 3' sekwencji. Uzyskane wyniki dowodzą, iż rozkład enzymatyczny w obu matrycach zachodzi według takiego samego schematu. Świadczy to m.in. o tym, że mikrosomy, wykazujące aktywność enzymatyczną, mogą być użyteczne w badaniu metabolizmu oligonukleotydów antysensownych, w odniesieniu do organizmu człowieka [56, 67].

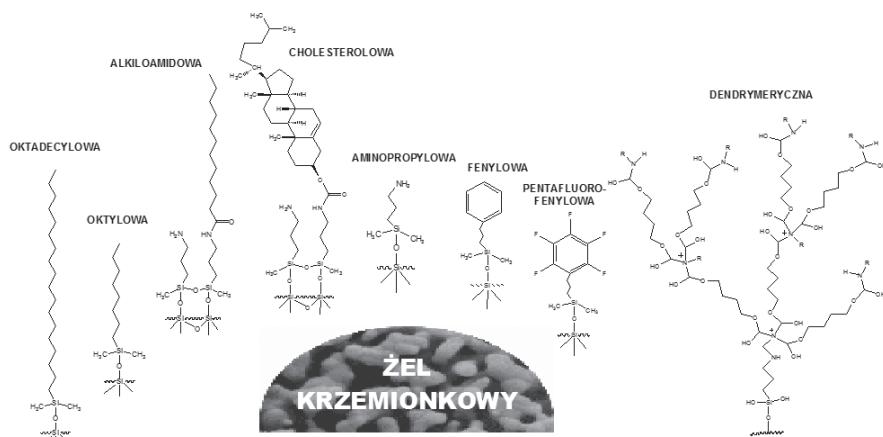
#### 4. NOWE KIERUNKI BADAŃ CHROMATOGRAFICZYCH ZWIĄZEK BUDUJĄCYCH KWASY NUKLEINOWE

Możliwość monitorowania zmian chorobowych, zachodzących w organizmie poprzez oznaczenie nukleozydów, jak również terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów powoduje, iż niezbędne staje się ich oznaczanie w różnego typu matrycach. Prowadzi to do poszukiwania nowych metod analizy lub udoskonalania metod

już istniejących. Zastosowanie chromatografii cieczowej umożliwia dobór warunków analiz w szerokim zakresie różnego typu parametrów, takich jak np. faza stacjonarna, czy ruchoma. Nukleozydy, nukleotydy oraz oligonukleotydy analizowane są jednak głównie z wykorzystaniem oktadecylowego wypełnienia kolumny chromatograficznej. W wielu przypadkach nie umożliwia ono uzyskania wystarczającego rozdzielenia wszystkich związków w mieszaninie lub też krótkiego czas analizy. To wypełnienie kolumny chromatograficznej zazwyczaj nie jest odpowiednie do analiz małych, polarnych cząsteczek (nukleozydy lub niektóre nukleotydy), ponieważ są one często wymywane blisko objętości martwej układu. Stosowanym dotychczas rozwiązań jest wykorzystanie kolumn o długości 250 mm, co prowadzi jednak do długiego czasu analizy. Długie czasy analiz uzyskiwane są także w przypadku chromatograficznego rozdzielania mieszanin oligonukleotydów, zwłaszcza w przypadku związków o niewielkich różnicach w sekwencji (np. zamiana jednej zasady w danej pozycji sekwencji).

Istnieją zatem problemy w analizie chromatograficznej związków budujących kwasy nukleinowe, spowodowane przez niekorzystne oddziaływanie analitów z najpopularniejszymi fazami stacjonarnymi. Z tego względu jednym z nowych kierunków badań nad nukleozydami, nukleotydami i oligonukleotydami jest próba wykorzystania innego typu faz stacjonarnych zawierających różne, chemicznie związane do powierzchni nośnika, grupy funkcyjne. U podstaw tych badań leży koncepcja udoskonalenia istniejących już rozwiązań analitycznych, które umożliwiają uzyskanie lepszych wyników w stosunku do prezentowanych dotychczas w literaturze.

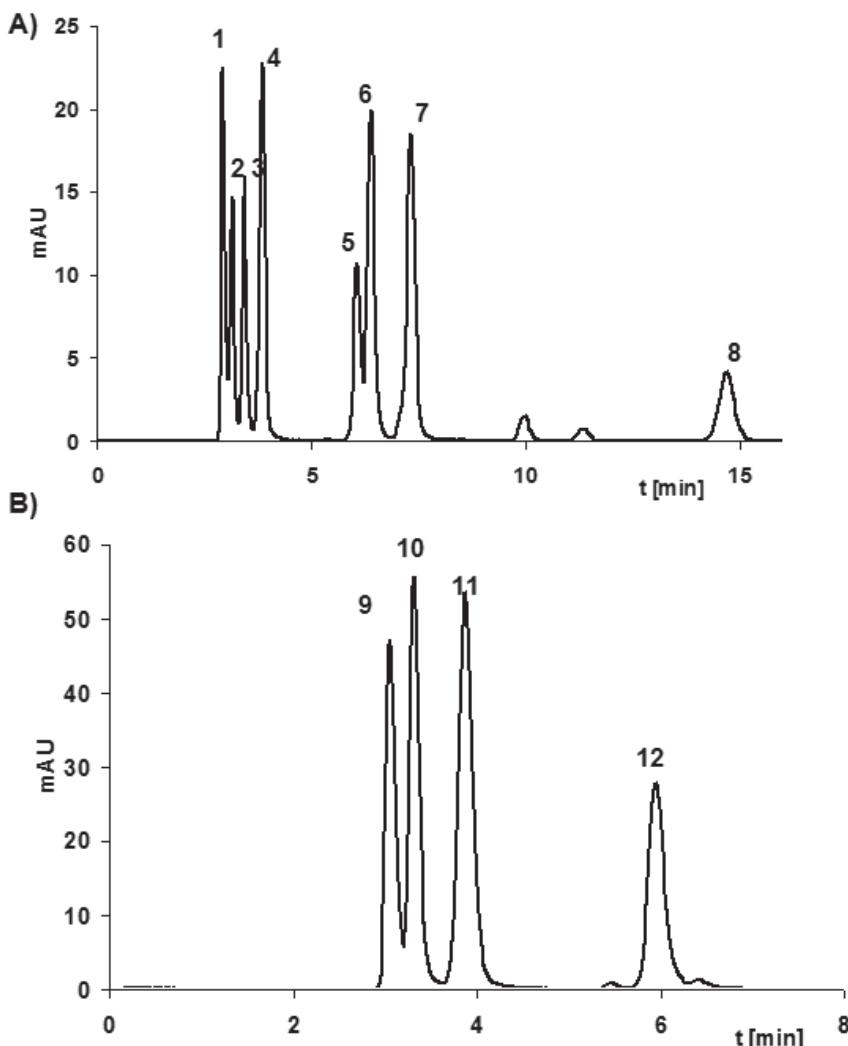
W ciągu ostatnich 5 lat prowadzono badania nad wykorzystywaniem różnego typu wypełnień kolumn chromatograficznych, w przypadku których do nośnika krzemionkowego związano na drodze chemicznej modyfikacji różne grupy funkcyjne. Były to fazy stacjonarne aminopropylowe, alkiloamidowe, cholesterolowe, N,O-dialkilofosforoamidowe, fenylowe, pentafluorofenylowe czy też wypełnienia o strukturze dendrymerycznej, zawierające centra anionowymienne [68–71]. Ich schematyczne struktury zostały przedstawione na Rysunku 2. Kolumny tego typu nie były nigdy wcześniej wykorzystywane w analizie tych biocząsteczek. Prowadzono systematyczne badania, mające na celu dobór warunków analiz chromatograficznych do rozdzielania nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów. W tym celu dokonywano zmian w obrębie fazy ruchomej: typu rozpuszczalnika organicznego, buforu, jego stężenia i pH. Stosowano odwrócony układ faz, chromatografię oddziaływań hydrofilowych, par jonowych oraz chromatografię jonową. Warte podkreślenia jest wykazanie, iż odczyn buforu wchodzącego w skład fazy ruchomej jest w przypadku niekonwencjonalnych faz stacjonarnych istotnym parametrem, umożliwiającym sterowanie rozdzielczością, co jest niezwykle ważne w rutynowych analizach chromatograficznych związków budujących kwasy nukleinowe [68–71].



Rysunek 2. Schematyczne struktury faz stacjonarnych, stosowanych w analizie nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów

Figure 2. Schematic structures of stationary phases applied in the analysis of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides

Wykorzystanie alkiloamidowej fazy stacjonarnej umożliwiło rozdzielenie polarnych, małocząsteczkowych nukleozydów (cytozyna, urydyna), co nie było możliwe w przypadku wypełnienia oktadecylowego [69]. Jednocześnie czas analizy był krótszy. Natomiast zastosowanie cholesterolowej fazy stacjonarnej pozwala na uzyskanie analogicznych czasów retencji, jak w przypadku kolumny z wypełnieniem oktadecylowym. Selektyność tego wypełnienia kolumny była wyższa dla najbardziej polarnych nukleozydów i nukleotydów (cytozyna, urydyna, urydyno-5'-monofosforan, cytydyno-5'-monofosforan) w porównaniu do konwencjonalnej kolumny oktadecylowej (Rys. 3) [68]. Zastosowanie fenylowego wypełnienia kolumny chromatograficznej prowadziło do uzyskania krótszych czasów analiz w stosunku do oktadecylowej fazy stacjonarnej, jednakże rozdzielenie niepolarnych, małocząsteczkowych składowych kwasów nukleinowych nie było możliwe [70]. Analogiczne tendencje zaobserwowano podczas prób rozdzielania mieszanin oligonukleotydów, w przypadku których czasy analiz były krótsze dla alkiloamidowej i cholesterolowej fazy stacjonarnej. Ich wykorzystanie umożliwiało rozdzielenie oligonukleotydów z dobrą selektynością w warunkach elucji izokratycznej. W ten sposób wykazano, że stosowanie tych typów wypełnień kolumn chromatograficznych jest dobrą alternatywą w chromatograficznej analizie związków budujących kwasy nukleinowe w stosunku do powszechnie stosowanej oktadecylowej [68–70]. Poza hydrofobowo-hydrofilowymi fazami stacjonarnymi, stosowano także po raz pierwszy wypełnienia dendrymeryczne do chromatografii jonowej. Uzyskano wzrost selektyności i sprawności rozdzielania oraz krótsze czasy rozdzielania nukleotydów w stosunku do danych prezentowanych w literaturze [71].

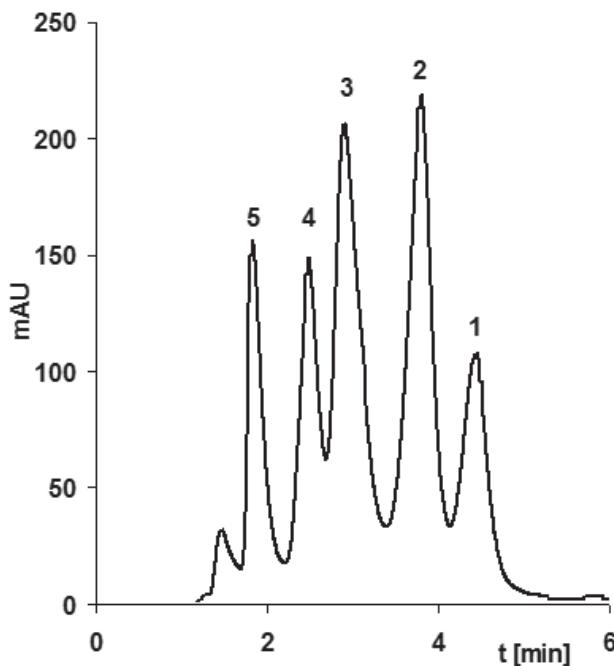


Rysunek 3. Chromatogramy rozdzielania nukleozydów i nukleotydów z wykorzystaniem cholesterolowej fazy stacjonarnej: A) mieszanina nukleozydów, skład fazy ruchomej: 30 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 6,5 oraz metanol, elucja gradientowa: 0–3 min 5% v/v MeOH, 3–15 min – 50% v/v MeOH, przedkość przepływu fazy ruchomej: 0,5 mL min<sup>-1</sup>; B) mieszanina monofosforanów nukleotydów, skład fazy ruchomej: 5% v/v MeOH oraz 95% v/v 30 mM  $CH_3COONH_4$  pH 5. Oznaczenie: 1 – cytidyna, 2 – urydyna, 3 – guanozyna, 4 – tymidyna, 5 – 1-metyloguanozyna G, 6 – 1-metylinozyna, 7 – adenozyna, 8 – 1-metyladenozyna, 9 – cytidyna-5'-monofosforan, 10 – urydyno-5'-monofosforan, 11 – guanozyna-5'-monofosforan, 12 – adenozyna-5'-monofosforan

Figure 3. Chromatograms of separation of nucleosides and nucleotides with the use of cholesterol-based stationary phase: A) mixture of nucleosides, mobile phase composition: 30 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 6.5 and methanol, gradient elution: 0–3 min 5% v/v MeOH, 3–15 min – 50% v/v MeOH, flow rate: 0.5 mL min<sup>-1</sup>; B) mixture of nucleotides, mobile phase composition: 5% v/v MeOH and 95% v/v 30 mM  $CH_3COONH_4$  pH 5. Notation: 1 – cytidine, 2 – uridine 3 – guanosine, 4 – thymidine 5 – 1-methylguanosine 6 – 1-methylinosine, 7 – adenosine 8 – 1-methyladenosine, 9 – cytidine 5'-monophosphate, 10 – uridine 5'-monophosphate, 11 – guanosine 5'-monophosphate, 12 – adenosine 5'-monophosphate

Innym trendem analitycznym w chromatograficznym badaniu nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów jest wykorzystanie UHPLC [72, 73]. W literaturze istnieje jednak tylko kilka przykładów wykorzystania tej techniki w rozdzieleniu i oznaczaniu związków budujących kwasy nukleinowe. Z tego względu podjęto próbą zastosowania różnych średnic częściek (1,3–2,0 µm) komercyjnych faz stacjonarnych (oktylowa, oktedecylowa, fenylowa, pentafluorofenylowa, niezmodyfikowany żel krzemionkowy) w analizie potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów. W przypadku pierwszej grupy związków wykazano, że duża sprawność układów UHPLC umożliwiła analizę polarnych nukleozydów bez konieczności stosowania buforów w fazie ruchomej przy zachowaniu symetrycznych kształtów pików [73]. Chromatograficzna analiza tych cząsteczek wymagała stosowania buforów o różnych stężeniach, co było przyczyną ograniczonych możliwości zastosowań różnorodnych detektorów, zwłaszcza spektrometrów mas. Uzyskano całkowite rozdzielenie mieszaniny dziesięciu potranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów w czasie jedynie 4 minut. Podobne wyniki w zakresie skrócenia czasu rozdzielenia uzyskano także w przypadku oligonukleotydów [72]. Testowano możliwości rozdzielcze UHPLC dla mieszanin oligonukleotydów i ich syntetycznych metabolitów oraz mieszanin oligonukleotydów będących swoimi izomerami sekwencyjnymi. W każdym z opisanych przypadków otrzymano pełną separację biocząsteczek w czasie krótszym niż 10 minut z zastosowaniem fenylowej oraz pentafluorofenylowej fazy stacjonarnej [72, 74]. Wykorzystanie wypełnienia oktadecylowego o małej średnicy częściek fazy stacjonarnej pozwoliło natomiast na rozdzielenie w krótkim czasie oligonukleotydów antysensowych od ich metabolitów, czego przykład przedstawiono na Rysunku 4.

Metody oznaczania nukleozydów z wykorzystaniem cholesterolowej fazy stacjonarnej lub techniki UHPLC zostały z powodzeniem zastosowane do rozdzielenia i oznaczenia ilościowego w próbkach moczu i osocza. UHPLC wykorzystano także do oznaczania zmodyfikowanych oligonukleotydów i ich metabolitów w osoczu. Natomiast metody opracowane z wykorzystaniem hydrofobowo-hydrofilowych oraz dendrymetrycznych faz stacjonarnych zastosowane zostały do rozdzielenia nukleotydów i oznaczania poziomu ich stężenia w zmodyfikowanym mleku dla niemowląt. Opracowane metody cechuje liniowość w szerokim zakresie stężeń, wysoka dokładność i precyzja. Mogą one być z powodzeniem stosowane w rutynowych analizach nukleozydów i oligonukleotydów, jak i ich zmodyfikowanych pochodnych w próbkach biologicznych [68–74].



**Rysunek 4**

Rysunek 4. Chromatogram rozdzielenia oligonukleotydu tiofosforanowego oraz jego syntetycznych metabolitów za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Warunki analiz: kolumna chromatograficzna Kinetex C18 1,7  $\mu$ m (100  $\times$  2,1 mm); skład fazy ruchomej: 5 mM DMBA/150 mM HFIP oraz MeOH, elucja gradientowa: 24–27% v/v MeOH w 10 minut; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,3 mL min $^{-1}$ ; detekcja UV-Vis dla  $\lambda = 260$  nm. Oznaczenie: 1 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTCA-3'; 2 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTC-3'; 3 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTT-3'; 4 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTT-3'; 5 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAG-3'

Figure 4. Chromatogram of separation of phosphorothioate oligonucleotide and its metabolites with the use of ultra high performance liquid chromatography. Experimental conditions: chromatographic column Kinetex C18 1.7  $\mu$ m (100  $\times$  2.1 mm); mobile phase composition 5 mM DMBA/150 mM HFIP and methanol, gradient elution: 24–27% v/v of methanol in 10 min.; flow rate 0.3 mL min $^{-1}$ ; UV-Vis detection for  $\lambda = 260$  nm. Notation: 1 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTCA-3'; 2 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTC-3'; 3 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTT-3'; 4 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTT-3'; 5 – 5'-GTTCTCGCTGGTGAG-3'

## PODSUMOWANIE

Poznanie właściwości, roli i struktury kwasów nukleinowych umożliwiło udzielenie odpowiedzi na pytania dotyczące wzrostu, rozwoju organizmu, dziedziczenia cech, ale także procesów chorobowych. Obecnie kwasy nukleinowe jak i związki je budujące stanowią narzędzia, którymi posługuje się biologia molekularna w medycynie i biotechnologii. Określenie mechanizmów powstawania chorób mających podłożę genetyczne pozwala na zaprojektowanie leków, które będą zapobiegać rozwojowi schorzenia. Terapia genowa i antysensowa są intensywnie rozwijającymi się

obecnie kierunkami badań. Wykorzystują one krótkie fragmenty DNA lub RNA, czyli oligonukleotydy w celu wyciszenia ekspresji genów powodujących choroby. Te składowe kwasów nukleinowych nie są jedynymi, które pozwalają chemikom analitykom na uzyskanie informacji o stanie naszego organizmu. Oznaczenie zmodifikowanych nukleozydów umożliwia wykrycie choroby nowotworowej, a analiza nukleotydów pozwala na oszacowanie wzmacniania układu odpornościowego.

W każdym z tych trzech przypadków konieczne są czułe, selektywne i precyzyjne metody rozdzielania nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów oraz ich analizy jakościowej i ilościowej. Wymagania te spełniają techniki chromatograficzne, a zwłaszcza chromatografia cieczowa, która jest najpowszechniej stosowana w analizie związków budujących kwasy nukleinowe. Do najpowszechniej wykorzystywanych typów tej techniki zalicza się IEC i RP HPLC. Obie techniki w analizie trzech omawianych grup związków mają swoje zalety i wady. W przypadku IEC konieczne jest stosowanie wysokich stężeń lub gradientów stężeń soli w fazie ruchomej, co znacząco ogranicza możliwość wykorzystania detekcji MS. Technika ta umożliwia jednak uzyskanie zadowalającej rozdzielczości i selektywności w analizie nukleotydów i oligonukleotydów. RP HPLC można sprzęgać z detekcją MS pod warunkiem stosowania faz ruchomych, w skład których wchodzą lotne sole (np. mrówczan amonu). Istotnym problemem analiz prób zawierających związki budujące kwasy nukleinowe jest brak wystarczającej selektywności względem najbardziej polarnych nukleozydów i nukleotydów, które najczęściej nie ulegają rozdzieleniu w przypadku konwencjonalnie stosowanych faz stacjonarnych. Pomimo tego ograniczenia RP HPLC, jest ona najczęściej wykorzystywana w oznaczaniu nukleozydów i nukleotydów ze względu na prostotę sprzężenia z detektorem mas. Jest to niezwykle istotne ze względu zarówno na wysoką czułość, jak i na kompleksową analizę jakościową.

Innym układem chromatografii cieczowej wykorzystywanym zwłaszcza do analiz oligonukleotydów jest IP RP HPLC. Związki te nie mogą być analizowane za pomocą RP HPLC, ze względu na ich dużą polarność. Z powodzeniem są jednak rozdzielane i oznaczane za pomocą IP RP HPLC. Zaletą metody jest duża selektywność przy odpowiednim doborze składu fazy ruchomej oraz możliwość analiz za pomocą MS. Wadą IP RP HPLC w analizie oligonukleotydów jest jednak niższa czułość IP RP HPLC MS w porównaniu do RP HPLC MS. Jest to efekt różnego składu faz ruchomych i thumienia procesu jonizacji oligonukleotydów w przypadku stosowania soli par jonowych.

W czasie kilku ostatnich lat rośnie ilość prac naukowych prezentujących wyniki prób zastosowania układu HILIC do rozdzielenia mieszanin nukleozydów, nukleotydów, oligonukleotydów wyekstrahowanych z próbek biologicznych lub żywności. Prezentowane wyniki dowodzą użyteczności tej metody, jednakże zdolności rozdzielcze HILIC są ograniczone ze względu na asymetryczny kształt pików, będący konsekwencją dużej polarności składowych kwasów nukleinowych. Niemniej odpowiedni dobór składu fazy ruchomej oraz stacjonarnej może doprowadzić do uzyskania dużej selektywności w analizie najbardziej polarnych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów, których nie można rozdzielić RP HPLC.

## PIŚMIENIĘTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.
- [2] A.C. McGinnis, B. Chen, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B*, 2012, **883**, 76.
- [3] N. Dias, C.A. Stein, *Mol. Cancer Therap.*, 2002, **1**, 347.
- [4] W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, M. J. Markuszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2039.
- [5] A. Ranogajec, S. Beluhan, Z. Šmit, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 1024.
- [6] A. Contreras-Sanz, T.S. Scott-Ward, H.S. Gill, J.C. Jacoby, R.E. Birch, J. Malone-Lee, K.M.G. Taylor, C.M. Peppiatt-Wildman, S.P. Wildman, *Purinergic Signalling*, 2012, **8**, 741.
- [7] Y. Baba, L. Zhang, *Nucleic acids and their constituents, chromatographic methods*, [w:] *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques*, E. Heftmann (Red.), Elsevier Science, 2004.
- [8] D. Farbis, P.A. Limbach, *J. Am. Soc. Mass.*, 2010, **21**, R1.
- [9] G.M. Blackburn, *Nucleic Acid in Chemistry and Biology*, The Royal Society of Chemistry, Great Britain, 2006.
- [10] D. Bullinger, H. Fröhlich, F. Klaus, H. Neubauer, A. Frickenschmidt, C. Henneges, A. Zell, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, B. Kammerer, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **618**, 29.
- [11] M.J. Markuszewski, W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2300.
- [12] W. Struck-Lewicka, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **101**, 50.
- [13] P. Yeung, L. Ding, W.L. Casley, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **47**, 377.
- [14] C. Bolin, F. Cardozo-Pelaez, *J. Chromatogr. B*, 2007, **856**, 121.
- [15] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, S. Martínez-López, I. Vasallo, M. Hernández-Córdoba, *J. Agricul. Food Chem.*, 2009, **57**, 7245.
- [16] N. Yamaoka, Y. Kudo, K. Inazawa, S. Inagawa, M. Yasuda, K. Mawatari, K. Nakagomi, K. Kaneko, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 2054.
- [17] J. Czarnecka, M. Cieślak, M. Komoszyński, *J. Chromatogr. B*, 2005, **822**, 85.
- [18] A. Gil, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002, **56**, 1.
- [19] J.R. Hess, N.A. Greenberg, *Nutr. Clin. Pract.*, 2012, **27**, 281.
- [20] E. Urban, C.R. Noe, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 243.
- [21] E.W.M. Ng, D.T. Shima, P. Calias, E.T. Cunningham, D.R. Guyer, A.P. Adamis, *Nature Rev. Drug Disc.*, 2006, **5**, 123.
- [22] R.S. Geary, B.F. Baker, S.T. Crooke, *Clin. Pharmacokin.*, 2015, **54**, 133.
- [23] E. Szymańska, M.J. Markuszewski, Y.V. Heyden, R. Kaliszan, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3573.
- [24] S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1502.
- [25] C.W. Gehrke, K.C. Kuo, *J. Chromatogr.*, 1980, **188**, 129.
- [26] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, M. Bacher, H.-G. Scheel-Walter, X. Lu, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, K.-R. Kim, H. Gérard, *J. Chromatogr. B*, 2005, **814**, 275.
- [27] A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G.I. Fritz, O. Herbarth, *Br. J. Cancer*, 2006, **94**, 1726.
- [28] S.-H.Cho, B.H. Jung, S.H. Lee, W.-Y. Lee, G. Kong, B.Ch. Chung, *Biomed. Chromatogr.*, 2006, **20**, 1229.
- [29] N. Takeda, H. Yoshizumi, T. Niwa, *J. Chromatogr. B*, 2000, **746**, 51.
- [30] X. Zhao, W. Wang, J. Wang, J. Yang, G. Xu, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 2444.
- [31] T. Henriksen, P.R. Hillestrom, H. E Poulsen, A. Weimann, *Free Rad. Biol. Med.*, 2009, **47**, 629.
- [32] A. Contreras-Sanz, T.S. Scott-Ward, H.S. Gill, J.C. Jacoby, R.E. Birch, J. Malone-Lee, K.M. G. Taylor, C.M. Peppiatt-Wildman, S.P. Wildman, *Purinergic Signalling*, 2012, **8**, 741.
- [33] T. Cecchi, *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques*, Taylor & Francis Group, 2010.

- [34] T. Uesugi, K. Sano, Y. Uesawa, Y. Ikegami, K. Mohri, J. Chromatogr. B, 1997, **703**, 63.
- [35] R. Tuytten, F. Lemière, W. Van Dongen, E. Witters, EL. Esmans, RP. Newton, E. Dudley, Anal. Chem., 2008, **80**, 1263.
- [36] J.J. Pesek, M.T. Matyska, J. Sep. Sci., 2005, **28**, 1845.
- [37] J. Pesek, M.T. Matyska, M.T. W. Hearn, R.I. Boysen, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 1140.
- [38] J. Kehr, M. Chavko, Fresenius Anal. Chem., 1986, **325**, 466.
- [39] Y. Ren, J. Zhang, X. Song, X. Chen, D. Li, J. Chromatogr. Sci., 2011, **49**, 332.
- [40] C. Perrin, L. Meyer, C. Mujahid, C.J. Blake, Food Chem., 2001, **74**, 245.
- [41] C. Ren, J. Zhang, X. Song, X. Chen, D. Li, , J. Chromatogr. Sci., 2011, **49**, 332.
- [42] M. Cichna, M. Raab, H. Daxecker, A. Griesmacher, M.M. Müller, P. Markl, J. Chromatogr. B, 2003, **787**, 381.
- [43] N. Kochanowski, F. Blanchard, R. Cacan, F. Chirat, E. Guedon, A. Marc, J.-L. Goergen, Anal. Biochem., 2006, **348**, 243.
- [44] R.M. Seifar, C. Ras, J.C. van Dam, W.M. van Gulik, J.J. Heijnen, W.A. van Winden, Anal. Biochem., 2009, **388**, 213.
- [45] M. Ganzena, P. Vrabl, E. Wörle, W. Burgstaller, H. Stuppner, Anal. Biochem., 2006, **359**, 132.
- [46] I. Ferreira, E. Mendes, A. Gomes, M. Faria, M. Ferreira, Food Chem., 2001, **74**, 239.
- [47] N. Yamaoka, Y. Kudo, K. Inazawa, S. Inagawa, M. Yasuda, K. Mawatari, K. Nakagomi, K. Kaneko, J. Chromatogr. B, 2010, **878**, 2054.
- [48] J. Aussénac, D. Chassagne, C. Claparols, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, C. Charpentier, J. Chromatogr. A, 2001, **907**, 155.
- [49] S. Giannattasio, S. Gagliardi, M. Samaja, E. Marra, Brain Research Protocols, 2003, **10**, 168.
- [50] V. Reichelova, F. Albertioni, J. Liliemark, J. Chromatogr. B, 1996, **682**, 115.
- [51] Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 7394.
- [52] N. Tomiya, E. Ailor, S.M. Lawrence, M.J. Betenbaugh, Y.C. Lee, Anal. Biochem., 2001, **293**, 129.
- [53] D. Sýkora, F. Svec, J.M.J. Frechet J. Chromatogr. A, 1999, **852**, 297.
- [54] C.P. Bisjak, R. Bakry, Ch.W. Huck, G.K. Bonn, Chromatogr., 2005, **62**, S31.
- [55] J.R. Thayer, V. Barreto, S. Rao, C. Pohl, Anal. Biochem., 2005, **338**, 39.
- [56] X. Wei, G. Dai, Z. Liu, H. Cheng, Z. Xie, G. Marcucci, K. K. Chan, The AAPS Journal, 2006, **8**, 743.
- [57] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, J.L. Holyoke, H. Davoudi, J.C. Gebler, Oligonucleotides, 2003, **13**, 229.
- [58] S.M. McCarthy, M. Gilar, Waters Corporation 2010
- [59] C. Liu, D. Lu, X. Deng, Y. Wang, J. Zhang, Y. Zhang, S. Wang, Anal. Bioanal. Chem., 2012, **403**, 1333.
- [60] V. Bonilla, G. Srivatsa, *Handbook of analysis of oligonucleotides and related products*, CRC Press, 2011.
- [61] A.J. Alpert J. Chromatogr., 1990, **499**, 177.
- [62] L. Gong, J.S.O. McCullagh, J. Chromatogr. A, 2011, **1218**, 5480.
- [63] R.N. Easter, K.K. Kröning, J.A. Caruso, P.A. Limbach, Analyst, 2010, **135**, 2560.
- [64] R. Easter, C. Barry, J. Caruso, P. Limbach, . Anal. Met., 2013, **5**, 2657.
- [65] Q. Li, F. Lynena, J. Wang, H. Li , G. Xub, P. Sandra, J. Chromatogr. A, 2012, **1255**, 237.
- [66] Z.J. Lin, W. Li, G. Dai, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, **44**, 330.
- [67] G. Dai, X. Wei, Z. Liu, S. Liu, G. Marcucci, K. K. Chan, J. Chromatogr. B, 2005, **825**, 201.
- [68] S. Studzińska, B. Buszewski, Anal. Bioanal. Chem., 2013, **405**, 1663.
- [69] S. Studzińska, B. Buszewski, Biomed. Chromatogr., 2014, **28**, 1140.
- [70] S. Studzińska, L. Pietrzak, B. Buszewski, Chromatographia, 2014, **77**, 1589.
- [71] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, J. Chromatogr. B, 2014, **949**, 87.

- [72] S. Studzińska, B. Buszewski, Anal. Bioanal. Chem., 2014, **406**, 7127.
- [73] S. Studzińska, B. Buszewski, J. Chromatogr. B, 2012, **887**, 93.
- [74] S. Studzińska, S. Mounicou, J. Szpunar, R. Łobiński, B. Buszewski, Anal. Chim. Acta, 2015, **855**, 13.

Praca wpłynęła do Redakcji

## MODYFIKACJA CHITOZANU – KRÓTKI PRZEGŁĄD

## MODIFICATION OF CHITOSAN – A CONCISE OVERVIEW

Jadwiga Ostrowska-Czubenko\*, Milena Pieróg,  
Magdalena Gierszewska

Katedra Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń  
\*e-mail: jocz@chem.umk.pl

---

### Abstract

### Wprowadzenie

1. Ogólna charakterystyka procesu modyfikacji
2. Modyfikacja polisacharydów
3. Modyfikacja chitozanu
  - 3.1. Modyfikacja chitozanu przez podstawienie grup aminowych i hydroksylowych
    - 3.1.1. Reakcje kwartenizacji i n-alkilowania
    - 3.1.2. Reakcje acylowania
    - 3.1.3. Reakcje karboksymetylowania
    - 3.1.4. Tworzenie pochodnych chitozanu zawierających fosfor i siarkę
  - 3.2. Modyfikacja chitozanu w wyniku reakcji szczepienia
  - 3.3. Modyfikacja chitozanu przez sieciowanie
  - 3.4. Modyfikacja chitozanu przez depolimeryzację
  - 3.5. Tworzenie nanokompozytów opartych na chitozanie

### Uwagi końcowe

### Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Jadwiga Ostrowska-Czubenko** jest profesorem nadzwyczajnym Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Po ukończeniu studiów rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Fizycznej tej jednostki. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów Wydziału Chemii UMK, w Zespole Fizykochemii i Chemometrii Zjawisk Membranowych. Stopnie naukowe doktora nauk chemicznych i doktora habilitowanego w zakresie chemii – fizykochemii polimerów uzyskała na Wydziale Chemii UMK. Głównym przedmiotem jej zainteresowań naukowych jest chemia i fizykochemia syntetycznych i naturalnych polimerów jonowych i chemia biomimetyczna. Prowadzi badania eksperymentalne przy zastosowaniu różnych technik badawczych, głównie spektralnych oraz obliczenia numeryczne. Obiektem badań są syntetyczne polimery jonowe (w tym polimery biopodobne, modelujące strukturę i właściwości naturalnych polimerów bakteryjnych) oraz naturalne polimery jonowe w stanie skondensowanym i w roztworze. Obecnie swoje zainteresowania naukowe koncentruje na badaniu hydrożeli (membran hydrożelowych) na bazie naturalnych polimerów jonowych, przeznaczonych do zastosowań biomedycznych (procesy kontrolowanego uwalniania leków) i przemysłowych (oczyszczanie wód i rozdział substancji ciekłych).

**Dr Milena Pieróg** jest absolwentką studiów magisterskich (2006) oraz studiów doktoranckich (2011) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Przedmiotem badań prowadzonych przez nią w ramach rozprawy doktorskiej, której obrona odbyła się w 2013 r., były membrany hydrożelowe otrzymywane z modyfikowanego chitozanu. Od roku 2013 dr Milena Pieróg pracuje poza uczelnią.

**Dr Magdalena Gierszewska** jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (2005). Pracę licencjacką i magisterską napisała w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Chemii. Tematyka obu prac dotyczyła zastosowania procesów membranowych do rozdziału mieszanin ciekłych. W roku 2009 ukończyła studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMK i w roku 2010 obroniła pracę doktorską. Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej dotyczyły hydrożeli jonowych. Od roku 2009 dr Magdalena Gierszewska pracuje na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów Wydziału Chemii UMK. Jej główne zainteresowania naukowe dotyczą hydrożeli jonowych, membran hydrożelowych na bazie modyfikowanych polimerów naturalnych oraz procesów membranowych (perwaporacji).

## ABSTRACT

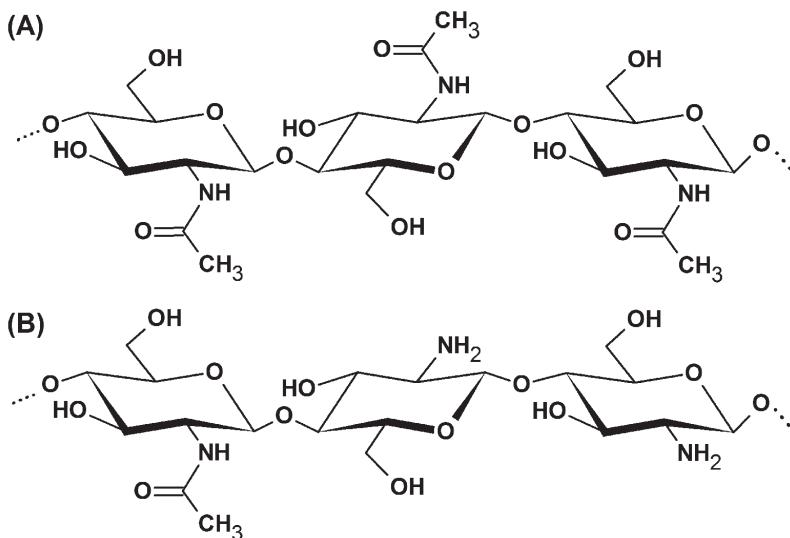
Chitosan is the most important derivative of chitin, a polysaccharide found in the exoskeleton of shellfish like shrimp and crab. It is a product of deacetylation of chitin under alkaline conditions or enzymatic hydrolysis in the presence of chitin deacetylase. Both chitin and chitosan are linear polysaccharides and are chemically defined as copolymers consisting of varying amounts of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (GlcNAc) and 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (GlcN). The difference between chitin and chitosan lies in the content of GlcNAc and GlcN units. Chitin samples contain a high content of GlcNAc units. Due to excellent properties of chitosan, such as biocompatibility, biodegradability, hydrophilicity, non-toxicity, cationicity, ease of modification, film forming ability, affinity to metals, protein and dyes, etc., this polymer has found applications in medicine and pharmacy, as food additive, antimicrobial agent, in paper and textile industry, in environmental remediation and other industrial areas. The presence of functional groups, reactive amino and hydroxyl groups, in chitosan backbone makes it suitable candidate for chemical modification. Chemical modification of chitosan to generate new polymers with useful physicochemical properties and distinctive biological functions is of key interest because it would not change the fundamental skeleton of the polymer. In this article the main three methods of chitosan modification: substitution reactions, reactions leading to the chain elongation and/or molecular weight increasing and methods of depolymerization are shortly characterized. Moreover, the selected methods of chitosan modification, i.e. quaternization, alkylation, acylation, carboxyalkylation, phosphorylation, sulfation, graft copolymerisation, crosslinking and depolymerization are discussed in more detail. A special attention is drawn to chitosan crosslinking with low and high molecular compounds. Chitosan modification by covalent and ionic crosslinking allows to obtain polymer materials with improved mechanical and chemical resistance and suitable for example for chitosan hydrogel membranes formation.

**Keywords:** chitosan, chitosan modification, chitosan derivatives, crosslinking

**Słowa kluczowe:** chitozan, modyfikacja chitozantu, pochodne chitozantu, sieciowanie

## WPROWADZENIE

Chitozan jest jedną z najważniejszych pochodnych chityny. Otrzymywany jest on w procesie chemicznej lub enzymatycznej deacetylowacji tego polimeru [1–3]. Chityna jest drugim po celulozie najbardziej rozpowszechnionym w przyrodzie polimerem naturalnym, wytwarzanym na drodze biosyntezy. Roczną naturalną odtwarzalność chityny na drodze biosyntezy szacuje się na 2–3 miliardy ton [4]. Występuje ona w pancerzach skorupiaków morskich, insektów i w ścianach komórkowych niektórych grzybów [1–3]. Zarówno chityna, jak i chitozan, są liniowymi polisacharydami – kopolimerami zawierającymi różne ilości statystycznie rozłożonych jednostek strukturalnych 2-acetamido-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozy, (*N*-acetylglukozamin) oraz 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozy ( $\beta$ -D-glukozaminy) powiązanych wiązaniemami  $\beta$ -(1→4) – glikozydowymi. Różnica między chityną i chitozanem polega na stopniu deacetylowacji (DD), definiowanym jako stosunek liczby jednostek D-glukozaminy do ogólnej liczby jednostek  $\beta$ -D-glukozaminy i *N*-acetylglukozaminy. Chityna cechuje się dużą zawartością jednostek *N*-acetylglukozaminy. Na Rysunku 1 przedstawiono „idealną” strukturę chityny i rzeczywistą strukturę chitozanu.



Rysunek 1. Struktura chemiczna chityny (A) i chitozanu (B)  
 Figure 1. Chemical structure of chitin (A) and chitosan (B)

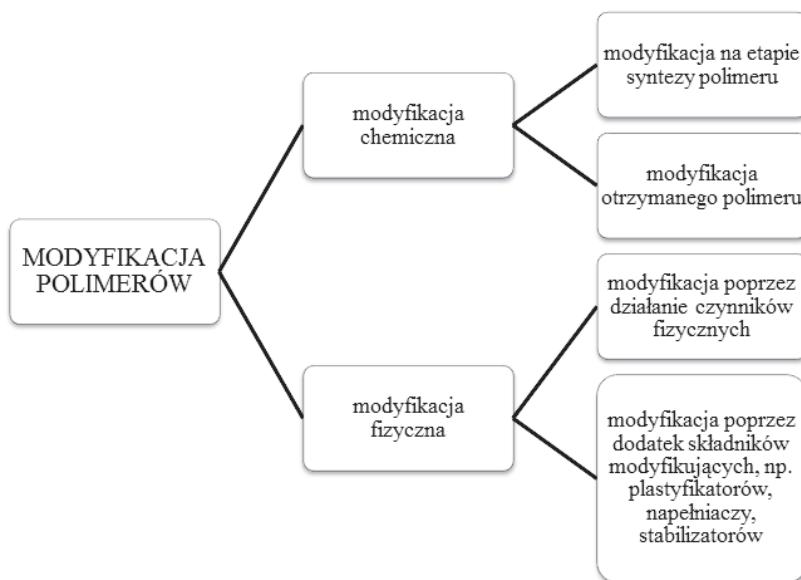
Chitozan posiada szereg cennych właściwości fizykochemicznych, takich jak: biokompatybilność, biodegradowalność, nietoksyczność, zdolność tworzenia polikationów w środowisku kwaśnym, łatwość ulegania modyfikacji, duże powinowactwo do metali, barwników i białek, hydrofilowość, zdolność tworzenia filmów, itd. [1–3, 5]. Cechy te sprawiają, że znajduje on zastosowanie w medycynie i farmacji,

w różnego typu gałęziach przemysłu, w ochronie środowiska, procesach oczyszczania wód, różnego typu procesach separacyjnych, itp. [3, 5–8]. Roczna światowa produkcja chitozanu w 2010 roku wynosiła ok. 13,7 tysięcy ton i ciągle wzrasta. Zgodnie z przewidywaniami do 2015 roku miała osiągnąć wartość 21,4 tysięcy ton [4]. Chitozan posiada jednak szereg właściwości fizykochemicznych, które ograniczają jego zastosowanie w pewnych obszarach. Polimer ten silnie pęcznieje w wodzie (szczególnie w środowisku kwaśnym) i w stanie spęcznionym cechuje się niską trwałością mechaniczną, rozpuszcza się w roztworach kwasów, nie rozpuszcza się w wielu rozpuszczalnikach. Aby zmienić szereg właściwości fizykochemicznych chitozanu, m.in. poprawić jego rozpuszczalność w wodzie, obniżyć zdolność do rozpuszczania w środowisku kwaśnym, zwiększyć zdolność wiązania różnych substancji oraz poprawić odporność chemiczną i mechaniczną, a przez to rozszerzyć możliwości zastosowania tego polimeru, poddaje się go różnorodnym procesom modyfikacji chemicznej i fizycznej.

## 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PROCESU MODYFIKACJI

Wiele materiałów polimerowych o dużym zastosowaniu w różnych gałęziach przemysłu, medycynie i farmacji otrzymuje się na drodze modyfikacji [9–13]. Proces modyfikacji polimerów umożliwia poprawę szeregu ich właściwości fizykochemicznych i przetwórczych. Modyfikacja polimerów jest ponadto w wielu przypadkach procesem bardziej ekonomicznym niż syntetyzowanie nowych monomerów i polimerów. Modyfikację polimerów dzieli się ogólnie na dwa rodzaje: modyfikację chemiczną i modyfikację fizyczną, jak przedstawiono schematycznie na Rysunku 2.

Modyfikacja fizyczna polimeru polega na ukierunkowanej zmianie jego właściwości fizykochemicznych poprzez działanie czynnikami fizycznymi, takimi jak np. energia cieplna (obróbka termiczna), ultradźwięki, pole elektryczne i magnetyczne lub przez wprowadzanie do polimerów składników dodatkowych (modyfikujących), prowadzących do zmiany kompozycji polimerowej [11, 12]. Modyfikacja fizyczna w porównaniu do modyfikacji chemicznej jest metodą prostszą technicznie i tańszą. Mechanizm procesu jest jednak w wielu przypadkach bardzo złożony. Nazywana jest ona również modyfikacją strukturalną, ponieważ w efekcie działania na polimer czynników fizycznych zachodzą głównie przemiany w strukturze nadmolekularnej polimeru.



Rysunek 2. Rodzaje modyfikacji polimerów  
Figure 2. Types of polymer modification

Modyfikacja chemiczna polimeru polega na zmianie jego właściwości przez kontrolowaną zmianę składu chemicznego makrocząsteczek. Zachodzi ona najczęściej podczas wprowadzania nowych grup funkcyjnych do cząsteczek polimeru, przemiany grup funkcyjnych w polimerze, cyklizacji wewnętrzcząsteczkowej, reakcji utleniania, redukcji, szczepienia, sieciowania łańcuchów polimerowych oraz degradacji. Modyfikacja pod wpływem czynników chemicznych może zachodzić bezpośrednio podczas syntezy polimeru lub może być dokonywana na gotowym polimerze [11–13].

Modyfikacja chemiczna w stadium syntezy polimeru polega na zastosowaniu podczas syntezy odpowiednich komonomerów lub na dodaniu do układu składników reaktywnych (jedno-, dwu- lub trójfunkcyjnych modyfikatorów, zawierających grupy reaktywne), które wbudowując się w łańcuch makrocząsteczki powodują zmianę struktury chemicznej i w rezultacie zmianę właściwości polimeru. W przypadku modyfikacji chemicznej gotowego polimeru wykorzystuje się wszystkie reakcje chemiczne typowe dla związków małocząsteczkowych, takie jak: reakcje podstawiania, chlorowcowania, przyłączania do wiązań nienasyconych, wymiany grup funkcyjnych, tworzenia pierścieni, blokowania grup polarnych oraz sieciowania. Przebieg reakcji z udziałem związków małocząsteczkowych i wielkocząsteczkowych różni się w wielu przypadkach wydajnością i szybkością reakcji. W wyniku zachodzących reakcji otrzymuje się różnego typu polimery i kopolimery, których synteza jest niemożliwa na drodze bezpośredniej polireakcji, np. poli(alkohol winylowy), szereg polimerów zawierających fluor, chlор, itp.

Spośród metod modyfikacji polimerów najczęściej wykorzystywane są te metody, w których modyfikacja jest wynikiem reakcji kopolimeryzacji, szczepienia i sieciowania oraz mieszania z innymi polimerami, bądź substancjami pomocniczymi. Modyfikację polimerów prowadzi się bądź w masie polimeru, bądź na jego powierzchni.

Ostatnio wśród polimerów modyfikowanych coraz większe zainteresowanie wzbudzają materiały kompozytowe i nanokompozytowe. Kompozyty polimerowe to materiały składające się co najmniej z dwóch faz (ciąglej i rozproszonej), o wyraźnych powierzchniach rozdziału. W przypadku nanokompozytów składnik rozproszony (nanopełniacz) charakteryzuje się co najmniej jednym wymiarem w skali nanometrycznej ( $10^{-9}$  m) [14, 15]. Do tworzenia nanokompozytów polimerowych wykorzystuje się cząstki nieorganiczne, organiczne i hybrydy nieorganiczno-organiczne, które mogą występować w postaci proszków (napełniacze 3D), włókien lub prętów (napełniacze typu 2D) oraz płytEK (napełniacze 1D). Jako napełniacze typu 3D wykorzystuje się nanocząstki metali. Najbardziej znane napełniacze typu 2D to nanorurki i nanowłókna węglowe, a napełniacze 1D – montmorylonit i inne naturalne glinokrzemiany. Spośród różnych nanokompozytów przeważającą rolę w badaniach podstawowych i zastosowaniach praktycznych odgrywają glinokrzemiany.

Nanokompozyty polimerowe otrzymuje się różnymi metodami [15, 16]: (i) w procesach fizycznego mieszania proszkowych nanonapełniaczy z polimerem w stanie stopionym lub z jego roztworem/dispersją; (ii) w procesach polimeryzacji *in situ*, które prowadzi się w obecności cząstek napełniacza w roztworze/dispersji lub w bloku, (iii) w procesach obejmujących syntezę nanocząstek z prekursora wstępnie zdyspergowanego lub rozpuszczonego w matrycy polimerowej. Rodzaj zastosowanej metody syntezy zależy zarówno od właściwości polimeru, jak i nanonapełniacza.

Polimery poddane określonym procesom modyfikacji, głównie modyfikacji fizycznej, stają się w pewnych warunkach tworzywami sztucznymi. Termin tworzywo sztuczne, wykorzystywany powszechnie w przetwórstwie i w różnych zastosowaniach polimerów, oznacza materiał, którego głównym składnikiem jest polimer, a składnikami dodatkowymi, modyfikującymi są takie substancje, jak napełniacze, zmiękczacze, stabilizatory, środki barwiące, itp.

## 2. MODYFIKACJA POLISACHARYDÓW

Polisacharydy, analogicznie jak inne polimery, poddawane są procesom modyfikacji fizycznej i chemicznej [17–21]. Do polisacharydów modyfikowanych najczęściej i w największej ilości należą celuloza i skrobia. Do czynników fizycznych, powodujących modyfikację polisacharydów, należą takie czynniki, jak: promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV, ultradźwięki (sonifikacja), energia cieplna.

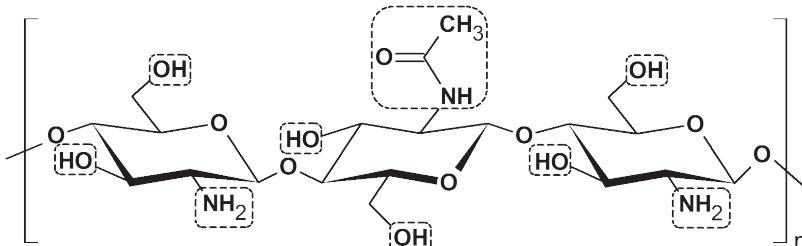
Najczęściej stosowaną metodą modyfikacji polisacharydów jest modyfikacja chemiczna. Polisacharydy zawierają w swojej strukturze grupy hydroksylowe i stąd ulegają reakcjom charakterystycznym dla alkoholi, m.in. estryfikacji, eteryfikacji, redukcji, reakcji z metalami. Reakcji estryfikacji ulegają zarówno pierwszorzędowe, jak i drugorzędowe grupy hydroksylowe. Polisacharydy ulegają także innym reakcjom prowadzącym do otrzymania polimerów modyfikowanych, takim jak: reakcje kopolimeryzacji szczepionej, sieciowania, hydrolizy, utleniania, itp. Depolimeryzacja z wytworzeniem D-glukozy i produktów pośrednich, zawierających więcej niż jedną cząsteczkę glukozy, jest najprostszą metodą modyfikacji chemicznej polisacharydów.

Często stosowaną metodą modyfikacji chemicznej polisacharydów jest ich utlenianie, które polega na utlenianiu pierwszo- i drugorzędowych grup hydroksylowych jednostek glukozowych, z wytworzeniem grup karboksylowych lub karbonylowych. Utlenianiu polisacharydów towarzyszy częściowa depolimeryzacja łańcuchów polimerowych lub/oraz rozluźnienie wiązań międzycząsteczkowych. Polisacharydy ulegają również sieciowaniu.

### 3. MODYFIKACJA CHITOZANU

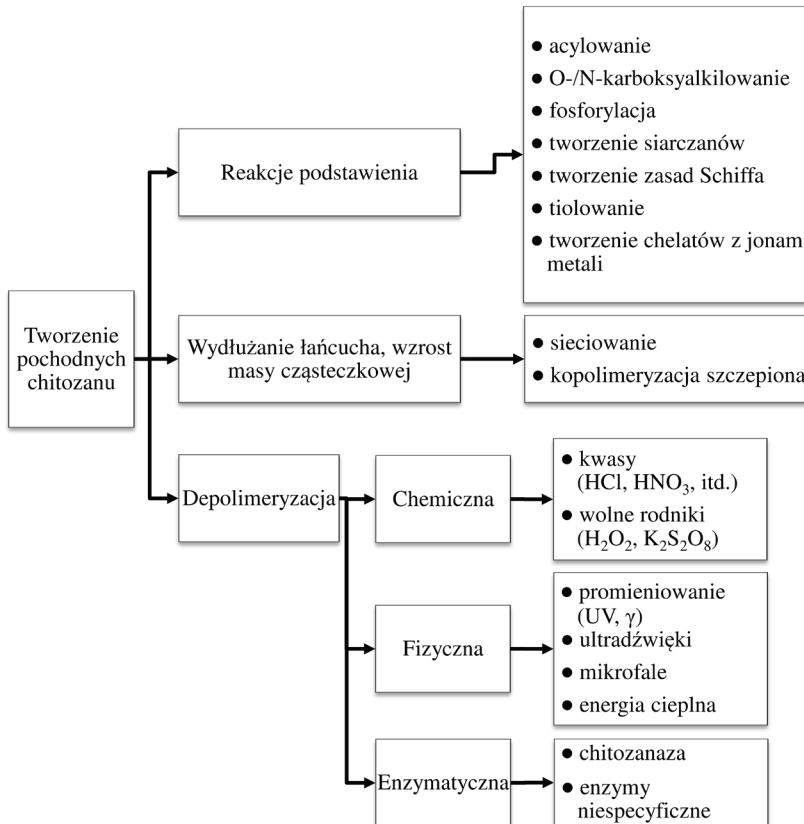
Chitozan, analogicznie jak inne polisacharydy, może ulegać zarówno modyfikacji chemicznej, jak również modyfikacji fizycznej. Stosowane metody modyfikacji mają na celu zwiększenie odporności mechanicznej i chemicznej tego polimeru, zmianę jego hydrofilowości i rozpuszczalności, poprawę aktywności biologicznej, biokompatybilności, itd. i stąd zwiększenie obszaru zastosowań tego polimeru. Dotychczas pojawiło się wiele prac przeglądowych poświęconych ogólnie zagadnieniu modyfikacji chitozanu [21–34] oraz modyfikacji chitozanu przeznaczonego do różnorodnych zastosowań przemysłowych, biomedycznych i farmaceutycznych [35–47].

Zdolność chitozanu do modyfikacji, głównie modyfikacji chemicznej, wynika przede wszystkim z obecności dwóch rodzajów reaktywnych grup funkcyjnych: grupy aminowej i dwóch grup hydroksylowych - przy trzecim i szóstym atomie węgla w pierścieniu sacharydowym (Rys. 3).



Rysunek 3. Możliwe miejsca reakcji w łańcuchu chitozanu  
Figure 3. Possible reaction sites in chitosan chain

Metody modyfikacji chitozantu obejmują trzy grupy metod [26, 27]: (i) metody polegające na wprowadzeniu grup bocznych do łańcucha chitozantu w wyniku reakcji podstawienia (substytucji), (ii) metody prowadzące do wydłużenia łańcucha i/lub wzrostu średniej masy cząsteczkowej oraz (iii) metody depolimeryzacji (Rys. 4). Spośród wymienionych grup metod najczęściej stosowane są metody grup (i) oraz (ii).



Rysunek 4. Reakcje prowadzące do otrzymania pochodnych chitozantu [26, 27]

Figure 4. Derivatization of chitosan [26, 27]

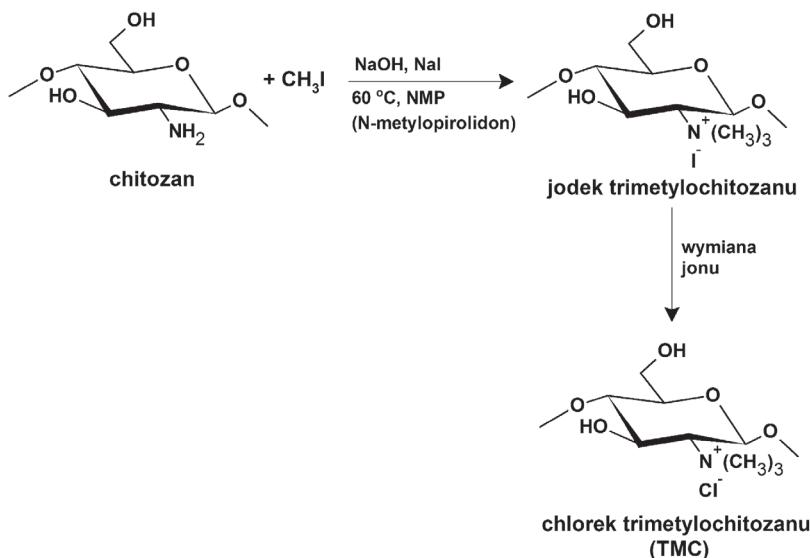
Poniżej scharakteryzowano wybrane, stosowane często metody modyfikacji chitozantu i otrzymywane pochodne.

### 3.1. MODYFIKACJA CHITOZANU PRZEZ PODSTAWIENIE GRUP AMINOWYCH LUB HYDROOKSYLOWYCH

#### 3.1.1. Reakcje kwarternizacji i n-alkilowania

Wprowadzenie grup bocznych do łańcucha chitozantu realizuje się poprzez różnego typu reakcje, takie jak reakcje alkilowania, acylowania, arylowania, tiolowania, sulfonowania, fosforylacji, itp. [21–34].

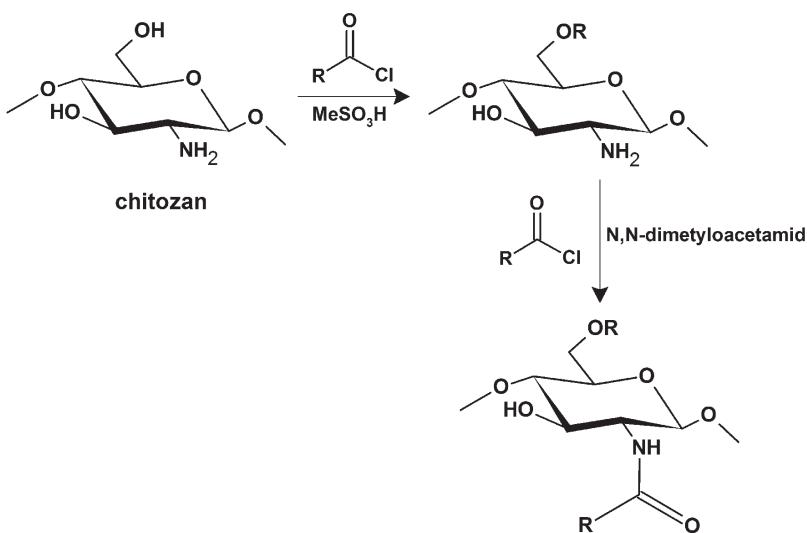
Poniżej przedstawiono schemat reakcji metylowania (kwaternizacji) grup aminowych chitozantu oraz syntezy jego *N*-alkilowych pochodnych (Rys. 5) [25, 28, 33, 48].



Rysunek 5. Reakcja metylowania chitozantu oraz tworzenia jego *N*-alkilowych pochodnych  
Figure 5. Methylation and *N*-alkylation of chitosan

#### 3.1.2. Reakcje acylowania

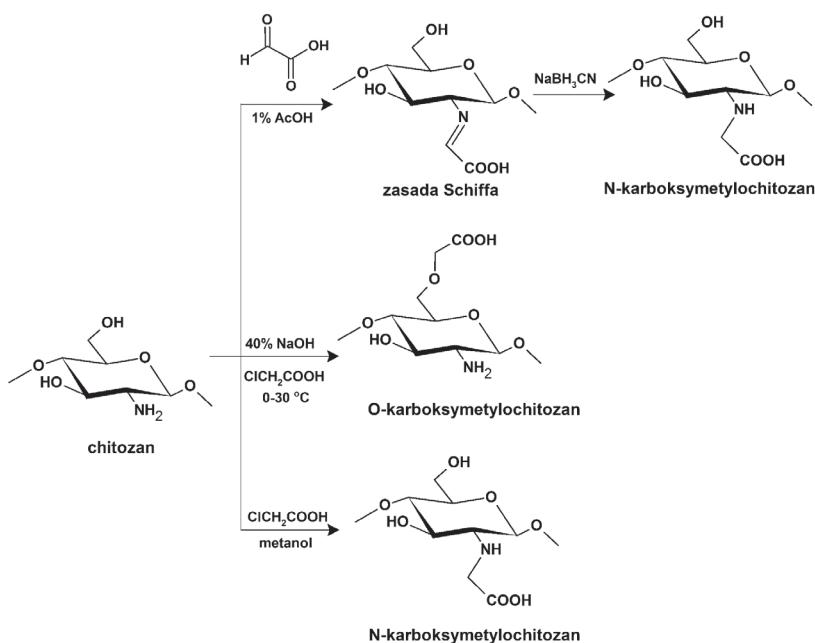
W reakcji acylowania, w zależności od charakteru czynnika modyfikującego i warunków reakcji, podstawieniu ulegają grupy aminowe i/lub grupy hydroksylowe chitozantu i otrzymuje się *N*-, O- i *N,O*-acylowe pochodne chitozantu. Na Rysunku 6 przedstawiono schemat reakcji tworzenia *N,O*-acylowych pochodnych chitozantu [25, 28, 33, 48].



Rysunek 6. Reakcja tworzenia N,O-acylowych pochodnych chitozanu  
 Figure 6. N,O-acylation of chitosan

### 3.1.3. Reakcje karboksymetylowania

Jedną z najczęściej badanych pochodnych chitozanu jest karboksymetylochitozan [27]. Polimer ten zawiera w łańcuchu dwa rodzaje grup funkcyjnych: zasadowe grupy aminowe i kwasowe grupy karboksylowe i stąd należy do grupy polielektrolitów amfoterycznych [25, 27, 48, 49]. W zależności od warunków reakcji karboksymetylowania otrzymuje się  $O$ -,  $N$ - lub  $O,N$ -podstawione pochodne. Reakcje prowadzące do otrzymania  $O$ - i  $N$ -karboksymetylochitozanu przedstawiono na Rysunku 7.

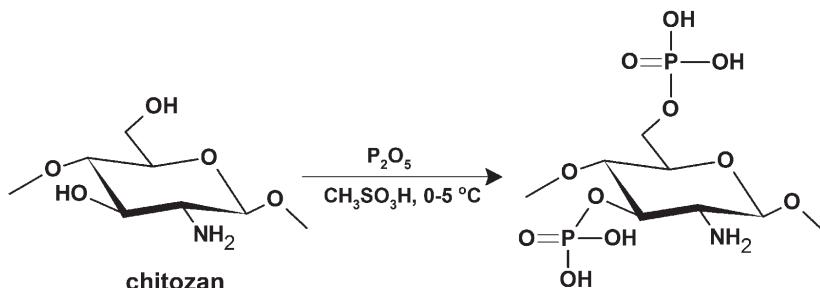


Rysunek 7. Reakcje otrzymywania O- i N-karboksymetylochitozanu  
 Figure 7. Synthesis of O- and N-carboxymethylated chitosan

### 3.1.4. Tworzenie pochodnych chitozantu zawierających fosfor i siarkę

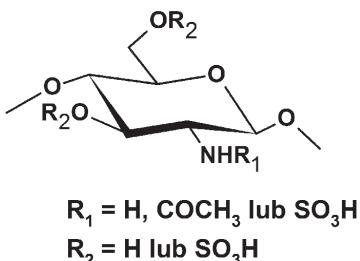
Dużą grupę pochodnych chitozantu stanowią pochodne zawierające w swojej strukturze fosfor lub siarkę.

Fosforowany chitozan może być otrzymany różnymi metodami, w których czynnikiem modyfikującym jest kwas ortofosforowy(V) lub kwas ortofosforowy(III), pięciotlenek fosforu, itp. Metody otrzymywania fosforowanego chitozantu zostały scharakteryzowane przez wielu autorów w pracach przeglądowych [25, 28, 33, 35, 36, 40, 50]. Na Rysunku 8 przedstawiono reakcję fosforylacji chitozantu przez pięciotlenek fosforu w obecności kwasu metanosulfonowego [50].



Rysunek 8. Reakcja otrzymywania fosforowanego chitozantu  
 Figure 8. Synthesis of phosphorylated chitosan

Chitozan zawierający w swojej strukturze grupy  $-\text{SO}_3\text{H}$  otrzymuje się poprzez działanie różnych czynników, m.in. stężonego kwasu siarkowego, oleum, dwu- i trójtlenku siarki, kwasu chlorosulfonowego i w różnym środowisku reakcji [25, 27, 28, 33, 51, 52]. W wyniku działania wszystkich wymienionych reagentów otrzymuje się N-podstawiony chitozan (grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$  przyłączona jest do grupy  $-\text{NH}_2$ ) i O-podstawiony chitozan (grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$  przyłączona jest do grupy  $-\text{OH}$  i/lub  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) [25, 51]. Na Rysunku 9 przedstawiono strukturę siarczanu chitozanu.

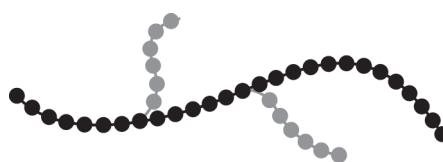


Rysunek 9. Struktura chemiczna siarczanu chitozanu  
Figure 9. Chemical structure of sulphated chitosan

Otrzymane siarczane pochodne chitozanu, których struktura w dużym stopniu przypomina strukturę chemiczną heparyny, posiadają również właściwości przecizwakrzepowe.

### 3.2. MODYFIKACJA CHITOZANU W WYNIKU REAKCJI SZCZĘPIENIA

Kopolimeryzacja szczepiona jest jedną z głównych metod modyfikacji chemicznej chitozanu. Na Rysunku 10 przedstawiono schematycznie strukturę kopolimeru szczepionego chitozanu, gdzie łańcuch główny stanowi łańcuch chitozanu, a łańcuchy boczne to łańcuchy polimerowe tworzone z zaszczepionych monomerów, takich jak np. kwas akrylowy, kwas metakrylowy, akryloamid, akrylonitryl, styren, anilina, kwas mlekowy, itp. [25]. Metoda kopolimeryzacji szczepionej pozwala otrzymać pochodne chitozanu o właściwościach fizykochemicznych stwarzających możliwość poszerzenia zastosowania tego polimeru. Właściwości kopolimerów szczepionych zależą w dużym stopniu od charakteru chemicznego łańcuchów bocznych, ich długości (średniej masy cząsteczkowej) i ich liczby w danym łańcuchu (zawartości w kopolimerze).



Rysunek 10. Struktura kopolimerów szczepionych chitozanu

Figure 10. Structure of graft copolymers of chitosan

W literaturze istnieje szereg informacji dotyczących różnego typu szczepionych kopolimerów chitozanu i stosowanych metod szczepienia [25–28, 33, 53–56]. Na łańcuchu chitozanu szczepi się różnego typu monomery, głównie monomery winylowe, a do zainicjowania procesu szczepienia wykorzystuje się różnego typu inicjatory, promieniowanie nisko- i wysokoenergetyczne, promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie plazmy i enzymy [25–27, 54–56], (Tab. 1). W procesie szczepienia monomerów winylowych najczęściej wykorzystuje się inicjatory polimeryzacji rodnikowej. Szczepienie monomerów na chitozanie może zachodzić również w procesie polikondensacji lub polimeryzacji z otwarciem pierścienia [25, 54]. Przykładem monomeru, który ulega szczepieniu na drodze polikondensacji jest kwas mlekowy. Szczepienie monomerów cyklicznych (np. laktonów i epoksydów) zachodzi natomiast w procesie polimeryzacji z otwarciem pierścienia.

Tabela 1. Charakterystyka szczepionych kopolimerów chitozanu [26, 27]

Table 1. Characteristics of chitosan graft copolymers [26, 27]

Metoda inicjowania	Rodzaj inicjatora	Monomer szczepiony na chitozanie
inicjowanie rodnikowe	Ce <sup>4+</sup> , K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , odczynnik Fentona (Fe <sup>2+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), boran tributylu	akrylonitryl, N-izopropylakryloamid, metakrylan metylu, monomery winylowe
inicjowanie radiacyjne	promieniowanie $\gamma$ , <sup>60</sup> Co	styren, metakrylan 2-hydroksyetylu
inicjowanie przy wykorzystaniu promieniowania mikrofalowego metoda „szczepienie na”, ang. „grafting onto method”	katalizatory różnego typu [4,4'-azobis(kwas 4-cyanowalerianowy)]	poliakryloamid, polimery telecheliczne, glikol polietylenowy, polidimetylosiloskan
tworzenie dendrymerów na powierzchni chitozanu	N-alkilowanie redukcyjne	poliamidoamina, styren

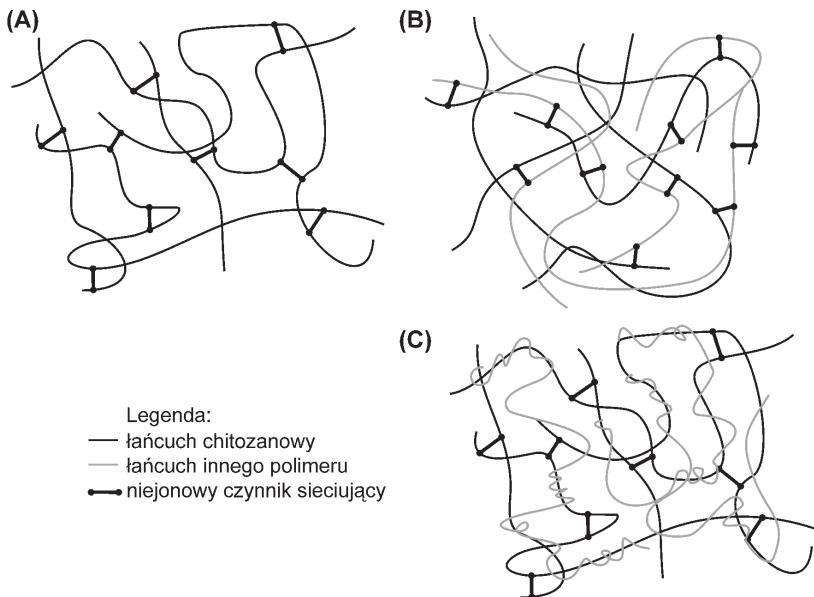
### 3.3. MODYFIKACJA CHITOZANU PRZEZ SIECIOWANIE

Modyfikacja chitozanu poprzez sieciowanie prowadzi do powstania trójwymiarowej sieci polimerowej. Sieć polimerowa powstaje w wyniku tworzenia wiązań chemicznych lub fizycznych bezpośrednio pomiędzy łańcuchami polimerowymi lub pomiędzy łańcuchami polimerowymi i wielofunkcyjnym czynnikiem sieciującym. Wiązania sieciujące to przede wszystkim wiązania kowalencyjne i/lub wiąza-

nia jonowe. Oprócz wymienionych typów wiązań w sieci polimerowej chitozanu występują wiązania wodorowe i oddziaływanie hydrofobowe.

W wyniku sieciowania chemicznego chitozanu mogą tworzyć się różnego typu sieci polimerowe [57, 58]. Na Rysunku 11 przedstawiono struktury proponowane przez autorów niniejszej pracy:

- trójwymiarowej sieci polimerowej tworzonej w wyniku reakcji chitozanu i niejonowego czynnika sieciującego (Rys. 11A);
- hybrydowej sieci polimerowej tworzonej z chitozanu i innego polimeru, wzajemnie powiązanych niejonowym czynnikiem sieciującym (Rys. 11B);
- wzajemnie przenikających się sieci polimerowych z chitozanu i innego polimeru, z których jeden jest usieciowany niejonowym czynnikiem sieciującym (Rys. 11C).



Rysunek 11. Struktura sieci polimerowych tworzonych przez: czysty chitozan (A), hybrydową sieć polimerową (B), wzajemnie przenikające się sieci polimerowe (C)

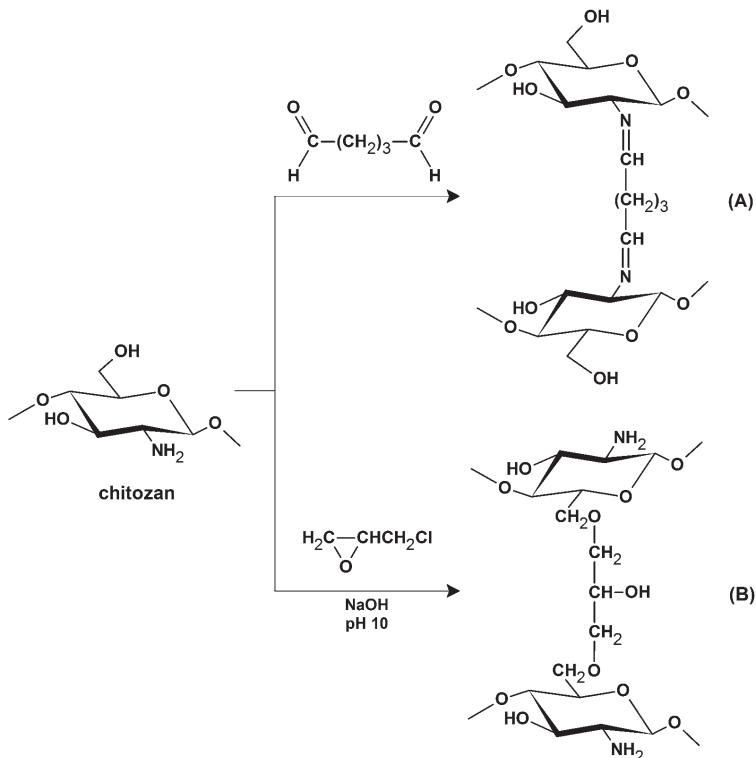
Figure 11. Structure of polymer networks formed by pure chitosan (A), hybrid polymer network (B), semi-interpenetrating networks (C)

Do sieciowania chemicznego chitozanu używane są takie czynniki sieciujące, jak np. dialdehydy (aldehyd glutarowy (GA), glioksal), genipina, epichlorohydryna (ECH), glikol etylenowy, itp. [22, 27, 38, 43, 57–62]. W zależności od rodzaju zastosowanego czynnika sieciującego sieciowanie zachodzi z udziałem grupy aminowej lub grupy hydroksylowej przy atomie C-6 łańcucha.

W przypadku stosowania dialdehydu reakcja sieciowania zachodzi z udziałem grup aminowych chitozanu i grup aldehydowych GA. Produktem reakcji jest kowaleencyjne wiązanie iminowe (Rys. 12 A). Wadą sieciowania chitozanu dialdehydami

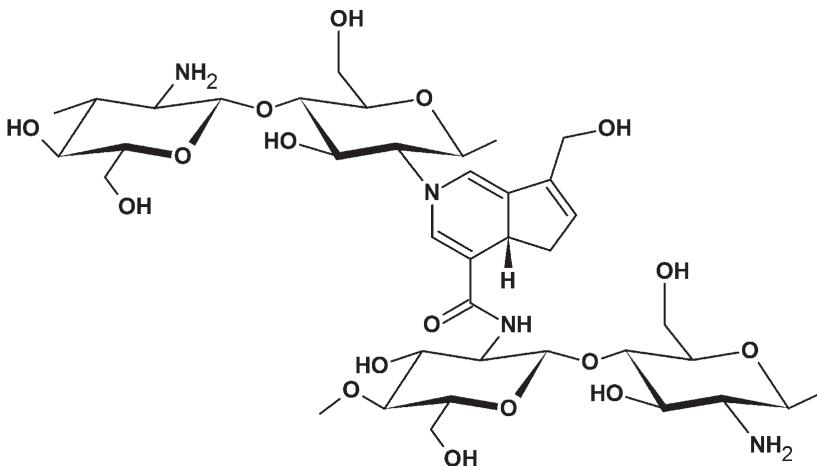
jest ich toksyczność. Aldehyd glutarowy jest neurotoksykczny, natomiast glioksal posiada właściwości mutagenne. Ogranicza to możliwości zastosowania usieciowanego chitozantu w medycynie i farmacji.

W przypadku zastosowania epichlorohydryny w procesie sieciowania bierze udział grupa hydroksylowa chitozantu przy atomie C-6 i cząsteczka ECH, która zawiera bardzo reaktywny pierścień oksiranowy. Produkt końcowy reakcji sieciowania chitozantu przez ECH przedstawiono na Rysunku 12 B. Epichlorohydryna, podobnie jak aldehyd glutarowy, wykazuje silne właściwości toksyczne.



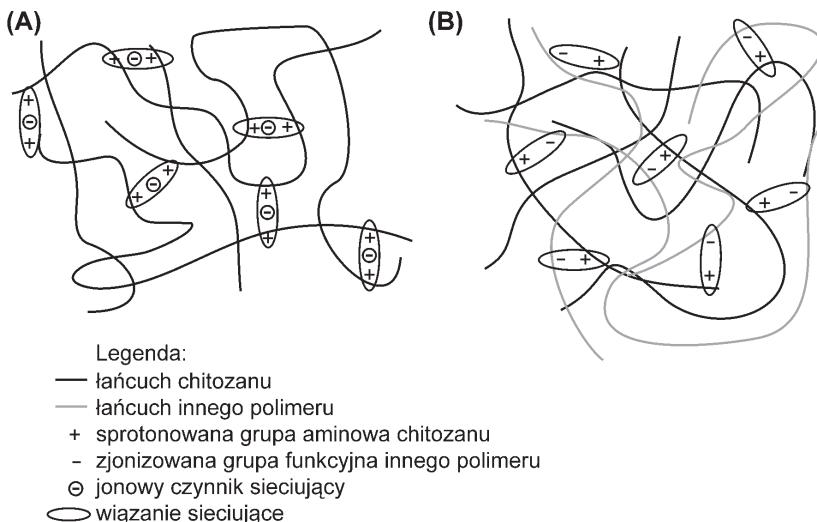
Rysunek 12. Sieciowanie chitozantu przez aldehyd glutarowy (A) i epichlorohydrynę (B)  
Figure 12. Chitosan crosslinking through glutaraldehyde (A) and epichlorohydrin (B)

Ze względu na biokompatybilność i bardzo niską cytotoxisyczność lepszym czynnikiem sieciującym chitozan, szczególnie w przypadku przeznaczenia tego polimeru do zastosowań biomedycznych, jest genipina [59–64]. Genipina jest naturalnym związkiem, pozyskiwanym z *Gardenia jasmonoides*. Związek ten jest ok. 5000–10000 razy mniej toksyczny niż aldehyd glutarowy [64]. Mechanizm procesu sieciowania chitozantu za pomocą genipiny zależy od pH środowiska [28, 63, 64]. Strukturę chitozantu sieciowanego przez genipinę w środowisku kwaśnym przedstawiono na Rysunku 13 [62, 63].



Rysunek 13. Struktura chemiczna chitozantu usieciowanego przez genipinę  
 Figure 13. Chemical structure of chitosan crosslinked with genipin

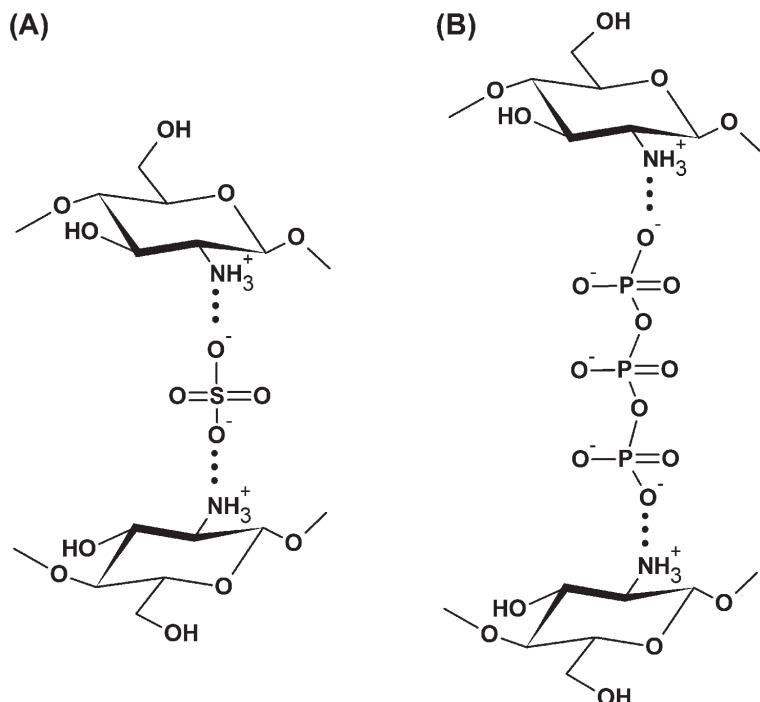
Chitozan jest polimerem kationowym i w środowisku kwaśnym tworzy polikationy, które mogą oddziaływać z ujemnie naładowanymi cząsteczkami lub makrocząsteczkami (anionami lub polianionami), prowadząc do tworzenia trójwymiarowych sieci polimerowych. Zaproponowane przez autorów niniejszej pracy struktury usieciowanego jonowo chitozantu przedstawiono schematycznie na Rysunku 14.



Rysunek 14. Struktura chemiczna chitozantu usieciowanego jonowo poprzez anion (A) oraz polianion (B)  
 Figure 14. Chemical structure of chitosan ionically crosslinked with anion (A) and polyanion (B)

Wśród małocząsteczkowych jonowych czynników sieciujących stosowane były dotychczas jony kompleksowe Pt(II), Pd(II) i Mo(VI), kwas siarkowy i siarczany,

kwas i sole kwasu fosforowego, kwas sulfobursztynowy [57, 61, 62, 65–68]. Sprotonowana grupa aminowa chitozantu, oddziałyując ze zjonizowaną grupą mało-cząsteczkowego czynnika sieciującego, np. kwasem siarkowym lub fosforanem pentasodu, tworzy usieciowany polimer o strukturze przedstawionej na Rysunku 15. Rodzaj substancji sieciującej i jej stężenie, średnia masa cząsteczkowa chitozantu i jego stopień deacetylowania, stężenie roztworu chitozantu (w przypadku sieciowania w roztworze) oraz czas sieciowania mają wpływ na gęstość sieciowania. Metoda sieciowania jonowego jest prosta, tania i nie wymaga stosowania katalizatorów.



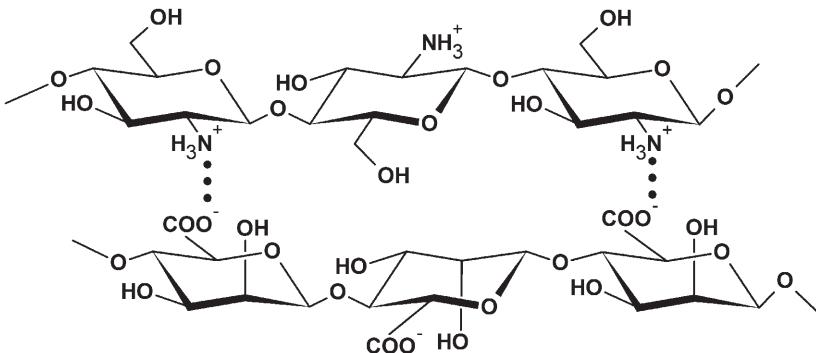
Rysunek 15. Struktura chemiczna chitozantu usieciowanego przez kwas siarkowy (A) i trifosforan pentasodu (B) [65, 66, 68]

Figure 15. Chemical structure of chitosan crosslinked with sulfuric acid (A) and pentasodium tripolyphosphate (B) [65, 66, 68]

W szeregu przypadków stosuje się więcej niż jeden rodzaj środka sieciującego [56, 66, 67]. Zastosowanie dwóch rodzajów czynników sieciujących, tzn. czynników prowadzących równocześnie do sieciowania kowalencyjnego i jonowego, umożliwia dalsze zwiększenie wytrzymałości mechanicznej polimeru, przy zachowaniu jego hydrofilowych właściwości.

Chitozan jako polielektrytolit kationowy zdolny jest do reakcji z różnego typu naturalnymi i syntetycznymi polielektrytolitami anionowymi i tworzenia kompleksów polielektrytolitowych [34, 38, 57, 58, 60, 68–71]. Jako wielkokząsteczkowe jonowe czynniki sieciujące chitozan wykorzystywane były dotychczas polisacharydy (np.

alginian, pektyna, ksantan, karboksymetyloceluloza, kwas hialuronowy), polimery syntetyczne (np. poli(kwas akrylowy), kwas polifosforowy i polifosforany, polilaktyd), DNA i białka. Strukturę chemiczną kompleksów polielektrylitowych chitozan/polielektrylit anionowy przedstawiono na przykładzie kompleksu chitozan/alginatej (Rys. 16).



Rysunek 16. Struktura chemiczna kompleksu polielektrylitowego chitozan/alginatej sodu [68, 71]  
Figure 16. Chemical structure of chitosan/sodium alginate complex [68, 71]

Usieciowany chitozan tworzy się również w procesie radiacyjnego sieciowania [72]. Inicjatorem radiacyjnego sieciowania chitozanu jest strumień elektronów lub promieniowanie gamma. Absorpcja promieniowania przez chitozan powoduje jego homolityczny rozpad na rodniki, jony i cząstki wzbudzone. Wiązania poprzeczne w sieci polimerowej tworzą się w wyniku złożonego mechanizmu z udziałem rodników i/lub jonów. Chitozan może również ulegać fotosieciowaniu, które zachodzi pod wpływem działania promieniowania UV [73]. Sieciowanie chitozanu zachodzi również pod wpływem enzymów, np. peroksydazy, transglutaminazy [23, 73]. Jednym z czynników powodujących sieciowanie chitozanu jest również jego ogrzewanie [73].

#### **3.4. MODYFIKACJA CHITOZANU PRZEZ DEPOLIMERYZACJĘ**

Depolimeryzacja chitozanu, polegająca na rozpadzie polimeru na oligomery i monomery, może zachodzić pod wpływem czynników chemicznych, fizycznych lub enzymów [26, 74–77]. Proces degradacji jest wynikiem rozpadu wiązań glikozydowych w łańcuchu chitozanu. Depolimeryzacja chemiczna chitozanu zachodzi w obecności różnych kwasów, takich jak kwas azotowy(III), chlorowodorowy, fosforowy oraz wolnych rodników (pochodzących np. z rozpadu ditlenku diwodoru, nadsiarczanu potasu lub powstających w reakcji ozonowania). Metody degradacji chemicznej z zastosowaniem kwasów (metody hydrolizy kwasowej) są metodami niespecyficznymi i prowadzą do otrzymania różnego typu oligomerów i dużej ilości monomeru D-glukozoaminy. Bardziej specyfczną metodą degradacji chitozanu

jest depolimeryzacja enzymatyczna, zachodząca w obecności różnych enzymów, np. papainy, lipazy, chitanazy [77]. Proces depolimeryzacji chitozanu zachodzi również pod wpływem takich czynników, jak energia cieplna, promieniowanie gamma, ultradźwięki (ultrasonifikacja) oraz plazma [26]. Procesy degradacji chemicznej chitozanu zachodzą według różnych mechanizmów: hydrolizy kwasowej, reakcji utleniania i redukcji oraz specyficznego mechanizmu z udziałem kwasu azotowego(III). Reakcji depolimeryzacji towarzyszą często inne reakcje uboczne, prowadzące do powstawania różnego typu pochodnych, szczególnie, jeśli proces depolimeryzacji zachodzi według mechanizmu wolnorodnikowego.

Chitozan o niskiej masie cząsteczkowej oraz oligomery chitozanu o różnym stopniu N-acetylacjii są obiektem zainteresowania medycyny, biotechnologii, przemysłu kosmetycznego, rolnictwa i innych dziedzin.

### 3.5. TWORZENIE KOMPOZYTÓW OPARTYCH NA CHITOZANIE

Nanokompozyty oparte na chitozanie otrzymuje się metodami stosowanymi powszechnie do otrzymywania nanokompozytów polimerowych, wymienionymi w rozdz. 1. Rodzaj zastosowanej metody zależy głównie od zastosowanego nanopełniacza. W literaturze istnieją doniesienia dotyczące chitozanu zawierającego różnego typu nanopełniacze, m.in. glinki, hydroksyapatyt, nanocząstki różnych metali, nanorurki węglowe.

Nanokompozyty oparte na chitozanie są ciekawą i obiecującą grupą nanokompozytów, szczególnie ze względu na ich zastosowania medyczne, m.in. w inżynierii tkanki kostnej, jako materiały antybakterijne i regeneracyjne [78–81].

### UWAGI KOŃCOWE

Problem składowania i utylizacji odpadów oraz zwiększająca się troska o ochronę środowiska naturalnego wpłynęły na wzrost zainteresowania polimerami pochodzenia naturalnego. Do polimerów naturalnych należy m.in. chitozan, produkt deacetylacjii chityny. Chitozan posiada wiele cennych właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych, takich jak: bioaktywność, biodegradowalność, biogodność, nietoksyczność, zdolność do chelatowania i wiązania jonów metali i substancji organicznych oraz błono- i włóknotwórczość. Wymienione właściwości chitozanu decydują o jego różnorodnym zastosowaniu, począwszy od różnych gałęzi przemysłu, poprzez agrotechnikę, biotechnologię, włókiennictwo, po medycynę i farmację. Z powyższych względów chitozan jest bardzo częstym obiektem badań.

Chitozan posiada jednak szereg właściwości fizykochemicznych, które ograniczają jego zastosowanie w pewnych obszarach. Aby zmienić szereg właściwości fizykochemicznych chitozanu i jednocześnie zwiększyć obszar jego zastosowania, poddaje się go różnorodnym procesom modyfikacji chemicznej i fizycznej.

W niniejszej pracy przedstawiono krótki przegląd głównych metod modyfikacji chitozantu, zwracając szczególną uwagę na modyfikację chemiczną. Spośród materiałów otrzymywanych w wyniku modyfikacji fizycznej scharakteryzowano krótko otrzymywanie kompozytów opartych na chitozanie. Podkreślić należy, że corocznie ukazuje się wiele prac poświęconych otrzymywaniu, badaniu struktury oraz właściwości fizykochemicznych i biologicznych różnego typu produktów modyfikacji chitozantu, przeznaczonych do konkretnych zastosowań przemysłowych, medycznych i farmaceutycznych.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M.H. Struszczyk, Polimery, 2002, **47**, 316.
- [2] M.G. Peter, [w:] *Biopolymers*, E.J. Vandamme, S. De Baets (red.), Wiley, Weinheim, 2002, t. 6, s. 481.
- [3] M. Mucha, *Chitozan – wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2010.
- [4] T.S. Demina, A.B Gilman, T.A. Akopova, A.N. Zelenetskii, High Energ. Chem., 2014, **48**, 293.
- [5] M. Rinaudo, Prog. Polym. Sci., 2006, **31**, 603.
- [6] M.H. Struszczyk, Polimery, 2002, **47**, 396.
- [7] T. Chakrabarty, M. Kumar, V.K. Shahi, [w:] *Biopolymers*, M. Elnashar (red.), InTech 2010, rozdz. 10, s. 201. Dostępny w Internecie: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/chitosan-based-membranes>.
- [8] S.K. Kim (red.), *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, CRC Press, Boca Raton 2011.
- [9] Z. Florjańczyk, S. Penczek (red.), *Chemia polimerów*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1995, t. II.
- [10] J.F. Rabek, *Współczesna wiedza o polimerach*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
- [11] K. Kelar, *Modyfikacja polimerów*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 1991.
- [12] D. Braun, H. Cherdron, M. Rehahn, H. Ritter, B. Voit, *Polymer Synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, Methods, Experiments*, Springer, Berlin, Heidelberg 2001.
- [13] J.J. Meister, *Polymer Modification: Principles, Techniques and Applications*, Marcel Dekker, New York 2000.
- [14] W. Królikowski, Z. Rosłaniec, Kompozyty, 2004, **4**, 3.
- [15] Z. Florjańczyk, M. Dębowksi, E. Chwojnowska, K. Łokaj, J. Ostrowska, Polimery, 2009, **54**, 609.
- [16] E. Spasówka, E. Rudnik, J. Kijeński, Polimery, 2006, **5**, 615.
- [17] R.L. Lundblad, [w:] *Chemical Modification of Biological Polymers*, R.L. Lunberg (red.), CRC Press, Boca Raton 2011, s. 383.
- [18] P. Tomasik, [w:] *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*, P. Tomasik (red.), CRC Press, Boca Raton, 2004, s. 123.
- [19] I. Cumpstey, ISNR Org. Chem., vol. 2013, article ID 417672.
- [20] H. Struszczyk, [w:] *Chemia polimerów*, Z. Florjańczyk, S. Penczek (red.), Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1998, t. III, s. 57.
- [21] G.G. D'Ayala, M. Malinconico, P. Laurienzo, Molecules, 2008, **13**, 2069.
- [22] K. Kurita, Prog. Polym. Sci., 2001, **26**, 1921.
- [23] H. Sashiwa, S. Aiba, Prog. Polym. Sci., 2004, **29**, 887.
- [24] K. Kurita, Mar. Biotechnol., 2006, **8**, 203.

- [25] V.K. Moruya, N.N. Inamdar, *React. Funct. Polym.*, 2008, **68**, 1013.
- [26] K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan, *Trends Food Sci. Tech.*, 2007, **18**, 117.
- [27] D. Sahoo, P.L. Nayak, [w:] *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*, S. Kalia, L. Averous (red.), Wiley, Hoboken 2011, s. 129.
- [28] J. Li, L. Deng, F. Yao, [w:] *Chitosan – Based Hydrogels. Functions and Applications*, K. Yao, J. Li, F. Yao, Y. Yin (red.), CRC Press, Boca Raton 2012, s. 39.
- [29] J. Ji, L. Wang, H. Yu, Y. Chen, Y. Zhao, H. Zhang, W.A. Amer, Y. Sun, L. Huang, M. Saleem, *Polym. Plast. Technol. Eng.*, 2014, **53**, 1494.
- [30] N. Chopin, X. Guillory, P. Weiss, J. Le Bideau, S. Collicet-Jouault, *Curr. Org. Chem.*, 2014, **18**, 867.
- [31] A. Anitha, N.S. Rejinold, J.D. Bumgardner, S.V. Nair, R. Jayakumar, [w:] *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, B. Sarmento, J. das Neves (red.), Wiley, Chichester, 2012, s. 107.
- [32] D. Thomas, S. Thomas, [w:] *Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties and Applications*, A. Dufresne, S. Thomas, L.A. Pothen (red.), Wiley, Hoboken 2013, s. 33.
- [33] A. Jain, A. Gulbake, S. Shilpi, A. Jain, P. Hurkat, S.K. Jain, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2013, **30**, 91.
- [34] R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, *Adv. Polym. Sci.*, 2005, **186**, 151.
- [35] N.M. Avec, J.F. Mano, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2008, **43**, 401.
- [36] M. Prabaharan, *J. Biomater. Appl.*, 2008, **23**, 5.
- [37] M.E.I. Badawy, E.I. Rabea, *Int. J. Carbohyd. Chem.*, vol. 2011, article ID 460381.
- [38] T.K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, A.H. Badwaik, D.K. Tripathi, *Acta Pharm. Sinic. B*, 2012, **2**, 439.
- [39] S.K. Yong, M. Srivastava, P. Srivastava, A. Kunhikrishnan, N. Bolan, *Rev. Environ. Contam. T.*, 2015, **233**, 1.
- [40] J. Ma, Y. Sahai, *Carbohyd. Polym.*, 2013, **92**, 955.
- [41] S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, **59**, 46.
- [42] A. Owczarczak, G. Schroeder, [w:] *Chemiczna funkcjonalizacja powierzchni dla potrzeb nanotechnologii*, G. Schroeder (red.), Wydawnictwo Cursiva, Poznań 2011, s. 131.
- [43] G.Z. Kyzas, D.N. Bikarisid, *Mar. Drugs*, 2015, **13**, 312.
- [44] J. Wang, C. Chen, *Bioresource Technol.*, 2014, **160**, 129.
- [45] J. Wang, C. Chen, *Carbohyd. Polym.*, 2014, **113**, 115.
- [46] D.J. Macquarrie, J.J.E. Hardy, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, **44**, 8499.
- [47] S. Ahmed, S. Ikram, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, **6**, 14.
- [48] I. Aranaz, R. Harris, A. Heras, *Curr. Org. Chem.*, 2010, **14**, 308.
- [49] V.K. Mourya, N.M. Inamdar, A. Tivari, *Adv. Mat. Lett.*, 2010, **1**, 11.
- [50] R. Jayakumar, N. Selvamurugan, S.V. Nair, S. Tokura, H. Tamura, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2008, **43**, 221.
- [51] R. Jayakumar, N. Nwe, S. Tokura, H. Tamura, R. Jayakumar, *J. Biol. Macromol.*, 2007, **40**, 175.
- [52] S.K. Yong, N.S. Bolan, E. Lombi, W. Skinner, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 2013, **43**, 1741.
- [53] R. Jayakumar, M. Prabaharan, R.L. Reis, J.F. Mano, *Carbohyd. Polym.*, 2005, **62**, 142.
- [54] M.J. Zohuriaan-Mehr, *Iran. Polym. J.*, 2005, **14**, 235.
- [55] M.W. Sabaa, [w:] *Polysaccharide Based Graft Copolymers*, S. Kalia, M.W. Sabaa (red.), Springer, Berlin, Heidelberg 2013, s. 111.
- [56] N.M. Alves, J.F. Mano, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2008, **43**, 401.
- [57] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **57**, 19.
- [58] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **57**, 35.
- [59] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, C.C. Su, C.K. Peng, *Polymer*, 2003, **44**, 6521.

- [60] Y. Yin, J. Li, [w:] *Chitosan - Based Hydrogels: Functions and Application*, K. Yao, J. Li., F. Yao, Y. Yin (red.), CRC Press, Boca Raton 2012, s. 179.
- [61] M.C. Chen, F.L. Mi, Z.X. Liao, H.W. Sung, *Adv. Polym. Sci.*, 2011, **243**, 185.
- [62] S. Aggarwal, S. Pahuja, *Int. Res. J. Pharm.*, 2013, **4**, 45.
- [63] R.A.A. Muzzarelli, *Carbohyd. Polym.*, 2009, **77**, 1.
- [64] F.L. Mi, S.S. Shyu, C.K Peng, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.*, 2005, **43**, 1985.
- [65] J. Ostrowska-Czubenko, M. Pieróg, *Pol. J. Appl. Chem.*, 2009, **53**, 155.
- [66] J. Ostrowska-Czubenko, M. Pieróg, M. Gierszewska-Drużyńska, *Pol. J. Appl. Chem.*, 2011, **55**, 49.
- [67] E. Dashtimoghadama, M.M. Hasani-Sadrabadi, H. Moaddele, *Polym. Adv. Technol.*, 2010, **21**, 726.
- [68] M. Gierszewska-Drużyńska, *Trójskładnikowe membrany hydrożelowe do zastosowań biomedycznych i przemysłowych*, rozprawa doktorska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, 2010.
- [69] A.V. Il'ina, V.P. Varlamov, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2005, **41**, 9.
- [70] Y. Luo, Q. Wang, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **64**, 353.
- [71] M. Gierszewska-Drużyńska, J. Ostrowska-Czubenko, *Polimery*, 2007, **52**, 517.
- [72] J.M. Rosiak, I. Janik, S. Kadłubowski, M. Kozicki, P. Kujawa, P. Stasica, P. Ułański, *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications. The International Atomic Energy Agency's Report*, 2002, [on line], [dostęp 2016-07-10]. Dostępny w Internecie: AEA report - Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical ... - MiTR mitr.p.lodz.pl/biomat/old\_site/raport/book\_index.html
- [73] M. Padmanabhan, L.S. Nair, [w:] *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*, P.K. Dutta (red.), Springer, New Delhi. Heidelberg, New York 2016, s. 3.
- [74] V.K. Mourya, N.N. Inamdar, Y.M. Choudhari, *Polym. Sci.*, 2011, **53**, 583.
- [75] G. Lodhi, Y.S. Kim, J.W. Hwang, S.K. Kim, Y.J. Jeon, J.Y. Je, C.B. Ahn, S.H. Moon, B.T. Jeon, P.J. Park, *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, article ID 654913.
- [76] B.B. Aam, E.B. Heggset, A.L. Norberg, M. Sørlie, K.M. Vårum, V.G.H. Eijssink, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 1482.
- [77] S.K. Kim, N. Rajapakse, *Carbohyd. Polym.*, 2005, **62**, 357.
- [78] D. Feldman, J. *Macromol. Sci.*, Part A, 2016, **53**, 55.
- [79] R.A. Hule, D.J. Pochan, *MRS Bull.*, 2007, **32**, 354.
- [80] E. Stodolak, A. Frączek-Szczypta, M. Błażewicz, *Kompozyty*, 2010, **10**, 322.
- [81] K. Pazdan, K. Pielichowska, K. Gryń, J. Chłopek, *Eng. Biomater.*, 2014, **7**, 31.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 września 2016



## NOWE WYDAWNICTWA



Z.M. Migaszewski, A. Gałuszka, „*Geochemia środowiska*”, PWN Warszawa 2016, wyd. pierwsze, oprawa miękka, str. 637

Jest zastanawiające, jak mało studentom chemii mówi się o geochemii oraz jak mało studentom geologii mówi się o chemii. Te dwie nauki są ze sobą związane i raczej się bez siebie nie mogą obejść, a już z pewnością geologia jest bardzo uboga bez chemii. Publikacja prof. Agnieszki Gałuszki i prof. Zdzisława Migaszewskiego z UJK w Kielcach jest kontynuacją, czy może raczej twórczym, rozszerzonym remake wcześniejszych podręczników tych Autorów, a mianowicie „Zarysu geochemii środowiska” z 2003 r. i „Podstawa geochemii środowiska” z 2007 r.

Jest to kompendium wiedzy na temat bardzo szeroko pojętego chemicznego rozumienia procesów geologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień związanych z ochroną środowiska naturalnego, wpływu świata żywego na świat nieożywiony itp. Książka liczy około 500 stron tekstu, uzupełnionego obszerną, imponującą literaturą przedmiotu (kilkaset pozycji), szczegółowym skorowidzem terminów oraz niemal 40 stronami dodatku, zawierającego kolorowe zdjęcia – ilustracje do zagadnień poruszanych w tekście. Szczególną cechą tej książki, wyraźnie odróżniającą ją od innych podobnych opracowań jest duży nacisk położony na antropogeniczne zmiany środowiskowe, elementy badań środowiskowych, zmiany globalne spowodowane przez rośliny, zwierzęta i ludzi.

Książkę rozpoczyna wprowadzenie do geologii i hydrologii. Już w rozdziale o oceanicznych źródłach hydrotermalnych pojawiają się pierwsze informacje o ekosystemach – widomy znak zainteresowania Autorów związkami między przyrodą nieożywioną i ożywioną. Począwszy jednak od rozdziału 6 („Czynniki geochemiczne i klasyfikacje pierwiastków”) pojawiają się elementy klasycznej geochemii. Autorzy omawiają więc podstawowe pojęcia z zakresu krystalografii, typy wiązań chemicznych, szkoda jednak, że bardzo pobieżnie. Dalej omówiono pojęcie pH i jego związek z rozpuszczalnością, co ma fundamentalne znaczenie dla geologii oraz badań środowiskowych w ogólności. To samo dotyczy pojęcia potencjału red-ox. Jeżeli chcielibyśmy się trzymać tego schematu postępowania, to można by oczekiwać osobnego podrozdziału poświęconego związkom kompleksowym, te jednak omówiono dość zdawkowo w rozdziale pod nieco nazbyt ogólnie sformułowanym tytułem „Roztwory”. Autorzy w ogóle nie wspominają o energetyce reakcji chemicznych, choć później w tekście pojawiają się pojęcia takie, jak reakcja egzo- czy endotermiczna. To samo dotyczy zagadnień kinetycznych. Także naturalne przemiany promieniotwórcze omówiono nieco nazbyt pobieżnie, ten podrozdział zajmuje zaledwie pół strony. A przecież nie trzeba w tym miejscu wyjaśniać, dlaczego ten temat jest ważny w geologii, zresztą pojawia się później wielokrotnie w rozdziale „Występowanie izotopów w środowisku przyrodniczym”, który dla niezorientowanego w temacie będzie mało zrozumiałym bez odpowiedniego wprowadzenia.

---

Starannie i ze znanstwem omówiono natomiast procesy chemiczne zachodzące w litosferze. Wszystkie omawiane procesy są ilustrowane odpowiednimi reakcjami chemicznymi. Występując z pozy- cji dydaktyka postulowałbym jednak unikanie ułamkowych współczynników stekiometrycznych (np.  $\frac{1}{4}\text{O}_2$  czy  $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  na str. 136).

Obszerny rozdział poświęcony geochemicznej oraz toksykologicznej charakterystyce wybranych pierwiastków poprzedzony jest omówieniem najważniejszych obiegów pierwiastków (N, P, S, O, C i H) na kuli ziemskiej („Globalne cykle geochemiczne”). Słowo „wybrane” jest chyba nazbyt dosłownie traktowane przez Autorów, bo nie widać przyczyny, dla której nie ma wśród omawianych pierwiastków złota (ale jest platyna) czy helu (występuje w litosferze, głównie w gazie ziemnym).

Bardzo dokładnie omówiono metodykę pobierania i badania próbek środowiskowych oraz metody analityczne stosowane w geochemii. Tutaj jednak logiczne byłoby wydzielenie rozdziału dotyczącego kontroli jakości wraz z omówieniem analizy niepewności, bo obecnie jest to informacja „wciśnięta” pomiędzy różne omawiane techniki badawcze. Taki rozdział powinien się chyba znaleźć raczej w części „Statystyczna interpretacja wyników badań środowiska przyrodniczego”. Ten ostatni z kolei wymaga chyba uzupełnienia o niektóre wzory.

Dalsze części dotyczą m.in. takich zagadnień, jak geochemia sądowa, związek między zdrowiem a składem chemicznym gleby, skał, wód i in.

Reasumując, jest to bardzo obszerne opracowanie, które może służyć nie tylko studentom i specjalistom z różnych dziedzin, ale wszystkim zainteresowanym zjawiskami, jakie zachodzą w naszym naturalnym środowisku.

Jacek Gliński  
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

„Wybrane metody badania materiałów. Badanie metali i stopów”, W. Kubiński, PWN Warszawa 2016, wyd. pierwsze, oprawa miękka, str. 319

Może nieco dziwić, że tę książkę omawia się w czasopiśmie chemicznym. Jest to obszerne kompendium wiedzy na temat metod badania metali, stopów i spieków przydatnych raczej materiałoznawcom i technologom, a nie chemikom. Omówiono tu wprawdzie podstawowe badania fizyczne, jakim poddaje się metale i stopy metali (dylatometria, gęstość, porowatość, obserwacje za pomocą mikroskopii optycznej i elektronowej), lecz stanowią one jedynie niewielki fragment tekstu. Autor skupił się na badaniach technologicznych i mechanicznych: próbylemęczeniowe i wytrzymałościowe, pomiary twardości, korożji bimetalicznej i naprężeniowej itp. Nie oznacza to wcale, że nie znajdziemy tutaj elementów chemii, bowiem elementy badań chemicznych czy wiedzy chemicznej użytecznej w badaniach metali przewijają się przez cały tekst. Choćby z tego powodu tę lekturę można śmiało polecić chemikom. Niemniej, w tym opracowaniu skupimy się przede wszystkim na aspektach i metodach chemicznych badania metali i stopów.

Strukturę metalu Autor od samego początku wiąże z budową na poziomie atomowych, omawiając typowe sieci krystaliczne metali, przemiany fazowe tych sieci, wpływ defektów i dodatków stopowych itp. (rozdział „Podstawowe informacje o metalach”), ale traktując te zagadnienia nieco nazbyt pobieżnie i raczej bez wyjaśnienia mechanizmów, jakie nimi rządzą. Dla przykładu: na str. 38–39 omówiono wpływ budowy krystalograficznej metalu na jego plastyczność (najbardziej plastyczne są metale krystalizujące w układzie regularnym, zwłaszcza płasko centrowanym, a najmniej w romboedrycznym, ponadto dodatki stopowe i zanieczyszczenia, np. wodór, fosfor, siarka itp., ją obniżają), jednak nie podano żadnego wyjaśnienia tego zjawiska. Podobny brak występuje także w innych miejscach. Jeżeli to wydawnictwo ma służyć także celom dydaktycznym, powinno zawierać – oprócz faktów – również ich wyjaśnienie.

Autor, prof. Wiktor Kubiński a krakowskiej AGH, jest wybitnym materiałoznawcą specjalizującym się w badaniach właściwości mechanicznych i użytkowych metali i stopów, więc nieco pobieżne traktowanie niektórych zagadnień jest zrozumiałe. Niemniej w następnych edycjach tej książki dobrze byłoby dodać wyjaśnienie przyczyn tych czy innych zjawisk. Szczególnie potrzebne jest to w rozdziale 5 (“Metalograficzne badania metali i stopów”). Badania makroskopowe polegają na trawieniu powierzchni próbki odpowiednio dobranymi odczynnikami i obserwowaniu ujawniających się zróżnicowań wielkości ziarna, obecności różnych faz czy defektów. Ten rozdział potraktowano nazbyt pobieżnie, z lektury z trudem można się zorientować, jak wygląda powierzchnia po wytrawieniu i czy interpretacja wyników jest łatwa czy trudna. Aż się prosi, aby tabelę 5.1 uzupełnić o fotografie przykładowych wytrawionych powierzchni wraz z opisem i interpretacją. To samo dotyczy tabeli 5.6 (obserwacje mikrostruktury). Jedyny przykład – rys. 5.4 – pozostawiono bez dokładnego opisu, nie wiadomo więc jak i czym trawiono próbkę przed badaniem oraz jakim właściwie stopem była próbka.

Nieproporcjonalnie mało miejsca poświęcono badaniom nieniszczącym (rozdz. 7), podczas gdy w wielu przypadkach są one niezastąpione, zwłaszcza wtedy, gdy nie można uszkodzić badanego przedmiotu. Przykładem jest defektoskopia ultradźwiękowa. Można mieć nawet pretensje do Autora o zilustrowanie wyglądu typowego defektoskopu sprzędem czeskiej firmy Starmans, podczas gdy istnieją liczne i równie dobre – o ile nie lepsze – urządzenia rodzime (np. firm ZBM Ultra, Metrison, Kalla, Max:control i in.), które na pewno warto przy okazji zareklamować.

Powysze uwagi krytyczne bynajmniej nie umniejszają wartości książki. Jest ona obszerna (ponad 300 stron) i bogato ilustrowana. Wrażenie robi już sam alfabetyczny spis omówionych w pracy metod badań. Większość zagadnień omówiono dokładnie i z niewątpliwym głębokim znanstwem przedmiotu.

Nie można mieć też zastrzeżeń do strony edytorskiej: praktycznie nie ma błędów literowych, interpunkcyjnych, o innych nawet nie wspominając, a sam tekst jest napisany prostym, zwięzłym i jasnym, jak na ten stopień specjalizacji, językiem. Wszystko to sprawia, że jest kompendium przydatne inżynierom

mającym cokolwiek wspólnego z metalami, stopami i ich obróbką oraz że będzie to doskonały podręcznik dla studentów politechnik.

Warto tu dodać, że niniejsze opracowanie jest dopiero pierwszą częścią niezmiernie ambitnie pomyślanego cyklu „Wybrane metody badania materiałów”. Następne tomy będą poświęcone tworzywom sztucznym, drewnu i ceramikom.

*Jacek Gliński  
Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego*

## INFORMACJE

### PATRONAT MEDIALNY

„Wiadomości Chemiczne” objęły patronatem medialnym ostatnie publikacje książkowe Wydawnictwa Naukowego PWN SA, które mogą być niezwykle interesujące i przydatne dla społeczności polskich chemików:

Wiktor Kubiński

„Wybrane metody badania materiałów. Badanie metali i stopów.”

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek

„Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki.”

Zdzisław Migaszewski, Agnieszka Gałuszka

„Geochemia środowiska”

Robert J. Whitehurst, Marten Van Oort

„Enzymy w technologii spożywczej”

Jan F. Rabek

„Współczesna wiedza o polimerach. Tom 1. Budowa strukturalna polimerów i metody badawcze.”

Jan F. Rabek

„Współczesna wiedza o polimerach. Tom 2. Polimery naturalne i syntetyczne, otrzymywanie i zastosowania.”

Praca zbiorowa pod redakcją Anny Swiderskiej-Środy, Witolda Wojkowskiego,

Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego

„Świat nanocząstek”

Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej

„Nanotechnologia w praktyce”

W najbliższych numerach czasopisma ukażą się recenzje wyżej wspomnianych książek.

---

---

11th International Seminar on Thermal Analysis and Calorimetry to the memory of Prof. St. Bretsznajder

Płock, 26–29 września 2016 r.

W dniach 26–29 września 2016 roku w Politechnice Warszawskiej Filii w Płocku odbyła się konferencja naukowa – 11<sup>th</sup> International Seminar on Thermal Analysis and Calorimetry to the memory of Prof. St. Bretsznajder. Seminarium zostało zorganizowane przez Instytut Chemii Wydziału Budownictwa, Mechaniki i Petrochemii Politechniki Warszawskiej Filii w Płocku przy współpracy z Polskim Towarzystwem Kalorymetrii i Analizy Termicznej im. W.Świętosławskiego (PTKAT). Głównymi sponsorami Seminarium byli: Urząd Miasta Płocka i Polski Koncern Naftowy ORLEN S.A. Patronat nad tym wydarzeniem naukowym został objęty przez JM Rektora Politechniki Warszawskiej Profesora Jana Szmidta oraz Prezydenta Miasta Płocka Andrzeja Nowakowskiego.

Tematyka Seminarium obejmowała zagadnienia związane z zastosowaniami metod takich jak analiza termiczna i kalorymetria, także w połączeniu z innymi technikami, w różnych kierunkach badawczych. W skład Komitetów Naukowego i Honorowego konferencji weszli wiodący przedstawiciele nauki z kraju i z zagranicy. Przewodniczącą Seminarium była Prof. Barbara Pacewska. Komitet Organizacyjny stanowili pracownicy Zakładu Podstaw Chemii Instytutu Chemii Politechniki Warszawskiej w Płocku.

Organizacja w Płocku naukowych seminariów pamięci wybitnego polskiego chemika Profesora St. Bretsznajdera ma już blisko 40-letnią tradycję. Pierwsze tego typu spotkanie naukowe odbyło się w 1977 roku w dziesiątą rocznicę śmierci wybitnego naukowca, chemika, Prof. Stanisława Bretsznajdera. W ciągu lat tematyka Seminarium rozszerzała się, dostosowując się do aktualnych trendów naukowych. Obecnie obejmuje niemal wszystkie dziedziny chemii, a wspólnym mianownikiem jest wykorzystywanie w badaniach różnych metod analizy termicznej i kalorymetrii.

W Seminarium uczestniczyło ponad 100 osób reprezentujących wiodące ośrodki naukowe w kraju, a także goście zagraniczni z Bułgarii, Czech, Litwy, Rosji, Serbii, Słowacji i Węgier. W konferencji brali udział przewodniczący kilku zagranicznych towarzystw naukowych o profilach analogicznych do działalności PTKAT. Pośród uznanych autorytetów w dziedzinie analizy termicznej i kalorymetrii w konferencji uczestniczyła też duża grupa młodych przedstawicieli nauki.

Pierwszy wykład pt. „Company overview, existing situation and future trends” wygłosił Pan Piotr Baranowski z PKN Orlen S.A. Wykład ten, mimo iż nie do końca związany z tematyką Seminarium, przybliżył uczestnikom konferencji zagadnienia dotyczące rozwoju przemysłu rafineryjnego i petrochemicznego w Polsce.

W czasie trzech dni obrad zaprezentowano w sumie, w formie referatów, komunikatów i posterów, 122 prace naukowe. Wśród przedstawionych referatów połowa była prezentowana przez przedstawicieli nauki z zagranicy. Dyskutowane zagadnienia dotyczyły zastosowań analizy termicznej i kalorymetrii w różnych kierunkach

badawczych, takich m.in. jak: badania rozkładu termicznego związków chemicznych, struktury ciał stałych, hydratacji cementu i innych spoiw, równowag fazowych, właściwości związków kompleksowych, szkieł, polimerów, leków, sorbentów i innych.

Streszczenia prezentowanych prac zostały opublikowane w materiałach seminarystycznych. W czasie konferencji trwały też prezentacje firm dystrybuujących nowoczesną aparaturę badawczą: HAAS, Linseis, METTLER-TOLEDO Sp. z o.o., NETZSCH Instrumenty Sp. z o.o., TA INSTRUMENTS.

Podobnie jak w latach ubiegłych, planuje się wydanie specjalnego numeru *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, w którym wydrukowane zostaną wybrane, poddane wcześniejszej pełnej procedurze recenzyjnej, publikacje prac prezentowanych na Seminarium. Edytorem specjalnego numeru *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* będzie Prof. Barbara Pacewska.



## INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

### CENY PRENUMERATY NA ROK 2016

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2016 r. będzie wynosiła **231 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2016 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

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

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

- Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł  
*Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996*, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł  
*Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996*, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł  
I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł  
K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł  
Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowe*, red. B. Burczyk, cena 18 zł  
*Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł  
I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł  
M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.  
Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.  
Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł  
*Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994)*, red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.  
*Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi*, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.  
Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.  
*Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I.* Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.  
*Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II.* Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna  
*Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w rozwiązaniach*, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.  
*Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzżeń spinowo-spinowych*. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

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

## REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPISMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

### 1. Informacje ogólne

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

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesyłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

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

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przesyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wynierane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216\\_MNiSW\\_broszura\\_210x210.pdf](http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNiSW_broszura_210x210.pdf).
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwriting” (któro wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

### **3. Koszty**

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

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

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

### **4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku**

#### **4.1. Wymagania merytoryczne**

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

#### **4.2. Wymagania techniczne składu tekstu**

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

- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),  
– dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.
- **Tabele, rysunki, fotografie**  
Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczotki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.  
Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).  
Wszystkie fotografie – należy przesyłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielcości co najmniej 300 dpi.
- **Piśmiennictwo cytowane**  
Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.  
W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.  
[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.  
[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.  
W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.  
[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.  
[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999  
W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.  
[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie:  
<http://www.....>

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

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

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

- 1 plik tekstu zredagowanego zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesyłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

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

Na etapie przygotowania szczotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkował **czarno-białym wydrukiem wersji papierowej**. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesyłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

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

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*



## SPIS TREŚCI

Nowi członkowie Rady Redakcyjnej .....	561
Zmiany w składzie Komitetu Redakcyjnego .....	562
Maria CIEŚLAK-GOLONKA: W poszukiwaniu układu okresowego dla materii w skali nano .....	563
Maria OWIŃSKA: Skręty zwrotne w peptydach i białkach. Mimetyki skrętów zwrotnych. Część 1 ...	597
Monika KADELA-TOMANEK, Elwira CHROBAK, Ewa BĘBENEK, Agnieszka LUBCZYŃSKA, Szymon SIUDAK, Anna WÓJCIK, Agnieszka OTULAKOWSKA, STANISŁAW BORYCZKA: Aktywność biologiczna związków acetylenowych pochodzenia naturalnego .....	613
Sylwia STUDZIŃSKA, Rafał ROLA, Filip ŁOBODZIŃSKI, Katarzyna KRZEMIŃSKA: Chromatograficzna analiza związków budujących kwasy nukleinowe .....	633
Jadwiga OSTROWSKA-CZUBENKO, Milena PIERÓG, Magdalena GIERZEWSKA: Modyfikacja chitozanu – krótki przegląd .....	657
<b>Nowe wydawnictwa .....</b>	<b>681</b>
<b>Informacje .....</b>	<b>685</b>

## W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

- Krzysztof BULENGER, Bogumił BIERNACKI, Dorota Marta KRASUCKA, Jakub SZUMIŁO, Beata CUVELIER:  
Przegląd zastosowań spektroskopii bliskiej podczerwieni w analizie wilgotności śladowej w produktach leczniczych weterynaryjnych immunologicznych  
Joanna WĄTEŁY, Henryk KOZŁOWSKI: Polihistydylowe sekwencje z motywem his-tag – ich rola i biologiczne znaczenie oddziaływanie z jonami metali