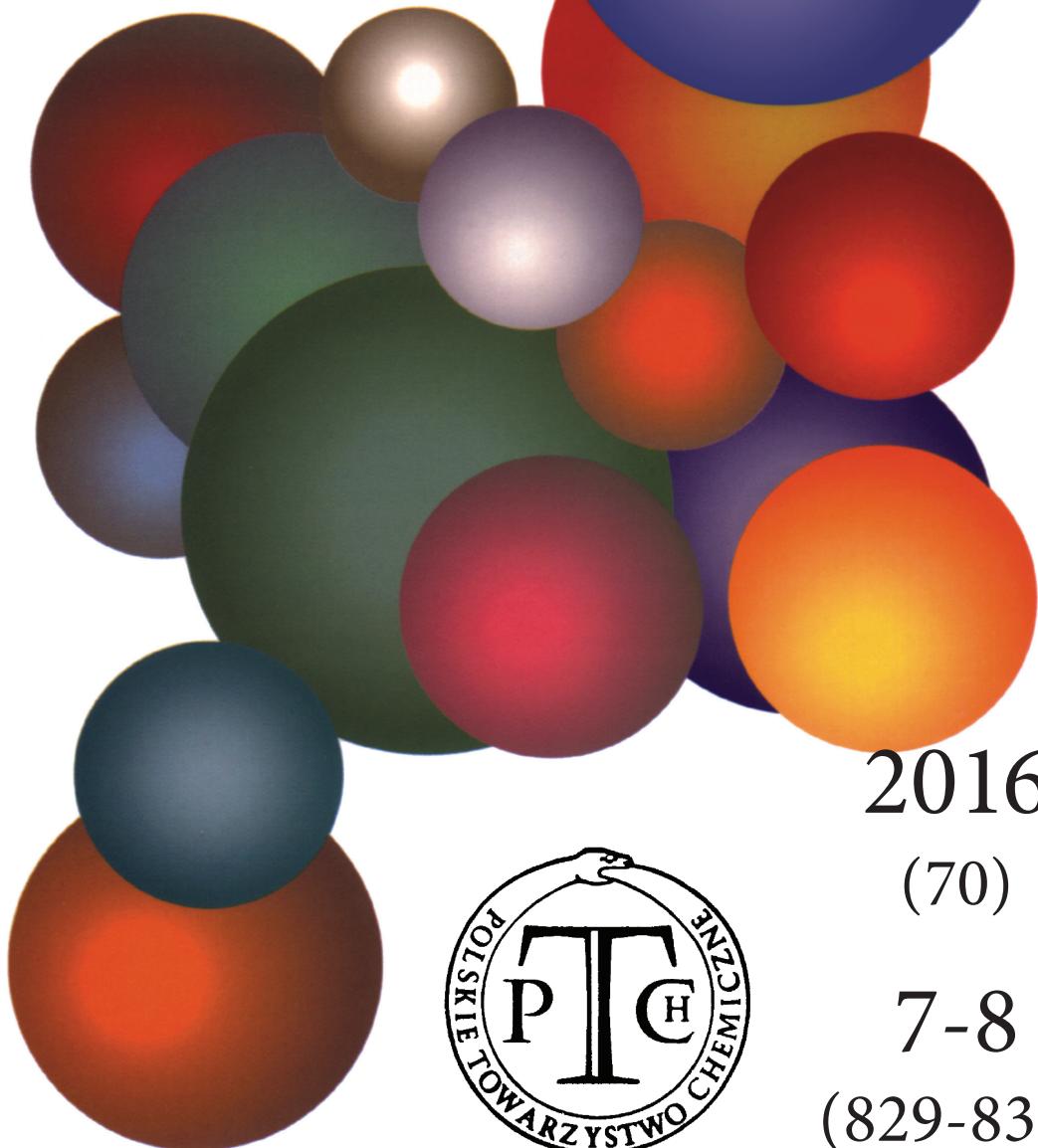


WIADOMOŚCI *chemiczne*

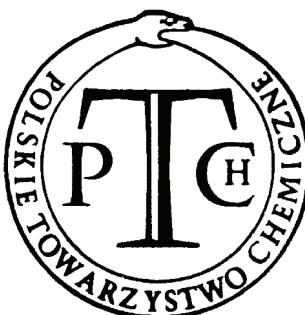


2016

(70)

7-8

(829-830)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

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

KOMITET REDAKCYJNY

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

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĘTEK-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 sierpniu 2016

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

WSPOMNIENIE O PROFESORZE JÓZEFIE HURWICU (1911–2016)



Profesor Józef Hurwic jako dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej

27 lipca 2016 roku zmarł w Paryżu w wieku 105 lat Profesor Józef Hurwic. Był najstarszym polskim profesorem i wybitnym popularyzatorem nauki. Jako znany profesor Politechniki Warszawskiej zajmował ważne stanowiska, był członkiem honorowym Komitetu Historii Nauki Polskiej Akademii Nauk, członkiem wielu polskich i zagranicznych towarzystw naukowych, m.in. Europejskiej Akademii Nauk i Sztuk w Paryżu (od 1985 r.), Francuskiego Towarzystwa Chemicznego (od 1960 r.), Francuskiego Towarzystwa Chemii Fizycznej (od 1970 r.), członkiem Prezydium Towarzystwa Wiedzy Powszechnej, zasiadał w Państwowej Radzie do spraw Pokojowego Wykorzystania Energii Jądrowej (w latach 1958–1968). Był członkiem polskich i międzynarodowych komisji do spraw nauczania (m.in. rady naukowej Muzeum Techniki oraz międzynarodowego jury nagrody Kalinga za popularyzację wiedzy przyznawanej przez UNESCO). Był także bardzo aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego, pełniąc w nim ważne funkcje.

Profesor Józef Hurwic urodził się 23 maja 1911 roku w Warszawie, gdzie spędził dzieciństwo i lata szkolne. Jego rodzice, jak pisze w swych wspomnieniach, byli niepraktykującymi Żydami, starali się jednak zachować pewne żydowskie tradycje religijne. W roku 1929 Józef Hurwic zdał egzamin dojrzałości i rozpoczął studia wyższe na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W marcu 1939 roku zakończył studia egzaminem dyplomowym z wynikiem bardzo dobrym.

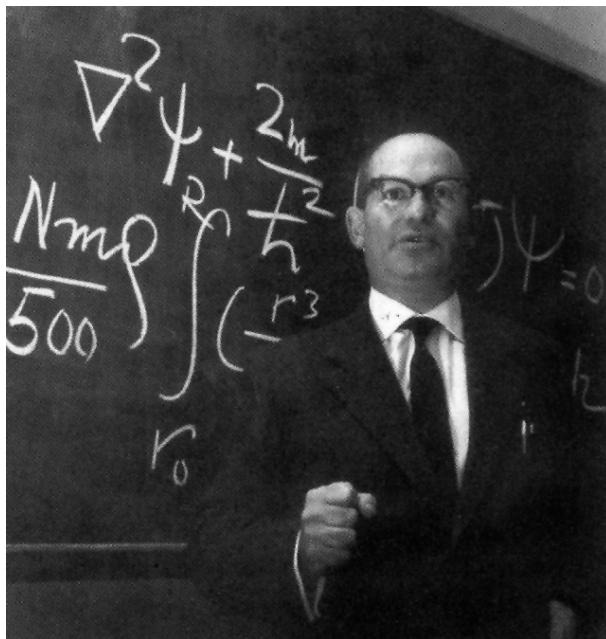
Podczas okupacji razem z matką i siostrą znalazł się w Związku Radzieckim (1940–1947). Na początku tego okresu we Lwowie był redaktorem podręczników do matematyki, fizyki i chemii, które wydawano w Państwowym Wydawnictwie

Radzieckim Mniejszości Narodowych Ukrainy. Nieco później jako ochotnik zgłosił się do wojska, po kilku miesiącach został wcielony do batalionu pracy, dotarł do Uralu, gdzie został przyjęty do pracy na stanowisko inżyniera w zakładach budowy maszyn dla przemysłu chemicznego i zbrojeniowego. Po tym okresie w roku 1945 przeniósł się do Moskwy i rozpoczął pracę na stanowisku redaktora w oddziale Polskiej Agencji Prasowej.

W czerwcu 1947 powrócił do Warszawy, a pół roku później rozpoczął pracę jako starszy asystent w Pracowni Badań Dielektrycznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, gdzie 12 grudnia 1950 roku obronił rozprawę doktorską. W 1954 roku został mu nadany tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego. Kilka lat później, 22 czerwca 1967 r., Rada Państwa przyznała mu tytuł profesora zwyczajnego.

W Instytucie Chemii Przemysłowej Profesor Hurwic poznał swoją przyszłą żonę – Marię Nowakowską. Małżeństwem zostali w roku 1952, w następnym roku przyszła na świat ich córka Anna, a cztery lata później syn Aleksander.

W latach 1948–1950 Profesor wykładał w Studium Dziennikarskim w Akademii Nauk Politycznych. Od 1951 roku, pracując w Katedrze Chemii Fizycznej Politechniki Warszawskiej, zajmował się dielektrykchemią: wyznaczaniem stałej dielektrycznej, pomiarami momentów dipolowych w cząsteczkach organicznych, a także badaniami oddziaływań międzymolekularnych. W 1960 roku objął kierownictwo Katedry Fizyki na Politechnice Warszawskiej.



Profesor Józef Hurwic podczas jednego ze swoich wykładów

Profesor Hurwic był doskonałym popularyzatorem nauki, przez ponad dwadzieścia lat (1948–1968) redagował bardzo ceniony miesięcznik *Problemy* oraz należał do rad redakcyjnych kilku czasopism naukowych; m.in. *Roczników Chemii*, *Wiadomości Chemiczne*, *Nukleoniki*; czasopism popularnonaukowych *Wiedza i Życie* oraz *Wszechświat*; a także serii i wydawnictw monograficznych *Chemia Współczesna*, *Encyklopedia Współczesna* i *Encyklopedia Techniki*.

Problemy były pismem niezwykle ważnym dla młodej inteligencji. Wielu profesorów nauk matematyczno-przyrodniczych na polskich wyższych uczelniach zwierzało się przy różnych okazjach, że to właśnie lektura *Problemów* skierowała ich na drogę naukową. W tym miesięczniku swoje teksty drukowali nie tylko wybitni uczeni, ale także przedstawiciele świata literatury pięknej, m.in. Julian Tuwim (przyjaciel prof. Hurwica), Maria Dąbrowska, Arkady Fiedler, Jarosław Iwaszkiewicz, Paweł Jasienica, Ludwik Hieronim Morstin, Igor Newerly, Jan Parandowski i Antoni Słonimski, a z przedstawicieli nauki: Stanisław Lorentz, Kazimierz Ajdukiewicz, Władysław Tatarkiewicz, Włodzimierz Antoniewicz, Wojciech Rubinowicz i wielu innych.



Uroczystość otwarcia Muzeum Marii Skłodowskiej-Curie. Józef Hurwic z córką Marią – Ewą Curie-Labouisse. Warszawa, 16.10.1967 r.

Należy również przypomnieć wielkie zasługi Profesora w działalności akademickiej i dydaktycznej. W latach 1962–68 Profesor był dziekanem Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Był niezwykle aktywnym pedagogiem i czynnie uczestniczył w życiu akademickim. W roku 1968 według ankiety przeprowadzonej wśród studentów był jednym z najlepszych wykładowców na Wydziale. Cieszył się szacunkiem i uznaniem swoich studentów i współpracowników. Był promotorem 13 prac doktorskich. W dorobku naukowym Profesora jest około 100 prac naukowych z chemii i fizyki, których był autorem lub współautorem, około 100 prac z historii nauki, a także wielu wydawnictw książkowych. Był autorem artykułów i książek o polskich uczonych, m.in. o Marii Skłodowskiej-Curie, Kazimierz

Fajansie i Wojciechu Świętosławskim. Profesor Hurwic był znawcą i popularyzatorem wiedzy o życiu i działalności Marii Skłodowskiej-Curie. W roku 1967 był organizatorem muzeum biograficznego Marii Skłodowskiej-Curie w kamienicy przy ul. Freta 16 w Warszawie, w której urodziła się nasza Noblistka i gdzie również siedzibę otrzymało Polskie Towarzystwo Chemiczne.

W roku 1968 w następstwie wydarzeń marcowych został pozbawiony funkcji dziekana, profesury i obywatelstwa polskiego. Zmuszony do opuszczenia kraju w roku 1969 wyemigrował z rodziną do Francji. Jego współpracownicy i wychowankowie zażenowani całą tą sytuacją zawsze wyrażali uznanie i podziw dla Profesora. Na pożegnanie uczniowie wręczyli mu miedziany talerz z syrenką warszawską, który na spodniej części miał wyryty napis:

*„Żyłem z wami, cierpiałem i płakałem z wami,
Nigdy mi, kto szlachetny, nie był obojętny,
Dziś was rzucam i dalej idę w cień – z duchami-
A jak gdyby tu szczęście było – idę smętny.”*

J. Słowacki „Testament mój”

We Francji Profesor zamieszkał w Marsylii i został zatrudniony jako profesor chemii fizycznej na Université de Provence, gdzie utworzył Zakład Dielektrochemii. Prowadził pracę badawczą i wykłady aż do roku 1979, kiedy przeszedł na emeryturę. W latach późniejszych związany był również z Akademią Medyczną la Timone w Marsylii. Jego działalność naukowa jednak nie osłabła i Profesor uczestniczył w licznych zjazdach, konferencjach naukowych z zakresu fizyki i chemii, organizowanych na całym świecie.

Przebywając we Francji, utrzymywał także ścisłe kontakty ze Stacją Polskiej Akademii Nauk w Paryżu, szczególnie w okresie, gdy ta instytucja była kierowana przez znanego fizykochemika prof. Henryka Ratajczaka. Uczestniczył wtedy w zebraniach i sesjach naukowych organizowanych przez Stację, a także wygłaszał wykłady związane z historią polskiej nauki.

Profesor Hurwic nigdy nie zerwał kontaktów z bliskimi w Polsce. Od roku 1981 przyjeżdżał systematycznie co roku, biorąc udział w Zjazdach Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Po raz ostatni Profesor odwiedził ojczyznę w 2006 roku podczas promocji swojej książki pt. „Wspomnienia i refleksje. Szkic autobiograficzny”.

Profesor był osobą bardzo zasłużoną dla Polskiego Towarzystwa Chemicznego. W latach 1953–1954 i 1957–1963 był wiceprezesem, a w latach 1964–1967 prezesem naszego Towarzystwa. W uznaniu za Jego zasługi Towarzystwo przyznało mu w 1986 roku godność członka honorowego, a w 2001 roku medal im. Marii Skłodowskiej-Curie.

W maju bieżącego roku Prezes Polskiego Towarzystwa prof. dr hab. inż. Jerzy Błażejowski w imieniu całego Polskiego Towarzystwa Chemicznego przesłał Jubilatowi list gratulacyjny z okazji jego 105 rocznicy urodzin oraz piękny bukiet kwiatów.

Profesor Józef Hurwic był uczonym o szerokich horyzontach, wieloletnim pedagogiem, redaktorem, a także wybitnym znawcą dziejów badań nad promieniotwórczością.

Jako student był dumny, że jego profesorem chemii fizycznej był Wojciech Świętosławski, a kiedy wybitni uczeni przyjeżdżali z zagranicy by wygłosić odczyt w Polskim Towarzystwie Chemicznym, obecność swoją na odczycie uważały za przyjemność i powinność. Również gdy wiosną 1938 roku odbywała się w Warszawie międzynarodowa konferencja fizyki teoretycznej, a uczestniczyli w niej tacy uczeni, jak Niels Bohr, Charles Dalton Darwin, Paul Langevin czy John von Neumann, przychodził na salę obrad, wielu rzeczy nie rozumiejąc, tylko po to, by z bliska zobaczyć, jak wyglądają i posłuchać jak mówią ludzie, którzy dla niego byli legendą.

Dziś Profesor Józef Hurwic jest dla nas postacią, której należy się zasłużony szacunek i pamięć.

*Małgorzata Ewa Rosen
(Kustosz Muzeum MSC PTChem)*

Te słowa pamięci o Profesorze Józefie Hurwicu zostały oparte między innymi na Jego pracy *Wspomnienia i refleksje – szkic autobiograficzny* (Dom Wydawniczo-Promocyjny GAL, Warszawa 2006) oraz materiałach archiwalnych z Muzeum Marii Skłodowskiej-Curie PTChem.

RUTYNA – BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI RUTIN – STRUCTURE AND PROPERTIES

Justyna Samaszko-Fiertek*, Piotr Roguszczak,
Barbara Dmochowska, Rafał Ślusarz, Janusz Madaj

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

- Abstract
Wprowadzenie
1. Flawonoidy
 1.1. Budowa i właściwości
 1.2. Budowa rutyny
 1.3. Właściwości rutyny
 1.4. Kompleksy rutozydu
Uwagi końcowe
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane
-

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–1998 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

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

Mgr Piotr Roguszczak w roku 2012 ukończył Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku.

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

ABSTRACT

Flavonoids commonly can be found in plants. They protect them against various microorganisms or insects [1]. Flavonoids demonstrate not only antioxidant properties, but also prevent the development of cancer [2]. This is attributed to their ability to induce apoptosis of tumor cells. The structure of this type of compound is based mainly on the flavone skeleton with the keto group in position 4 (Fig. 2).

The difference in structure of flavonoids consists mainly in the number and nature of the substituents. Flavonoid compounds have a 15-carbon atoms skeleton, consisting of two aromatic rings (A and B) connected to 3 carbon atoms, by oxygen contained within the heterocyclic ring C (Fig. 2) [5]. Structural difference of the pyranose ring C and position of the phenyl ring B are the basis for the division flavonoids into seven groups (Fig. 3) [6]. In recent years a number of work focused on the study of flavonoids complexes with ions of copper(II) or iron(II) were published [20–22].

One of the most important flavonoids is rutoside, which has a number of important biological activities. One of the most important function of this compound is inhibition hyaluronidase activity by reducing the permeation and improving the flexibility of blood vessels. It is used to treat diseases such as diabetic retinopathy, inflammation of the mucous membranes of the nose, atherosclerotic diseases or disorders of the venous circulation.

Rutoside forms a relatively stable complex with ions of iron(II) or calcium(II) as well as nickel(II) and especially with copper(II). This type of complex protect from rapid degradation/oxidation of L-ascorbic acid [14, 15]. In 2011, Sak-Bosnar and colleagues proposed the structure of rutoside complex with ions of copper (II) (Fig. 9) [20].

In the same year was published work suggesting that a key role in this type of mechanism play hydroxyl group at the 3 ,carbon atom, which becomes a „carrier” of the electron/radical (Fig. 5) [19].

Keywords: flavonoids, rutin, structure, antioxidant properties

Słowa kluczowe: flawonoidy, rutyna, budowa, właściwości antyoksydacyjne

WPROWADZENIE

Rośliny posiadają wiele organicznych produktów naturalnych, takich jak alkaloidy, flavonoidy, terpenoidy itp. Syntezowane są one przez nie i są odpowiedzią na szkodliwy wpływ ze strony środowiska m.in. grzybów, pasożytów, owadów. Dlatego z roku na rok coraz szersze zainteresowanie tymi grupami związków wykazują takie dziedziny nauki jak chemia, biochemia czy farmakologia [1].

Spośród tych wszystkich organicznych związków chemicznych flavonoidy stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę polifenoli pochodzenia roślinnego. Mają znaczący wpływ na kształtowanie smaku i barwy owoców, warzyw i produktów powstających w wyniku ich przetwarzania. Występują zarówno w postaci wolnej, jak i glikozydów. Flavonoidy są składnikami wielu roślin od setek lat stosowanych w medycynie ludowej. Dzięki wiedzy o właściwościach ziół, przekazywanej z pokolenia na pokolenie, flavonoidy zastępowały leki. Jednak flavonoidami jako grupą określonych związków chemicznych zaczęto interesować się dopiero w latach trzydziestych ubiegłego wieku, kiedy to węgierski biochemik Albert Szent-Györgyi wyizolował i dokonał identyfikacji pierwszych flavonoidów (m.in. witaminy P) w owocach cytrusowych i papryce. W późniejszych badaniach zaobserwowano, że wyciągi z cytryny i czerwonej papryki mają korzystny wpływ na świnie morskie dotkniete szkrobutem. Wpływ ten był silniejszy niż obserwowany podczas podawania preparatów czystego kwasu L-askorbinowego. Wkrótce z soku cytrynowego wyodrębniono substancję odpowiedzialną za tę aktywność i nazwano ją witaminą P (od ang. *permeability*, tzn. przepuszczalność) lub C2 (czynnik wspomagający witaminę C). Niedługo potem okazało się, że wyodrębnioną substancję stanowiła mieszanina flavonoidów, którą zaczęto nazywać bioflavonoidami [2]. Do tej pory rozpoznano ponad 8000 różnych bioflavonoidów, z czego ponad 500 jest dogłębniej poznanych.

Poznanie połączeń glikozydowych pomiędzy fragmentami flavonoidów a sacharydami doprowadziły do powstania nowej grupy związków. Możemy do nich zaliczyć, m.in. witeksynę, hesperydynę i najbardziej rozpowszechniony glikozyd kwercetyny – rutynę. Większość z nich posiada właściwości podobne do nieglikozydowych bioflavonoidów. Jednakże fragmenty cukrowe mono-, di-, trisacharydowe wpływają na zmianę ich właściwości chemicznych, biochemicalnych, fizykochemicznych, co niesie za sobą różnice w działaniu samego związku na organizmy żywie.

Szersze zrozumienie mechanizmów działania flavonoidów i ich pochodnych może przynieść wielkie korzyści w wielu dziedzinach nauki, szczególnie w medycynie. Dodatkowymi czynnikami przemawiającymi na korzyść tych grup związków są:

- ogólnodostępność,
- znikoma bądź brak toksyczności wobec komórek organizmu,
- możliwość przenikania przez barierę krew-mózg.

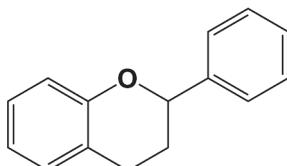
Szczególnie ta ostatnia właściwość może być wykorzystywana w leczeniu schorzeń związanych z ośrodkowym układem nerwowym, a także z dostarczaniem składników odżywczych i substancji pomocniczych do mózgu [3].

1. FLAWONOIDY

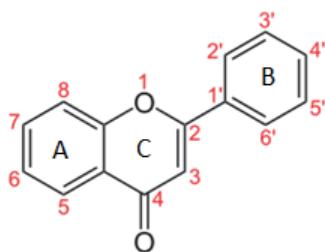
Flawonoidy stanowią przykład substancji fitochemicznych, która to nazwa pochodzi od greckiego słowa *phyto* – roślina. Występują one w większości produktów spożywczych, a najczęściej w owocach, warzywach, nasionach, liściach, kaszy gryczanej, roślinach strączkowych (np. soi), herbatie, w czerwonym winie czy młodym pieprzu. Większość z nich to barwniki zgromadzone w powierzchniowych warstwach tkanek roślinnych, dzięki czemu ograniczają szkodliwy wpływ promieniowania ultrafioletowego i nadają intensywne zabarwienie roślinom. Najwięcej flawonoidów zawierają barwne owoce cytrusowe i warzywa. Związki te pozyskuje się głównie na drodze ekstrakcji. Ze względu na swoje różnorodne właściwości znalazły zastosowanie w obecnie bardzo modnych suplementach diety.

1.1. BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI

Budowa flawonoidów oparta jest na pierścieniu 2-fenylochromanu (Rys. 1), przy czym większość typów flawonoidów (poza katechinami i antocyjanidynami) zawiera szkielet flawonu (Rys. 2), z grupą ketonową w pozycji 4 [4].



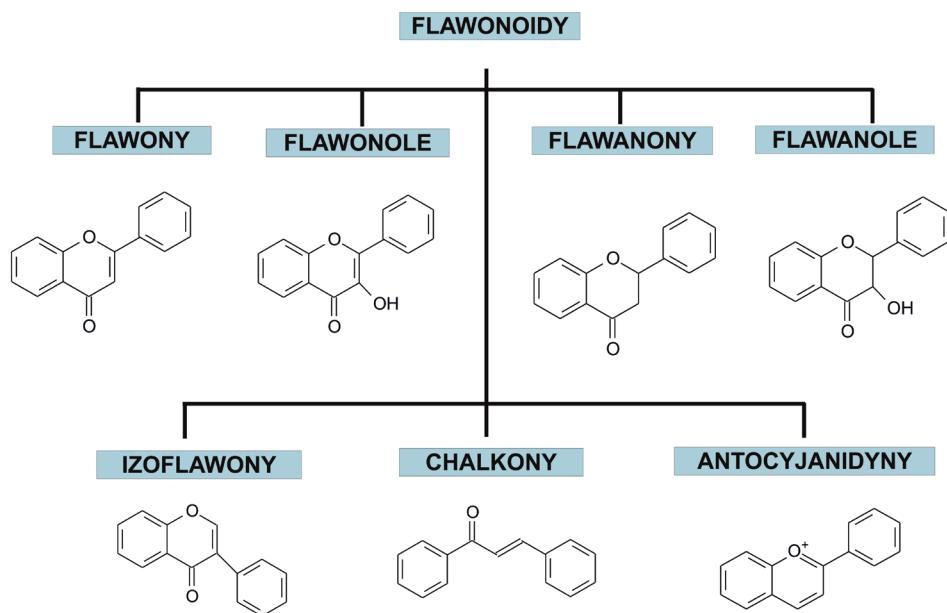
Rysunek 1. Struktura 2-fenylochromanu
Figure 1. Structure of the 2-phenylchromane



Rysunek 2. Struktura flawonu
Figure 2. Structure of flavones

Związki flawonoidowe posiadają 15-węglowy szkielet, składający się z dwóch pierścieni aromatycznych (A i B) połączonych z trzema atomami węgla, które poprzez tlen zamkają się w heterocykliczny pierścień C (Rys. 2) [5]. Różnice w ogólnej strukturze pierścienia piranowego (C) i położenie pierścienia fenylowego (B)

przyczyniły się do podziału flavonoidów na siedem klas (Rys. 3) [6]. Związki należące do tej samej klasy różnią się ilością grup hydroksylowych przy zewnętrzny pierścieniu (B). Poza tym ilość i ułożenie tych grup znacznie wpływa na zmianę właściwości chemicznych i biologicznych poszczególnych związków [7].



Rysunek 3. Podział flavonoidów ze względu na budowę
Figure 3. Distribution of flavonoids due to structure

W ostatnich latach flavonoidy ze względu na swoje właściwości cieszą się bardzo dużym zainteresowaniem. Mechanizm działania tak szerokiej grupy związków flavonoidowych nie jest do końca poznany. Rośliny wykorzystują je przede wszystkim do nadawania barwy owocom, liściom, kwiatom i płatkom kwiatów. Istotną funkcją jest również ochrona roślin przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego, a także zabezpieczanie rośliny przed atakiem ze strony owadów i grzybów. Niektóre badania wykazały, że flavonoidy mogą działać jako inhibitory cyklu komórkowego i posiadają zdolność do apoptozy komórek nowotworowych [8]. Flavonoidy coraz częściej wykorzystywane są w medycynie do leczenia wielu schorzeń m.in. alergii czy poprawienia elastyczności naczyń krwionośnych. Niektóre badania potwierdzają także, że flavonoidy korzystnie wpływają na układ krążenia [9]. Hamują działanie wielu enzymów np. lipoksygenazy i cyklooksygenazy czy oksydazy ksantyny [10]. Te biologiczne działania flavonoidów mogą być wynikiem ich właściwości przeciwutleniających, czyli zdolności do reagowania z wolnymi rodnikami powstającymi często w reakcjach enzymatycznych [11]. Dokładny mechanizm działania antyoksydantów flavonoidowych nie jest do końca poznany. Flavonoidy znalazły także zastosowanie jako środki przeciw krwawieniom, żyła-

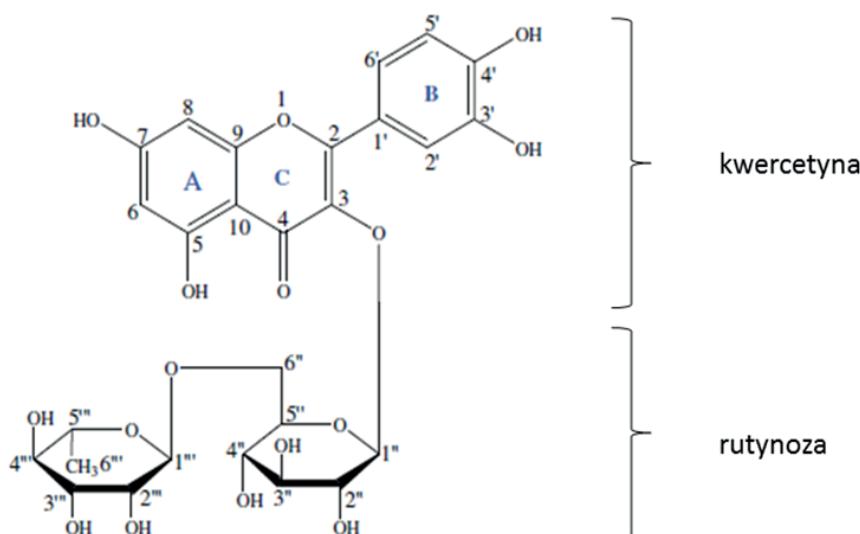
kom czy wybroczynom. Działanie to związane jest z hamowaniem przez flawonoidy jednego z enzymów występujących w ścianach naczyń – hialuronidazy, która odpowiedzialna jest za degradację substancji międzykomórkowych i zwiększenie przepuszczalności przestrzeni międzykomórkowych. Flawonoidy poprawiają także krążenie krwi w mięśniu sercowym, dlatego mogą być stosowane pomocniczo w chorobach wieńcowych.

1.2. BUDOWA RUTYNY

Rutozyd (z łac. *Rutosidum*), zwany także rutyną i kwercetyną-3-O-rutozydu jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych glikozydów bioflawonoidowych. Rutyna została odkryta w 1984 r. przez norweskiego aptekarza Augusta Weissa. Wyizolował ją z liści rutyny zwyczajnej (łac. *Ruta graveolens*), dzięki której rutozyd zawdzięcza swoją nazwę. Pozyckać ją można także z gryki i perłowca japońskiego (łac. *Sophora japonica*), w którym występuje nawet 30% aktywnych związków rutozydu. Oprócz wymienionych ziół rutyna występuje także w wielu pospolitych owocech i warzywach, m.in. w skórkach jabłek, pomarańczy, limonki, cytryny, brokułach, śliwkach, winogronach, a także we większości roślin strączkowych i niektórych gatunkach herbat.

Losy rutyny w organizmie nie są do końca poznane. Zauważono, że ok. 15% spożywanego związku się wchłanianych jest przez organizm, reszta natomiast ulega hydrolizie do kwercetyny, po czym następuje rozpad heterocyklicznego związku. Większość przemian jakim ulega rutyna zachodzi w wątrobie [12].

Rutyna zbudowana jest z dwóch fragmentów – aglikonu, który stanowi kwercetyna połączona wiązaniem glikozydowym z disacharydem rutynozą (Rys. 4). Rutynoza zbudowana jest z L-ramnopiranozy (6-deoksy-L-mannozy) połączoną z D-glukopiranozą wiązaniem α -(1 \rightarrow 6)-O-glikozydowym [13]. Warto tu wspomnieć, że obecność tego disacharydu wpływa na zmianę właściwości związku w stosunku do kwercetyny. Czysty rutozyd kwercetyny występuje w postaci żółtych kryształów słabo rozpuszczalnych w wodzie.



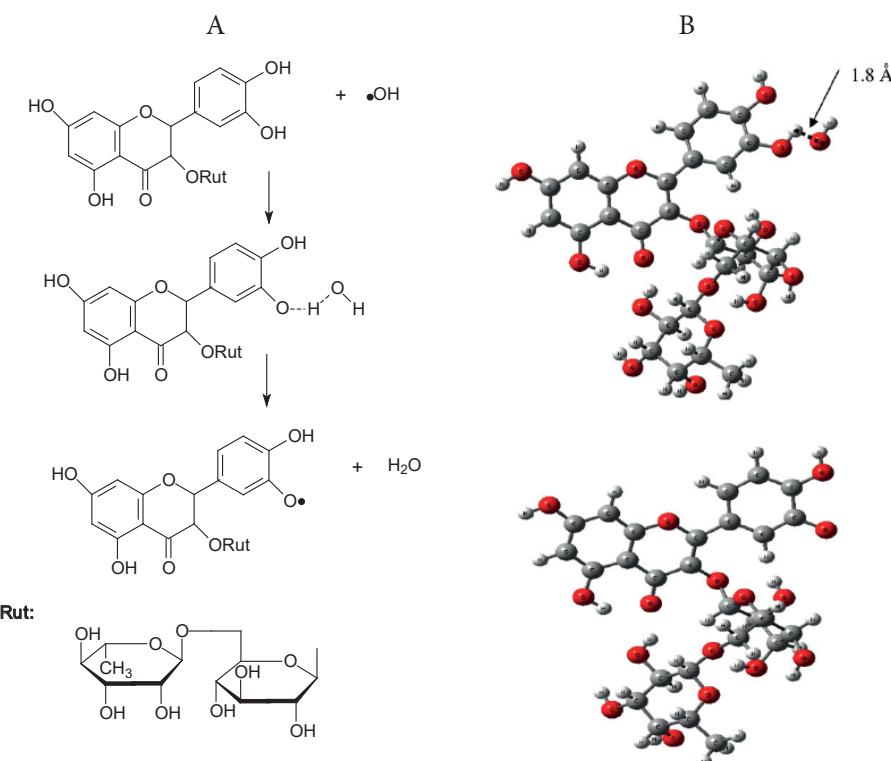
Rysunek 4. Struktura rutozydu
Figure 4. Structure of rutoside

1.3. WŁAŚCIWOŚCI RUTYNY

Pomimo stosunkowo prostej budowy rutynie można przypisać dużą aktywność biologiczną. Związana jest ona przede wszystkim z jej właściwościami antyoksydacyjnymi. Rutyna obecna w części lipidowej błony komórkowej chroni ją przed utlenieniem, a w konsekwencji przed jej zniszczeniem [14]. Rutozyd kwercetyny poprawia także elastyczność naczyń krwionośnych neutralizując obecność wolnych rodników. Zapobiega to obrzękom i zapaleniu żył, które w konsekwencji mogłyby doprowadzić do uszkodzenia zastawek żylnych i powstaniu żyłaków. Rutyna wraz z witaminą C wpływa także na ochronę kolagenu i elastyny – związków budujących naczynia krwionośne. Rutozyd hamuje również aktywność hialuronidazy, enzymu rozklejającego śródbłonek naczyń włosowatych. Rutyna znalazła również zastosowanie w leczeniu retinopatii cukrzycowej, ponieważ zmniejsza ciśnienie wewnętrz gałki ocznej i chroni siatkawkę oka przed działaniem wolnych rodników. Właściwości antyoksydacyjne tego związku wpływają także na poprawę odporności organizmu w walce z infekcjami [15], czynnikami nowotworowymi (dzięki ochronie DNA przed uszkodzeniem [16]). Niektóre badania wykazały również zdolność rutozydu do hamowania reduktazy aldozowej, która powoduje dysfunkcje lewej komory serca [17]. Poza tym rutyna spowalnia starzenie się skóry i łuszczenie naskórka, niweluje siniaki i stłuczenia, a także przyśpiesza gojenie się ran. Dodatkowo wykazuje się właściwościami antyalergicznymi (hamuje wydzielanie histaminy i bradykininy), przeciwzapalnymi i przeciwwbólowymi. Stwierdzono, że rutyna wykazuje również działania neuroprotekcyjne w przypadku zaburzeń pamięci oraz obumarcia neuronów spowodowanych niedokrwieniem mózgu [18].

Tak szerokie spektrum aktywności biologicznej rutyna zawdzięcza bardzo silnym właściwościom przeciwitleniającym [19–22]. Dokładny mechanizm działania wychwytu wolnych rodników przez rutozyd nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, że kluczową rolę odgrywają grupy hydroksylowe przy pierścieniu B flawonoidu (Rys. 5).

Wolne rodniki hydroksylowe mogą z łatwością przejść przez błony komórkowe roślin czy zwierząt uszkadzając tym samym tkanki i powodując śmierć komórki. Dlatego tak ważne jest usuwanie ich dla ochrony organizmów żywych. W celu bliższego poznania mechanizmu działania rutozydu grupa badawcza pod kierunkiem Mina Ghiasi przeprowadziła badania z wykorzystaniem techniki modelowania molekularnego. Stwierdzili, że grupa hydroksylowa przy węglu 3' jest najodpowiedniejszym miejscem do ataku przez wolny rodnik [19].

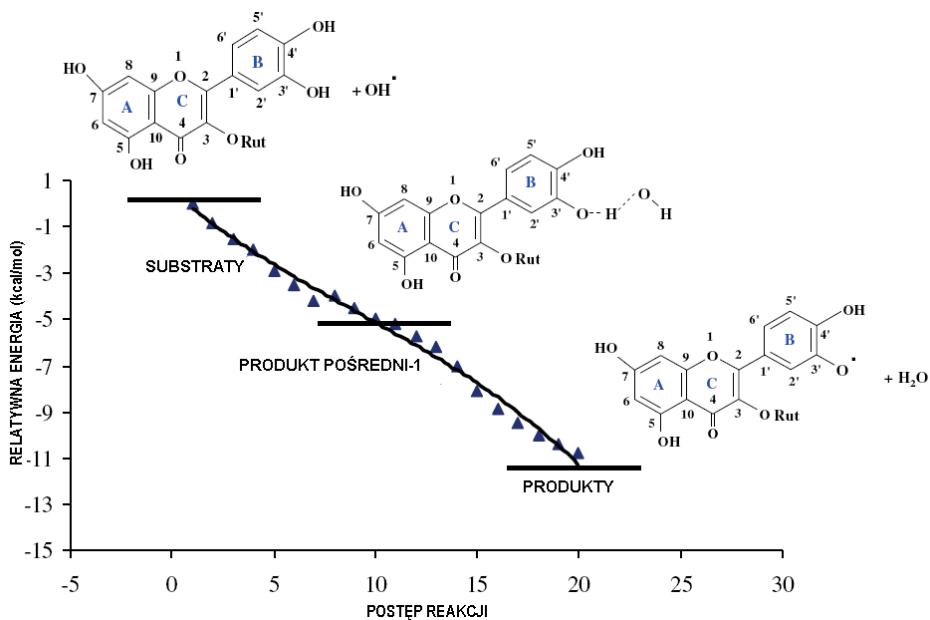


Rysunek 5. Sugerowany mechanizm działania wychwytu rodnika hydroksylowego (A), zoptymalizowana struktura produktu pośredniego (B)

Figure 5. Suggested mechanism of uptake of the hydroxyl radical (A), the optimized structure of the intermediate product (B)

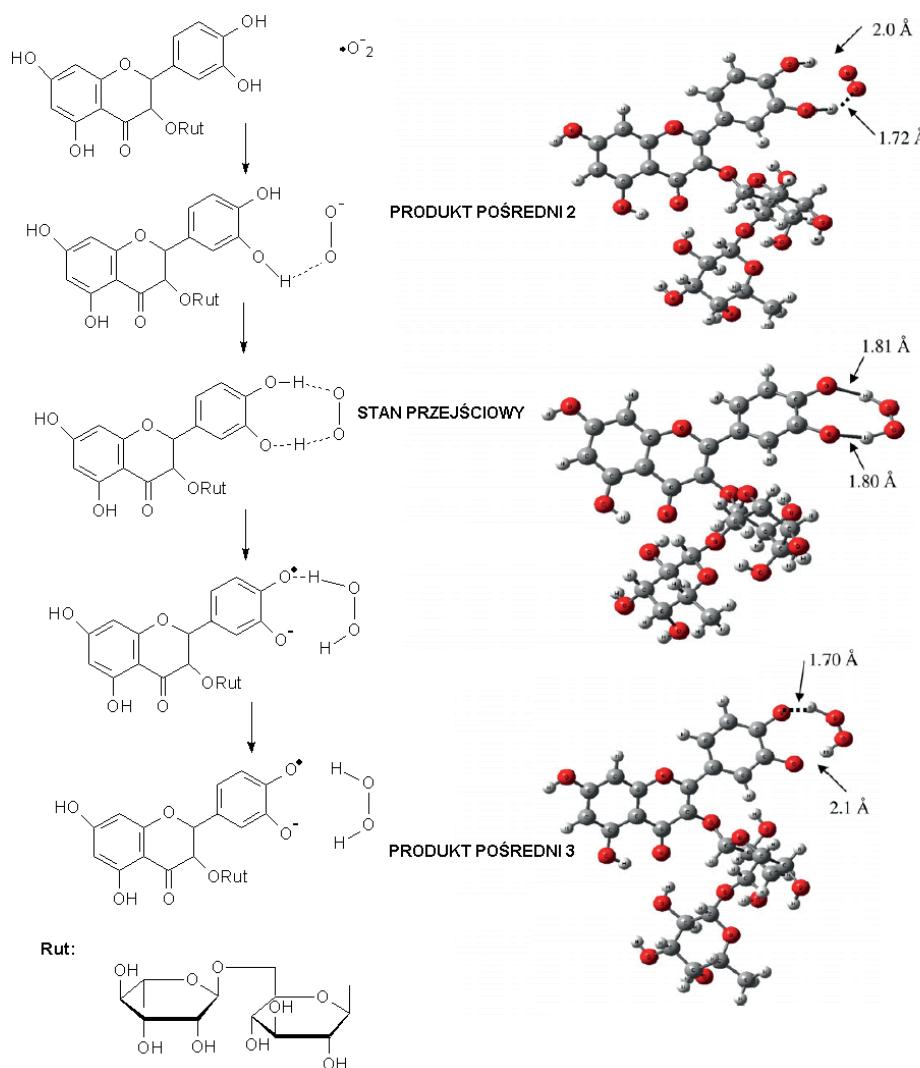
Początkowe starania nad znalezieniem optymalnej geometrii stanu przejściowego pomiędzy substratami, produktem pośrednim a produktami reakcji okazały się bezwocne. Dlatego wysnuli wniosek, że rodnik hydroksylowy atakuje bezpo-

średnio atom wodoru grupy hydroksylowej przyległej do węgla 3'. Po zoptymalizowaniu geometrii produktu pośredniego (Rysu. 5B), przypisali mu względną wartość energetyczną (10,8 kcal/mol) co sugeruje, że reakcja ta jest egzoenergetyczna (Rys. 6).



Rysunek 6. Wykres zmian energii reakcji rodnika hydroksylowego z cząsteczką rutyny [19]
Figure 6. Changes of energy for the reaction of the hydroxyl radical with rutin molecule [19]

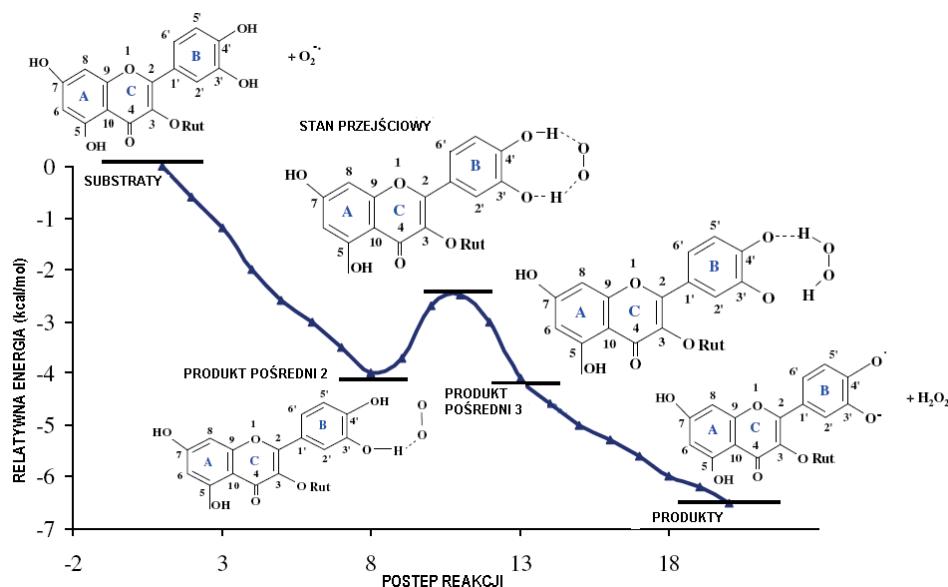
Inaczej wygląda mechanizm wychwytu anionu nadtlenkowego przez rutozyd, ponieważ biorą tu udział dwie grupy hydroksylowe przy węglu 3' i 4' (Rys. 7A). Powstanie produktu reakcji odbywa się przez dwa produkty pośrednie. W tym przypadku udało się znaleźć i zoptymalizować strukturę stanu przejściowego między produktami pośrednimi 2 i 3 (Rys. 7B).



Rysunek 7. Mechanizm działania wychwytu anionu nadtlenkowego (A), optymalizacja struktur stanu i produktów pośrednich (B)

Figure 7. The mechanism of uptake of superoxide anion (A), optimization of the state and structure of the intermediates (B)

Względna wartość energetyczna sugeruje, że reakcja ta jest również egzoenergetyczna (6,5 kcal/mol). Produkt końcowy jest generowany z pośredniego produktu 3 pomijając stan przejściowy o barierze 2,1 kcal/mol. Ta mała bariera sugeruje, że następuje natychmiastowe przekształcenie ośmioczłonowego pierścienia do produktu pośredniego 3, a następnie do produktu, w którym to rutozyt staje się „nosicielem” rodnika (Rys. 8). Rutyna jest bardziej stabilnym i mniej reaktywnym związkiem w przeciwieństwie do anionu nadtlenkowego [23].

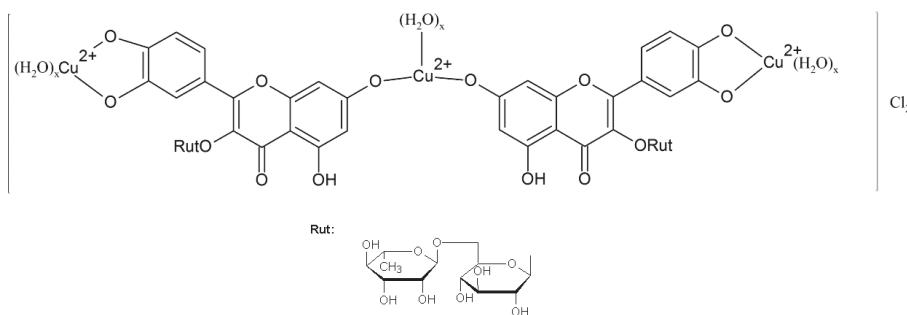


Rysunek 8. Wykres zmian energii reakcji rodnika nadtlenkowego z cząsteczką rutyny [19]
Figure 8. Changes of energy for the reaction of the peroxide radical with rutin molecule [19]

Wyniki te potwierdzają istotną rolę grup hydroksylowych znajdujących się przy pierścieniu B na właściwości antyoksydacyjne rutozydu. Dodanie rodnika hydroksylowego do cząsteczki rutyny prowadzi do powstania produktów pośrednich, które przekształcane są bezpośrednio do stabilnych produktów uwalniając 10,8 kcal/mol. W nukleofilowym ataku rodnika nadtlenkowego, powstają produkty pośrednie, z których jest generowany produkt główny. Bariera energetyczna dla tej reakcji wynosi około 6,5 kcal/mol.

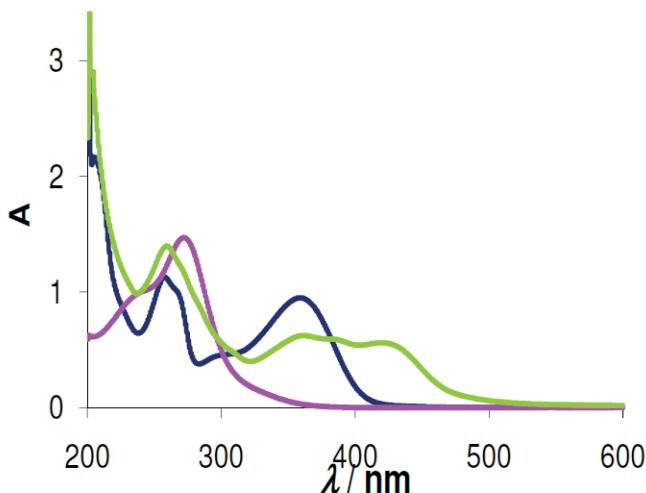
1.4. KOMPLEKSY RUTOZYDU

Rutozyd posiada zdolności do tworzenia stosunkowo trwałych kompleksów z jonami m.in. niklu(II), wapnia(II), żelaza(II), które mogą powodować uwalnianie wolnych rodników. Tworzy także kompleksy z jonami miedzi(II), co powoduje relatywne wydłużenie czasu działania witaminy C (jony miedzi(II) są odpowiedzialne za reakcję utleniania kwasu L-askorbinowego). W 2011 roku Sak-Bosnar wraz z współpracownikami zaproponował strukturę kompleksu z tymi jonami (Rys. 9) [24].



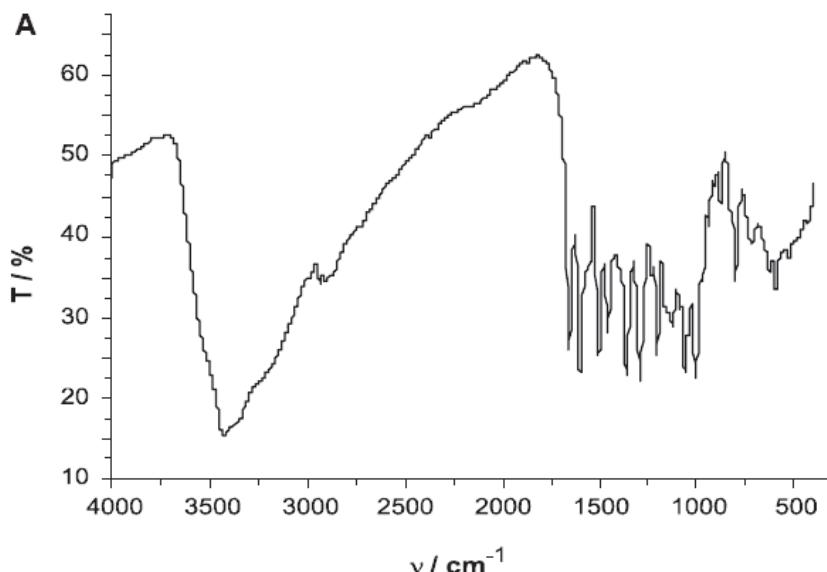
Rysunek 9. Struktura kompleksu rutozydu z jonami miedzi(II) [24]
Figure 9. Structure of the complex rutoside the copper ion (II) [24]

Główną rolę w tworzeniu tego kompleksu odgrywają grupy hydroksylowe przy 7 atomie węgla, które łączą się z atomem miedzi. Z dokonanych analiz wynioskowano, że także grupy przy atomach węgla 3' i 4' wpływają na tworzenie tej struktury. Powstanie kompleksu potwierdza m.in. analiza widma UV-VIS (Rys. 10).



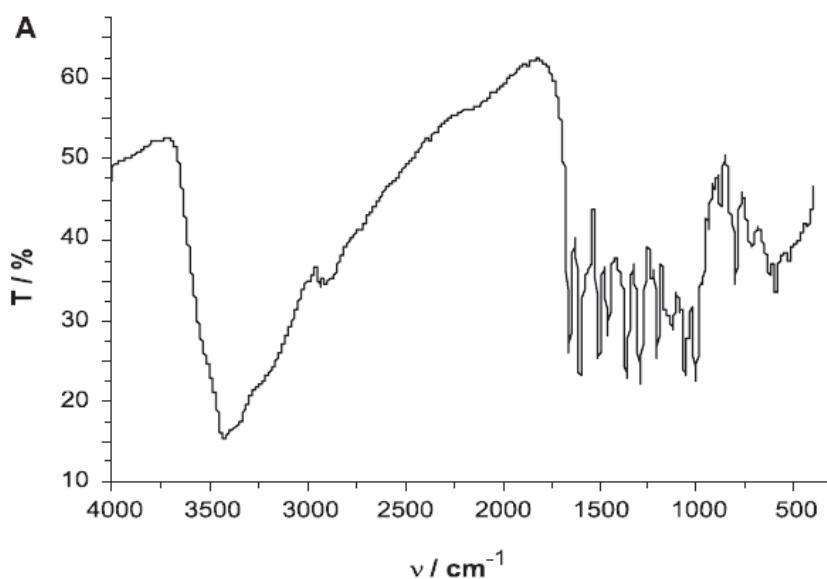
Rysunek 10. UV-VIS: CuCl₂ (-), rutyna (-), kompleks Cu(II)-rutyna (-) [24]
Figure 10. UV-VIS: CuCl₂ (-), rutin (-), the complex Cu(II) -rutin (-) [24]

W rutynie obserwujemy pasma absorpcji odpowiednio dla pierścienia B w zakresie 320–385 nm i dla pierścienia A w zakresie 240–280 nm. W widmie kompleksu byłyauważalne zmiany związane z przejściem $\pi \rightarrow \pi^*$ liganda, co prowadziło do przesunięcia pasma w kierunku wyższych liczb falowych. W wyniku przeprowadzonej analizy zaobserwowano także powstanie pasma przy 419 nm odpowiedzialnego za wiązanie d-d rutyny z jonami miedzi(II). Obecność tworzącego się kompleksu potwierdziło wykonane widmo IR. Do badań wykorzystano czystą rutynę (Rys. 11) lub rutynę w obecności jonów Cu(II) z (Rys. 12).



Rysunek 11. Widmo IR rutyny [24]

Figure 11. IR spectrum of rutin [24]



Rysunek 12. Widmo IR kompleksu Cu(II)-rutyna [24]

Figure 12. IR spectrum of the complex Cu (II)-rutine [24]

Wyniki analizy widm, przedstawione w Tabeli 1, potwierdziły powstanie kompleksu. Zauważać można powstanie pasma odpowiedzialnego za wiązanie metal-

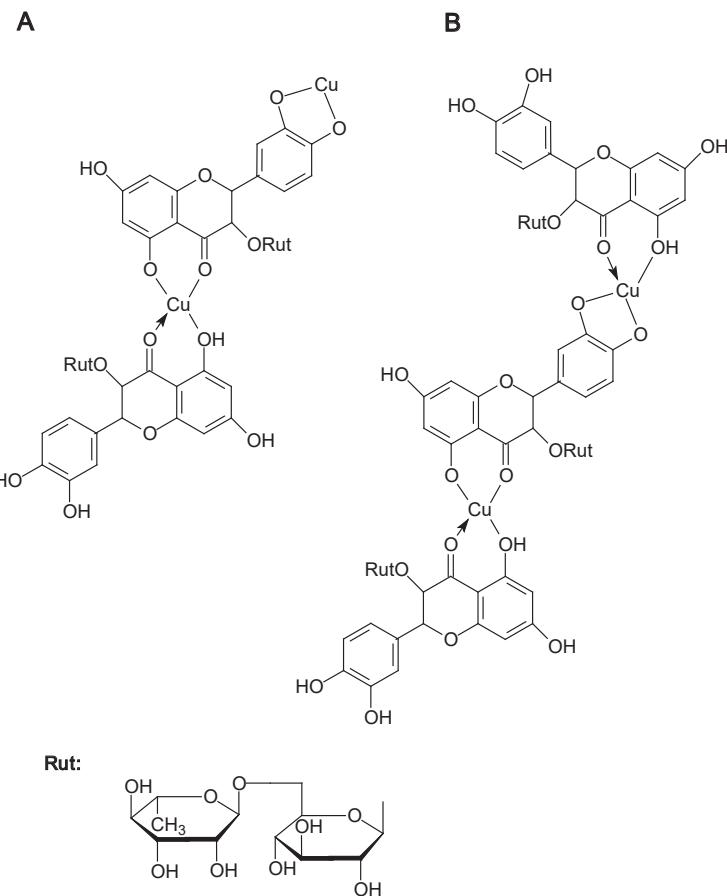
tlen ($M-O$ przy 623 cm^{-1}), które nie było widoczne na widmie IR niezwiązanej rutyny. Ponadto niewielka zmiana przesunięcia pasma odpowiadającego wiążaniu karbonylowemu ($C=O$) może wynikać z tego, że grupa hydroksylowa przy 3 atomie węgla została zablokowana przez ugrupowanie cukrowe. Na widmie kompleksu pojawiło się średniej szerokości pasmo potwierdzające obecność wody w strukturze rutyny.

Tabela 1. Zestawienie danych IR [24]
Table 1.

Związek	$\nu(M-O)/\text{cm}^{-1}$	$\nu(C=O)/\text{cm}^{-1}$	$\nu(C-O-C)/\text{cm}^{-1}$	$\nu(C=C)/\text{cm}^{-1}$	$\nu(O-H)/\text{cm}^{-1}$
Rutyna	–	1655 s	1296 s	1599 s	3600...3000 b,m
Kompleks rutyna-Cu(II)	623 w	1630 s	1286 s	1600 s	3600...2800 b,m

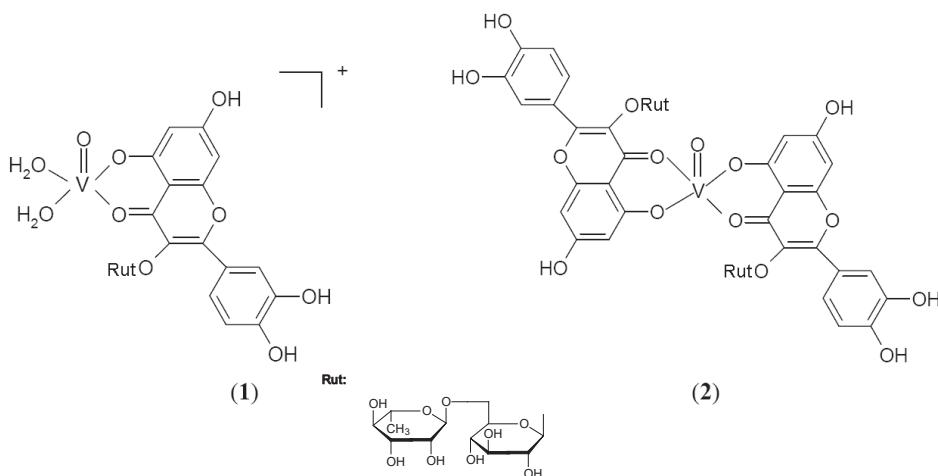
Grupa Fengrui Song'a [25] w wyniku przeprowadzonych badań zasugerowała istotną rolę w tworzeniu kompleksów z jonami miedzi(II) grupy hydroksylowej przy 5 atomie węgla i grupy ketonowej przy 4 węglu pierścienia C kwercetyny. Analizy widma spektrometrii masowej (ESI-MS) potwierdziły powstanie kompleksu rutyna-jony miedzi(II) (Rys. 13A) [25].

Z przeprowadzonej analizy wynikało, że grupy hydroksylowe przy węglu 3' i 4', należące do najbardziej zewnętrznego pierścienia B rutozydu, uczestniczyły w tworzeniu wiążania z jonami miedzi(II). Masa otrzymanego jonu kompleksu wynosiła $M_A = 1343\text{ m/z}$. Tak otrzymaną strukturę kompleksu poddano reakcji tworzenia wiążania koordynacyjnego z trzecią cząsteczką rutyny otrzymując kompleks (Rys. 13B) o masie $M_B = 1953\text{ m/z}$.



Rysunek 13. Przypuszczalne struktury kompleksów rutozydu z jonami miedzi(II) [25]
Figure 13. Structure of rutoside complexes with ions of copper (II) [25]

Podobną strukturę posiadają kompleksy rutozydu z kationami oksowanadu(IV). Kompleksy te były otrzymywane w celu zwiększenia wchłaniania i zmniejszenia toksyczności związków wanadu [26]. Efekty procesów kompleksowania między tymi związkami przedstawia Rysunek 14.

Rysunek 14. Proponowane struktury kompleksów $[\text{VO}(\text{Rut})(\text{H}_2\text{O})_2]_2^+$ + (1) i $[\text{VO}(\text{Rut})_2]_2^+$ [26]Figure 14. The proposed structure of the complexes $[\text{VO}(\text{Rut})(\text{H}_2\text{O})_2]_2^+$ + (1) and $[\text{VO}(\text{Rut})_2]_2^+$ [26]

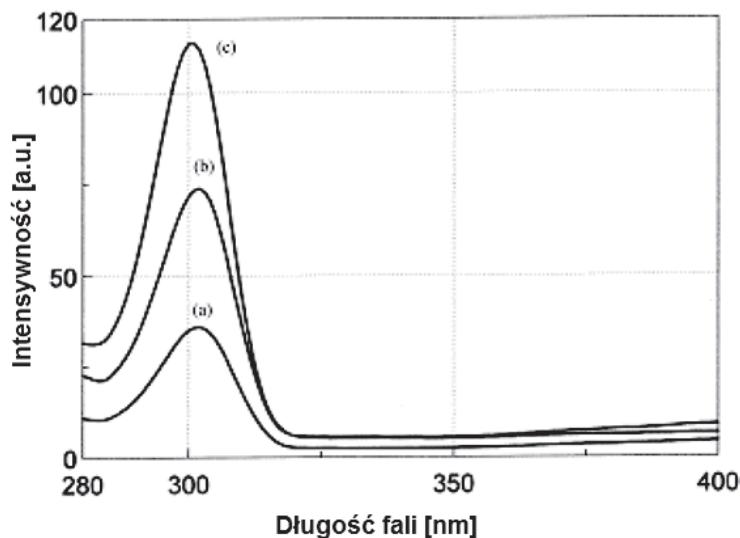
Arama wraz ze współpracownikami [26] zasugerowała, że również w tym przypadku grupa karbonylowa i hydroksylowa przy węglu 4 i 5 są związane z tworzeniem wiązania między metalem a rutozydem. Obie te struktury zostały scharakteryzowane m.in. na podstawie analizy elementarnej i cieplnej oraz dzięki technikom spektroskopowym. Spektroskopia masowa potwierdziła obecność kompleksu **1** ($M_1 = 676 \text{ m/z}$) i kompleksu **2** ($M_2 = 1284 \text{ m/z}$). Wyniki analiz widm IR obu kompleksów i rutyny generujących określone pasma absorpcji przedstawione są w Tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie danych IR [26]
Table 2. Summary of the IR data [26]

Związek	$\nu(\text{OH}) \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{C=O}) \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{C-O-C}) \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{V=O}) \text{ cm}^{-1}$
Rutyna	3,429	1,656 (s)	1,296 (s)	
Kompleks 1	3,401	1,631 (s)	1,296 (s)	983 (m)
Kompleks 2	3,422	1,622 (s)	1,294 (s)	972 (m)

Z przeprowadzonej analizy wynika, że pasmo grupy karbonylowej kompleksu **1** i **2** przesunięte jest w kierunku wyższych długości fali w porównaniu z samym ligandem co potwierdza powstanie kompleksu z jonom metalu. Dodatkowe rozciągające pasmo $\nu(\text{V=O})$ przy około 980 cm^{-1} odpowiada drganiu wiązania metal-ligand. Analiza widm IR sugeruje, że dogodniejszym miejscem przyłączania się metalu są grupy przy 3 i 4 atomie węgla niż *ortho*-hydroksylowe grupy w pierścieniu B.

Z analizy widm fluorescencji wynika, że rutyna występująca w kompleksie z metalem wykazuje znacznie silniejszą intensywnością fluorescencji aniżeli wolna (Rys. 15).



Rysunek 15. Widmo fluorescencji: (a) – rutyna, (b) – kompleks 1, (c) – kompleks 2 [26]

Figure 15. Fluorescence spectrum: (a) – rutine, (b) – a complex 1, (c) – complex 2 [26]

UWAGI KOŃCOWE

Rutozyd jest powszechnie stosowanym związkiem o właściwościach antyoksydacyjnych. Znalazł on szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i stanowi składnik w suplementach diety (przede wszystkim preparatach multiwitaminowych). Rutozyd tworzy dość trwały kompleks nie tylko z jonami żelaza(II), wapnia(II) czy niklu(II), ale przede wszystkim z kationami miedzi(II) chroniąc tym samym przed szybką degradacją/utlenieniem kwasu L-askorbinowego. Pełni funkcję wymiatacza wolnych rodników zwiększąc tym samym trwałość i czas działania witaminy C.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z DS 530-8455 -D 501-16.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B.A. Bohm, *Introduction to Flavonoids. Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products*, CRC Press, 1998.
- [2] Ł. Glinka, J. Ochocki, Pol. J. Cosmet., 2004, 2, 70.

- [3] S.-L. Hwang, P.-H. Shih, G.-Ch. Yen, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**(4), 877.
- [4] S. van Waalwijk, B. van Doorn-Khosrovani, J. Janssen, L.M. Maas., R.W. Godschalk, *Carcinogenesis*, 2007, **28**(8), 1703.
- [5] X. He, D. Liu, R.H. Liu, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**(20), 9337.
- [6] R.H. Liu, *J. Nutr.*, 2004, **134**, 3479.
- [7] J.A. Ross, C.M. Kasum, *Annu. Rev. Nutr.*, 2002, **22**, 19.
- [8] F. Galeotti, E. Barile, P. Curir, M. Dolci, V. Lanzotti, *Phytochem. Lett.*, 2008, **1**, 44.
- [9] M. Balcerek, I. Matławska, *Herba Polonica*, 2006, **52**(3).
- [10] A.J. Dugas, Jr., J. Castañeda-Acosta, G.C. Bonin, K.L. Price, Nikolaus H. Fischer, G.W. Winston, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**(3), 327.
- [11] a) U. Takahama, *Phytochem.*, 1985, **24**, 1443; b) G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, *Free Radicals Biol. Med.*, 1997, **22**, 749.
- [12] H. Schneider, A. Schwierz, M.D. Collins, M. Blaunt, *Archiv. Microbiol.*, 1999, **171**, 81.
- [13] N. Lucci, P. Mazzafera, *Can. J. Plant Sci.*, 2009, **89**(5), 895.
- [14] O. Ortolani, A. Conti, A.R. De Gaudio, M. Masoni, G. Novelli, *Shock.*, 2000, **13**(1), 14.
- [15] J.R. Soberón, M.A. Sgariglia, D.A. Sampietro, E.N. Quirogo, M.A. Vattuone, *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **102**(6), 1450.
- [16] U. Undeğer, S. Aydin, A.A. Başaran, N. Başaran, *Toxicol. Lett.*, 2004, **151**(1), 143.
- [17] K.M. Krishna, A. Annapurna, G.S. Gopal, C.R. Chalam, K. Madan, V.K. Kumar, G.J. Prakash, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2005, **83**(4), 343.
- [18] F. Pu, K. Mishima, K. Irie, K. Motohashi, Y. Tanaka, K. Orito, T. Egawa, Y. Kitamura, N. Egashira, K. Iwasaki, M. Fujiwara, *J. Pharmacol. Sci.*, 2007, **104**(4), 329.
- [19] M. Ghiasi, M.M. Heravi, *Carbohydr Res.*, 2011, **346**, 739.
- [20] P.M. Aron, J.A. Kennedy, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, **52**, 79.
- [21] B. Halliwell, *Cardiovasc. Res.*, 2007, **73**, 341.
- [22] R. Guo, P. Wei, W. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **43**, 1580.
- [23] J. Sanhueza, J. Valdes, R. Campos, A. Garrido, A. Valenzuela, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1992, **78**, 211.
- [24] M. Medvidovic-Kosanovic, M. Samardžić, N. Malatesti, M. Sak-Bosnar, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2011, **6**, 1075.
- [25] Y. Bai, F. Song, M. Chen, J. Xing, Z. Liu, S. Liu, *Anal Sci.*, 2004, **20**, 1147.
- [26] V. Uivarosi, S.F. Barbuceanu, V. Aldea, C. Arama, M. Badea, R. Olar, D. Marinescu, *Molecules.*, 2010, **15**, 1578.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lipca 2016

ADENOZYNO-5'-O-(N-ACYLOSULFAMOILOWE) POCHODNE JAKO POTENCJALNE LEKI PRZECIWGRUŽLICZE

5'-O-[N-(ACYL)SULFAMOYL]ADENOSINE DERIVATIVES AS POTENTIAL ANTITUBERCULOSIS DRUGS

Katarzyna Kulik^{1*}, Janina Baraniak²

¹ Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-262 Łódź

² Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemiczny i Ochrony Środowiska,
Akademia im. Jana Długosza,
Al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa

*e-mail: kpieta@cbmm.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Projektowanie nowych leków przeciwegrzliczych ukierunkowane na mykobaktyny
2. Mimetyki acyloadenylanu
 - 2.1. Synteza analogów adenozyny modyfikowanych w pozycji 5' grupą aminoacylosulfamoiłową
 3. Badanie zależności pomiędzy aktywnością a modyfikacją w obrębie domeny cukrowej, arylowej oraz nukleozasadowej
 4. Synteza konformacyjnie usztywnionych pochodnych Sal-AMS
 5. Analigi mające na celu polepszenie parametrów farmakokinetycznych Sal-AMS

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Katarzyna Kulik ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2013 roku. Jej zainteresowania naukowe dotyczą głównie projektowania, syntezy i badanie wybranych właściwości biologicznych modyfikowanych nukleozydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym.

Dr hab. Janina Baraniak po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej rozpoczęła pracę w CBMM PAN w Łodzi pod kierunkiem Prof. Wojciecha Steca, gdzie w 1986 roku uzyskała stopień naukowy doktora a w 2005 roku stopień doktora habilitowanego. Głównym przedmiotem zainteresowań naukowych jest chemia modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów. Prowadzone badania są skoncentrowane nad syntezą związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jak i istotnym znaczeniu poznawczym nakierowanym na badania mechanistyczne procesów biochemicalnych. Jest promotorem dwóch prac doktorskich i współautorką 68 publikacji. Od 2006 roku pracuje w Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), the etiological agent of tuberculosis (TB), is the leading bacterial cause of infectious disease mortality. The current WHO-approved treatment for TB involves a three- or four-drug regimen comprising isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and/or ethambutol for a minimum of 6 months. While these first-line agents remain useful in treating susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains, the emergence of multidrug resistant tuberculosis demands the development of new drugs [1].

Iron acquisition is an essential process for *M. tuberculosis* as well as almost all other microorganisms. However, this essential micronutrient is highly sequestered in a mammalian host. In response to iron starvation, *Mtb* produces small-molecule iron chelators, a pair of related peptidic siderophores known as mycobactin and carboxymycobactins that vary by the appended lipid residue termed siderophores [4, 5, 7, 8]. Because mycobactins are critical for growth and virulence of *M. tuberculosis*, they have emerged as attractive targets for the development of anti-TB agents [4].

Biosynthesis of mycobactin is initiated by the aryl acid adenylation enzyme MbtA which activates salicylic acid forming an acyladenylate intermediate (Sal-AMP). MbtA is also responsible for loading the acyladenylate intermediate onto the thiolation domain of MbtB-SH – the enzyme taking part in the next step of biosynthesis process [10].

Given the documented importance of many siderophores for virulence and lack of human aryl acid adenylation enzymes homologues, several analogues possessing stable linkers as bioisosteres of the labile acyl phosphate function have been synthesized as the potent enzyme inhibitors [13]. The initial lead compound 5'-O-[*N*-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (Sal-AMS) has emerged as a promising inhibitor of MbtA and was shown to possess promising whole-cell activity toward *M. tuberculosis*.

Keywords: 5-O-[*N*-(acyl)sulfamoyl]adenosine derivatives, antituberculosis drugs, *Mycobacterium tuberculosis*, acyl adenylates

Słowa kluczowe: adenozyno-5'-O-(*N*-acylosulfamoilowe) pochodne, leki przeciwgružlicze, prątek gružlicy, acyloadenylany

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
CBr ₄	– tetrabromometan
CDI	– 1,1'-karbonylodiiimidazol
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undecen-7
DIAD	– azodikarboksylan diizopropylu
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
Mtb	– prątek gruźlicy
NaN ₃	– azydek sodu
PPh ₃	– trifenylofosfina
TFA	– kwas trifluoroetanowy
Sal-AMS	– 5'-O-[N-(salicylo)sulfamoilo]adenozyna
MbtA	– enzym katalizujący reakcję adenylowania podczas biosyntezy mykobaktyn
MbtB-SH	– białko uczestniczące w biosyntezie mykobaktyn

WPROWADZENIE

Gružlica będąca chorobą zakaźną jest wywołana przez prątką gružlicy (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*), który występuje zarówno w formie utajonej, jak i aktywnej. Utajone bakterie mogą trwać w ustroju nawet przez lata, nigdy nie namnażając się i nie powodując choroby. Na aktywną postać choroby zapadają najczęściej osoby z osłabionym układem odpornościowym.

Mtb atakuje człowieka już od ponad 500 tys. lat i z powodu tej choroby zmarło wielu wybitnych ludzi (np. Fryderyk Chopin), gdyż dopiero odkrycie w 1943 roku streptomycyny stanowiło przełom w walce z tą chorobą. Jakkolwiek streptomycyna miała wiele działań niepozadanych to okazała się pierwszym skutecznym lekiem na gružlicę. Następnie w połowie ubiegłego wieku opracowano kolejne środki przeciwprątkowe, które kompensowały wady streptomycyny. Zalicza się do nich leki bakteriobójcze i wyjaławiające (izoniazyd, rifampicyna, pirazynamid, streptomycyna) oraz leki bakteriostatyczne (kwas *p*-aminosalicylowy, cykloseryna). Chociaż stwarza to możliwość dużej kombinacji w leczeniu wielolekowym, to nie jest równoznaczne z dowolnym zestawem leków [1]. Stosowanie tych leków sprawiło, że na początku lat siedemdziesiątych XX wieku wielu ekspertów uznało, że gružlica została prawie całkowicie wyparta. Tymczasem obecnie prątek gružlicy jest wśród czynników zakaźnych drugim po HIV najgroźniejszym zabójcą uśmiercającym rocznie ponad 2 mln osób [2]. Zresztą zakażenie wirusem HIV zwiększa podatność na gružlicę a w przypadku osób z utajoną formą gružlicy ryzyko rozwinięcia się aktywnej postaci choroby wzrasta nawet 50 krotnie.

Właściwości biologiczne prątka gružlicy powodują, że w odróżnieniu od wielu innych chorób zakaźnych gružlica musi być leczona kilkoma lekami jednocześnie, na które prątki danego chorego są wrażliwe, i dostatecznie długo. Zbyt krótkie leczenie kilkoma, nawet najlepszymi lekami, powoduje ryzyko nawrotu choroby. Ponadto, chociaż dostępność dość dużej liczby leków stwarza możliwość dużej kombinacji w leczeniu wielolekowym, to nie jest równoznaczne z dowolnym zestawem leków.

Opracowane w latach sześćdziesiątych schematy terapeutyczne są skuteczne na zwykłe prątki jeżeli terapia jest kontynuowana przez okres 6–9 miesięcy [1]. Natomiast przedwczesne zakończenie leczenia skutkuje pojawiением się szczepów opornych na antybiotyki. Oporność szczepów prątka na dwa z czterech leków pierwszego rzutu – izoniazyd i rymfapicynę- odnotowuje się w przypadku gružlicy wielolekoopornej. Te przypadki gružlicy są zwykle uleczalne, ale wymagają zastosowania preparatów drugiego rzutu, które są kosztowne i mają poważne działania niepozadane.

Niestety ostatnio pojawiły się hiperlekooporne szczepy prątków gružlicy, niewrażliwe na niemal wszystkie znane leki przeciwprątkowe. Do ich ewolucji i rozprzestrzeniania może dochodzić wtedy, gdy w leczeniu gružlicy należałoby stosować leki drugiego rzutu. Biorąc pod uwagę, że większość tego typu zdarzeń dotyczy krajów Trzeciego Świata drogie terapie są najczęściej nie do zaakceptowania. Według

danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku gruźlicę hiperleko-oporną odnotowano w 49 państwach.

Upowszechnienie się międzynarodowych podróży sprawiło, że gruźlica ponownie stanowi ogromny ogólnoświatowy problem zdrowotny zarówno w krajach afrykańskich jak i wysoko rozwiniętych i w rzeczywistości ludzkość stanęła u progu największej epidemii.

Jakkolwiek modyfikacja istniejących leków w celu polepszenia ich parametrów terapeutycznych może stanowić istotne źródło nowych terapeutyków to w dniu sieniu do szczepów opornych na niemodyfikowany lek istnieje zapotrzebowanie na leki, które będą inhibitorami nowych miejsc (ang. *target*) terapeutycznych. Tego typu podejście w projektowaniu leków spotyka się z coraz większym zainteresowaniem (ang. *target-based approach*) [3]. Kilka obiecujących specyfików ukierunkowanych na hamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii, hamowanie replikacji DNA i syntezy białek znajduje się obecnie w różnych fazach badań klinicznych.

W projektowaniu nowych leków przeciwgruźliczych szczególnie interesujące podejście dotyczy inhibicji syntezy niskocząsteczkowych chelatorów żelaza, tzw. sideroforów [4].

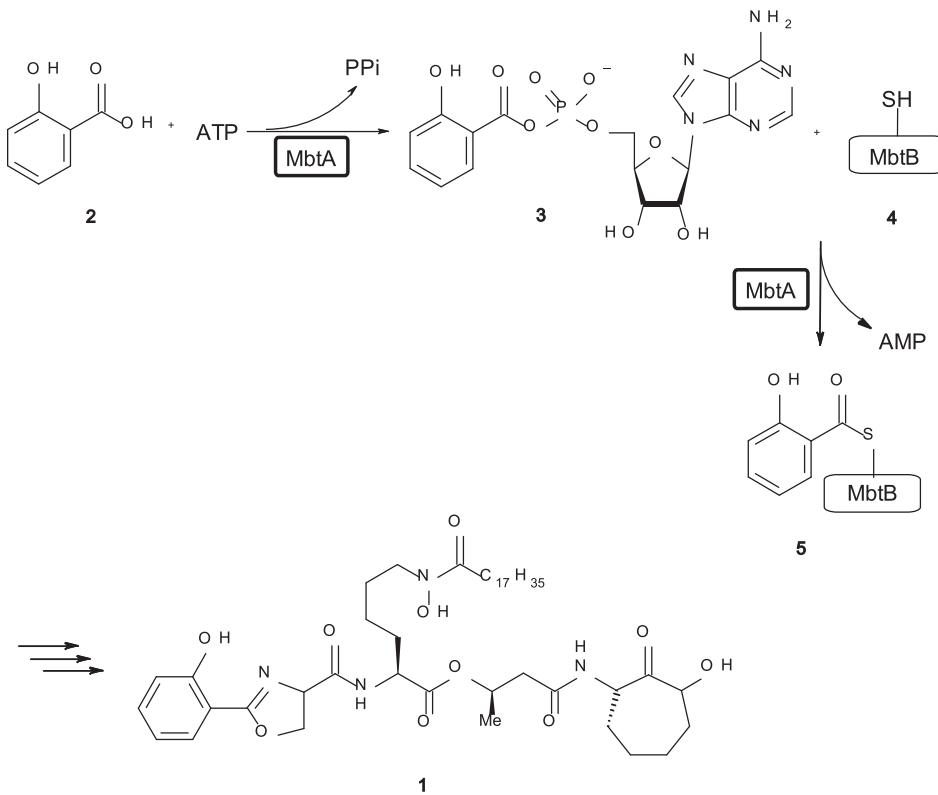
1. PROJEKTOWANIE NOWYCH LEKÓW PRZECIWGRUŽLICZYCH UKIERUNKOWANE NA MYKOBAKTYNY

Mycobacterium tuberculosis tak jak inne patogeny wymaga obecności jonów żelaza między innymi do syntezy niektórych enzymów [5]. Jednakże w organizmie człowieka żelazo jest trudno dostępne, gdyż w układzie krwionośnym ssaków glikoproteina gospodarza o właściwościach chelatujących żelazo tzw. transferyna wiąże żelazo i przekazuje je do komórek.

Stąd też stężenie wolnych jonów żelaza w surowicy krwi oraz w płynach organizmu jest zbyt niskie, aby wspomóc wzrost bakterii i ich kolonizację. Aby zaspakoić zapotrzebowanie na ten pierwiastek wiele patogenów wytworzyło mechanizmy obejmujące syntezę i wydzielanie małych cząsteczkowych chelatorów żelaza zwanych siderofarami, których zadaniem jest wyciąganie żelaza z białek gospodarza [6]. *Mycobacterium tuberculosis* do wzrostu komórkowego wykorzystuje dwie klasy strukturalnie podobnych peptydowych sideroforów: mykobaktyny i karboksykobaktyny, które różnią się wyłącznie resztą lipidową [7]. Absolutne wymagania patogenów dotyczące żelaza doprowadziły do badania możliwości specyficznego hamowania biosyntezy mykobaktyn, czego konsekwencją byłoby zahamowanie wzrostu i wirulencji *Mycobacterium tuberculosis*.

Pierwsze wzmianki o tym, iż na mykobaktyny może być ukierunkowane projektowanie potencjalnych chemoterapeutyków pochodzą z 1945 roku. Wykazano wówczas, iż związki chemiczne będące analogami mykobaktyn mogą pełnić rolę ich antagonistów [8].

Biosynteza mykobaktyny (**1**) jest inicjowana przez MbtA, enzym katalizujący adenylowanie kwasu salicylowego [9]. W pierwszym etapie karboksylowy atom tlenu kwasu salicylowego (**2**) atakuje α atom fosforu w cząsteczce ATP prowadząc do utworzenia acyloadenylnanu **3** i pirofosforanu (PPi; Schemat 1). Następnie MbtA również katalizuje przyłączenie związku **3** do białka MbtB-SH (**4**), w wyniku czego tworzy się związek pośredni **5**, który stanowi substrat w wieloetapowym procesie syntezy mykobaktyny (**1**) [10].

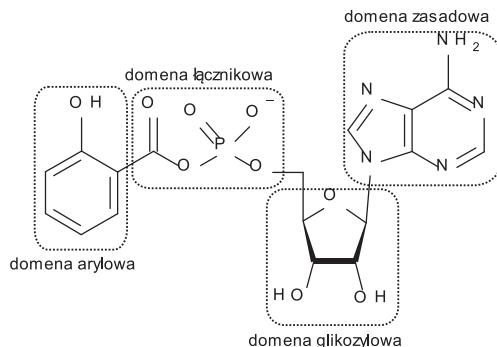


Schemat 1. Biosynteza mykobaktyn - mechanizm reakcji enzymatycznej katalizowanej przez MbtA
 Scheme 1. Biosynthesis of the mycobactins – enzyme reaction mechanism catalyzed by MbtA

Najintensywniej badanym etapem biosyntezy mykobaktyn jest mechanizm reakcji katalizowanej przez MbtA. Enzym ten nie posiada ssacznego homologu i stąd też stanowi idealny obiekt do projektowania potencjalnych inhibitorów. Analigi nukleozydów projektowane w celu hamowania aktywności tego enzymu powinny być stabilnymi związkami pośrednimi naśladującymi strukturalnie acyloadenylnan.

2. MIMETYKI ACYLOADENYLANU

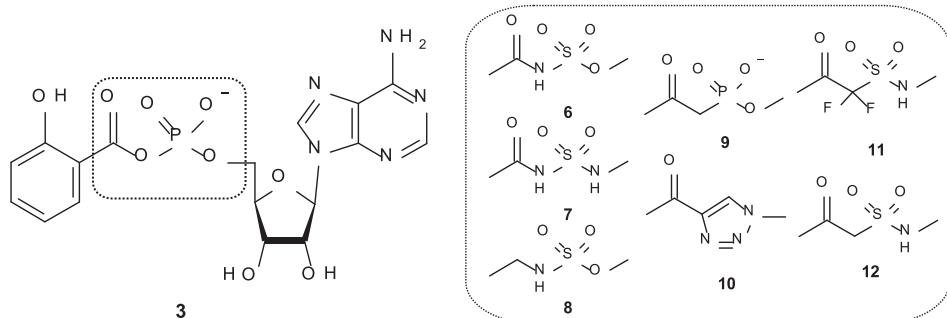
Intensywne badania dotyczące poszukiwania efektywnych inhibitorów MbtA były prowadzone niezależnie w trzech laboratoriach [11–13], przy czym szczególnie badanie zależności pomiędzy budową a aktywnością (ang. *Structure Activity Relationships*, SAR) miały miejsce w zespole Aldricha [13]. W cząsteczce acyloadenylanu **3** wyróżniono cztery domeny: arylową, łącznikową, glikozylową oraz domenę nukleozasadową (Rys. 1). Do każdej z tych domen były wprowadzane zmiany strukturalne.



Rysunek 1. Poddawane modyfikacji domeny acyloadenylanu **3**

Figure 1. Modified acyl adenylate **3** domains

Region łącznikowy stanowił miejsce największej liczby modyfikacji. Zsyntezowano serię związków (Rys. 2), w których labilny acylosforanowy łącznik zastąpiono takimi ugrupowaniami jak: acylosulfamidoilowe (**6**), acylosulfamidowe (**7**), sulfaminowe (**8**), α -ketofosfonianowe (**9**) oraz acylotriazolowe (**10**) [13]. Przesłankę do wprowadzenia w obrębie cząsteczki potencjalnego inhibitora ugrupowania sulfonamidowego stanowił szeroki potencjał terapeutyczny sulfonamidów obejmujący leki przecizwakaźne, przeciwcukrzycowe oraz moczopędne.



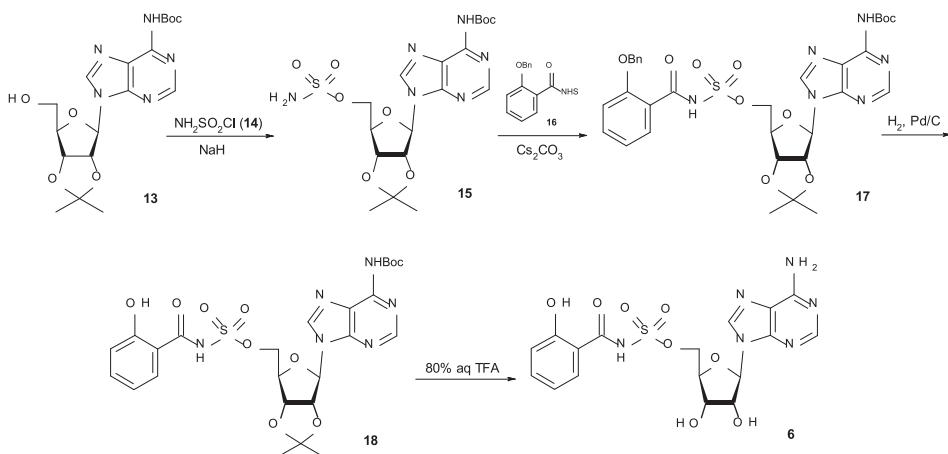
Rysunek 2. Struktura inhibitorów Mbt modyfikowanych w obrębie domeny łącznikowej

Figure 2. Structure of Mbt inhibitors with linker modifications

Wśród zsyntezowanych związków pochodne kwasu salicylowego posiadające łącznik acylosulfamoiowy (**6**) oraz acylosulfamidowy (**7**) okazały się najsilniejszymi inhibitorami MbtA wykazując aktywność przeciwgružliczą na poziomie sub-mikromolarnym wobec wszystkich komórek *M. tuberculosis*, co jest porównywalne z aktywnością izoniazydu stosowanego obecnie w terapii gružlicy.

2.1. SYNTEZA ANALOGÓW ADENOZYNY MODYFIKOWANYCH W POZYCJI 5' GRUPĄ AMINOACYLOSLFAMOILOWĄ

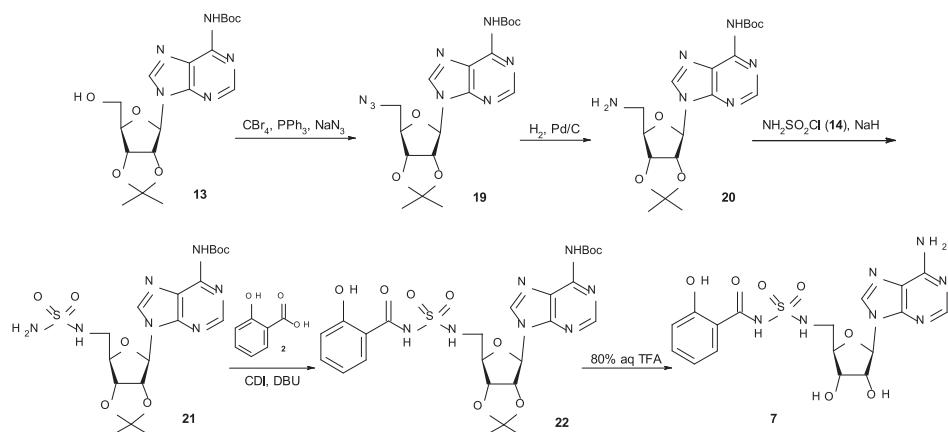
Pierwszy etap syntezy związku **6** polegał na reakcji chlorku sulfamoiowego (**14**) z *N*⁶-Boc-2',3'-O-izopropylidenoadenozyną (**13**, Schemat 2). Otrzymana w ten sposób 5'-sulfamoiowana pochodna **15** pod działaniem estru *N*-hydroksybursztynowego kwasu *O*-benzylo-salicylowego (**16**) wobec węglanu cezu została przekształcona w związek **17**. Następnie usunięcie grupy benzylowej (katalityczne uwodornienie, związek **18**) i *t*-butylokarbaminianowej oraz izopropylidenowej za pomocą kwasu trifluorooctowego dało sulfamoiową pochodną adenozyny (**6**, Sal-AMS).



Schemat 2. Synteza 5'-O-sulfamoiowej pochodnej adenozyny (**6**, Sal-AMS)

Scheme 2. Synthesis of 5'-O-sulfamoyl adenosine derivative (**6**, Sal-AMS)

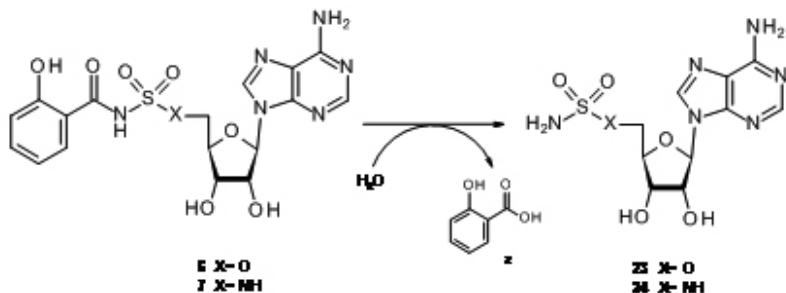
W syntezie acylosulfamidowej pochodnej adenozyny (**7**) jako substrat wykorzystano również *N*⁶-Boc-2',3'-O-izopropylidenoadenozę (**13**), która w warunkach reakcji Appela ($\text{Ph}_3\text{P}, \text{CBr}_4, \text{NaN}_3$) została przekształcona w odpowiednią azydo pochodną **19** (Schemat 3). Katalityczne uwodornienie **19** prowadziło do aminy **20** a następnie jej sulfamoiowanie dało sulfamid **21**, który z kolei w reakcji z kwasem salicylowym wobec CDI i DBU został przekształcony w związek **22**. Przeprowadzone finalnie usunięcie grup ochronnych z **22** za pomocą TFA dało pożądaną pochodną **7**.



Schemat 3. Synteza 5'-O-acylosulfamidowej pochodnej adenozyny (7)

Scheme 3. Synthesis of 5'-O-acylsulfamide adenosine derivative (7)

Jakkolwiek aktywność pochodnych **6** i **7** potwierdzała zaproponowaną przez Aldricha koncepcję projektowania potencjalnych inhibitorów MbtA to hydroliza tych związków mogła prowadzić do uwalniania 5'-O-(sulfamoilo)adenozyny (**23**) bądź jej aminowej pochodnej **24**, związków posiadających silne właściwości cytotoksyczne (Schemat 4) [14]. Ponadto analogi **6** i **7** w fizjologicznym pH występują w formie zjonizowanej co wyraźnie zmniejsza ich biodostępność przy podaniu doustnym. Aldrich zsyntezował ziązki, w których centralny atom azotu łącznika acylsulfamidowego zastąpiono atomem węgla (**11**, **12**, Rys. 2) [15]. Jednakże badanie właściwości inhibitorowych otrzymanych β -ketosulfonamidów **11** i **12** wobec MbtA wykazały, iż są one mniej aktywne w porównaniu do związków **6** i **7**.



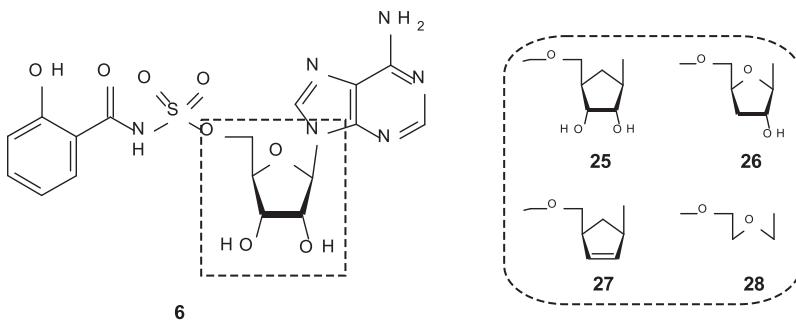
Schemat 4. Hydroliza 5'-O-sulfamoilowej i 5'-O-acylosulfamidowej pochodnej adenozyny (6, 7)

Scheme 4. Hydrolysis of 5'-O-sulfamoyl and 5'-O-acylsulfamide adenosine derivatives (6, 7)

3. BADANIE ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY AKTYWNOŚCIĄ A MODYFIKACJĄ W OBREBIE DOMENY ARYLOWEJ, CUKROWEJ ORAZ NUKLEOZASADOWEJ

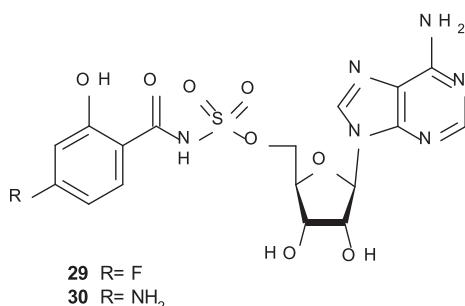
5'-O-[*N*-(salicylo)sulfamoilo]adenozyna (**6**, Sal-AMS) posłużyła Aldrichowi jako struktura wiodąca w badaniu zależności pomiędzy aktywnością a modyfikacją w obrębie domeny cukrowej, arylowej oraz nukleozasadowej. Badanie aktywności związków modyfikowanych w pierścieniu cukrowym wykazało, iż obecność atomu tlenu w pozycji 4' (**25**, zastąpienie atomu tlenu grupą metylenową) oraz 3' (**26**, zastąpienie grupy hydroksylowej atomem wodoru) pierścienia rybofuranozy nie jest niezbędnym elementem struktury inhibitora, podczas gdy brak tlenu w pozycji 2' oraz modyfikacje zmniejszające (**27**) lub zwiększające (**28**) elastyczność cząsteczki wpływają negatywnie na aktywność związku (Rys. 3) [16]. Karbocykliczny analog **25**, okazał się wyjątkowo aktywnym związkiem. Autorzy tłumaczą ten fakt wzrostem trwałości spowodowanym wyeliminowaniem mniejszości stabilnego chemicznie i enzymatycznie oraz bardziej hydrofilowego wiązania glikozydowego.

Natomiast modyfikacje w obrębie reszty arylowej inhibitora wykazały, iż obecność grupy benzoilowej jest niezbędna dla aktywności tych związków [17].



Rysunek 3. Struktura inhibitorów *Mbt* modyfikowanych w obrębie domeny glikozylowej
Figure 3. Structure of *Mbt* inhibitors with glycosyl modifications

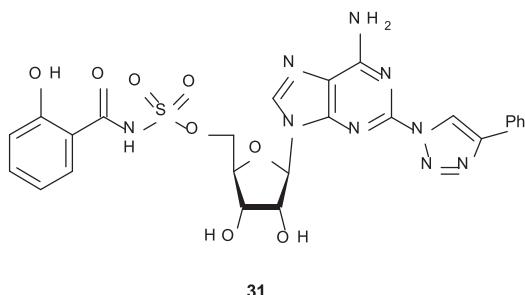
Zsyntezowano również serię związków zawierających różne podstawniki w pierścieniu aromatycznym fragmentu salicylowego oraz analogi, w których grupa hydroksylowa w pozycji *ortho* została zastąpiona innymi podstawnikami, a także ziązki, w których fragment salicylowy zastąpiono innymi grupami heterocyklicznymi, cykloalkilowymi, alkilowymi oraz aminoacylowymi.



Rysunek 4. Struktura inhibitorów *Mbt* modyfikowanych w obrębie domeny arylowej
Figure 4. Structure of *Mbt* inhibitors with aryl modifications

Badania właściwości inhibitorowych tych związków wykazały, iż obecność funkcji hydroksylowej oraz atomu fluoru w pozycji C-2 pierścienia aromatycznego bardzo korzystnie wpływa na aktywność zaś obecność małych podstawników w pozycji C-4 nie obniża aktywności w porównaniu z niemodyfikowanymi acyloadenylanami. W otrzymanej serii związków pochodna zawierająca resztę 4-fluorosalicylową (**29**, Rys. 4) okazała się być najaktywniejszym związkiem natomiast analog *p*-aminosalicylowy **30** był wyjątkowo selektywnym inhibitorem, o aktywności 16-krotnie większej w warunkach niskiego stężenia jonów żelaza w stosunku do aktywności obserwowanej przy wysokim stężeniu tych jonów. Ma to istotne znaczenie, gdyż synteza sideroforów zachodzi według dwóch alternatywnych procesów biochemicznych zależnych od stężenia jonów żelaza. Obydwa te procesy przebiegają z udziałem pochodnych o strukturze acyloadenyanów, stąd też selektywność inhibitora jest istotnym elementem oceny aktywności związków [18].

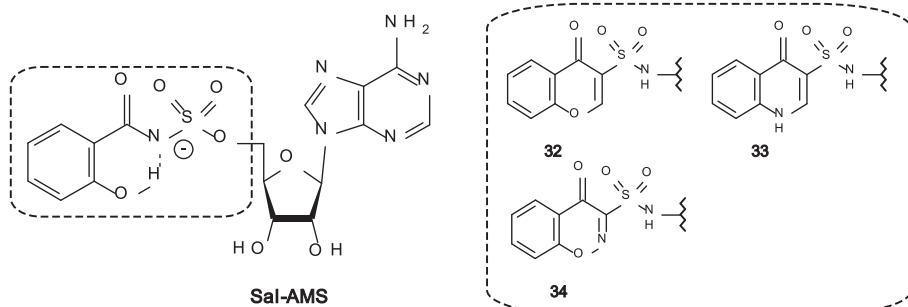
W przypadku modyfikacji nukleozasady brak azotu w pozycji N-1 lub N-3 w obrębie pierścienia purynowego nie miał wpływu na aktywność związków, podczas gdy usunięcie azotu N-7 prowadziło do wyraźnego zmniejszenia właściwości inhibitorowych [19]. Wbrew oczekiwaniom duże przestrzennie podstawniki w pozycji C-2 oraz małe alkilowe grupy dołączone do azotu w pozycji N-6 puryny, w przeciwieństwie do modyfikacji w miejscu C-8, nie zmniejszały aktywności otrzymanych pochodnych acyloadenyanowych. Przeprowadzone przez grupę Aldricha symulacje dynamiki molekularnej enzymu MbtA odpowiedzialnego za adenylowanie kwasu salicylowego wykazały znaczną plastyczność kieszeni wiążącej nukleozyd pozwalając tym samym na wiązanie pochodnych Sal-AMS, których pozycję C-2 puryny modyfikowano dużymi podstawnikami takimi jak 1,2,3-triazole podstawione w pozycji 4 [20]. Pochodna fenylotriazolowa **31** (Rys. 5) okazała się najlepszym kandydatem na lek przeciwgruźliczy i charakteryzowała się najkorzystniejszymi właściwościami inhibitorowymi, wysoką selektywnością, brakiem cytotoksyczności oraz zwiększoną lipofilowością ułatwiającą wnikanie przez błony komórkowe.



Rysunek 5. Struktura inhibitora Mbt modyfikowanego w obrębie domeny zasadowej grupą 1,3,2- triazolową
 Figure 5. Structure of Mbt inhibitors with nucleobase modifications by means of 1,3,2- triazole moiety

4. SYNTEZA KONFORMACYJNIE USZTYWNIONYCH POCHODNYCH SAL-AMS

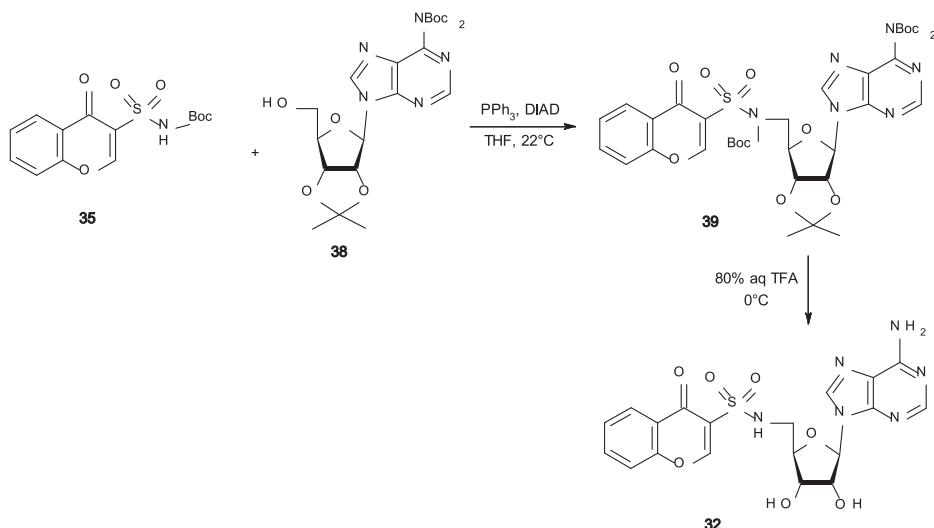
Jednakże wstępne badania farmakokinetyczne wykazały, że Sal-AMS i jego analogi charakteryzują się słabą biodostępnością przy podaniu doustnym [21]. Wobec danych literaturowych mówiących o tym, że biodostępność zwiększa się wraz z ograniczeniem rotacji wokół wiązań [22] w zespole Aldricha zsyntezowano konformacyjnie usztywnione analogi 32–34 (Rys. 6). Związki te mimikują hipotetyczną konformację Sal-AMS związanego z enzymem MbtA i powinny wykazywać większą biodostępność będącą skutkiem usunięcia dwóch wiązań i ujemnie zjonizowanego ugrupowania sulfaminianowego.



Rysunek 6. Konformacyjnie ograniczone analogi 5'-O-[N-(salicylo)sulfamoiło] adenozyny (32–34)
 Figure 6. Conformationally constrained analogues of 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl] adenosine (32–34)

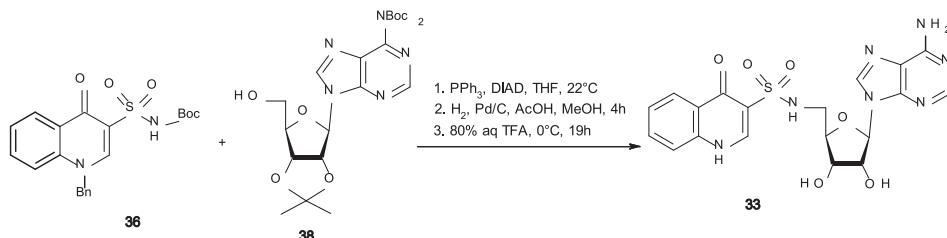
Strategia syntezy tych związków polegała na kondensacji bicyklicznych-3-sulfonamidów (35–37) z *N⁶,N⁶-bis(tert-butoksylkarbonylo)-2',3' izopropylidenoadenozyną (38) w warunkach reakcji Mitsunobu (PPh₃, DIAD). Wprowadzenie na grupę egzaminową N-6 dwóch reszt *tert*-butoksylkarbonylowych eliminowało konkurenncyjną reakcję cyklizacji pomiędzy atomem N-3 puryny i rybozy C-5', gdyż protekcja N-6 grupy aminowej obniża nukleofilowość N-3 atomu.*

I tak w wyniku reakcji bicyklicznego sulfonamidu **35** z **38** (Schemat 5) otrzymano z wydajnością 80% związek **39**, który po potraktowaniu 80% kwasem TFA (usunięcie grup ochronnych) został przekształcony w pożądany analog **32**.



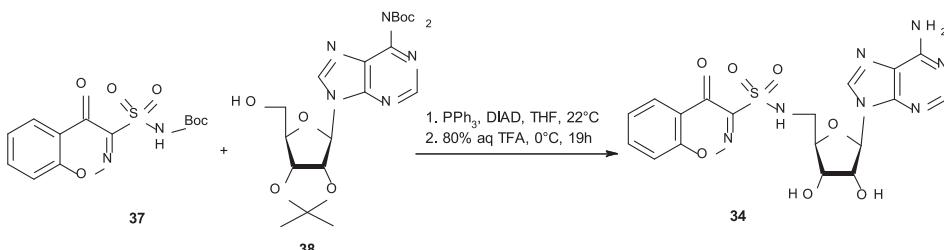
Schemat 5. Synteza kromonowej pochodnej Sal-AMS (32)
Scheme 5. Synthesis of chromone derivative of Sal-AMS (32)

Przeprowadzona w analogiczny sposób reakcja sulfonamidu **36** z **38** prowadziła do pożądanego analogu **33** (Schemat 6) a reakcja pomiędzy sulfonamidem **37** i blokowaną adenozyną **38** dawała analog **34** (Schemat 7).



Schemat 6. Synteza chinolonowej pochodnej Sal-AMS (33)
Scheme 6. Synthesis of quinolone derivative of Sal-AMS (33)

Badanie powinowactwa związków **32–34** względem enzymu MbtA pokazało, że obecność ujemnego ładunku w związkach **6** jest koniecznym warunkiem, gdyż analogi **32** i **34** nie posiadające w pierścieniu heterocyklicznym atomów ulegających jonizacji nie wiązały się z enzymem.



Schemat 7. Synteza benzoksazynowej pochodnej Sal-AMS (34)
Scheme 7. Synthesis of benzoxazinone derivative of Sal-AMS (34)

Natomiast dla związku 33 zawierającego w pozycji N-1 grupę NH to powinowactwo było 18-krotnie mniejsze niż dla Sal-AMS (6). Prawdopodobnie jest to generalna zależność wszystkich enzymów katalizujących reakcje adenylowania [15, 23]. Niestety związek 33 nie wykazywał żadnej aktywności inhibitorowej zarówno przy niskim stężeniu jonów żelaza jak i przy wysokim stężeniu tych jonów. Autorzy tłumaczą to zredukowaną akumulacją związku w komórkach.

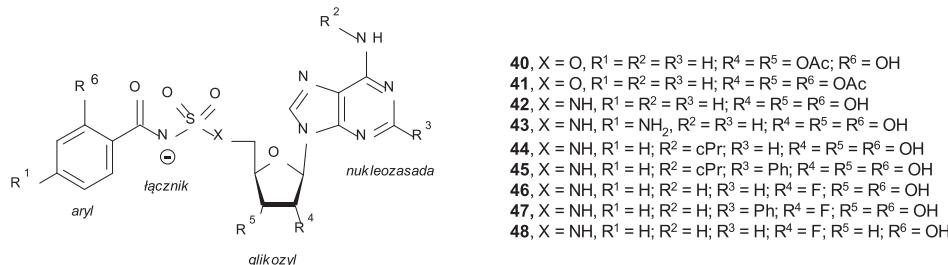
5. ANALOGI MAJĄCE NA CELU POLEPSZENIE PARAMETRÓW FARMAKOKINETYCZNYCH SAL-AMS (6)

Dalsze badania prowadzone w laboratorium Aldricha miały na celu poprawę parametrów farmakokinetycznych takich jak biodostępność, biologiczny okres półtrwania, zmiana stężenia w czasie, wchłanianie i eliminacja inhibitora Sal-AMS (6). W tym celu zsyntezowano analogi będące prolekami (40–41; Rys. 7), analogi zwiększające pKa reszty sulfaminianowej (42–43), analogi modulujące lipofilowość polarnego nukleozydu (44–45), analogi zawierające w reszcie nukleozydowej atomy fluoru (46–48).

Proleki 40–41 zawierające grupy acetylowe maskujące polarne grupy hydroksylowe w prototypowym inhibitorze 6 charakteryzowały się bardzo małą biodostępnością prawdopodobnie wskutek powolnej hydrolizy grup maskujących.

Wobec tego, że ładunek ujemny grupy sulfaminianowej jest warunkiem koniecznym aktywności tych związków a z drugiej strony ulegający jonizacji acylosulfonylowy łącznik potencjalnych inhibitorów może utrudniać ich przechodzenie przez błonę komórkową zespół Aldricha zsyntezował analogi 42–43 zwiększające pKa acylosulfonylowego atomu azotu. Analog 42 wykazywał tylko 3-krotnie lepszą biodostępność w porównaniu z 6. Wprowadzenie w pozycję *para* reszty salicylowej grupy aminowej (43) prowadziło do znacznej utraty biodostępności. Ostatecznie Aldrich założył, że wewnętrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe tworzące się pomiędzy sulfonylowym atomem azotu i *ortho*-fenolową grupą reszty salicylowej [25] częściowo obniża polarność poprzez delokalizację ładunku.

Również analogi **44–45** nie charakteryzowały się zadawalającymi parametrami farmakokinetycznymi. Natomiast analogi **46–48** zawierające atom fluoru przy C-2' atomie posiadały najkorzystniejsze parametry farmakokinetyczne, przede wszystkim zwiększał się okres półtrwania tych związków.



Rysunek 7. Struktura analogów mających na celu polepszenie parametrów farmakokinetycznych inhibitora Sal-AMS (**6**)

Figure 7. Structure of analogs designed to improve pharmacokinetic parameters of Sal-AMS (**6**) inhibitor

Atom fluoru jest często uważany jako izosteryczny w odniesieniu do atomu wodoru i w chemii nukleozydów fluoropochodne są od wielu lat syntezowanymi i badanymi związkami. Zastąpienie 2' lub 3' hydroksylowej grupy atomem fluoru powoduje niewielkie zmiany strukturalne ale znacznie zmienia stereoelektronowe własności cząsteczki cukru [26]. Te zmienione własności mogą kontrolować równowagę konformacyjną i reszta cukru może przyjąć konformację North (C3'-endo cukier) lub South (C2'-endo cukier) [27], mogą stabilizować wiązanie glikozydowe [28] jak również zwiększać lipofilowość związku [29].

Stąd też w zespole Aldricha zsyntezowano serię analogów Sal-AMS (**6**) systematycznie wprowadzając w pozycję przy C2' i C3' atomy fluoru [30]. Okazało się, że fluorowana cząsteczka cukru może przyjmować obydwie konformacje. Badanie aktywności fluorowanych pochodnych pokazało, że największą aktywność przeciwgruźliczą wykazuje związek **47**, który był 2-krotnie bardziej aktywny niż Sal-AMS (**6**). Jednakże w porównaniu do **6** nie nastąpiła poprawa biodostępności. Stąd też zsyntezowano serię estrowych proleków **47**, wprowadzając na grupę 3'-hydroksylową łańcuch alkilowy zawierający od dwóch do dwunastu atomów węgla [31]. Jest to powszechnie stosowana strategią mającą na celu zwiększenie biodostępności po podaniu doustnym, polegającą na tym, że wszechobecne w organizmie esterazy hydrolizują ugrupowanie estrowe i uwalniają docelowy lek. Niestety żaden z otrzymanych proleków nie charakteryzował się lepszymi parametrami niż związek **47**.

PODSUMOWANIE

Najsilniejsze inhibitory MbtA spośród związków otrzymanych przez zespół Aldricha posiadały większą aktywność niż część leków obecnie stosowanych w leczeniu gružlicy. Stąd też należy przypuszczać, że pochodne Sal-AMS mogą być szeroko wykorzystywane wobec patogenów syntezujących siderofory na drodze reakcji katalizowanej przez enzymy adenylanowe. Prawdopodobnie Mtb koduje przynajmniej 67 enzymów katalizujących proces adenylowania, które mogą stanowić potencjalne miejsce oddziaływanego z syntezowanymi pochodnymi Sal-AMS. Dalsze badania w tym kierunku są nadal prowadzone w zespole Aldricha [31].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] World Health Organization, *Tuberculosis handbook*, WHO: Geneva, 1998 (WHO/TB/98.253).
- [2] *Global Tuberculosis Report*, WHO: Geneva, 2014.
- [3] Y. Zhang, M. Amzel, Current Drug Targets, 2002, **3**, 131.
- [4] M. Luo, E.A. Fadeev, J.T. Groves, Nature Chem. Biol., 2005, **1**, 149.
- [5] J.H. Crosa, C.T. Walsh, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2002, **66**, 223.
- [6] M. Miethke, M.A. Marahiel, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2007, **71**, 413.
- [7] A. F.Vergne, A.J. Walz, M.J. Miller, Nat. Prod. Rep., 2000, **17**, 99.
- [8] G.A. Snow, Bacteriol. Rev., 1970, **34**, 99.
- [9] L.E.N. Quadri, J. Sello, T.A. Keating, P.H. Weinert, C.T. Walsh, Chem. Biol., 1998, **5**, 631.
- [10] S.S. Chavadi, K.L. Stirrett, U.R. Edupuganti, O. Vergnolle, G. Sadhanandan, E. Marchiano, C. Martin, W.G. Qiu, C.E. Soll, L.E. Quadri, J. Bacteriol., 2011, **193**, 5905.
- [11] J.A. Ferreras, J.S. Ryu, F. Di Lello, D.S. Tan, L.E. Quadri, Nat. Chem. Biol., 2005, **1**, 29.
- [12] M. Miethke, P. Bisseret, C.L. Beckering, D. Vignard, J. Eustache, M.A. Marahiel, FEBS, 2006, **273**, 409.
- [13] R.V. Somu, H. Boshoff, C. Qiao, E.M. Bennett, C.E. Barry, C.C. Aldrich, J. Med. Chem., 2006, **49**, 31.
- [14] A. Bloch, C. Coutsogeorgopoulos, Biochemistry, 1971, **10**, 4394.
- [15] J. Vannada, E.M. Bennett, D. Wilson, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, Org. Lett., 2006, **8**, 4707.
- [16] R.V. Somu, D.J. Wilson, E.M. Bennett, H.I. Boshoff, L. Celia, B.J. Beck, C.E. Barry, C.C. Aldrich, J. Med. Chem., 2006, **49**, 7623.
- [17] Ch. Qiao, A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, E.M. Bennett, R.V. Somu, C.E. Barry, C.C. Aldrich, J. Med. Chem., 2007, **50**, 6080.
- [18] J.A. Ferreras, J.S. Ryu, F. Di Lello, D.S. Tan, L.E. Quadri, Nat. Chem. Biol., 2005, **1**, 29.
- [19] J. Neres, N.P. Labello, R.V. Somu, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J. Vannada, L. Chen, C.E. Barry, E.M. Bennett, C.C. Aldrich, J. Med. Chem., 2008, **51**, 5349.
- [20] A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J. Neres, N.P. Labello, R.V. Somu, Ch. Xing, C.E. Barry, C.C. Aldrich, J. Med. Chem., 2008, **51**, 7495.
- [21] C.A. Engelhart, C.C. Aldrich, J. Org. Chem., 2013, **78**, 7470.
- [22] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, J. Med. Chem., 2002, **45**, 2615.
- [23] M. Ikeuchi, M.E. Meyer, Y. Ding, J. Hiratake, N.G. Richards, Bioorg. Med. Chem., 2009, **17**, 6641.

- [24] K.M. Nelson, K. Viswanathan, S. Dawadi, B.P. Duckworth, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 5459.
- [25] N.P. Labello, E.M. Bennett, D.M. Ferguson, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7154.
- [26] C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 4967.
- [27] J.J. Barchi, L.-S. Jeong, S.A. Siddiqui, V.E. Marquez, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1997, **34**, 11.
- [28] W. Zhou, G. Gumina, Y. Chong, J. Wang, R.F. Schinazi, C.K. Chu, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3399.
- [29] J.C. Biffinger, H.W. Kim, S.G. DiMagno, *Chem. Bio. Chem.*, 2004, **5**, 622.
- [30] S. Dawadi, K. Viswanathan, H.I. Boshoff, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 4835.
- [31] S. Dawadi, S. Kawamura, A. Rubenstein, R. Remmel, C.C. Aldrich, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 1314.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 czerwca 2016

EGZOPOLISACHARYDY BAKTERYJNE – BUDOWA I FUNKCJE

BACTERIAL EXOPOLYSACCHARIDES – STRUCTURE AND FUNCTIONS

Justyna Samaszko-Fiertek, Monika Kuźma,
Barbara Dmochowska, Rafał Ślusarz, Janusz Madaj*

Wydział Chemiczny Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
*e-mail: janusz.madaj@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Egzopolisacharydy

1.1. Biosynteza egzopolisacharydów

1.1.1. Wewnętrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

1.1.2. Zewnętrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

2. Budowa i zastosowania egzopolisacharydów bakteryjnych

2.1. Ksantan

2.2. Żelan

2.3. Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego

2.4. Dekstran

2.5. Bakteryjna celuloza

2.6. Kwas alginowy

2.7. Kwas hialuronowy

2.8. Mannany

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

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

Dr Monika Kužma ukończyła studia na kierunku Ochrona Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Rozprawę doktorską pod tytułem: „Badanie struktury pierwszorzędowej oraz właściwości reologicznych egzopolisacharydów wyodrębnionych z hodowli *Pseudomonas mutabilis*”. obroniła na początku 2011 roku, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych. Od stycznia 2010 roku związana z Zakładami Farmaceutycznymi Polpharma SA, pracując w Laboratorium Rozwoju Analitycznego w Dziale Badań i Rozwoju.

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

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

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–1998 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

ABSTRACT

Exopolysaccharides fulfil protective functions and allow bacteria live in the communities, single or mixed, by facilitating adhesion to surfaces and to each other. Microbes prefer to exist in the form of a biofilm. The term biofilm was introduced in 1978 and is the group of microorganisms surrounded by extracellular, highly hydrated mucus, which allows adhesion on various surfaces and adhesion of cells to each other [1]. The extracellular slime owes its character mainly due to the presence of exopolysaccharides. Bacteria living in biofilms, have a high resistance to external factors, such as changes in temperature, pH, humidity, oxygenation, presence of bacteriocins, antibodies or antibiotics. They may be up to 1,000 times more resistant to antibiotics than planktonic forms. They can be synthesized inside and outside bacteria cell. The structure of the bacterial exopolysaccharide is very diverse, but very often, due to the presence of uronic acid residues, or non-sugar organic acids as pyruvic acid, succinic acid, as well as residues of inorganic acids such as phosphoric acid or sulfuric acid, they are negatively charged particles. In addition, a characteristic of most of the exopolysaccharides (EPS) is their enormous molecular mass of up to several million g/mol [11]. Thanks to its rheological properties, ease of isolation, and often biodegradable antioxidant activity extracellular polysaccharides are increasingly used in industry as a gelling agents, hardening and thickening agents, emulsifiers, food coatings and pharmaceutical products. In addition, they can be used as bandages, anti-cancer agents, cholesterol-lowering, antiulcer or immuno-modulators [20–27]. This article discusses in details the selected exopolysaccharides such as xanthan, gellan, exopolysaccharides of lactic acid bacteria, dextran, bacterial cellulose, alginic acid, hyaluronic acid, mannans.

Keywords: exopolysaccharide, hyaluronic acid, bacterial cellulose, dextran, gellan, xanthan

Słowa kluczowe: egzopolisacharydy, kwas hialuronowy, celuloza bakteryjna, dekstran, żelan, ksantan

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

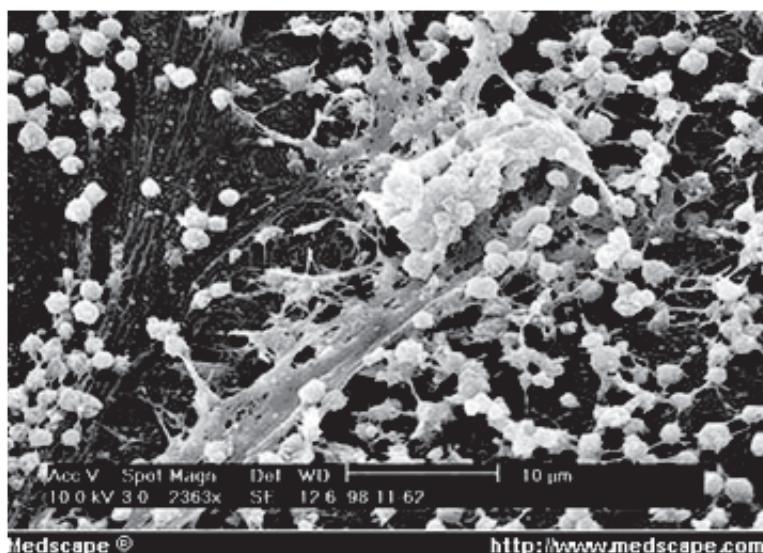
Ac	– acyl
BC	– celuloza bakteryjna (ang. <i>bacterial cellulose</i>)
EPS	– egzopolisacharyd (ang. <i>exopolysaccharide</i>)
Fucp	– fukopiranoza
Gal	– galaktoza
GDP	– guanozynodifosforan (ang. <i>guanosine diphosphate</i>)
Glc	– glukoza
GlcP	– glukopiranoza
GlcA	– kwas glukouronowy
GlcPA	– kwas glukopiranouronowy
GPC	– żelowa chromatografia filtracyjna (ang. <i>gel permeation chromatography</i>)
HA	– kwas hialuronowy (ang. <i>hyaluronic acid</i>)
LAB	– bakterie kwasu mlekowego (ang. <i>lactic acid bacteria</i>)
Lac	– mleczan
L-Gl	– L-glicerynian
LPS	– lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
Man	– mannoza
Manp	– mannopiranoza
Pyr	– pirogronian
Rha	– ramnoza
SEC	– chromatografia wykluczenia (ang. <i>size exclusion chromatography</i>)
Xp	– ksylolipanoza
UDP	– urydynodifosforan (ang. uridindiphosphat)

WPROWADZENIE

Spora część bakterii, zarówno Gram-dodatnich, ujemnych jak i mykobakterii posiada zdolność syntezy pozakomórkowych polisacharydów, które ze względu na stopień związania z powierzchnią komórki dzieli się na polisacharydy otoczkowe (CPS), ściśle związane ze ścianą komórkową oraz egzopolisacharydy (EPS), śluzowe polisacharydy luźno związane z powierzchnią mikroorganizmu. Pozakomórkowe polisacharydy przede wszystkim chronią mikroorganizmy przed działaniem czynników zewnętrznych oraz umożliwiają im życie w skupiskach.

1. EGZOPOLISACHARYDY

Egzopolisacharydy, zwane również polisacharydami śluzowymi (ang. *slime*) w odróżnieniu do polisacharydów otoczkowych luźno przywierają do komórki mikroorganizmu. Polisacharydy śluzowe pełnią funkcje ochronne oraz umożliwiają życie w społecznościach, jedno czy wielogatunkowych, poprzez ułatwienie przylegania do powierzchni oraz do siebie wzajemnie. Poniżej przedstawiono zdjęcie komórek *Staphylococcus aureus* otoczonych pozakomórkowym śluzem.



Rysunek 1. Biofilm *Staphylococcus aureus*, zdjęcie ze skaningowego mikroskopu elektronowego [Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA]

Figure 1. *Staphylococcus aureus* biofilm, image from a scanning electron microscope [Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA]

Przywykliśmy myśleć o bakteriach jako o pojedynczych, planktonowych formach. Jednakże obserwacje mikroorganizmów w różnych środowiskach pozwa-

lają wysnuć wniosek, iż planktonowe formy bardzo rzadko występują w naturze. Mikroby preferują funkcjonowanie w formie biofilmu. Termin biofilm został wprowadzony już w 1978 roku i oznacza grupę mikroorganizmów, otoczonych zewnętrzkomórkowym, wysoce uwodnionym śluzem, umożliwiającym adhezję do martwych bądź żywych powierzchni oraz przyleganie komórek wzajemnie do siebie [1]. Pozakomórkowy śluz zawdzięcza swoją postać obecności egzopolisacharydów, niejednokrotnie również białek, syntezowanych przez mikroorganizmy. Mikroorganizmy w biofilmie posiadają zdolność porozumiewania się za pomocą chemicznych sygnałów, proces ten nazywany jest *quorum sensing* (QS) [2–6].

Bakterie żyjące w postaci biofilmu, wykazują dużą oporność na czynniki zewnętrzne, takie jak zmiany temperatury, pH, wilgotności, natlenienie, obecność bakteriocyn, przeciwniczących czy antybiotyków. Mogą być nawet do 1000 razy bardziej oporne na działanie antybiotyków w porównaniu z formami planktonowymi. Najnowsze badania pokazują, że większość infekcji bakteryjnych jest spowodowana z udziałem biofilmu [7, 8]. Bakterie tworzą biofilmy na rozmaitych powierzchniach od skał, poprzez tkanki organizmów żywych, narzędzi i implanty medyczne, po instalacje wodne czy klimatyzacyjne [9, 10].

Dodatkowo wyrzucanie śluzu przez pory na zewnątrz komórki jest jednym ze sposobów poruszania się bakterii. U *Myxococcus xanthus* pory rozmieszczone są na przeciwnych biegunach komórki. Podczas wyrzucania polimeru węglowodanowego zaobserwowano ruch bakterii w przeciwnym kierunku.

Struktura egzopolisacharydów bakteryjnych jest ogromnie zróżnicowana, aczkolwiek bardzo często, za sprawą obecności reszt kwasów uronowych, lub nieckowanych kwasów organicznych jak pirogronowego, bursztynowego, a także reszt nieorganicznych kwasów, jak na przykład fosforowego czy siarkowego, są to ujemnie naładowane cząsteczki. Dodatkowo cechą charakterystyczną większości EPS-ów jest ich ogromna masa cząsteczkowa sięgająca kilku milionów g/mol [11].

1.1. BIOSYNTEZA EGZOPOLISACHARYDÓW

Obecnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad technologią otrzymywania mikrobiologicznych polimerów, poprzez optymalizację warunków hodowli, tak aby mikroorganizmy syntetyzowały polisacharydy o zadanych cechach i z wysoką wydajnością. Proces biosyntezy można regulować poprzez zmiany temperatury, odczynu środowiska hodowli, składu pożywki czy natlenienia. Aktywność drobnoustrojów w produkcji egzopolisacharydów jest coraz częściej stymulowana przy użyciu metod inżynierii genetycznej. W celu ingerencji w szlak biosyntezy egzopolisacharydów konieczna jest znajomość jego przebiegu. Obecnie wiadomo, że większość EPS-ów syntetyzowana jest wewnątrz komórki, według bardzo zbliżonego mechanizmu do syntezy polisacharydów ściany komórkowej – LPS-ów czy peptydoglikanu. Jednakże, znany jest również mechanizm biosyntezy egzopolisacharydów zachodzącej pozakomórkowo. Wyjątkami egzopolisachary-

dów syntezowanych poza komórką mikroorganizmu są: dekstran, alternan i lewan [12, 13]. Dodatkowo znajomość szlaku biosyntezy jest bardzo istotna w projektowaniu leków przeciwbakteryjnych. Jak wcześniej wspominano mikroorganizmy otoczone EPS mogą być do 1000 razy bardziej oporne na działanie antybiotyków w porównaniu z formami planktonowymi, stąd też celowe jest hamowanie biosyntezy EPS-ów u szczepów patogennych.

1.1.1. Wewnętrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

Większość egzopolisacharydów powstaje w wyniku wewnętrzkomórkowego szlaku biosyntezy, w którym wyróżnić można cztery główne etapy: transport cukrów do wnętrza cytoplazmy, syntezę cukrowych nukleotydów, polimeryzację jednostek cukrowych oraz eksport polimeru na zewnątrz komórki. W proces syntezy i transportu egzopolisacharydów zaangażowanych jest wiele enzymów, regulowanych przez klaster genów, odpowiedzialnych za aktywację monosacharydów poprzez tworzenie pochodnych nukleotydowych, modyfikacje ich struktury w wyniku epimeryzacji, dekarboksylacji oraz dehydrogenacji, tworzenie oligosacharydowych jednostek, ich polimeryzację i transport na zewnątrz komórki bakteryjnej.

Na uwagę zasługuje fakt, iż pewna część bakterii, przykładowo *Lactobacillus casei* podgat. *cremoris*, posiada geny kontrolujące biosyntezę egzopolisacharydów zlokalizowane na plazmidzie, a nie jak u większości dotąd poznanych bakterii na chromosomie [14]. Wiele pozakomórkowych polisacharydów jest częściowo podstawniona grupami acetylowymi, pirogronianowymi, bursztynianowymi, fosforanowymi, sulfonowymi czy metylowymi. W badaniach nad szlakiem biosyntezy egzopolisacharydu *Klebsiella pneumoniae* wykazano, że grupa acetylowa wywodzi się z acetylokoenzymu A, natomiast prekursorem grupy pirogronianowej jest fosfoenolopirogronian. W O-metylowych polisacharydach donorem funkcji metylowej jest metionina lub S-adenozylometionina. Obecność reszt kwasu fosforowego(V), występujących w niektórych polisacharydach, jest wynikiem przeniesienia grupy fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową cukru [15].

Zrozumienie szlaku biosyntezy EPS może ułatwić przykład ksantana. Jest to proces niezwykle złożony, w który zaangażowane są nośniki energetyczne. Jego szczegółową prezentację można znaleźć w literaturze [15].

Biosynteza ksantana przez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 jest wieloetapowym procesem i ma miejsce w różnych regionach komórki, od cytoplazmy po błonę białkowo-lipidową, przestrzeń peryplazmatyczną i zewnętrzna błonę komórkową. Rozpoczyna się od syntezy prekursorowych cukrowych nukleotydów. Do syntezy prekursorów UDP-glukozy i GDP-mannozy wykorzystywane są geny *xanA* i *xanB* zlokalizowane w innym miejscu chromosomu. Geny te odpowiadają za syntezę cukrowych prekursorów wykorzystywanych również do syntezy LPS-u. Trzeci prekursor UDP-glukouronian powstaje w wyniku utlenienia UDP-glukozy,

regulowanego przez gen *ugd* [15–18]. Proces syntezy ksantanu jest regulowany przez kластер 12 генов, от *gumB* до *gumM*.

Po syntezie cukrowych nukleotydów ma miejsce przeniesienie glukozo-1-fosforanu z UGP-glukozy na nośnikową jednostkę fosforanu undekaprenylu (C-55-P), gdzie kolejno są dostarczane pozostałe substraty w celu syntezy powtarzającej się pentasacharydowej jednostki budulcowej ksantanu. Po utworzeniu pentasacharydu następuje przyłączenie grup niecukrowych, pirogronianowej i acetylowej. Powyższe etapy zachodzą na wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Następnie ma miejsce przeniesienie pentasacharydowego fragmentu połączonego z nośnikiem lipidowym do przestrzeni peryplazmatycznej przez błonę cytoplazmatyczną, gdzie następuje polimeryzacja fragmentów pentasacharydowych, poprzez redukujący koniec. Finalnym etapem jest transport polisacharydu z przestrzeni peryplazmatycznej na zewnątrz komórki. Proces polimeryzacji i transportu ksantanu na zewnątrz komórki nie jest do końca poznany, aczkolwiek wydaje się być bardzo zbliżony do mechanizmu Wzy-zależnego [Wzy – białko membranowe (polimeraza O-antigenowa), która kontroluje polimeryzację łańcuchów polisacharydowych przez dodawanie kolejnych podjednostek do redukującego końca powstającego polimeru] mającego miejsce podczas syntezy fragmentu O-swoistego lipopolisacharydów *Enterobacteriaceae*.

1.1.2. Zewnętrzkomórkowa biosynteza egzopolisacharydów

Zdecydowanie mniejsza część egzopolisacharydów syntezowana jest poza komórką mikroorganizmu i tak opisanymi w literaturze przykładami są: dekstran, alternan i lewan. Dekstran jest homopolisacharydem, zbudowanym z reszt D-glukopiranozy, połączonych wiązaniem glikozydowym $\alpha(1 \rightarrow 6)$, często rozgałęzionym w pozycji 3, rzadziej w 2 i 4. Dekstran jest syntezowany przez Gram-dodatnie bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, przy użyciu dekstranosacharazy (glukozylo-transferazy), katalizującej rozpad wiązania glikozydowego w cząsteczce sacharozy, a następnie przenoszącej glukozę na redukujący koniec powstającego dekstranu. Energia potrzebna do procesu syntezy polimeru powstaje z rozpadu wiązania glikozydowego w cząsteczce sacharozy.



Alternan jest egzopolisacharydem produkowanym również przez bakterie z gatunku *Leuconostoc mesenteroides*. Podobnie do dekstranu zbudowany jest z reszt D-glukopiranozy, aczkolwiek połączone są one na przemian wiązaniami $\alpha(1 \rightarrow 6)$ i $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Formowanie alternanu zachodzi w obecności alternanosacharazy, analogicznie jak w przypadku dekstranu. Przypuszcza się, że alternanosacharaza jest wynikiem translacji zmutowanej sekwencji genu oryginalnie kodującego dekstranosacharazę.

Kolejnym przykładem pozakomórkowo wytwarzanego z sacharozy egzopolisacharydu jest lewan – β -2,6-fruktan syntezowany między innymi przez bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus*, *Steptococcus* oraz Gram-ujemne z rodzaju *Erwinia* i *Gluconobacter*. Enzymem umożliwiającym przemianę sacharozy w lewan jest lewanosacharaza, katalizująca hydrolizę sacharozy oraz przeniesienie D-fruktozy na powstający łańcuch lewanu i jej przyłączenie poprzez wiązanie β -2,6-glikozydowe [12, 19].



2. BUDOWA I ZASTOSOWANIA EGZOPOLISACHARYDÓW BAKTERYJNYCH

Egzopolisacharydy bakteryjne spełniają wiele funkcji, od ochrony mikroorganizmów przed czynnikami zewnętrznymi takimi jak: zmiany temperatury, wilgotności, odczynu czy obecności substancji toksycznych, poprzez umożliwianie adhezji i formowania biofilmu, stabilizowanie enzymów oraz magazynowanie składników pokarmowych. Dzięki swym właściwościom reologicznym, łatwości izolowania, biodegradowalności oraz często aktywności przeciwyutleniających pozakomórkowe polisacharydy znajdują coraz szersze zastosowanie w przemyśle jako substancje żelujące, utwardzające i zagięszczające, emulgatory, powłoki produktów spożywczych i farmaceutycznych. Dodatkowo próbuje się je wykorzystywać jako opatrunki, środki przeciwnowotworowe, obniżające poziom cholesterolu, przeciwrrzodowe czy immunomodulatory [20–27]. Przykładami bakteryjnych egzopolisacharydów o szerokim zastosowaniu przez człowieka są: bakteryjna celuloza, ksantan, żelan, dekstran, kwas alginowy, kwas hialuronowy czy egzopolisacharydy bakterii fermentacji mleczowej (LAB). Przykłady zastosowań zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zastosowania wybranych egzopolisacharydów bakteryjnych [12, 28, 29]
Table 1. Applications of selected bacterial exopolysaccharides [12, 28, 29]

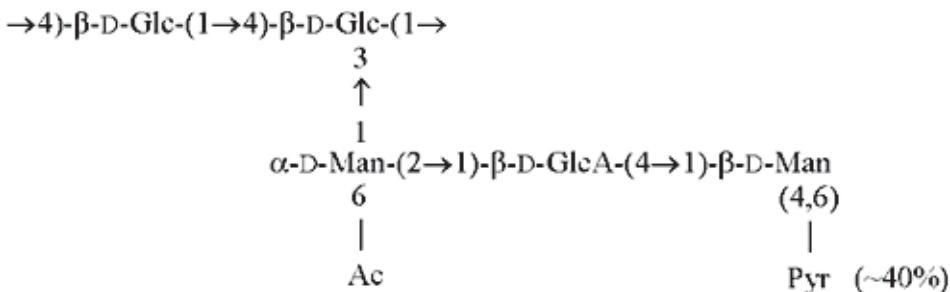
Egzopolisacharyd	Zastosowanie	Bakterie
Celuloza	Materiał opatrunkowy, tzw. sztuczna skóra, membrana akustyczna w sprzętach audio, dodatek do żywności (bakteryjny błonnik), membrana w technikach separacyjnych	<i>Acetobacter xylinum</i> (<i>Gluconacetobacter xylinum</i>)
Ksantan	Środek stabilizujący, zagięszczający, żelujący (w odłączaniu z gluko-mannanem) w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym, w drukarstwie	<i>Xanthomonas campestris</i>

Egzopolisacharyd	Zastosowanie	Bakterie
Żelan	Środek żelujący, stabilizujący w przemyśle spożywczym, kosmetycznym farmaceutycznym, biomedycznym, substytut agaru w hodowlach bakterii termofilnych, nośnik leków	<i>Sphingomonas elodea</i>
EPS-y bakterii kwasu mlekowego	Środki poprawiające reologię i teksturę oraz zapobiegające synerezie produktów mlecznych	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Dekstran	Preparat krwiozastępczy, poprawiający krążenie, obniżający poziom cholesterolu, lubrykant, ситo molekularne i wzorzec masy w chromatografii	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i>
Algian	Składniki hipialergicznych preparatów opatrunkowych, powłoka ochronna sadzonek, powłoki nawozów, pestycydów, matryca stabilizująca do przechowywania żywych komórek i enzymów	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>
Kurdlan	Środek wiążący, żelujący, stabilizujący, zagęszczający, usztywniający	<i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Agrobacterium biovar</i>
Kwas hialuronowy	Środek nawilżający oczy oraz stawy, wypełniający zmarszczki i blizny, powłoka implantów, składnik kosmetyków	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> , <i>Pasteurella multocida</i>

Struktury oraz zastosowanie wybranych egzopolisacharydów bakteryjnych przedstawiono w dalszych podrozdziałach.

2.1. KSANTAN

Ksantan jest głównym, komercyjnie dostępnym egzopolisacharydem. Od 1969 roku jest zarejestrowany przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) jako bezpieczny dodatek do żywności – E415. Pod względem budowy chemicznej jest rozgałęzionym heteropolisacharydem syntezowanym przez większość szczepów *Xanthomonas campestris*. Składa się z reszt D-glukopiranozy połączonych wiązaniem $\beta(1 \rightarrow 4)$, z których co druga podstawniona jest resztą trisacharydową, zbudowaną z dwóch reszt D-mannopiranozy i jednej reszty kwasu D-glukouronowego. Końcowa reszta mannozy podstawniona jest, w pozycji 4 i 6, resztą kwasu pirogronowego. Masa molowa ksantanu jest rzędu około $0,9\text{--}2,0 \times 10^6$ g/mol [30–32].



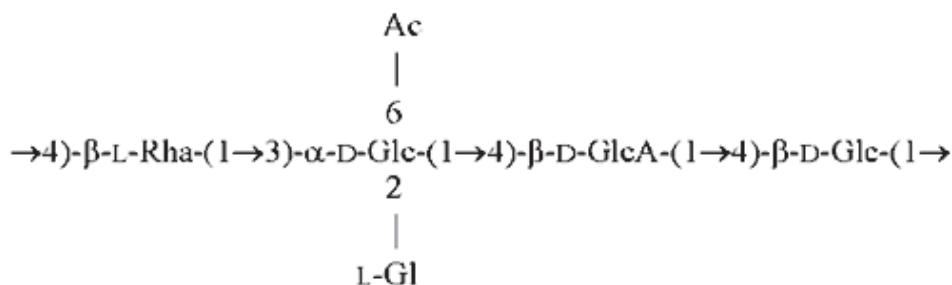
Rysunek 2. Struktura jednostki powtarzalnej ksantunu

Figure 2. Structure of repeating unit of xanthan

Ksantan jest wykorzystywany głównie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Tworzy pseudoplastyczne roztwory już w bardzo niskich stężeniach, rzędu 0,05–1%, których właściwości zależą głównie od masy cząsteczkowej polimeru, stopnia acetylowania i pirogronowania. Im mniejsza masa molowa i mniejszy stopień podstawienia obiema grupami tym mniejsza jest lepkość. Lepkość wodnych roztworów ksantantu jest w małym stopniu zależna od pH, temperatury, oraz czynników mechanicznych (mieszanie). Wytrzymuje zarówno ogrzewanie jak i zamrażanie oraz ponowne rozmrzanie. Obecność elektrolitów zwiększa lepkość roztworu ksantantu. Dzięki chemicznej i fizycznej stabilności polimer ten jest szczególnie przydatny do zagięszczania i stabilizacji silnie kwaśnych lub zasadowych roztworów. Co ciekawe, ksantan nie tworzy żeli, a w połączeniu z roślinnym gluko- bądź galaktomannanem obserwuje się ich synergistyczne działanie na proces żelowania, w wyniku czego powstają żele o różnym stopniu twardości [31, 33–37].

2.2. ŻELAN

Želan (nazwa handlowa – guma gellan), jest liniowym, anionowym egzopolisacharydem, syntezowanym na skalę przemysłową przez niepatogenny szczep bakterii *Sphingomonas elodea* ATCC 31461. Zbudowany jest z powtarzających się jednostek tetrasacharydowych złożonych z dwóch reszt D-glukopiranozy, reszty L-ramnozy i kwasu D-glukopiranuronowego. Jedna z reszt glukozy częściowo podstawiona jest resztą L-glicerynianu w pozycji 2 i acetylową w pozycji 6. Masa cząsteczkowa želana wynosi około $0,5 \times 10^6$ g/mol. Wykazano, że w roztworze tworzy on strukturę podwójnej helisy [38].



Rysunek 3. Struktura jednostki powtarzalnej żelanu
 Figure 3. Structure of repeating unit of gellan

Żelan, dzięki unikalnym właściwościom reologicznym znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz biomedycznym jako środek żelujący, zagęszczający i stabilizujący – E418. Wykorzystywany jest, między innymi, jako nośnik leków, umożliwiający powolne uwalnianie substancji czynnych. Właściwości żelujące żelanu zależą od stężenia, temperatury, obecności jedno- i dwuwartościowych kationów, jednak głównie od stopnia O-acetylowania. Wysoce acetylowany polimer tworzy delikatne, elastyczne, termoodwracalne żele, natomiast forma odacetylowana daje żele twarde, kruche i nieelastyczne [34, 39, 40].

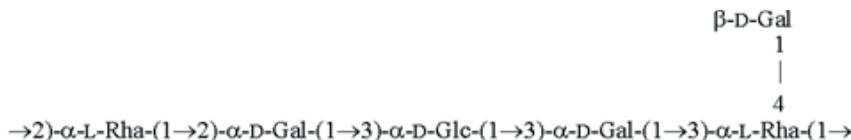
2.3. EGZOPOLISACHARYDY BAKTERII KWASU MLEKOWEGO

Wiele bakterii kwasu mleковego (LAB) wykorzystywana jest w przetwórstwie mleczarskim w celu otrzymania danego produktu, poprawienia konsystencji czy konserwacji poprzez zakwaszenie. Jedną z bakterii kwasu mlekovego jest *Streptococcus thermophilus* THS, szeroko stosowana w mleczarstwie w procesie fermentacji. Dla przykładu razem z *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* jest używana do produkcji jogurtów oraz niektórych twardych serów.

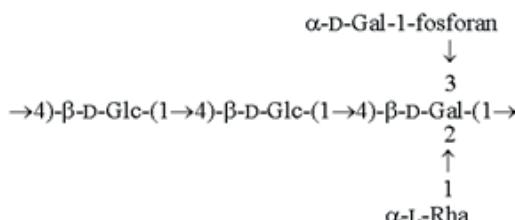
Przydatność *S. thermophilus* nie wynika tylko z możliwości zakwaszania produktów mlecznych, ale również możliwości syntezy egzopolisacharydów. Pozakomórkowe polisacharydy poprawiają właściwości reologiczne produktów fermentacji (konsystencję) i zmniejszają podatność na synerezę (wydzielanie się ośrodka dyspersyjnego z żelu, przykładowo wydzielanie się serwatki z kwaśnego mleka). Wpływ na właściwości reologiczne egzopolisacharydów ma: skład chemiczny, sposób połączenia reszt cukrowych (pozycja wiążania glikozydowego), obecność łańcuchów bocznych i podstawników niecukrowych oraz długość polisacharydu. Cechą charakterystyczną egzopolisacharydów bakterii kwasu mlekovego, jest to, że w większości zbudowane są z reszt D-galaktopyranozy, D-glukopyranozy i L-ramnopiranasy. Kilka przykładowych struktur powtarzających się jednostek EPS-ów zamieszczono na Rysunku 4. I tak egzopolisacharyd syntezowany przez *S. thermophilus* Sfi12, zawierający wiiązania glikozydowe o konfiguracji α jest bar-

dziej elastyczny, giętki niż śluzowy polisacharyd *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* B40, gdzie reszty cukrowe połączone są wiązaniem β glikozydowym. Częściowe usunięcie łańcuchów bocznych z egzopolisacharydów *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* B39 i B891 zmniejszyło właściwości zagęszczające tych polimerów. Porównanie pozakomórkowych polisacharydów o identycznej strukturze pierwszorzędowej wykazało, że egzopolisacharyd *S. thermophilus* Sts o masie cząsteczkowej około $3,7 \times 10^6$ g/mol jest zdecydowanie bardziej lepki od syntezowanego przez *S. thermophilus* Rs polisacharydu o mniejszej masie cząsteczkowej rzędu $2,6 \times 10^6$ g/mol [41–43].

Poza właściwościami głównie teksturowyczymi obserwuje się jeszcze inny rodzaj korzyści z wytwarzania egzopolisacharydów przez LAB, a mianowicie EPS-y pozostają dłużej w przewodzie pokarmowym, przez co umożliwiają kolonizację bakteriom probiotycznym. Dodatkowo wykazano działanie przeciwnowotworowe, immunostymulujące oraz obniżające poziom cholesterolu EPS-ów bakterii kwasu mlekowego.

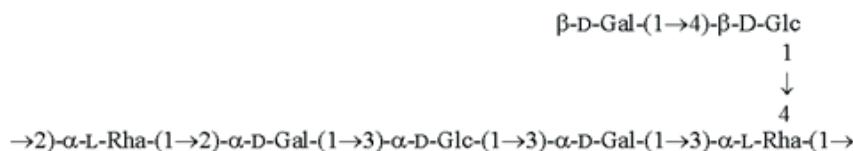


Streptococcus thermophilus Sfi12

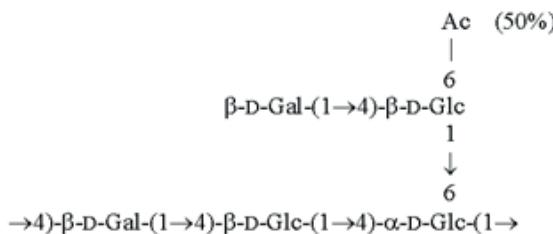


Lactococcus lactis B40

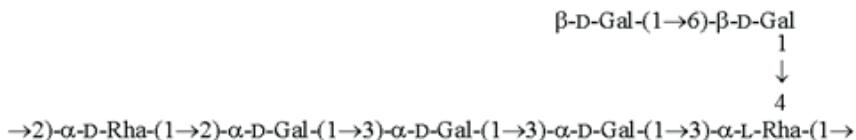
Rysunek 4. Struktury wybranych egzopolisacharydów bakterii kwasu mlekowego [41–43]
Figure 4. Structures of selected exopolysaccharides of lactic acid bacteria [41–43]



Lactococcus lactis B39

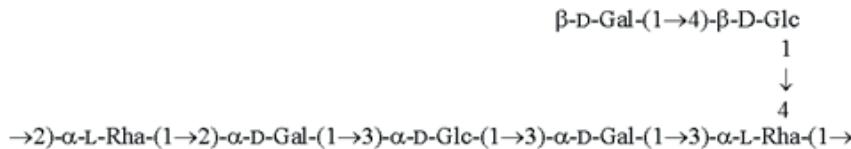
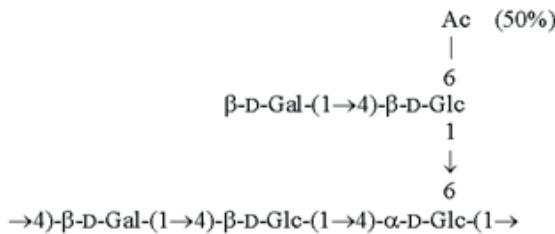
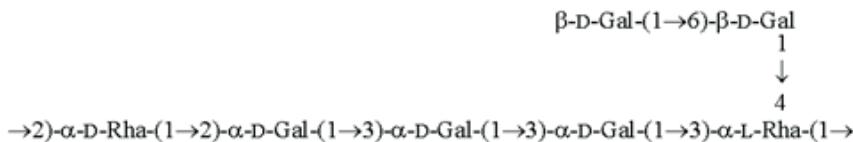


Lactococcus lactis B891



Streptococcus thermophilus Sts i Rs

Rysunek 4. Ciąg dalszy
Figure 4. Continuation

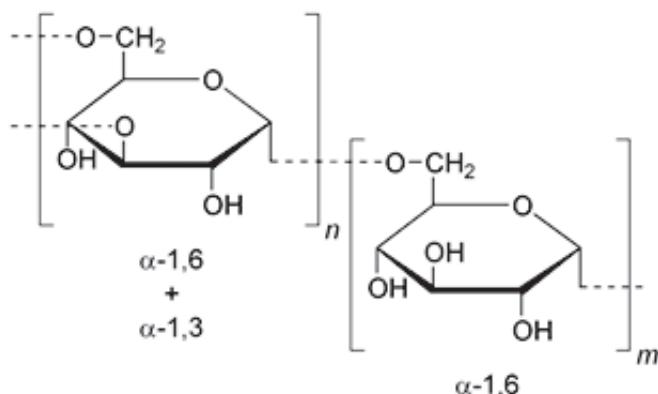
*Lactococcus lactis B39**Lactococcus lactis B891**Streptococcus thermophilus Sts i Rs*

Rysunek 4. Ciąg dalszy
Figure 4. Continuation

2.4. DEKSTRAN

Stosowanym na szeroką skalę egzopolisacharydem, produkowanym również przez bakterie kwasu mleковego należące do gatunku *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Leuconostoc dextranicum*, jest dekstran. Ze względu na specyficzne zastosowania zasługuje na oddzielne omówienie. Jak wspomniano wcześniej, dekstran

jest α -D-glukanem, w którym reszty cukrowe połączone są wiązaniem glikozydowym $\alpha(1 \rightarrow 6)$, często rozgałęzionym w pozycji 3, rzadziej w 2 i 4 wiązaniami α -glikozydowymi.

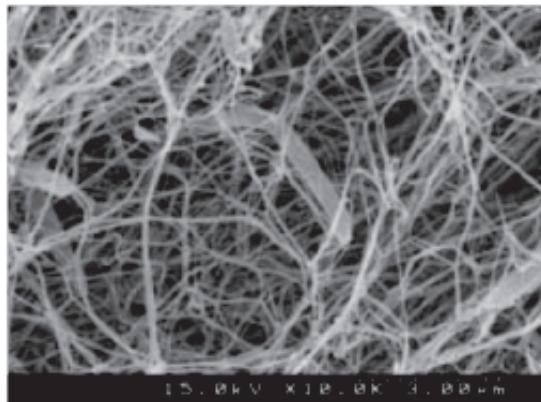


Rysunek 5. Przykładowa struktura dekstranu
Figure 5. Structural model of dextran

Główne zastosowanie znalazło w medycynie jako preparat krwiozastępczy, nośnik w szczepionkach, składnik roztworu do przechowywania organów w transplantologii oraz szeroko stosowany lubrykant. W przemyśle laboratoryjnym dekstran wykorzystuje się jako wypełnienie w chromatografii wykluczenia, nazywanej również sàngczeniem molekularnym (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC, ang. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) oraz jako wzorzec masy cząsteczkowej [34].

2.5. BAKTERYJNA CELULOZA

Celuloza, czyli $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-glukan jest najpowszechniej występującym polimerym na ziemi. Stanowi główny składnik roślinnej biomasy, aczkolwiek jest również syntezowana przez bakterie (ang. *bacterial cellulose*, BC), głównie Gram-ujemne z rodzaju *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* i *Sarcina*. Najbardziej wydajnym i najszerzej wykorzystywanym producentem bakteryjnej celulozy jest *Acetobacter xylinum* (w 1998 roku został zaklasyfikowany do odrębnego rodzaju *Gluconacetobacter*, przyjmując nazwę *Gluconacetobacter xylinum*). Łącuchy bakteryjnego β -D-glukana łączą się w procesie krystalizacji w mikrofibryle o szerokości 40–120 nm, grubości rzędu 3–4 nm i długości 1–9 μm . Mikrofibryle BC są co najmniej sto razy cieńsze niż w celulozie roślinnej. Dodatkowo BC posiada wysoki wskaźnik krystaliczności (60%), natomiast stopień polimeryzacji wynosi zazwyczaj 2000–6000. Poniżej zamieszczono fotografię, na której wyraźnie widoczne są włókna celulozy otaczające komórki *Gluconacetobacter xylinum*.



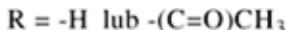
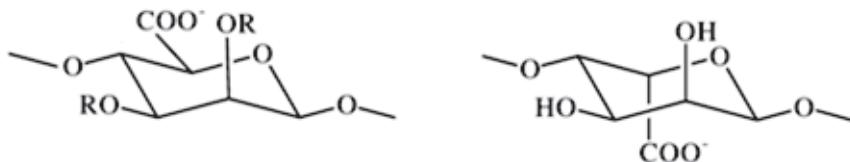
Komórki *Gluconacetobacter xylinum* otoczone celulozą, zdjęcie ze skaningowego mikroskopu elektronowego [44]
Gluconacetobacter xylinum cells surrounded by cellulose, image from a scanning electron microscope [44]

W zależności od zastosowanej metody hodowli bakterii, produkt celulozowy może być wytwarzany w formie płata o dowolnej powierzchni, rurek o zróżnicowanej średnicy, kulek czy pulpy. Silne uwodnienie (do 97%) płytów celulozowych sprawia, że przypominają one napęczniałą skórę o bardzo gładkiej powierzchni, stąd też często nazywa się je sztuczną skórą. Bakteryjna celuloza cechuje się wyjątkową czystością, nie towarzyszą jej inne substancje, jak ligniny czy hemicelulozy, charakterystyczne dla celulozy roślinnej, co znacznie upraszcza proces produkcji. W przypadku celulozy roślinnej produkcja wiąże się z wytwarzaniem przez fabryki bardzo dużej ilości produktów skażających środowisko naturalne. Charakterystyczne cechy celulozy bakteryjnej to wysoka elastyczność, krystaliczność oraz ogromna wytrzymałość mechaniczna. W ostatnich latach obserwuje się intensywny wzrost zainteresowania bakteryjną celulozą. Dotychczas znalazła ona zastosowanie głównie jako materiał opatrunkowy, szczególnie przydatny w leczeniu trudno gojących się ran. Opatrunek z bakteryjnej celulozy cechuje się wysoką czystością, elastycznością, wytrzymałością, porowatością, a także przepuszczalnością dla gazów, co uniemożliwia rozwój bakterii beztlenowych w miejscach nim zabezpieczonych. Jednocześnie materiał ten jest nieprzepuszczalny dla drobnoustrojów z zewnątrz i chroni ranę przed wtórną infekcją. Blony BC chronią również organizm przed utratą płynów ustrojowych poprzez zabezpieczenie pozbawionych skóry powierzchni ciała, co ma ogromne znaczenie dla chorych leczonych z powodu rozległych oparzeń. BC znajduje również zastosowania w mikrochirurgii jako sztuczne naczynia krewionośne [45–49].

2.6. KWAS ALGINOWY

Kwas alginowy jest liniowym egzopolisacharydem syntezowanym przez brunatnice (*Macrocystis*, *Laminaria*) oraz bakterie: *Azotobacter vinelandii* i *Pseudomonas*

aeruginosa. Jego masa molowa jest rzędu 10–1000 g/mol. Zbudowany jest z reszt kwasów uronowych: β -D-mannopiranouronowego (M) i α -L-gulopiranouronowego (G) połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$. Reszta kwasu mannopiranouronowego może być częściowo O-acetylowana w pozycji 2 i 3 (Rys. 6). Przypuszcza się, że grupy acetylowe podstawiające resztę kwasu mannopiranouronowego zapobiegają epimeryzacji do kwasu gulopiranouronowego [50]. W zależności od mikroorganizmu syntezującego ten egzopolisacharyd i warunków zewnętrznych stosunek ilości reszt obu kwasów jak i ich sekwencja są zmienne.



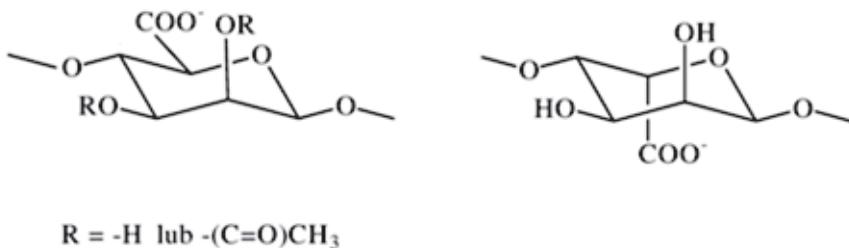
Rysunek 6. Struktura reszt kwasów manno- i gulopiranouronowego
Figure 6. Structure of manno- and gulopyranuronic acids

Właściwości kwasu alginowego ściśle zależą od stosunku M/G i tak im więcej reszt G tym tworzy się sztywniejszy żel. Wykazano również, że reszty G silniej wiążą się z kationami magnezu niż reszty M.

Dzięki właściwościom reologicznym kwas alginowy oraz jego sole –alginiany stosuje się jako: zagęszczacze żywności, leki w chorobach układu pokarmowego, impregnaty tkanin, składniki opatrunków do ran oraz w drukarstwie. W produktach spożywczych oznaczane są symbolami od E-400 do E-404 [33, 51–53].

2.7. KWAS HIALURONOWY

Kwas hialuronowy (HA) jest liniowym, wysokocząsteczkowym polisacharydem zbudowanym z reszt 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy i kwasu D-glukopiranouronowego, połączonych odpowiednio wiązaniemi $\beta(1\rightarrow4)$ i $\beta(1\rightarrow3)$, (Rys. 7). HA posiada bardzo dobre właściwości hydrokoloidalne, podaje się, że 1 g może związać około 6 litrów wody [28, 54].

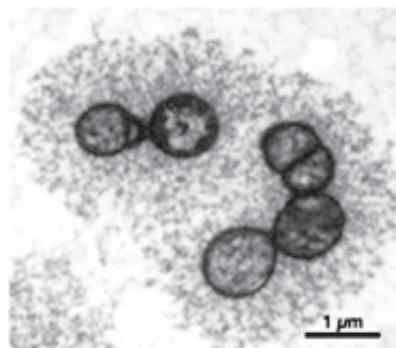


Rysunek 7. Powtarzająca się jednostka budulcowka kwasu hialuronowego
Figure 7. Repeating unit of *hyaluronic acid*

Kwas hialuronowy jest jednym z głównych składników międzykomórkowego płynu maziowego skóry, przestrzeni stawowych, pępowiny, ciała szklistego oka. W największej ilości występuje w mazi stawowej i skórze. Jest również polisacharydem o najwyższej masie cząsteczkowej, rzędu kilku milionów g/mol, syntezowanym przez kręgowce.

Kwas hialuronowy znalazł szerokie zastosowanie w medycynie, kosmetyce, jak również w przemyśle spożywczym. Przykładowo stosowany jest w ortopedii w chorobach zwyrodnieniowych stawów, w okulistyce do produkcji soczewek oraz jako składnik kropli nawilżających, w ginekologii i urologii do wzmacniania ściany pęcherza moczowego, w medycynie estetycznej do redukcji blizn i zmarszczek. Coraz częściej stanowi również materiał pokrywający protezy [55].

HA do celów komercyjnych do niedawna był głównie otrzymywany z grzebieni kogucich, aczkolwiek jest to metoda czasochłonna, trudna w oczyszczaniu i odpadotwórcza. W ostatnich latach odchodzi się od substancji pochodzenia zwierzęcego i w tym wypadku próbuje się, z powodzeniem, izolować kwas hialuronowy z hodowli bakteryjnych [56]. Między innymi szczepy bakterii z gatunku *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus thermophilus* oraz *Pasturella multocida* w warunkach naturalnych wytwarzają pozakomórkowo kwas hialuronowy o identycznej strukturze jak występujący w organizmach wyższych. Jest to egzopolisacharyd bezpieczny dla organizmu ludzkiego, praktycznie niewyołączający reakcji immunologicznej [57, 58]. Poniższe zdjęcie przedstawia kolonię *Streptococcus zooepidemicus* otoczoną kwasem hialuronowym.



Komórki *Streptococcus zooepidemicus* otoczone kwasem hialuronowym [59]
Streptococcus zooepidemicus cells surrounded by hyaluronic acid [59]

2.8. MANNANY

Mannany są wielkocząsteczkowymi cukrami zbudowanymi z reszt mannozy, połączonych wiązaniem glikozydowym. Mogą zawierać reszty innych cukrów, najczęściej D-glukozy, 2-acetamido-2-deoksy-D-glukozy, D-galaktozy, D-ksylozy czy też składniki niecukrowe takie jak grupy fosforanowe, siarczanowe, pirogronianowe oraz białka. Zidentyfikowano zarówno mannany liniowe, jak i rozgałęzione, o regularnej i nieregularnej budowie, o konfiguracji wiązań glikozydowych α i β .

Źródła mannozowych polimerów w przyrodzie są cały czas intensywnie badane. Zidentyfikowano mannany syntezowane zarówno przez organizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne, stąd też ze względu na pochodzenie można wyróżnić mannany bakteryjne, grzybowe, czy roślinne.

Mannany są istotnym czynnikiem stymulującym układ odpornościowy gospodarza, wykazują bardzo szerokie spectrum właściwości immuno- i chemioterapeutycznych. Stwierdzono również ich działanie fitotoksyczne. Dodatkowo, dzięki swym własnościom reologicznym znajdują zastosowanie jako substancje żelujące, stabilizujące, filmotwórcze, głównie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Mannany bakteryjne nie są tak popularne jak grzybowe czy roślinne, aczkolwiek również wśród tych prokariotycznych mikroorganizmów znajduje się przedstawicieli syntetyzujących mannozowe polimery. Najbardziej powszechnie jest występowanie mannanów w strukturach powierzchniowych bakterii z rodziny *Mycobacteriaceae*. Jak wspominano wcześniej mykobakterie charakteryzują się unikalną strukturą osłon komórkowych. Mykobakterie (prątki) wywołują jedne z najpoważniejszych schorzeń – gruźlicę (*Mycobacterium tuberculosis*) i trąd (*Mycobacterium leprae*). W skład ściany komórkowej mykobakterii wchodzi między innymi lipoarabinomannan, lipomannan. Natomiast arabinomannan i mannan są głównymi抗原ami polisacharydowymi otoczki mykobakterii. Mannany mykobakterii zbudowane są głównie ze szkieletu mannozowego połączonymi wiązaniem

glikozydowymi $\alpha(1 \rightarrow 6)$ rozgałęzionego resztami mannozylowymi połączonymi poprzez wiązania $\alpha(1 \rightarrow 2)$ [60–62].

Fragmenty mannanowe zostały także zidentyfikowane w lipopolisacharydach, i tak antygen O szczepu bakterii *Hafnia alvei* PCM 1223 jest liniowym mannanem zbudowanym z powtarzającej się pentasacharydowej jednostki z wiązaniami pomiędzy resztami D-mannozylowymi $\alpha(1 \rightarrow 2)$ i $\alpha(1 \rightarrow 3)$ (Rys. 8). Identyczne struktury antygenów O posiadają bakterie szczepów *Escherichia coli* O9 i *Klebsiella pneumoniae* O3, jednakże częsteczki lipopolisacharydów tych bakterii nie są takie same, różnią się strukturą regionu rdzeniowego [63].



Rysunek 8. Struktura powtarzającej się jednostki antygenu O *Hafnia alvei* PCM 1223

Figure 8. Structure of repeating unit of O *Hafnia alvei* PCM 1223 antigen

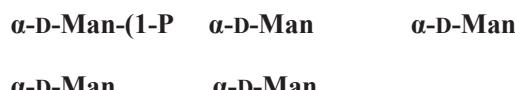
Interesującym mannanem, wcześniej nie zidentyfikowanym, jest egzopolisacharyd bakterii *Inquilinus limosus* szczep LMG 20952T, patogenu niedawno wykrytego u pacjentów chorych na mukowiscydozę. Określenie struktury egzopolisacharydów mikroorganizmów związanych z uporczywymi infekcjami dróg oddechowych jest jednym z pierwszych etapów zrozumienia ich roli w patogenezie. Egzopolimer *Inquilinus limosus* szczepu LMG 20952T zbudowany jest z reszt D-mannopiranozy połączonych wiązaniem $\alpha(1 \rightarrow 2)$, całkowicie podstawionych w pozycji 4 i 6 grupami pirogronianowymi z utworzeniem ketali (Rys. 9) [64].



Rysunek 9. Struktura pozakomórkowego mannanu *Inquilinus limosus*

Figure 9. Structure of extracellular mannn of *Inquilinus limosus*

Jeden z głównych sprawców chorób przyzębia, *Porphyromonas gingivalis* W50, oprócz LPS-u i CPS-u syntetyzuje pozakomórkowy fosfomannan o strukturze bardzo zbliżonej do mannanów grzybowych. Łańcuch główny zbudowany jest z powtarzających się jednostek $\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow$, natomiast rozgałęzienia zbudowane są z fragmentów mono- i disacharydowych o jednostce budulcowej $\alpha(1 \rightarrow 2)\text{-D-Man}$, pomiędzy jednym z disacharydowych rozgałęzień a łańcuchem głównym występuje wiązanie fosfodiestrowe (Rys. 10) [65].



Rysunek 10. Struktura pozakomórkowego mannanu *Porphyromonas gingivalis* W50

Figure 10. Structure of extracellular mannn of *Porphyromonas gingivalis* W50

UWAGI KOŃCOWE

Prowadzone współcześnie badania struktury egzopolisacharydów bakteryjnych pozwoliły na ich wprowadzenie do wielu gałęzi gospodarki. Za jedną z najważniejszych na pewno należy uznać przemysł spożywczy. Poprawa jakości, w tym i tekstury produktów spożywczych, a także produkcja nowych rodzajów żywności nie byłaby możliwa bez zastosowania polisacharydów. Przy wysokich kosztach izolowania węglowodanów z masy roślinnej i ich przetwarzania do formy użytkowej, na szczególną uwagę zasługuje otrzymywanie tych związków na drodze mikrobiologicznej. Dlatego tak ważne i użyteczne wydaje się poznawanie budowy i własności bakteryjnych egzopolisacharydów. Coraz częściej jako ich źródło zaczyna się również upatrywać mikroglony.

PODZIĘKOWANIE

Praca finansowana z DS 530-8455 -D 501-16.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.W. Costerton, G.G. Gessey, K.J. Cheng, *Sci. Am.*, 1978, **238**, 86.
- [2] J.J. Harrison, R.J. Turner, L.L.R. Marques, H. Ceri, *Am. Scient.*, 2005, **93**, 508.
- [3] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, *Science* 1999, **284**, 1318.
- [4] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanowa, *Molecules*, 2009, **14**, 2535.
- [5] M. Rivas, M. Seeger, D.S. Holmes, E. Jedlicki, *Biol. Res.*, 2005, **38**, 283.
- [6] D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglesias, J.W. Costerton, E.P. Greenberg, *Science*, 1998, **280**, 295.
- [7] A.L. Spoering, K. Lewis, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 6746.
- [8] P.S. Stewart, J.W. Costerton, *Lancet*, 2001, **358**, 135.
- [9] I. W. Sutherland, *Microbiology*, 2001, **147**, 3.
- [10] S. Tsuneda, H. Aikawa, H. Hayashi, A. Yuasa, A. Hirata, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, **223**, 287.
- [11] R. Weiner, S. Langille, E. Quintero, *J. Industr. Microbiol.*, 1995, **15**, 339.
- [12] A. S. Kumar, K. Mody, B. Jha, *J. Basic Microbiol.*, 2007, **47**, 103.
- [13] P.R. Reeves, M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Withfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C.R.H. Raetz, P.D. Rick, *Trends Microbiol.*, 1996, **4**, 495.
- [14] W.M. De Vos, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 498.
- [15] F.J. Vorhölter, S. Schneiker, A. Goesmann, L. Krause, T. Bekel, O. Kaiser, B. Linke, T. Patschkowski, C. Rückert, J. Schmid, V. K. Sidhu, V. Sieber, A. Tauch, S.A. Watt, B. Weisshaar, A. Becker, K. Niehaus, A. Pühler, *J. Biotechnol.*, 2008, **134**, 33.
- [16] F. Katzen, D.U. Ferreiro, C.G. Oddo, M.V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, L. Ielpi, *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 1607.
- [17] K. Born, V. Langendorff, P. Boulenguer, Xanthan, *Biotechnology of Biopolymers*, John Wiley & Sons, Inc., 2004.

- [18] A. Becker, F.J. Vorhälter, Xanthan Biosynthesis by *Xanthomonas Bacteria: an Overview of Current Biochemical and Genomic Data, Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*, Horizon Scientific Press, 2009.
- [19] A.E. Ghaly, F. Arab, N.S. Mahmoud, J. Higgins, Am. J. Biotech. & Biochem., 2007, **3**, 47.
- [20] C. Zhenming, F. Yan, Journal of Ocean University of China, 2005, **4**, 67.
- [21] G.T. Lamothe, L. Jolly, B. Mollet, F. Stingele, Arch. Microbiol., 2002, **178**, 218.
- [22] S.M. Deutsch, H. Falentin, M. Dols-Lafargue, G. LaPointe, D. Roy, Int. J. Food Microbiol., 2008, **125**, 252.
- [23] T.S. El-Tayeb, T.A. Khodair, J. Appl. Sci. Res., 2007, **3**, 1564.
- [24] H. Trommer, R.H.H. Neubert, Int. J. Pharmaceutics, 2005, **298**, 153.
- [25] S.N. Aslam, M.A. Newman, G. Erbs, K.L. Morrissey, D. Chinchilla, T. Boller, T.T. Jensen, C. De Castro, T. Ierano, A. Molinaro, R.W. Jackson, M.R. Knight, R.M. Cooper, Curr. Biol., 2008, **18**, 1078.
- [26] P.A. Sanford, I.W. Cottrell, D.J. Pettitt, Pure Appl. Chem., 1984, **56**, 879.
- [27] L. Wang, S. Li, Y. Li, FEMS Microbiol. Lett., 2003, **220**, 21.
- [28] I.W. Sutherland, Trends Biotechnol., 1998, **16**, 41.
- [29] R. Van Kranenburg, I.C. Boels, M. Kleerebezem, W.M. De Vos, Curr. Opin. Biotechnol., 1999, **10**, 498.
- [30] J.A. Casas, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Enz. Microb. Technol., 2000, **26**, 282.
- [31] B. Katzbauer, Polym. Degrad. Stabil., 1998, **59**, 81.
- [32] M.J. López, M.C. Vargaz-García, F. Suarez-Estrella, J. Moreno, J. Food Eng., 2004, **63**, 111.
- [33] K. Myszka, K. Czaczylk, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, **4**, 18.
- [34] B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanowa, Molecules, 2009, **14**, 2535.
- [35] I. Rottava, G. Batesini, M.F. Silva, L. Lerin, D. Oliveira, F.F. Padilha, G. Tonizazzo, A. Mossi, R.L. Cansian, M. Luccio, H. Treichel, Carbohydr. Polym., 2009, **77**, 65.
- [36] F. Alvarez-Manceñido, K. Braeckmans, S. De Smedt, J. Demeester, M. Landin, R. Martínez-Pacheco, Int. J. Pharmaceutics, 2006, **316**, 37.
- [37] T.M.B. Bresolin M., Milas, M. Rinaudo, F. Reicher, J.L.M.S. Ganter, Int. J. Biol. Macromol., 1999, **26**, 225.
- [38] A. J. Jay, I.J. Colquhoun, M.J. Ridout, G.J. Brownsey, V.J. Morris, A.M. Fialho, J.H. Leitão, I.S. Correia, Carbohydr. Polym., 1998, **35**, 179.
- [39] P.J. Wilson, B.J. Howlin, G.A. Webb, J. Mol. Struct., 1996, **385**, 185.
- [40] A.M. Fialho, L.M. Moreira, A.T. Granja, A.O. Popescu, K. Hoffmann, I. Sá-Correia, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, **79**, 889.
- [41] E.J. Faber, P. Zoon, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, Carbohydr. Res., 1998, **310**, 269.
- [42] E.L. Nordmark, Z. Yang, E. Huttunen, G. Widmalm, Biomacromolecules, 2005, **6**, 105.
- [43] A.D. Welman, I.S. Maddox, TRENDS Biotechnol., 2003, **21**, 269.
- [44] S. Bielecki, A. Krystynowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, *Bacterial cellulose, Biopolymers*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim 2002.
- [45] I.M.G. Martins, S.P. Magina, L. Oliveira, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, C.P. Neto, A. Gandini, Compos. Sci. Technol., 2009, **69**, 2163.
- [46] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezierska, M. Concalves-Miśkiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2002, **29**, 189.
- [47] T. Tsuchida, F. Yoshinaga, Pure & Appl. Chem., 1997, **69**, 2453.
- [48] W.G. Haigh, Biochem. J., 1977, **135**, 145.
- [49] S.S. Wong, S. Kasapis, Y.M. Tan, Carbohydr. Polym., 2009, **77**, 280.
- [50] U. Remminghorst, B.H. Rehm, Biotechnol. Lett., 2006, **28**, 1701.
- [51] N. Schürks, J. Wingender, H.C. Flemming, C. Mayer, Int. J. Biol. Macromol., 2002, **30**, 105.

- [52] C. Ouwerx, N. Velings, M.M. Mestdagh, M.A.V. Axelos, *Polym. Gels Netw.*, 1998, **6**, 393.
- [53] H. Ertesvåg, S. Valla, *Polym. Degrad., Stab.*, 1998, **59**, 85.
- [54] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, *FASEB J.*, 1992, **6**, 2397.
- [55] A. Ballini, S. Cantore, S. Capodiferro, F.R. Grassi, *Int. J. Med. Sci.*, 2009, **6**, 65.
- [56] J.M. Song, J.H. Im, J.H. Kang, D.J. Kang, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **78**, 633.
- [57] N. Izawa, T. Hanamizu, R. Iizuka, T. Sone, H. Mizukoshi, K. Kimura, K. Chiba, *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, **107**, 119.
- [58] A. Albersdörfer, E. Sackmann, *Eur. Phys. J. B*, 1999, **10**, 663
- [59] B.F. Chong, L.M. Blank, R. McLaughlin, L.K. Nielsen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **66**, 341.
- [60] W.B. Severn, R.H. Furneaux, R. Falshaw, P.H. Atkinson, *Carbohydr. Res.*, 1998, **308**, 397.
- [61] R.H. Furneaux, C.L. Landersjö, J.L. McCullough, W.B. Severn, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 1618.
- [62] E. Maes, B. Codeville, L. Kremer, Y. Guérardel, *Glycoconj. J.*, 2007, **24**, 439.
- [63] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, G.V. Zatonsky, J. Kübler-Kiełb, A. Gamian, S. Shaskov, Y.A. Knirel, E. Romanowska, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, **30**, 223.
- [64] Y. Herasimenka, P. Cesutti, G. Impallomeni, R. Rizzo, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 2404.
- [65] N. Paramonov, M. Rangarajan, A. Hashim, A. Gallagher, J. Aduse-Opoku, J.M. Slaney, E. Hounsell, M.A. Curtis, *Mol. Microbiol.*, 2005, **58**, 847.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 czerwca 2016

CEKROWE CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE

SUGAR QUATERNARY AMMONIUM SALTS

Barbara Dmochowska^{*1}, Karol Sikora^{1,2},
Justyna Samaszko-Fiertek¹, Rafał Ślusarz¹,
Janusz Madaj¹

¹ Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

² Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

*e-mail: basia.dmochowska@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Czwartorzędowe sole amoniowe przyłączone do anomerycznego atomu węgla cząsteczki cukru poprzez łańcuch węglowodorowy
2. Czwartorzędowe sole amoniowe przy atomie węgla C6 w monosacharydach
3. Czwartorzędowe sole amoniowe przy terminalnym atomie węgla w oligosacharydach
4. Czwartorzędowe sole amoniowe pochodne polisacharydów

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

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

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–1998 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

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

Mgr Karol Sikora w roku 2010 ukończył studia magisterskie na Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku – na kierunku chemia, specjalność chemia biologiczna. Tematyka badawcza: synteza, oczyszczanie oraz analiza struktury pochodnych cukrów oraz czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych alditoli oraz cukrów. Obecnie zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

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

ABSTRACT

Quaternary ammonium compounds (QACs) exhibit the properties of both inorganic and organic compounds, and their ionic nature gives them hydrophilic character. The popularity of these compounds is allied to their many applications and ease of synthesis. Most of QACs are stable up to 150°C, readily soluble in water, usually non-toxic in utilitarian concentrations, are surface active, and do not irritate the skin or have a noxious odour [1]. Many of them have fungicidal, bactericidal and algicidal properties [2–5]. The antiviral action of QACs, including against HIV [6, 7], has been reported. They are used as timber preservatives, disinfectants, fabric softeners, anti-electrostatic agents and antifriction substances [5, 8, 9]. In addition, certain drugs administered in cases of diabetes, cardiac arrhythmia, neuroses, allergies and even carcinomas are QACs. Finally, QACs are used in chemical synthesis as catalysts, in phase-boundary catalysis [11], in the reduction of aldehydes and alkenes, and in the Friedl-Crafts reaction.

In literature there is only limited amount of information considering quaternary ammonium salts containing sugar substituents. Among them four group of compounds arises: salts linked to C6 atom in sugar, directly connected to anomeric carbon atom, linked trough hydrocarbon spacer and derivatives of polysacharides.

Kirk et al. described the synthesis of biologically active QACs [15]. In the Menshutkin reaction between an iodo-derivative and trimethylamine (Scheme 4), these authors obtained compounds with bactericidal and fungicidal properties. The authors obtained a series of analogous compounds using carboxylic acids (with carbon chains of various lengths) ester linked to the C-6-OH group of a sugar derivative.

Blizzard synthesized QAC derivatives of vancomycin [28]. It was noticed that the increased hydrophilicity of vancomycin following the addition to it of a suitable fragment enhanced its antibacterial properties [30, 31], one of the more active being a derivative containing an aminium group at position G-6 (Scheme 10).

Examples of reactions, in which the terminal carbon atoms in methyl glucopyranosides and polysaccharides are functionalized, are the syntheses carried out by Engel et al. [33, 34], one of which is shown in Figure 5. These authors aimed to find compounds with antibacterial properties. In the first instance, the hydroxyl groups at atoms C-6 of the sugar units in cellulose were O-tosylated. Then, the terminal carbons were functionalized with tertiary amines, yielding QACs. The most effective bactericide among these compounds was the one with a 16-carbon chain, the structure of which is shown Figure 6.

Keywords: quaternary ammonium salts, D-glycopyranosides, cellulose, chitosan

Słowa kluczowe: czwartorzędowe sole amoniowe, D-glikopiranozydy, celuloza, chitotan

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcCl	– chlorek acetylu
Ac ₂ O	– bezwodnik kwasu octowego
BclA	– <i>Burkholderia cenocepacia</i> lektyna A
CJ	– ciecze jonowe
CSA	– czwartorzędowe sole amoniowe
DABCO	– 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DMAP	– 4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)pirydyna
DMSO	– dimetylosulfotlenek
EC ₅₀	– medialne stężenie skuteczne, (ang. <i>effective concentration</i>)
EtOH	– alkohol etylowy
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
ICR-191	– dichlorowodorek 6-chloro-9-[3-(2-chloroethylamino)propylamino]-2-metoksyakrydyny
Me	– methyl
MIC	– minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MLC	– minimalne stężenie zabijające (ang. <i>minimal lethal concentration</i>)
Ph	– fenył
Ph ₃ P	– trifenylofosfina
Py	– pirydyna
QACs	– ang. <i>quaternary ammonium compounds</i>
TsCl	– chlorek tosylu

WPROWADZENIE

Czwartorzędowe sole amoniowe (CSA) wykazują właściwości związków nie-organicznych jak i organicznych, a jonowy charakter tych związków decyduje o ich właściwościach hydrofilowych. Popularność CSA wiąże się z ich szerokim zastosowaniem i łatwością otrzymywania. Większość CSA jest trwała aż do 150°C, dobrze rozpuszczalna w wodzie, zazwyczaj nietoksyczna w stężeniach użytkowych, wykazuje aktywność powierzchniowocząsteczną, nie wykazuje drażniącego działania na skórę ani przykrego zapachu [1]. Wiele z nich ma właściwości grzybobójcze, bakteriobójcze lub glonobójcze [2–5]. Istnieją doniesienia o działaniu antywirusowym tych związków, w tym przeciw wirusowi HIV [6, 7]. Powszechnie stosowane są jako: środki ochrony drewna, środki dezynfekujące, zmiękczające tkaniny, środki anty-elektryczne i substancje przeciwwzorcze [5, 8, 9]. Istnieją badania potwierdzające skuteczność czwartorzędowych soli amoniowych jako tzw. wzmacniaczy smaku [10]. Poza tym, niektóre leki na cukrzycę, arytmię serca, nerwice, alergie lub nawet nowotwory są czwartorzędowymi solami amoniowymi. Również w syntezie chemicznej stosuje się CSA jako katalizatory, w reakcji katalizy przeniesienia międzymolekularnego [11], w redukcji aldehydów i alkenów w reakcjach Dielsa-Aldera.

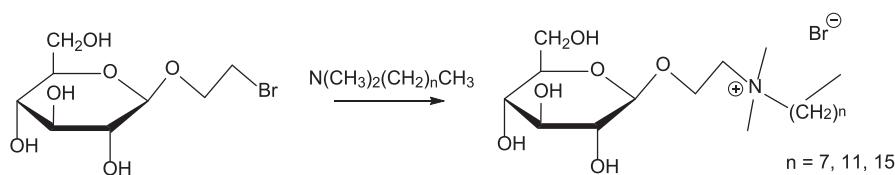
Czwartorzędowe sole amoniowe wykazują wiele użytecznych właściwości, dzięki czemu znalazły bardzo liczne zastosowania w życiu codziennym, przemyśle i farmaceutycznym. Jednak wciąż poszukiwane są nowe związki o większej aktywności, szerszym spektrum zastosowania oraz bardziej przyjazne środowisku.

Literatura opisująca czwartorzędowe sole amoniowe jest niezwykle obszerna, dlatego w artykule omówiono zagadnienia najistotniejsze z punktu widzenia syntezy czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych cukrów oraz ich właściwości.

1. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE PRZYŁĄCZONE DO ANOMERYCZNEGO ATOMU WĘGLA CZĄSTECZKI CUKRU POPRZEZ ŁAŃCUCH WĘGLOWODOROWY

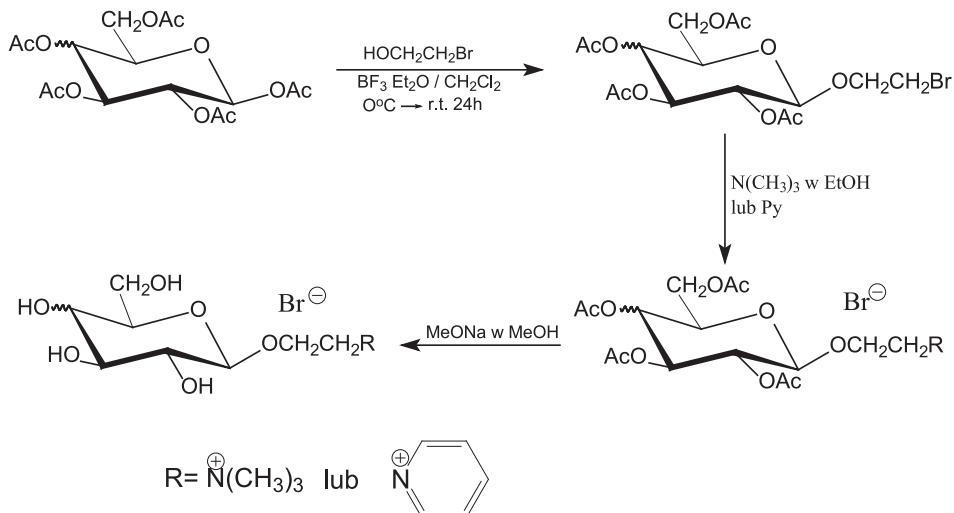
Zakłada się, że utworzenie CSA pochodnych związków naturalnie występujących w przyrodzie (cukry, alditole lub aminokwasy) pozwoli na wyeliminowanie ograniczeń w zastosowaniu tej klasy związków. Połączenie takie może doprowadzić do poznania nowych właściwości CSA.

W literaturze istnieją nieliczne doniesienia dotyczące syntezy oraz badania właściwości CSA powiązanych z cukrami. Jednym z przykładów mogą być ziązki otrzymane przez Quagliotto i in. [12]. Jako substratu użyto zsyntezowany wcześniej β -D-glukopiranozyd 2-bromoetylu, który następnie poddano reakcji czwartorzędowania w reakcji z trzema N,N -dimetyloalkiloaminami o łańcuchach węglowodorowych zawierających odpowiednio 8, 12 i 16 atomów węgla (Schemat 1).



Schemat 1. CSA pochodne β -D-glukopyranozidów 2-bromoetylu [12]
Scheme 1. QACs derivatives of 2-bromoethyl β -D-glucopyranosides [12]

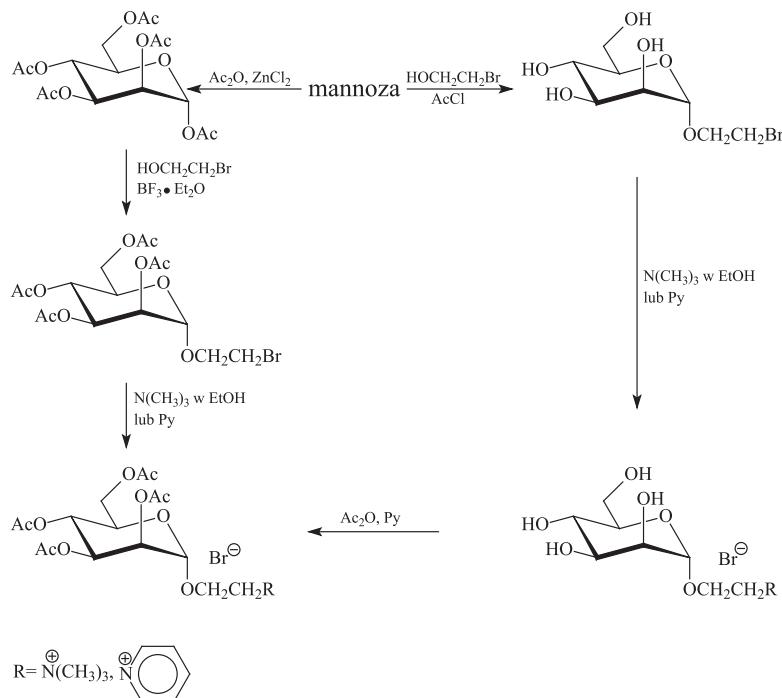
W Pracowni Chemii Cukrów UG również zsyntezowano czwartorzędowe sole amoniowe, w których atom azotu odsunięty jest od pierścienia cukrowego o dwa atomy węgla, tj. bromki glikopiranozyd 2-amonioetylu o konfiguracji: D-galakto, D-gluko i D-manno [13]. W pierwszym etapie syntezy, głównymi produktami są 1,2-trans glikozydy, co determinuje powstawanie w przewadze anomeru β w przypadku D-galaktozy oraz D-glukozy, natomiast w przypadku D-mannozy anomeru α . Zastosowanie w reakcji glikozydowania kwasu Lewisa ($BF_3 \cdot Et_2O$) jako aktywatora pozwala uzyskać odpowiednie, krystaliczne produkty o konfiguracji: β -D-galakto oraz β -D-gluko, tj. 2';3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-galaktopiranozyd 2-bromoetylu oraz 2';3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozyd 2-bromoetylu (Schemat 2).



Schemat 2. Synteza pochodnych bromku β -D-gluko- i β -D-galaktopiranoid 2-amonioetyl
Scheme 2. Synthesis of derivatives of N -[2-(β -D-glucosyl- and β -D-galactosyl)ethoxy]aminium bromide

2',3',4',6'-Tetra-O-acetylo- β -D-galaktopiranozyd 2-bromoetylu i 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozyd 2-bromoetylu poddane zostały reakcji z trimetyloaminą w etanolu oraz z pirydyną w celu uzyskania odpowiednich CSA oraz określenia wpływu podstawnika cukrowego na przebieg oraz wydajność reakcji czwartorzędowania. Zarówno bromek 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-glikopiranozyd 2-trimety-

loamonioetylu (o konfiguracji D-galakto i D-gluko) jak i bromek 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-glikopiranozyd 2-pirydynioetylu, (o konfiguracji D-galakto i D-gluko) uzyskano z prawie ilościowymi wydajnościami (95–99%) (Schemat 2). Metoda syntezy glikozydów zastosowana powyżej pozwala otrzymać 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- α -D-mannopiranozyd 2-bromoetylu, ale niestety z bardzo niską wydajnością (8%). Dlatego też przeprowadzono syntezę glikozydu w reakcji D-mannozy z 2-bromoetanolem w obecności chlorku acetylu jako aktywatora, co pozwoliło otrzymać go z 60% wydajnością (Schemat 3).



Schemat 3. Synteza bromku D-mannopiranozyd 2-amonioetylu
Scheme 3. Synthesis of *N*-[2-(*p*-mannopyranosyloxy)ethyl]aminium bromide

Bromek 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- α -D-mannopiranozyd 2-pirydynioetylu i bromek 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- α -D-mannopiranozyd 2-trimetyloamonioetylu uzyskano również z dobrymi wydajnościami (>85%). Jak wynika z powyższych przykładów odsunięcie grupy odchodzącej (halogenu), biorącej udział w reakcji czwartorzędowania, od atomu węgla C1 piranozy o dwuwęglowodorowy łańcuch prowadzi do uzyskiwania CSA z bardzo dobrymi wydajnościami i znacząco ułatwia tworzenie projektowanych soli pochodnych cukrów. Wszystkie otrzymywane CSA zostały poddane reakcji de-O-acetylowania za pomocą metanolanu sodu w metanolu.

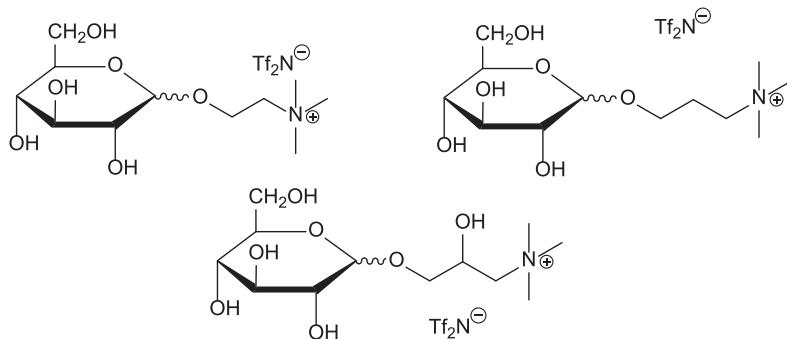
Czwartorzędowe bromki pirydyniowe i trimetyloamoniowe: 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo-D-glikopiranozyd 2-amonioetylu oraz D-glikopiranozyd 2-amonioetylu

(o konfiguracji D-galakto, D-gluko i D-manno) przebadano pod kątem aktywności mutagennej. W tym celu wykonano test wykrywania substancji mutagennych z wykorzystaniem zjawiska bioluminescencji szczepu bakterii *Vibrio harveyi* A16 [13]. Bromki D-glikopiranozydów 2-amonioetylu wykazują działanie mutagenne, niektóre związki większe niż zastosowany jako kontrola pozytywna modelowy silny mutagen ICR-191. Porównanie stopnia mutagenności soli wykazało, że te o konfiguracji D-manno były zdecydowanie słabszymi mutagenami w porównaniu do soli o konfiguracji D-galakto i D-gluko, natomiast najsilniejszym mutagenem okazał się bromek 2',3',4',6'-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozyd 2-trimetyloamonioetylu. Wyniki wskazują na istotny wpływ konfiguracji atomu węgla C2 glikopiranozy na aktywność mutagenną [14].

W celu weryfikacji otrzymanych wyników przeprowadzono badania mutagenności w oparciu o „klasyczny” test Amesa [15] na szczepach *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100. Wyniki tego testu nie wykazały czynności mutagennej otrzymanych związków [14].

Przeprowadzone badania okazały się niezwykle interesujące, gdyż w powszechnie używanym teście Amesa ziążki nie wykazywały właściwości mutagennych, natomiast w teście na szczepie A16 *Vibrio harveyi* wszystkie okazały się mutagenne, co potwierdza wyższą czułość testu bioluminescencyjnego.

Erfurt i in. [16] otrzymali pochodne D-glukopiranozy, które były połączone z czwartorzędowym atomem azotu poprzez 3 różnych długości łączniki: etylowy, propylowy oraz 2-hydroksypropylowy. Struktury otrzymanych pochodnych zostały zaprezentowane na Rysunku 1.

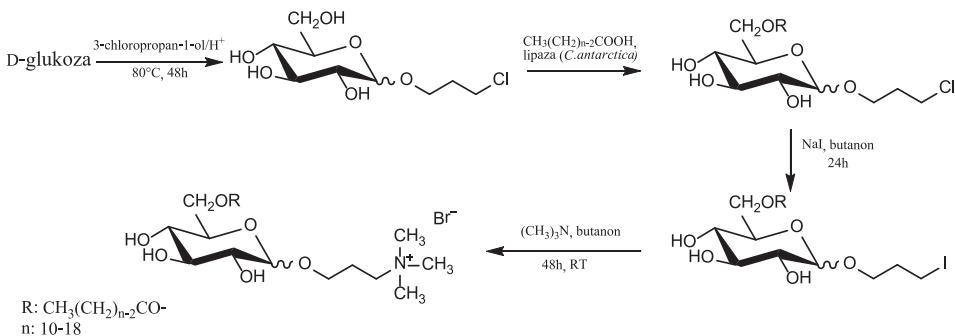


Rysunek 1. Struktura cukrowych soli amoniowych otrzymanych przez Erfurta i in. [16]
Figure 1. Structure of the sugar ammonium salts obtained by Erfurt and co-workers [16]

Otrzymane ziążki wykazywały charakter cieczy jonowych (CJ) oraz posiadały zdolność do tworzenia licznych wiązań wodorowych. Ziążki te zostały użyskane w sposób analogiczny do opisanych powyżej metod, a w dalszej części autorzy przebadali ich aktywność katalityczną w reakcji Dielsa-Aldera oraz porównali je z klasycznymi CJ stosowanymi w katalizie. Wyniki eksperymentów wykazały, że amoniowe pochodne D-glukozy były bardziej aktywne w porównaniu z klasycz-

nymi cieczami jonowymi niezawierającymi podstawników cukrowych. Kolejne prace potwierdziły, że pochodne cukrów zachowują swoją aktywność w stężeniach, w których klasyczne CJ traciły swoje właściwości katalityczne. Tak dużą aktywność CJ zazwyczaj tłumaczy się zdolnością do powstawania wiązań wodorowych stabilizujących produkty pośrednie reakcji. W przypadku badanych CSA taką stabilizację zapewnia obecność podstawnika cukrowego.

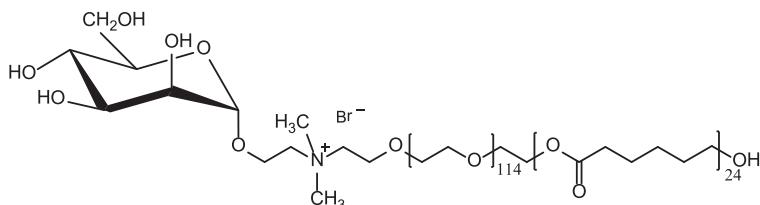
Kirk i współpracownicy [17] zsyntezowali związki o aktywności biologicznej, w których wbudowana byłaby jednostka cukru. Zabieg ten miał na celu utworzenie związków łatwo biodegradowalnych. W wyniku reakcji Mentschutkina, pomiędzy jodopochodną a trimetyloaminą (Schemat 4) uzyskano związki wykazujące działanie przeciwbakteryjne (działające zarówno na szczepy bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych) oraz działanie przeciwgrzybicze. Substancje te wykazywały także właściwości powierzchniowoczynne. Analogiczna do przedstawionej na Schemacie 4 synteza z zastosowaniem chloropochodnej nie przyniosła oczekiwanej efektu w postaci soli, dlatego przekształcono w reakcji Finkelsteina'a chlоро- w jodopochodną [18, 19]. Ta z kolei, po 48 godz. w temperaturze pokojowej i w roztworze butanonu, w reakcji z trimetyloaminą dała oczekiwana czwartorzędową sól amoniową. Uzyskano szereg analogicznych związków o różnej długości łańcucha węglo-wodorowego podstawnika karboksylowego związanego estrowo z grupą C6 cukru. Najbardziej aktywną biologicznie okazała się sól, gdzie n = 12 (Schemat 4).



Schemat 4. Synteza pochodnych bromku D-glukopiranowyd 3-(trimetyloamnio)propylu [17]

Scheme 4. Synthesis of derivatives of N -[3-(D -glucopyranosyloxy)propyl]- N,N,N -trimethylaminium bromide [17]

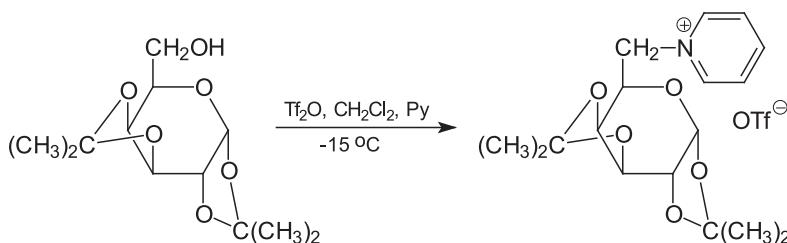
Ciekawym przykładem połączenia właściwości cukrów z solami amoniowymi jest synteza pochodnej bromku α -D-mannopiranowyd 2-amonioetylu [20]. Strukturę związku przedstawia Rysunek 2:

Rysunek 2. Bromek α -D-mannopiranozyd 2-amonioetylu [20]Figure 2. N -[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]aminium bromide [20]

Związek ten wykazywał bardzo ciekawą właściwość, tworzył micle, które na powierzchni posiadały reszty α -D-mannopiranozy. Reszty cukrowe wykazywały bardzo duże powinowactwo do lektyny BclA (*Burkholderia cenocepacia* lektyna A), białka specyficznie wiążącego D-mannozę. Właściwości tak otrzymanych miceli mogą potencjalnie prowadzić do opracowania nowej metody przenoszenia leków i szczepionek wewnątrz organizmów. Dzięki posiadaniu na swojej powierzchni reszt D-mannopiranozy, przenoszenie leków w oparciu o system micelarny, związek może wykazywać bardzo dużą specyficzność w oddziaływaniu z miejscami aktywnymi w organizmach [20, 21].

2. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE PRZY ATOMIE C6 W MONOSACHARYDACH

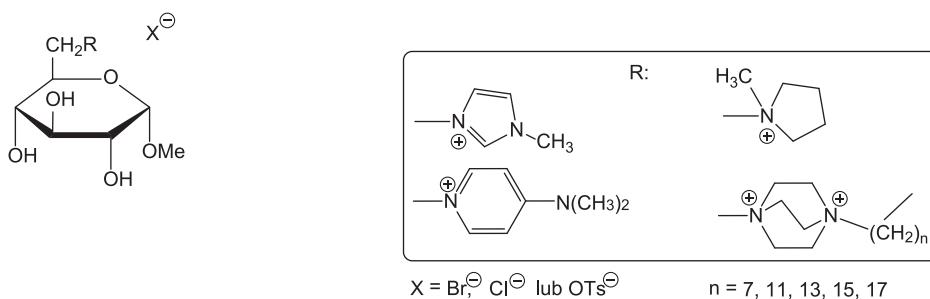
W kolejnych pracach dotyczących syntezy CSA pochodnych cukrów warto wyróżnić związki w których obdarzony ładunkiem dodatnim czwartorzędowy atom azotu, związkany jest z terminalnym atomem węgla jednostki cukru. Prze prowadzono reakcje czwartorzędowania 1,2:3,4-di-O-izopropylideno-6-O-tosylo- α -D-galaktopiranozy z pirydyną [20, 21]. Mimo, że reakcję prowadzono w podwyższonej temperaturze, oczekiwany produkt tj. tosylan N -[(6-deoksy-1,2:3,4-di-O-izopropylideno- α -D-galaktopiranoza)-6-ylo]pirydyniowy powstawał z niską 33% wydajnością. Dopiero w momencie zastosowania innej grupy odchodzącej tj. O-trifluorometanosulfonowej uzyskano oczekiwany CSA z 70% wydajnością (Schemat 5). Podjęto także próby uzyskania tosylanu N -[(3-deoksy-1,2:5,6-di-O-izopropylideno- β -D-allofuranosa)-3-ylo]pirydyniowego oraz tosylanu N -[(3-deoksy-1,2:5,6-di-O-izopropylideno- β -D-glukofuranosa)-3-ylo]pirydyniowego, poprzez analogiczną reakcję, w której grupa hydroksylowa przy C3 przekształcona została w O-tosyłową pochodną. Mimo wielu starań nie udało się uzyskać oczekiwanych soli.



Schemat 5. Synteza triflanu *N*[(6-deoksy-1,2:3,4-di-*O*-izopropylideno- α -D-galaktopiranoza)-6-yl]pirydiniowego [22, 23]

Scheme 5. Synthesis of *N*[(6-deoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranose)-6-yl]pyridinium triflate [22, 23]

W grupie profesora Engela z Queens College również prowadzono badania nad syntezą oraz właściwościami CSA, pochodnych cukrów [24, 25]. W kilku pracach opisano syntezę czwartorzędowych soli amoniowych, pochodnych α -D-glikopiranozydów metylu, w których grupa hydroksylowa przy atomie węgla C6 została zastąpiona czwartorzędowym atomem azotu. Przykładowe struktury zsyntezowanych CSA zostały zaprezentowane na Rysunku 3.

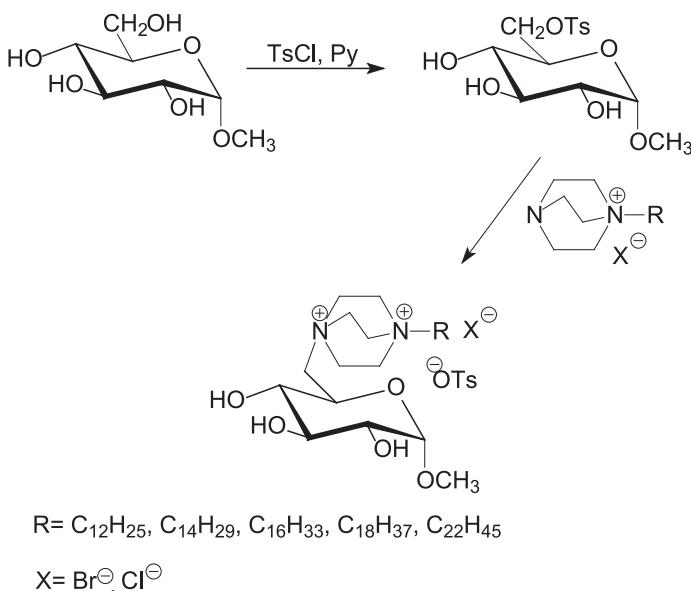


Rysunek 3. Struktury otrzymanych w grupie prof. Engela CSA pochodnych α -D-glukopiranozydów metylu [24, 25]

Figure 3. Structures obtained in the group of prof. Engel: QAS derivatives of methyl α -D-glucopyranosides [24, 25]

W reakcjach α -D-glikopiranozydu metylu z takimi aminami jak: DMAP, *N*-metyloimidazol, *N*-metylopirolidyna oraz pochodne *N,N,N'N'*-tertrametyloheksylo-1,6-diaminy otrzymywano szereg pochodnych w tym również takie, w których do jednej cząsteczki diaminy przyłączone były dwie jednostki cukrowe.

Najwięcej uwagi poświęcono pochodnym 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO). Jeden z atomów azotu w tej diaminie podstawiono węglowodorami o różnej budowie oraz długości łańcucha z utworzeniem soli amoniowej. Natomiast drugi podstawiono jednostką cukrową z utworzeniem drugiego centrum czwartorzędowego (Schemat 6).

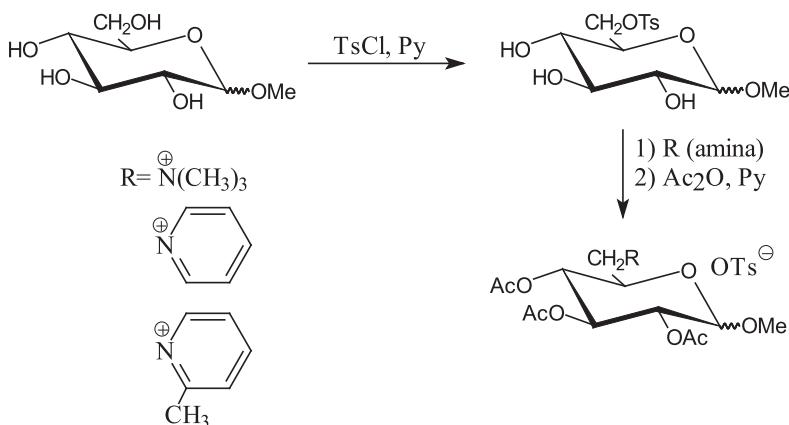


Schemat 6. Synteza diaminiowych pochodnych α -D-glukopiranozyd metylu [24, 25]

Scheme 6. Synthesis of diaminium QACs derivatives of methyl α -D-glucopyranosides [24, 25]

Związki te otrzymano poprzez sulfonowanie terminalnej grupy hydroksyloowej cukru przy pomocy chlorku tosylu, a następnie bezpośrednie czwartorzędowanie przy pomocy aminy (bez oczyszczania i izolowania tosylowej pochodnej). W wyniku takiej reakcji otrzymano czwartorzędowe sole z bardzo dobrymi wydajnościami (powyżej 90%). Dla omawianych soli przeprowadzone zostały badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Jednakże dla większości z nich czynność była niewielka. Ponadto, nie zaobserwowało typowego dla CSA wzrostu aktywności wraz ze zwiększeniem części hydrofobowej. Co bardzo interesujące, najbardziej aktywną solą wobec *S. aureus* była pochodna aminy o niewielkim charakterze hydrofobowym – *N*-metylopirolidyna [24, 25].

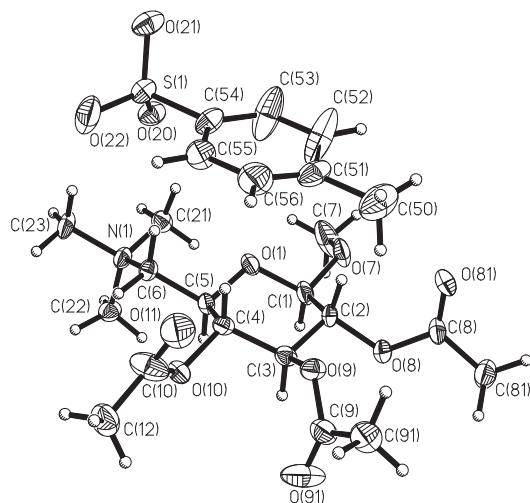
W Pracowni Chemii Cukrów UG badano reakcje tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych D-glukopiranozy, tj. tosylany N -[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- α - i β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowe [26]. Interesowała nas możliwość podstawienia nukleofilowego przy atomie węgla C6 w heksozach. Syntezy prowadzono w oparciu o dwa substraty różniące się konfiguracją anomerycznego atomu węgla: tzn. 6-O-tosylo- α -D-glukopiranozyd metylu i 6-O-tosylo- β -D-glukopiranozyd metylu. Przebadano reakcje powyższych związków z aminami alifatycznymi – trimetyloaminą w etanolu, trietyloaminą oraz z dwiema aminami aromatycznymi – pirydyną i 2-metylopirydyną (Schemat 7).



Schemat 7. Synteza tosylanów N -[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- α - i - β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych

Scheme 7. Synthesis of N -(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-deoxys- α - and - β -D-glucopyranoside-6-yl)aminium tosylates

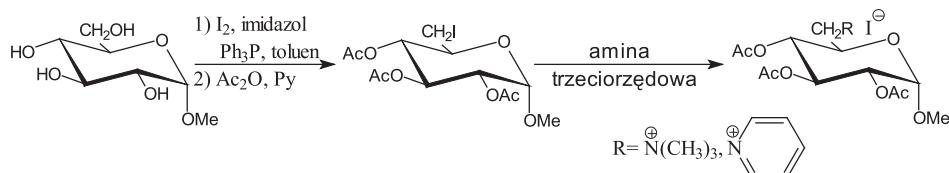
W wyniku zastosowanych klasycznych warunków reakcji czwartorzędowania (analogicznych jak dla soli N -D-glukopiranozyloamoniowych: ilości molowe substratów, temperatura pokojowa [27]) nie uzyskano oczekiwanych produktów. 6-O-Tosylo- α -D-glukopiranozyd metylu i 6-O-tosylo- β -D-glukopiranozyd metylu reagował z trimetyloaminą wyłącznie wtedy, gdy reakcje prowadzone były w łaźni ultradźwiękowej. Analogiczna reakcja z trietyloaminą nie zachodziła, nawet w minimalnym stopniu. Z kolei z aminami aromatycznymi mimo zastosowania łaźni ultradźwiękowej wydajności były bardzo małe, rzędu 20%. Stąd, przeprowadzono syntezę powyższych soli w zakręcanych, gwintowanych ampułkach umieszczonych w bloczku grzejnym o temperaturze 70°C. W tych warunkach uzyskano lepsze wydajności dla anomeru β niż α 6-O-tosylo-D-glukopiranozydu metylu. Dla tosylanu N -[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego wykonano analizę rentgenostrukturalną (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura krystalograficzna cząsteczki tosylanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego
 Figure 4. The X-ray structure of *N*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-deoxys- β -D-glucopyranoside-6-yl)trimethylammonium tosylate

Pierścień piranowy cukru w tej soli przyjmuje niemal idealną konformację krzesłową ${}^4\text{C}_1$ (identyczna z występującą w roztworze), co dowodzi, że ugrupowanie amoniowe znajdujące się przy terminalnym atomie węgla nie wpływa na konformację pierścienia cukru.

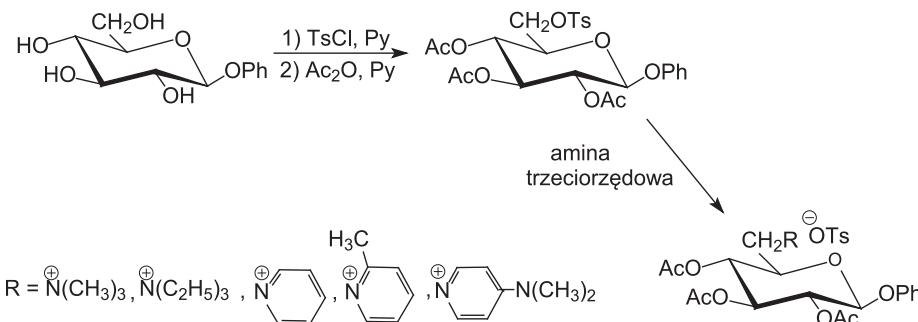
W oparciu o doniesienia literaturowe, o aktywności biologicznej czwartorzędowych jodków amoniowych, poddano reakcji 2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-6-jodo- α -D-glukopiranozyd metylu z aminami trzeciorzędowymi (trimetyloaminą w etanolu oraz pirydyną), co przedstawiono na Schemacie 8.



Schemat 8. Synteza jodków *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- α -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych
 Scheme 8. Synthesis of *N*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-deoxys- α -D-glucopyranoside-6-yl) ammonium iodides

Również w tym przypadku reakcja z trimetyloaminą była możliwa jedynie po zastosowaniu laźni ultradźwiękowej. Reakcje otrzymywania jodków *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- α -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych zachodziły trudniej niż analogiczne reakcje otrzymywania tosylanów. Anion jodkowy nie jest tak dobrą grupą odchodzącą jak anion tosylanowy, stąd uzyskano niższe wydajności reakcji czwartorzędowania [28].

W celu przebadania wpływu podstawnika (OMe , OPh) przy anomerycznym atomie węgla w jednostce β -glukopiranozydu na szybkość tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych przy terminalnym atomie węgla C6, reakcjom czwartorzędowania poddano 2,3,4-tri- O -acetylo-6- O -tosylo- β -D-glukopiranozyd fenułu. Podstawnik fenylowy w stosunku do metylowego jest większy oraz wywiera odmienny wpływ elektronowy na cząsteczkę cukru. Do badań użyto anomeru β 2,3,4-tri- O -acetylo-6- O -tosylo-D-glukopiranozydu fenułu oraz dwie trzeciorzędowe aminy alifatyczne (trimetyloamina w etanolu i trietyloaminy) i trzy aminy aromatyczne (4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna, 2-metylopirydyna oraz pirydyna) (Schemat 9).



Schemat 9. Synteza tosylanów N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd fenułu)-6-ylo]amoniowych
Scheme 9. Synthesis of N -(phenyl 2,3,4-tri- O -acetyl-6-deoxy- β -D-glucopyranoside-6-yl)aminium tosylates

Wykazano, że tosylan N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd fenułu)-6-ylo]trimetyloamoniowy tworzy się z dużo większą wydajnością niż tosylan N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowy. Natomiast w wyniku reakcji 2,3,4-tri- O -acetylo-6- O -tosylo- β -D-glukopiranozyd fenułu z trietyloaminą otrzymano tosylan N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd fenułu)-6-ylo]trietyloamoniowy z 30% wydajnością. W analogicznej reakcji dla pochodnej β -D-glukopiranozydu metylu nie obserwano nawet śladowych ilości tosylanu N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trietyloamoniowego. Z kolei, w wyniku reakcji 2,3,4-tri- O -acetylo-6- O -tosylo- β -D-glukopiranozyd fenułu z aminami aromatycznymi otrzymano zaprojektowane sole. Wydajność reakcji tworzenia soli N -[(2,3,4-tri- O -acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd fenułu)-6-ylo]amoniowych malała w szeregu: pirydyna (48%), 2-metylopirydyna (25%), 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna (18%). Spadek wydajności tworzenia soli 2-metylopirydynowej, w stosunku do soli pirydynowej spowodowany był obecnością grupy metylowej w pozycji 2, co z pewnością utrudniło atak nukleofilowy atomu azotu na atom węgla C6 O -tosylowej pochodnej cukru [29].

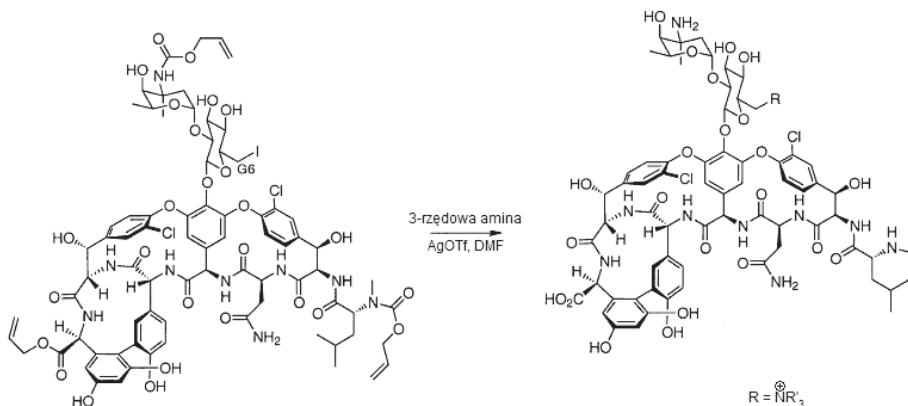
Wstępne wyniki uzyskane metodami chemii obliczeniowej w fazie gazowej (dotyczące wpływu podstawnika, OMe/OPh , przy anomerycznym atomie węgla na szybkość tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych na terminalnym atomie

węgla C6 D-glukopiranozydów) wykluczyły przypuszczenia, że zaobserwowane różnice w wydajnościach spowodowane są efektami sterycznymi. Dostęp do centrum reakcji jest podobnie łatwy we wszystkich przypadkach, niezależnie od struktury aglikonu (OMe czy OPh). Taki stan może być spowodowany czynnikami elektronowymi, co będzie przedmiotem dalszych badań.

Przeprowadzono badania cytotoxiczności otrzymanych tosylanów *N*-[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- α - i β -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych oraz tosylanów *N*-[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- β -D-glukopiranozyd fenylu)-6-ylo]amoniowych. Cytotoxiczność została wyznaczona w oparciu o test WST-1 polegający na określeniu przeżywalności szczurzych komórek białaczkowych (linia IPC-81). Celem tego testu było zbadanie wpływu poszczególnych związków na układ krwionośny [29]. Badane ziązki nie wykazywały w ogóle, bądź wykazywały bardzo niską, cytotoxiczność wobec komórek IPC-81. Dla dwóch z przebadanych związków, tj. tosylanu *N*-[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- α -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego oraz tosylanu *N*-[(2,3,4-tri-O-acetylo-6-deoksy- α -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]pirydyniowego, określono dawki skuteczne. W przypadku pozostałych substancji nie zauważono znaczącej inhibicji przeżywalności komórek, w badanym zakresie stężeń. Wszystkie badane ziązki wykazały niską toksyczność (EC_{50} wysokie, powyżej 1000 mM) w stosunku do komórek białaczkowych. Nie znaleziono korelacji między budową badanych soli a ich cytotoxicznością.

3. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE PRZY TERMINALNYM ATOMIE WĘGŁA W OLIGOSACHARYDACH

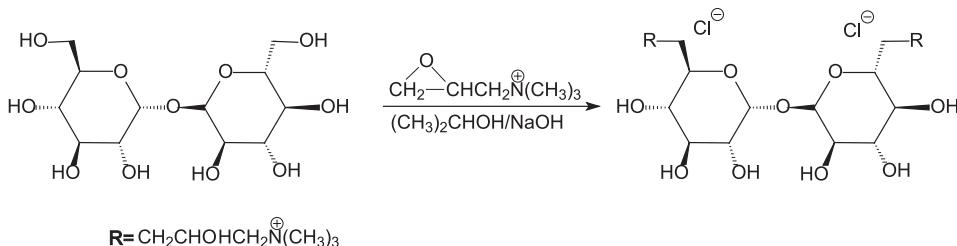
Blizzard ze współpracownikami zsyntezowali czwartorzędowe sole amoniowe, pochodne wankomycyny [30]. Wankomycyna została odkryta ponad 60 lat temu [31] i do tej pory jest antybiotykiem stosowanym w leczeniu licznych infekcji bakteryjnych (wywołanych np. przez gronkowca złocistego), często będąc tzw. lekiem ostatniej szansy. Zauważano, że zwiększenie hydrofilowości wankomycyny poprzez modyfikacje fragmentu struktury zwiększało jej właściwości przeciwbakteryjne [32, 33], a jedną z bardziej aktywnych okazała się pochodna posiadająca grupę aminową w pozycji G-6 (Schemat 10). Opublikowano syntezę m.in. sześciu czwartorzędowych soli amoniowych będących analogami wankomycyny posiadających zmodyfikowaną pozycję G-6. Wszystkie substancje wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów *Staphylococcus* i *Enterococcus*.



Schemat 10. Tworzenie czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych wankomycyny [30]
Scheme 10. Formation of quaternary ammonium salts derivatives of vancomycin [30]

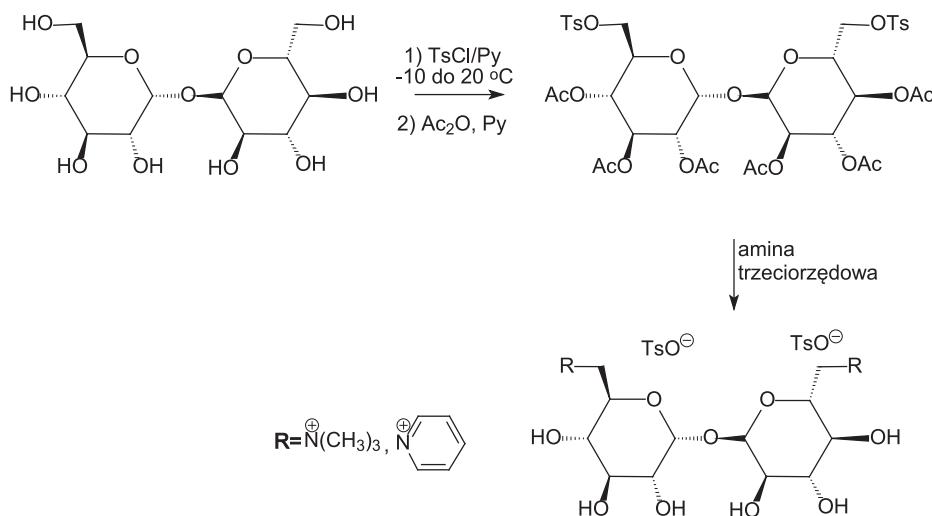
Pochodne α,α -trehalozy dzięki swoim właściwościom biologicznym wykorzystywane są jako leki. Dodatkowo, ułatwienie w planowanych syntezach stanowi budowa disacharydu jako cukru niereductującego, tzn. takiego, w którym w wiązaniu glikozydowym zaangażowane są oba anomeryczne atomy węgla oraz fakt, że obie terminalne grupy hydroksylowe przy C6 i C6' są wolne.

Ciekawe badania przedstawili naukowcy z Chin [34]. Zsyntezowano czwartorzędowe sole amoniowe pochodne α,α -trehalozy (Schemat 11), które przebadano pod kątem absorpcji wody. Stwierdzono, że otrzymana CSA pochodna α,α -trehalozy, doskonale wiąże wodę oraz posiada niską toksyczność. Posiadała ona zbliżone, a pod niektórymi względami lepsze, właściwości od kwasu hialuronowego, co może w przyszłości znaleźć zastosowanie w kosmetykach.



Schemat 11. Synteza CSA pochodnych α,α -trehalozy [34]
Scheme 11. Synthesis of quaternary ammonium salts derivatives of α,α -trehalose [34]

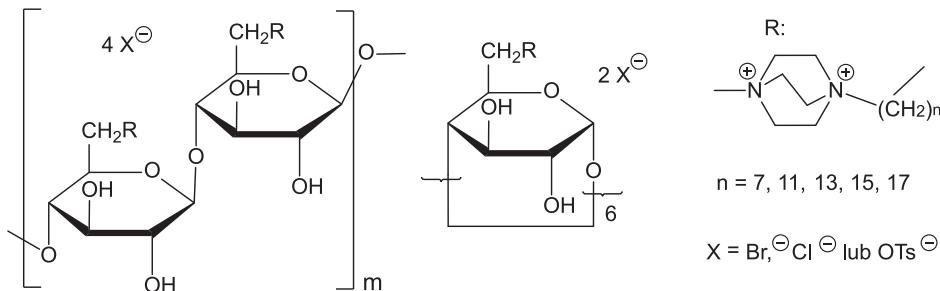
Przeprowadzone w Pracowni Chemii Cukrów UG reakcje per-O-acetyl-6,6'-di-O-tosylo- α,α -trehalozy z dwiema aminami: trimetyloaminą lub pirydyną, dostarczyły oczekiwanych soli bisamoniowych z wysokimi wydajnościami (wyniki nieopublikowane). W reakcjach czwartorzędowania zaobserwowano, że zarówno trimetyloamina jak i pirydyna, ze względu na właściwości zasadowe powodowały de-O-acetylowanie (Schemat 12).



Schemat 12. Synteza ditosylanów N,N' -[(6,6'-dideoxy- α,α -trehalosa)-6,6'-diylo]bisamoniowych
Scheme 12. Synthesis of N,N' -[(6,6'-dideoxy- α,α -trehalose)-6,6'-diyl]bisammonium ditosylates

4. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE POCHODNE POLISACHARYDÓW

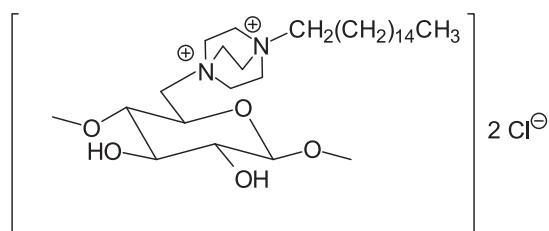
Przykładem reakcji polegających na funkcjonalizowaniu terminalnych atomów węgla w polisacharydach takich jak cykłodekstryny, skrobia oraz celuloza były syntezy przeprowadzone przez Engel'a i współpracowników [35, 36] (Rys. 5).



Rysunek 5. Struktury otrzymanych CSA pochodnych skrobi, celulozy i cykłodekstryn [35, 36]
Figure 5. Structures QACs derivatives of starch, cellulose and cyclodextrins [35, 36]

Podobnie jak w przypadku pochodnych monosacharydów powyższe sole zostały poddane badaniom właściwości przeciwbakteryjnych. Ze względu na wielokrotne podstawienie jednostek sacharydowych cząsteczkami CSA zaobserwowało znaczący wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej CSA pochodnych polisacharydów (skrobia, celuloza) w porównaniu z CSA pochodnymi cykłodekstryn. O ile w cząsteczkach cykłodekstryn, podstawionych cząsteczkami DABCO, wpływ

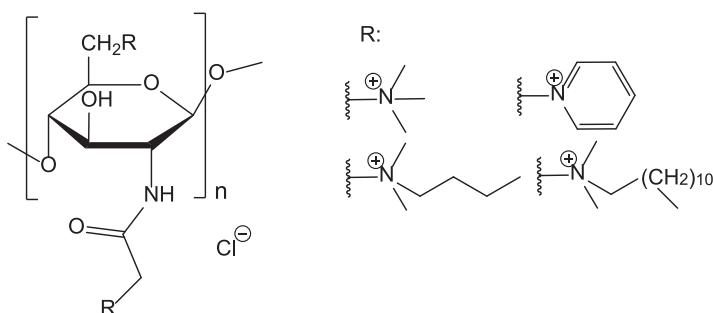
wielkości łańcucha węglowodorowego na aktywność jest niewielki to w pochodnych celulozy ma on bardzo duże znaczenie. Zaobserwowano wzrost aktywności dla pochodnych zawierających dłuższe łańcuchy węglowodorowe, aż do uzyskania optymalnej wartości przy szesnastu atomach węgla. Pochodne celulozy (w postaci modyfikowanej tkaniny) zawierające taki sam podstawnik (Rys. 6) hamowały całkowicie wzrost bakterii na ich powierzchni. Czynność tą zaobserwowano zarówno wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Bardzo dobre wyniki uzyskano dla modyfikowanej skrobi. Minimalne stężenie inhibujące dla *S. aureus*, wyniosło $1,3 \times 10^{-7}$ mg/cm³, co w porównaniu z pochodnymi cyklodekstryn jest 50 000 razy niższe [24, 37, 38].



Rysunek 6. CSA pochodna celulozy [35, 36]
Figure 6. QACs derivatives of cellulose [35, 36]

Liu i Baumann dokonali regioselektywnej modyfikacji atomów węgla C6 kilku jednostek monosacharydowych celulozy [39]. Pierwszym etapem syntezy było podstawienie grupy hydroksylowej przy C6 grupami O-tosyłowymi. „6-O-Tosylo-cellulozę” rozpuszczono w DMSO i do uzyskanego roztworu dodawano pirydynę, a następnie ogrzewano w temperaturze 100°C 24 godz. Otrzymano odpowiednią sól pirydyniową pochodną celulozy z wydajnością 84% w stosunku do oszacowanej poprzednio ilości grup O-tosyłowych.

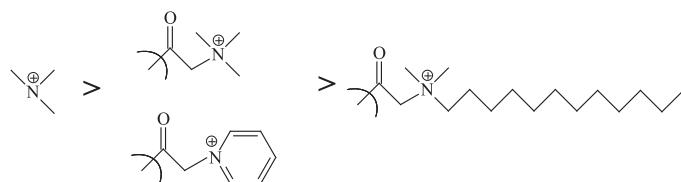
Kolejnym bardzo ciekawym przykładem połączenia polisacharydów oraz czwartorzędowych soli amoniowych są pochodne chitozanu. Chitozan to polimer D-glukozaminy, powstający w wyniku *N*-deacetylowania chityny. Posiada on bardzo wiele interesujących właściwości, w tym przeciwbakteryjne. Dość niska rozpuszczalność w wodzie ogranicza jego szersze zastosowania. Modyfikacja grupy aminowej poprzez czwartorzędowanie, prowadzące np. do pochodnej trimetyloamoniowej, w znacznym stopniu poprawia rozpuszczalność oraz aktywność przeciwbakteryjną. Zmiany nie ograniczają się tylko do podstawienia atomu azotu trzema identycznymi grupami, zazwyczaj syntezuje się związki posiadające różnorakie podstawniki aromatyczne lub alifatyczne. Przykładem może być synteza pochodnych chitozanu, w których poprzez łącznik amidowy do grypy aminowej cukru przyłączone zostały CSA, przedstawione na Rysunku 7 [40].



Rysunek 7. Struktury przykładowych CSA, pochodnych chitozanu [40]

Figure 7. Structures of QACs derivatives of chitosan [40]

Powyższe związki poddano badaniom aktywności przeciw bakteriom i grzybom. Porównano ich aktywność z syntetyzowanymi monomerycznymi odpowiednikami, tj. pochodnymi D-glukozaminy. W przypadku modyfikowanego chitozanu podstawniki bardziej hydrofilowe powodowały lepsze właściwości przeciwbakteryjne. Na podstawie wyznaczonych MIC i MLC uszeregowano aktywność przeciwbakteryjną czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych chitozanu (Rys. 8).



Rysunek 8. Szereg aktywności przeciwbakteryjnej CSA pochodnych chitozanu [40]

Figure 8. A number of antimicrobial activity QACs derivatives of chitosan [40]

Jednak w przypadku pochodnych monomerycznych tj. pochodnych D-glukozaminy zależność pomiędzy aktywnością oraz strukturą była odwrotna. Najbardziej aktywne pochodne zawierały podstawnik o charakterze hydrofobowym.

Tak modyfikowany chitozan może znaleźć zastosowanie jako składnik tkanin oraz materiałów o właściwościach przeciwbakteryjnych, z potencjalnym zastosowaniem w medycynie [41–45].

UWAGI KOŃCOWE

W Zakładzie Chemii Cukrów, od 2014 roku przekształconego w Pracownię Chemii Cukrów, od dłuższego czasu prowadzone są prace związane z syntezą, badaniami strukturalnymi oraz właściwościami biologicznymi CSA, połączonych z cukrami. Czwartorzędowe sole amoniowe przy anomerycznym atomie węgla w jednostce cukru zostały przez nas opisane we wcześniejszym artykule [46], stąd

w przeglądzie literaturowym omówiono przykłady syntezy związków z dodatnim ładunkiem na atomie azotu oddalonym od centrum anomerycznego o węglowodo-rowy linker oraz znajdującym się przy terminalnym atomie węgla.

PODZIĘKOWANIA

Praca dedykowana jest śp. Profesorowi Andrzejowi Wiśniewskiemu.
Praca została wykonana w ramach funduszu DS 530-8455-D 501-16

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Jerzykiewicz, W. Misiurny, M. Kozupa, *Chemik*, 1993, **2**, 31.
- [2] J. Pernak, J. Kalewska, H. Ksycińska, J. Cybulski, H. Ksycin, *Eur. Journaj Med. Chem.*, 2001, **36**, 899.
- [3] T. Thorsteinsson, M. Másson, K.G. Kristinsson, M.A. Hjálmarsdóttir, H. Hilmarsson, T. Loftsson, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4173.
- [4] D. Staneva, E. Vasileva-Tonkova, M.S.I. Makki, T.R. Sobahi, R.M. Abdel-Rahman, A.M. Asiri, I. Grabchev, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2015, **143**, 44.
- [5] E.R. Kenawy, S.D. Worley, R. Broughton, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1359.
- [6] M. Shiraishi, Y. Aramaki, M. Seto, H. Imoto, Y. Nishikawa, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, O. Nishimura, M. Baba, M. Fujino, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2049.
- [7] D.L. Prince, H.N. Prince, O. Thraenhart, E. Muchmore, E. Bonder, J. Pugh, *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 3296.
- [8] E. Grabińska-Sota, *Ocena oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych na środowisko wodne*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2004.
- [9] K. Bica, L.R. Cooke, P. Nugent, C. Rijksen, R.D. Rogers, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2344.
- [10] T. Soldo, O. Frank, H. Ottinger, T. Hofmann, *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, **48**, 270.
- [11] D. Landini, A. Maia, A. Rampoldi, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 3187.
- [12] P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, D. D'Angelo, E. Barni, C. Compari, E. Duce, E. Fisicaro, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 9857.
- [13] B. Podgorska, K. Pazdro, G. Węgrzyn, *J. Appl. Genet.*, 2007, **48**, 409.
- [14] B. Dmochowska, J. Piosik, A. Woziwodzka, K. Sikora, A. Wiśniewski, G. Węgrzyn, J. Hazard. Mater., 2011, **193**, 272.
- [15] D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 1983, **113**, 173.
- [16] K. Erfurt, I. Wandzik, K. Walczak, K. Matuszek, A. Chrobok, *Green Chem.*, 2014, **16**, 3508.
- [17] O. Kirk, F.D. Padersen, C.C. Fuglsan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 1645.
- [18] H. Finklestein, *Ber.*, 1910, **43**, 1528.
- [19] J.B., Conant, W.R. Kirner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, **46**, 323.
- [20] J. Riegier, H. Freicheis, A. Imbert, J. Putaux, T. Delair, C. Jérôme, R. Auzély-Velty, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 651.
- [21] J. Rieger, F. Stoffelbach, D. Cui, A. Imbert, E. Lameignere, J. Putaux, R. Jérôme, R. Auzély-Valty, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2717.
- [22] S. Tanimori, T. Ohta, M. Kirihata, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 1135.
- [23] L.D. Hall, D.C. Miller, *Carbohydr. Res.*, 1975, **40**, C1-C2.

- [24] M. Thomas, D. Montenegro, A. Castaño, L. Friedman, J. Leb, M.L. Huang, L. Rothman, H. Lee, C. Capodiferro, D. Ambinder, E. Cere, J. Galante, J. Rizzo, K. Melkonian, R. Engel, Carbohydr. Res., 2009, **344**, 1620.
- [25] R. Engel, I. Ghan, D. Montenegro, M. Thomas, B. Klaritch-Vrana, A. Castano, L. Friedman, J. Leb, L. Rothman, H. Lee, C. Capodiferro, D. Ambinder, E. Cere, C. Awad, F. Sheikh, J. Rizzo Lee, L.M. Nisbett, E. Testani, K. Melkonian, Molecules, 2011, **16**, 1508.
- [26] L. Pellowska-Januszek, B. Dmochowska, E. Skorupa, J. Chojnacki, W. Wojnowski, A. Wiśniewski, Carbohydr. Res., 2004, **339**, 1537.
- [27] E. Fischer, K. Raske, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1910, **43**, 1750.
- [28] L. Pellowska-Januszek, B. Dmochowska, E. Skorupowa, A. Wiśniewski, Proceedings of 4th International Conference of PhD Students, Published by Univ. Miskolc, Innovation and Technology Transfer Centre, ISBN 963 661 593 4, 2003, 341.
- [29] B. Dmochowska, L. Pellowska-Januszek, E. Skorupa, A. Nowacki, F. Stock, P. Stepnowski, A. Wiśniewski, Pol. J. Chem., 2006, **80**, 1513.
- [30] T.A. Blizzard, R.M. Kim, J.D. Morgan, II, J. Chang, J. Kohler, R. Kilburn, K. Chapman, M.L. Hammond, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, **12**, 849.
- [31] M.H. McCormick, W.M. Stark, G.E. Pittenger, R.C. Pittenger, G.M. McGuire, Antibiot. Annu., 1955, **3**, 606.
- [32] R. Nagarajan, A.A. Schabel, F.T. Occolowitz, F.T. Counter, J.L. Ott, J. Antibiot., 1988, **41**, 1430.
- [33] R. Nagarajan, A.A. Schabel, F.T. Occolowitz, F.T. Counter, J.L. Ott, A. M. Felty-Duckworth, J. Antibiot., 1989, **42**, 63.
- [34] S. Yang, Z. Guo, Y. Zhou, L. Zhou, Q. Xue, F. Miao, S. Qin, Carbohydr. Res., 2010, **345**, 120.
- [35] T. Abel, J.I. Cohen, R. Engel, M. Filshtinskaya, A. Melkonian, K. Melkonian, Carbohydr. Res., 2002, **337**, 2495.
- [36] M. Thomas, D. Montenegro, A. Castaño, L. Friedman, J. Leb, M. L. Huang, L. Rothman, H. Lee, C. Capodiferro, D. Ambinder, E. Cere, J. Galante, J. Rizzo, K. Melkonian, R. Engel, Carbohydr. Res., 2009, **344**, 1620.
- [37] T. Abel, J.I. Cohen, R. Engel, M. Filshtinskaya, A. Melkonian, K. Melkonian, Carbohydr. Res., 2002, **337**, 2495.
- [38] J.I. Cohen, S. Castro, J.A. Han, V. Behaj, R. Engel, Heteroat. Chem., 2000, **11**, 546.
- [39] Ch. Liu, H. Baumann, Carbohydr. Res., 2005, **340**, 2229.
- [40] Ö.V. Rúnarsson, J. Holappa, C. Malainer, H. Steinsson, M. Hjálmarsdóttir, T. Nevalainen, M. Måsson, Eur. Polym. J., 2010, **46**, 1251.
- [41] M.A. Maslov, N.G. Morozova, E.I. Chizhik, D.A. Rapoport, E.I. Ryabchikova, M.A. Zenkova, G.A. Serebrennikova, Carbohydr. Res., 2010, **345**, 2438.
- [42] R. Jayakumar, M. Prabaharan, P.T. Sudheesh Kumar, S.V. Nair, H. Tamura, Biotechnol. Adv., 2011, **29**, 322.
- [43] T. Xu, M. Xin, M. Li, H. Huang, S. Zhou, J. Liu, Carbohydr. Res., 2011, **346**, 2445.
- [44] M.E.I. Badawy, E.I. Rabea, N.E.M. Taktak, Carbohydr. Polym., 2014, **111**, 670.
- [45] T. Xu, M. Xin, M. Li, H. Huang, S. Zhou, Carbohydr. Polym., 2010, **81**, 931.
- [46] B. Dmochowska, E. Skorupowa, A. Wiśniewski, Wiad. Chem. 2002, **56**, 679.

ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK SREBRA W LASEROWEJ SPEKTROMETRII MAS ORAZ W OBRAZOWANIU MS – PRZEGŁĄD

APPLICATION OF SILVER NANOSTRUCTURES
IN LASER DESORPTION/IONIZATION MASS
SPECTROMETRY AND MASS SPECTROMETRY
IMAGING

Justyna Sekuła^{1*}, Joanna Nizioł¹, Tomasz Ruman¹

Politechnika Rzeszowska, Wydział Chemiczny
al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

*e-mail: justynasekulaa@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. AgNPs w analizie związków jonowych
2. AgNPs w analizie związków niejonowych
3. Nanostruktury srebra do analizy mikrobiologicznej
4. Aktywne powierzchnie z nanostrukturami srebra stosowane w LDI MS
5. AgNPs w obrazowaniu LDI MS

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. inż. Tomasz Rumian jest profesorem nadzwyczajnym w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej od 2012 roku. Tytuł magistra inżyniera uzyskał w 2003 roku. Pracę doktorską pt. „Ligandy polipirazoliloboranowe: homoskorpionianowe, heteroskorpionianowe i chiralne” obronił w 2004 roku pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Stanisława Wołowca. W roku 2011 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych to nowe metody do laserowej spektrometrii mas oraz obrzutowania MS, analizy metabolomiczne tkanek roślinnych i zwierzęcych, borowe nukleozydy i nukleotydy jako inhibitory enzymów istotnych w procesach nowotworzenia oraz w BNCT czy także badania potranslacyjnych modyfikacji białek.

Mgr inż. Justyna Sekuła ukończyła studia inżynierskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej, broniąc w 2012 roku pracę pt: „*Borowe pochodne nukleozydów*”. Następnie podjęła studia II stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku biotechnologia przemysłowa. Studia magisterskie ukończyła w 2013 roku otrzymując tytuł magistra inżyniera za pracę pt. „Badania nad syntezą nowych analogów arabinocytozyny (AraC)”. W październiku 2013 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej w dziedzinie nauk chemicznych w dyscyplinie technologia chemiczna. Pracę pod tytułem „*Nowe układy bezmatrycowe do laserowej spektrometrii mas*” realizuje pod kierownictwem dr hab. inż. Tomasza Rumana, prof. PRz.

Dr Joanna Nizioł urodzona w 1984 r. w Rzeszowie, ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2008 r. Doktorat nauk chemicznych uzyskała na Politechnice Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w 2015 r. Odbyła dwumiesięczny staż podoktorski w zespole prof. Jana Sunnera na Wydziale Mikrobiologii i Biologii Roślin na Uniwersytecie w Oklahomie. Od 2010 r. do chwili obecnej pracuje na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza, od 2015 r. na stanowisku asystenta w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles, especially silver nanoparticles, have attracted much attention due to their unique physical, chemical and opto-electronic properties. Silver nanoparticles have been successfully applied as a matrix replacement for the laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (LDI-ToF-MS). Silver nanoparticles (AgNPs) can efficiently absorb ultraviolet laser radiation, transfer energy to the analyte and promote analyte desorption, but also constitute a source of silver ions suitable for analyte cationisation. Nanoparticles, producing spectra with highly reduced chemical background in the low *m/z* region, are perfectly suited for low-molecular weight compound analysis and imaging.

AgNPs have been demonstrated to allow efficient capture of different chemical compounds (including amino acids, cholesterol, fatty acids) on their surface, thus efficiently promoting their desorption and gas phase cationisation. The minimum detectable amount for those organic and biological molecules is often in the fmol range [23]. Despite the fact that scientists have developed a variety of methods for the synthesis of silver nanoparticles, there are still problems with obtaining surfaces with nanoparticles of high durability and chemical purity. Recently, a successful application of cationic silver nanoparticles (AgNPs), which were placed on MALDI targets for highly sensitive detection of D-ribose at attomolar levels as well as analysis of biological samples such as urine and blood serum [51] was shown. The application of new ¹⁰⁹AgNPET surface has been presented with examples of analysis of nucleosides and nucleic bases [60].

One of the main directions of development of LDI-MS is the imaging mass spectrometry (MSI), enabling the visualization of surface distribution of biological samples. The critical limitations of the spatial resolution of MALDI-MSI are the size of the organic matrix crystals and the analyte migration during the matrix application process. To overcome these problems, researchers tried to use nanoparticles as substitutes of organic matrices. In 2013 Ruman group presented that direct contact of the analysed object with Ag nanoparticle-covered target permits direct surface transfer of chemical compounds. The active surface becomes then a "chemical photograph" of an object and allows MS analysis and MS imaging [68].

Keywords: low molecular weight compounds, mass spectrometry, mass spectrometry imaging, matrices, matrix free-system, silver nanoparticles

Słowa kluczowe: związki niskocząsteczkowe, spektrometria mas, obrazowanie spektrometrią mas, matryca, układy bezmatrycowe, nanocząstki srebra

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich 15 lat znacznie wzrosła liczba doniesień naukowych na temat wykorzystania spektrometrii mas z laserową desorpcją/jonizacją wspomaganą matrycą (MALDI MS). Technikę MALDI MS charakteryzuje wysoka czułość oraz szybkość analizy nie tylko związków jonowych, takich jak białka, peptydy czy kwasy nukleinowe, ale także różnych niejonowych związków chemicznych, wśród których bardzo istotnymi są lipidy czy sacharydy [1–6]. Technika ta umożliwia wykrywanie substancji w szerokim zakresie mas, co pozwala na jej zastosowanie w różnych dziedzinach chemii i biologii.

Poważną wadą techniki MALDI MS jest obecność na widmie pików pochodzących od jonów związanych z obecnością matryc organicznych, które przyczyniają się do tłumienia pików analitu [7–12] i są źródłem znacznej ilości pików w zakresie poniżej m/z 1000. Efektu tłumienia można uniknąć poprzez zastosowanie metod bezmatrycowych opierających się na zastosowaniu różnych nanostruktur. Nanostruktury często pozwalają nie tylko na redukcję tła chemicznego w niskim zakresie m/z , ale także znacznie polepszają klarowność widma, ponadto w znacznym stopniu ułatwiają przygotowanie próbki. Co więcej, metody oparte na nanostrukturach, a zwłaszcza te, w których nanostruktury tworzą aktywną powierzchnię, pozwalają na wyeliminowanie szeregu problemów niejednorodności powierzchni badanej (efekt „sweet spot”) [13].

Kilka lat po przedstawieniu metody MALDI opartej na matrycach organicznych, Karas [1] i Tanaka [14, 15] eksperymentowali z mieszaniną proszków nieorganicznych, badając ich zdolność do jonizacji analitu. Tanaka, jako pierwszy wykrył białka i polimery za pomocą układu dwufazowego, zawierającego kobalt w postaci bardzo drobnego proszku (30 nm) zawieszonego w glicerolu [14]. W 1995 Sunner i wsp. zastosowali zamiast matryc organicznych cząstki grafitu zawieszone w glicerolu [16]. Cząstki nieorganiczne wspierają proces jonizacji poprzez pochłanianie energii lasera i ułatwienie desorpcji termicznej analitu. Inni autorzy także testowali różnej wielkości cząstki metaliczne zawieszone w glicerolu lub w innych cieczach.

Jednak główną wadą takich rozwiązań jest występowanie zjawiska „sweet spot”, a także problem z zastosowaniem tych rozwiązań dla instrumentów z pionową pozycją płytki (targetu) [14, 16–18].

Zastosowanie AgNPs w analizie biomolekularnej zapewnia wiele korzyści m.in.: (i) relatywnie wysoka tolerancja na sole, (ii) eliminacja zakłóceń pochodzących od jonów matrycy organicznej, (iii) występowanie na widmie wysoce powtarzalnych sygnałów oraz (iv) możliwość kalibracji wewnętrznej na pikach pochodzących od jonów srebrowych. Ponadto, aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza nanocząstek srebra zapewnia pełną ochronę badanych tkanek.

Niniejsze opracowanie jest podzielone na pięć rozdziałów opisujących różne aspekty zastosowania nanocząstek srebra w technice laserowej desorpcji/jonizacji (LDI MS). Pierwsze dwa rozdziały dotyczą zastosowania nanocząstek srebra w „konwencjonalnej” analizie LDI MS, gdzie nanostruktury srebra stosowane są

jako dodatki ułatwiające jonizację jonowych i niejonowych analitów. Trzeci rozdział skupia się na zastosowaniu AgNPs w analizie mikroorganizmów oraz produktów ich metabolizmu. Czwarty natomiast dotyczy przykładów zastosowania aktywnych powierzchni zawierających nanostruktury srebrowe. Ostatni rozdział opisuje zastosowanie AgNPs w obrazowaniu LDI MS różnych powierzchni.

1. AgNPs W ANALIZIE ZWIĄZKÓW JONOWYCH

Mechanizm desorpcji i jonizacji w układach z nanostrukturami srebrowymi jest skomplikowany i nie do końca jeszcze poznany. Podobnie jest także w przypadku szeregu innych nanostruktur. Zwykle zakłada się, że mechanizm desorpcji/jonizacji dla analitu znajdującego się na lub w pobliżu nanocząstek polega na absorpcji nanosekundowych impulsów lasera przez nanocząstki, czego skutkiem jest niemal natychmiastowe, gwałtowne ogrzewanie analitu i wybuchowe przejście fazowe. Jednak Silina i in. sugerują istnienie innego mechanizmu – indukowanej światłem desorpcji akustycznej (ang. *laser-induced acoustic desorption*, LIAD), gdzie jony są desorbowane w wyniku efektów mechanicznych.

Efekt LIAD jest wywołyany poprzez impulsy akustyczne w obrębie cienkiej warstwy nanostrukturalnej i jego charakter zmienia się znacząco wraz ze wzrostem grubości warstwy [19]. Poza efektami typowo fizycznymi opisanymi powyżej, nanostruktury wykazują także szereg interesujących właściwości związanych raczej z charakterem chemicznym [20, 21].

Hua i in. [21], a następnie także inni badacze [22, 23] opracowali metodę nano-PALDI, w której wykorzystali AgNPs stabilizowane cytrynianem w celu skutecznej desorpcji/jonizacji kilku peptydów [21–23]. Autorzy zastosowali dwa modelowe peptydy: bradykininę (0,1 mg/ml) oraz angiotensynę I (0,5 mg/ml) w obecności środka powierzchniowo czynnego oraz odpowiedniej soli, aby zbadać potencjał nanocząstek srebra pełniących funkcję matrycy w procesie jonizacji [21]. Nanocząstki srebra otrzymano w wyniku redukcji chemicznej azotanu srebra z zastosowaniem procedury opisanej wcześniej w literaturze [24], wg której do roztworu 2 mM cyjanoborowodorku sodu w 1% roztworze cytrynianu sodu wkraplano 5 mM roztwór azotanu srebra w warunkach intensywnego mieszania. Powstałe AgNPs wielkości 160 ± 20 nm umożliwiły skutecną desorpcję/jonizację wspomnianych peptydów nie powodując fragmentacji [21, 22]. Procedura opisana przez tą grupę [21] jest dosyć prosta do zastosowania, jako że autorzy zalecają naniesienie na płytę MALDI 0,5 μl zawiesiny nanocząstek, a następnie 0,5 μl roztworu analitu oraz suszenie strumieniem powietrza [21].

Co ciekawe, Hua i in. w swoich badaniach wykazali, że nanocząstki srebra mogą być stosowane do desorpcji/jonizacji peptydów, a rozdzielnosc otrzymanych widm jest identyczna jak w przypadku analizy MALDI z użyciem matrycy organicznej. Ponadto, w przeciwieństwie do wcześniejszych prac tych autorów, nie zaobserwo-

wano na widmie obecności pików adduktów peptydów z kationami sodu czy potasu [21].

Powszechnie znane powinowactwo tioli do jonów srebra lub złota zostało wykorzystane w celu wykrycia peptydów zawierających cysteinę przez Shrivasa i in. [23]. Autorzy wykazali, że AgNPs z powodzeniem mogą być stosowane w metodzie AP-MALDI-ITMS (ang. *atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion-trap mass spectrometry*) do analizy biotoli (tj. glutation) czy tiopeptydów obecnych w moczu.

Nanocząstki srebrowe wielkości 10 oraz 20 nm bez stabilizatora oraz stabilizowane CTAB (ang. cetyl trimethylammonium bromide) oraz cytrynianem otrzymano poprzez redukcję jonów srebra za pomocą NaBH_4 [23]. Autorzy przedstawili rezultaty analizy leków zawierających siarkę oraz biotoli bez konieczności wykonywania dodatkowego etapu rozdzielania i przemywania [23].

Niemodyfikowane AgNPs w porównaniu z stabilizowanymi CTAB oraz cytrynianem nanocząsttkami srebra, wykazują najlepszą wydajność jonizacji. Powodem wysokiego powinowactwa AgNPs do biotoli jest, jak twierdzą autorzy, tworzenie się wiązań kowalencyjnych Ag-S. Adsorpja biotoli na powierzchni AgNPs spowodowała 4–15-krotne zwiększenie czułości analizy badanych biotoli [23].

Biorąc pod uwagę opisane oddziaływanie nanocząstek metali szlachetnych z biomolekułami [25–27], Shrivas i in. [28], zastosowali do analizy peptydów i białek nanocząstki srebra zmodyfikowane ligandami hydrofobowymi. Reakcję pomiędzy AgNPs, a dodekanotolem i oktadodekanotolem prowadzono w toluenie stosując mikroekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *liquid–liquid microextraction*, LLME).

Ta sama grupa naukowców opracowała jednoetapową metodę ekstrakcji peptydów z próbek biologicznych z zastosowaniem nanocząstek srebra w procesie ekstrakcji do pojedynczej kropli (ang. *single drop microextraction*, SDME). Nanocząstki srebra wytworzono w układzie wodnym przez redukcję AgNO_3 za pomocą NaBH_4 , a następnie derywatyzację nanocząstek i przeniesienie do fazy organicznej zawierającej dodekanotiol lub oktadodekanotiol.

Otrzymane tą metodą zmodyfikowane AgNPs posiadały zwykle rozmiary mniejsze niż 50 nm [28]. Shrivas i in. opisali także tworzenie nanocząstek srebra stabilizowanych bromkiem tetraalkiloamoniowym [29]. Stabilizowane nanostruktury wytworzone w toluenie zostały zastosowane w funkcji elektrostatycznych sond powinowactwa do wstępnie zatężania mieszaniny peptydów z próbek biologicznych, te ostatnie analizowane były następnie metodą laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej matrycą pod ciśnieniem atmosferycznym AP MALDI z pułapką jonową.

Stabilizowane bromkiem tetraoktyloamoniowym (ang. *tetraoctylammonium bromide*, TOAB) nanocząstki srebra wytworzono poprzez redukcję AgNO_3 za pomocą NaBH_4 w układzie dwufazowym zawierającym TOAB w toluenie. Roztwory wodne badanych peptydów wytrząsano z 0,8 μL zawiesiny AgNPs w toluenie, po czym fazę toluenową zebrano i umieszczono na płytce do analizy MS [29].

W roku 2010 Kailasa i in. [30] opisali zastosowanie nanocząstek selenku srebra (Ag_2Se) modyfikowanych oktadekanotolem (ang. *octadecanethiol*, ODT) i kwasem 11-merkaptoundekanoowym (ang. *11-mercaptopoundecanoic acid*, MUA) jako „sond ekstrakcyjnych” do analizy hydrofobowych peptydów i białek w roztworach wodnych. Funkcjonalizowane Ag_2SeNPs wytworzono w reakcji azotanu srebra ze sproszkowanym selenem i oktadekanoaminą. Reakcję prowadzono w temperaturze 180°C przez 10 minut. Otrzymane w postaci zawiesiny wtoluenie nanocząstki miały kulisty kształt i rozmiary w zakresie od 7 do 10 nm. W celu analizy peptydów wymagane było zmieszanie sfunkcjonalizowanych Ag_2SeNPs zawieszonych wtoluenie z mieszaniną peptydów oraz wirowanie, a następnie umieszczenie 2 μl fazy organicznej z tą samą objętością roztworu matrycy CHCA na płytce MALDI.

Nanocząstki $\text{Ag}_2\text{Se}@ODT$ i $\text{Ag}_2\text{Se}@MUA$ okazały się być dobrymi hydrofobowymi nanosondami umożliwiającymi skutecną ekstrakcję peptydów w obecności substancji przeszkadzających, takich jak mocznik, Triton X-100 czy chlorek sodu [30].

Wspomniana wcześniej grupa pod kierunkiem Shastri uzyskała interesujące wyniki w mikroekstrakcji oraz identyfikacji markerów białkowych stosując zmodyfikowane nanocząstki srebra: $\text{Ag}@ODT/\text{AMP}$ (ang. *1-octadecanethiol/4-aminothiophenol*, ODT/AMP) oraz $\text{Ag}@ODT/\text{TG}$ (ang. *1-octadecanethiol/1-thioglycerol*, ODT/TG). W porównaniu z konwencjonalną metodą MALDI ToF MS przy zastosowaniu optymalnych parametrów systemu $\text{Ag}@ODT/\text{AMP}$ zaobserwowano 10–15-krotny wzrost intensywnośc sygnałów.

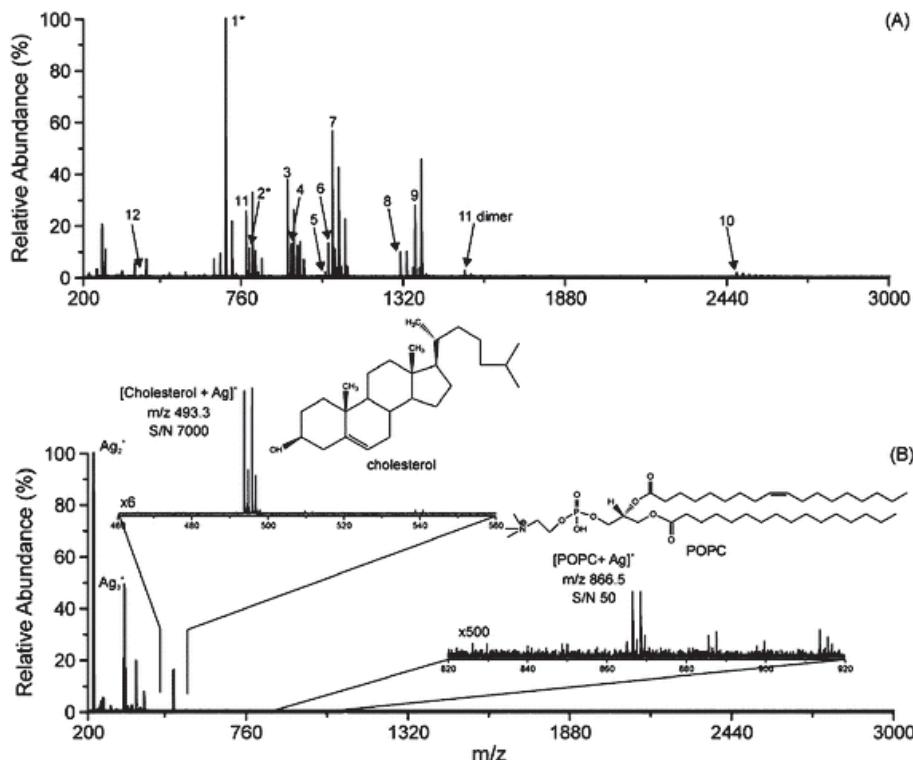
Niedawno Kawasaki i in. [32] przedstawili metodę analityczną polegającą na zastosowaniu efektu zlokalizowanego powierzchniowo rezonansu plazmonowego (ang. localized surface plasmon resonance, LSPR) w laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej matrycą (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) z wykorzystaniem trójkątnych nanopłytek srebrowych (ang. silver nanoplates, AgNPLs) unieruchomionych na podłożu stałym. AgNPLs wytworzono w prostej reakcji azotanu srebra z borowodorkiem sodu w obecności stabilizatora – cytrynianu trisodowego. Pierwszym krokiem tej syntezy była redukcja AgNO_3 za pomocą borowodorku w obecności cytrynianu trójsodowego. Otrzymano stabilizowane cytrynianem zarodki AgNPL, które napromieniowano światłem 550 ± 100 nm w temperaturze 50°C. Drugim krokiem tej syntezy była kontrola wzrostu nanostruktur srebra, w celu ułatwienia dalszego wzrostu AgNPLs, aż do uzyskania rozmiaru 30–70 nm. Zmodyfikowane trypsyną AgNPLs unieruchomiono na płytce MALDI z dodatkiem kwasu synapinowego jako matrycy, w celu przebadania ich zastosowania jako inhibitorów trypsyny sojowej (SBTI) [32].

Fujino i in. [33] w celu polepszenia stabilności zawiesiny AgNPs zastosowali unieruchomione zeolitem nanocząstki srebra o rozmiarach 20–35 nm. Otrzymany układ zeolit-nanocząstki (ang. *nanoparticle-zeolite system*, $\text{AgNPs-NH}_4\text{ZSM}_5$) może być skutecznym donorem Ag^+ . Autorzy przewidują, że zeolit może działać jako dobry odbiornik energii cieplnej zapobiegając niszczeniu AgNPs w procesie fotow-

zbudzania. Nowy materiał zastosowano w technice LDI MS do analizy jonowych i niejonowych substancji biologicznie czynnych o małej masie cząsteczkowej, w tym do analizy kwasu acetylosalicylowego, L-histydyny, glukozy, mocznika, cholesterolu, a także małych związków występujących w surowicy ludzkiej.

2. AgNPs W ANALIZIE ZWIĄZKÓW NIEJONOWYCH

Sherrod i in. [22], w swojej pracy wykorzystali oddziaływanie jony srebra-olefiny, w celu selektywnej jonizacji steroli i lipidów w obecności nanocząstek srebra o rozmiarach 20 oraz 60 nm. Autorzy w swoich badaniach analizowali próbki składającą się z mieszaniny 12 związków o różnej polarności, stosując do tego celu mieszaninę składającą się z matrycy DHB i azotanu srebra (Rys. 1A), lub tylko AgNPs (Rys. 1B).

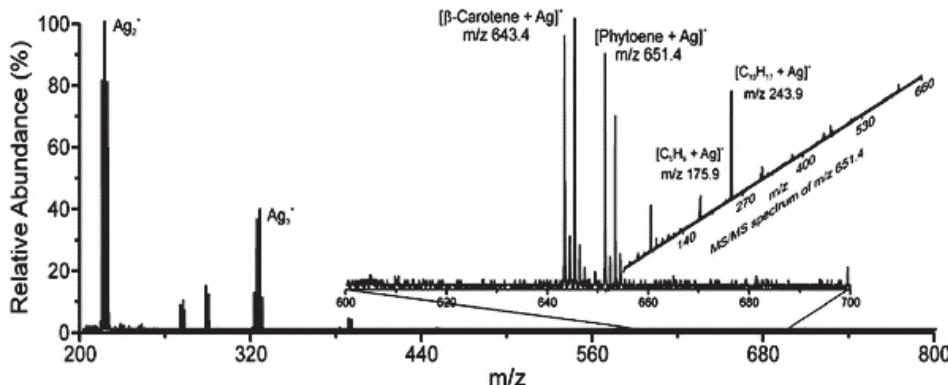


Rysunek 1. Widma MS mieszaniny peptydów (góra, A) wykonane z wykorzystaniem DHB/ AgNO_3 oraz fosfocholiny i cholesterolu (dół, B) wykonane z wykorzystaniem AgNPs. Przedrukowano za zezwoleniem D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, Anal. Chem., 2008, **80**, 6796. Prawa autorskie (2008) należą do American Chemical Society

Figure 1. MS spectra of a peptide mixture obtained with DHB/ AgNO_3 (A), phosphocholine and cholesterol obtained with AgNPs (B). Reprinted with permission from D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, Anal. Chem., 2008, **80**, 6796. Copyright 2008 American Chemical Society

Szczególnie interesujące okazało się, że przy wykorzystaniu matrycy organicznej na widmie zaobserwowano jedynie addukt [cholesterol-H₂O+H]⁺ natomiast nie zaobserwowano adduktów ze srebrem. Natomiast w przypadku wykorzystania AgNPs (Rys. 1A), na widmie widoczne są piki pochodzące od adduktu [cholesterol+Ag]⁺ oraz dodatkowe wysokie piki Ag₂⁺ i Ag₃⁺ (Rys. 1B) [22].

Ta sama grupa naukowców z powodzeniem wykorzystała 20 nm AgNPs, w celu ułatwienia jonizacji dwóch karotenoidów (β -karotenu i fitoenu) występujących w próbce soku marchwiowego (Rys. 2), będącego złożoną mieszaniną witamin, minerałów, terpenoidów, lipidów, węglowodanów, cukrów, białek, karotenoidów oraz aminokwasów. Rysunek 2 przedstawia widmo LDI MS, na którym wyraźnie widoczne są dwa sygnały odpowiadające adduktom [β -karoten+Ag]⁺ (*m/z* 643,3) oraz [fitoenu+Ag]⁺ (*m/z* 651,4). Przy czym wart podkreślenia jest fakt, iż obydwa te związki charakteryzują się niską, a nawet bardzo niską polarnością [22].



Rysunek 2. Widmo MS świeżo wyciśniętego soku z marchwi otrzymane z wykorzystaniem 20 nm AgNPs. Przedrukowano za zezwoleniem D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, Anal. Chem., 2008, **80**, 6796. Prawa autorskie (2008) należą do American Chemical Society
Figure 2. Mass spectrum of freshly squeezed carrot juice obtained with 20 nm AgNPs. Reprinted with permission from D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, Anal. Chem., 2008, **80**, 6796. Copyright 2008 American Chemical Society

W 2008 roku Chiu i in. [34] zastosowali nanocząstki srebra w technice laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej powierzchnią (SALDI MS), w celu identyfikacji trzech estrogenów: E1, E2 i E3. Po wstępny zatężeniu, badane związki były adsorbowane na AgNPs, a następnie bezpośrednio analizowane. Próg detekcji tych trzech związków wynosił odpowiednio 2,23 μM dla estronu (E1), 0,23 μM dla estradiolu (E2) oraz 2,11 μM dla estriolu (E3). Nanostruktury srebra o rozmiarach 34 ± 3 nm otrzymano nieco zmodyfikowaną metodą zaproponowaną przez Lee i in. [33], w której wodny roztwór azotanu srebra gotowano z dodatkiem cytrynianu trisodowego. Należy jednak zaznaczyć, że omówiona procedura zalicza się raczej do grupy metod nano-PALDI jako, że nie stosowano modyfikowanych nanostrukturami powierzchni targetu pomiarowego.

Wang i in. [36] opisali możliwość analizy antybiotyków aminoglikozydowych występujących w próbkach osocza ludzkiego za pomocą techniki SALDI MS z wykorzystaniem nanocząstek srebra pokrytych warstwą złota (Au@AgNPs). W swoich badaniach naukowcy założyli, że stabilizowane cytrynianem Au@AgNPs przyciągają dodatnio naładowane aminoglikozydy poprzez oddziaływanie elektrostatyczne. Syntezę ujemnie naładowanych nanocząstek srebra przeprowadzono wykorzystując metodę kontrolowanego wzrostu zarodków (seed-mediated growth). Bimetaliczne nanocząstki Au@AgNPs o rozmiarach 39 ± 5 nm otrzymano poprzez zmieszanie wodnego roztworu AgNO_3 z roztworem koloidalnego złota, tak powstałą mieszaninę dodano następnie do roztworu hydrochinonu. Otrzymaną zawiesinę Au@AgNPs mieszano z roztworem aminoglikozydów przez 1 godzinę, po czym odwirowano. Po usunięciu supernatantu, nanocząstki przemyto wodą, a następnie osadzono na płytce (target) i wysuszono na powietrzu. Granice wykrywalności aminoglikozydów w próbkach osocza określono na 9, 130, 81 i 180 nM odpowiednio dla paromomycyny, kanamycyny, neomycyny i gentamycyny [36].

Gholipour i in. [37] jako pierwsi zbadali możliwość zastosowania nanocząstek diamentowych, srebrowych, dwutlenku tytanu, tlenku barowo-strontowo-tytanowego ($(\text{BaTiO}_3)(\text{SrTiO}_3)$, BaSrTiO), oraz tlenku tytanowo-krzemowego (TiSiO_4) w analizie MALDI-MS węglowodanów zawartych w tkankach roślinnych. Autorzy wykorzystali dostępne handlowo nanocząstki srebra o rozmiarach mniejszych niż 20 nm do analizy sacharozy i fruktanów za pomocą laserowej desorpcji/jonizacji w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Wszystkie badane nanocząstki z wyjątkiem Ag umożliwiały desorpcję i jonizację węglowodanów w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Należy zaznaczyć, iż obserwacja dotycząca AgNPs jest nieoczekiwana oraz sprzeczna z innymi wynikami opisywanymi w tym przeglądzie i prawdopodobnie wynika ze zbyt dużego stężenia środków stabilizujących albo ze zbyt wysokiego pH zawiesiny AgNPs lub AgNPs-analit.

W 2012 Nie i in. [38] zaproponowali zastosowanie dostępnych handlowo 20 nm AgNPs w technice powierzchniowej wzmocnionej spektroskopii Ramana i LDI MS (ang. *surface-enhanced Raman spectroscopy and LDI MS*, SER/LDI MS), w celu wykrycia oraz pozyskiwania informacji z próbek stałych bez konieczności stosowania dodatkowych etapów przygotowania i oczyszczania próbki. W eksperymentach LDI, nanocząstki srebra zawieszono w układzie metanol-woda zawierającym cytryniany, a następnie mieszano przez noc z badanymi próbками (1 mM), po czym 1 μL powstałej mieszaniny nałożono na warstwę tlenku indowo-cynowego (ITO) osadzonego na podłożu szklanym.

Związki takie jak *p*-aminotiofenol, rodamina 6G i cholesterol wybrane do analizy przy użyciu techniki SER/LDI MS wykazują silne interakcje z AgNPs. Dla pierwszego związku zaobserwowane na widmie piki pochodząły od jonów zawierających w swym składzie *p*-aminotiofenol oraz 1-3 jony/atomy srebra, natomiast w przypadku rodaminy 6G i cholesterolu znaleziono piki będące prostymi adduktami z kationami H^+ oraz Ag^+ [38].

Grupa Preisler'a opracowała metodę identyfikacji steroli tj. brassikasterol (BR), cholesterol (CH), stigmasterol (ST), kampesterol (CA) oraz β -sitosterol (SI) występujących w próbkach oliwy z oliwek, oleju lnianego oraz słonecznikowego za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z zastosowaniem wspomaganej powierzchnią laserowej desorpcji/jonizacji (RPLC-SALDI MS). W opracowanej metodzie badane próbki poddano zmydlaniu w środowisku alkalicznym, po którym wykonano ekstrakcje frakcji niezmydlających się eterem dietylowym. Sterole rozdzielano na kolumnie z wypełnieniem typu C₁₈ w gradiencie metanolowo-wodnym. Próbkę do analizy SALDI przygotowano wykorzystując metodę automatycznego nakładania kropli badanej substancji na płytke, po czym w to samo miejsce nakroplona została zawiesina srebra. Zastosowanie nanocząstek srebra jako matrycy w technice SALDI pozwoliło na jonizację niepolarnych analitów zapewniając bardzo niskie granice wykrywalności 12 i 6 fmol odpowiednio dla cholesterolu oraz β -sitosterolu [39].

Nanostruktury tlenku srebra (I) otrzymane metodą strącania na mokro podobnie jak nanocząstki srebra zostały zastosowane przez Taira i in. jako środki kationizujące. Autorzy w swoich badaniach przeprowadzili analizę LDI MS tyminy oraz promotorów wzrostu włosów (*t*-flavanon oraz minoksydyl). Na otrzymanych przez nich widmach widoczne są addukty tych związków z kationami H⁺, Na⁺ oraz Ag⁺ [40].

3. NANOSTRUKTURY SREBRA W ANALIZIE MIKROBIOLOGICZNEJ

Metodę MALDI MS z użyciem nanostruktur srebra wykorzystano do scharakteryzowania gatunków bakterii patogennych. AgNPs mają wysoki stosunek powierzchni do objętości, dlatego też zostały zastosowane jako sondy powinowactwa (*affinity probes*) do wiązania całych komórek mikroorganizmów [41]. Generalnie, uważa się, że do przeprowadzenia analizy potrzebne są minimum ~ 10⁴ komórek bakteryjnych, dlatego też próbki zakaźnych płynów biologicznych oraz próbki płynów fizjologicznych pobranych od osób z zatrutkiem pokarmowym mogą być trudne do przeanalizowania bezpośrednio za pomocą MALDI MS ze względu na stosunkowo niską zawartość komórek w cieczy.

Poważnym problemem w analizie mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI/nanoPALDI/SALDI są szeroko opisywane w literaturze właściwości przeciwbakteryjne i przeciwigrybicze jonów oraz nanostruktur srebrowych. Aktywność przeciwbakteryjna wzrasta wraz ze wzrostem stężenia AgNPs i prowadzi do spadku intensywności sygnałów pochodzących od białek sygnałowych na widmie masowym. Problem ten zauważono nie tylko przy zastosowaniu srebra, ale także w przypadku innych nanocząstek, takich jak nanocząstki TiO₂ i ZnO. Dlatego też w analizach LDI MS kluczowym czynnikiem jest kontrola stężenia nanocząstek [41]. Niedawno ten ważny temat dotyczący analizy oraz identyfikacji drobnoustrojów metodami laserowymi MS z wykorzystaniem nanostruktur został opisany przez

Chiu [41]. Podobne badania przedstawiła grupa Bright'a, opisując zastosowanie techniki MALDI ToF MS w identyfikacji mikroorganizmów, takich jak wirusy, bakterie, zarodniki i komórki grzybów [42]. Równolegle Yao i in. [43] opisali zastosowanie MALDI MS do identyfikacji i scharakteryzowania peptydów, jak również białek w „nienaruszonych” mikroorganizmach. W celu zwiększenia czułości analizy mikroorganizmów tj. *Escherichia coli* i *Serratia marcescens* techniką MALDI MS Wu i in. [44] zastosowali niemodyfikowane nanocząstki srebra. Wyniki badań tych naukowców wskazują, że zsyntetyzowane nanocząstki srebra o rozmiarach 50–100 nm i odpowiednich stężeniach mogą być stosowane do wychwytywania i analizy bakterii w próbkach jogurtu.

Ci sami badacze wykonali badania, w których do bakterii w trakcie ich początkowej fazy wzrostu dodali AgNPs, w celu przystosowania mikroorganizmów do obecności ciał obcych. Ponadto opisali możliwość zastosowania techniki MALDI MS do oceny jakości oraz przydatności do spożycia mikroorganizmów zawartych w jogurcie [45].

Niemodyfikowanych AgNPs użyto także w analizie MALDI MS, celu zwiększenia czułości detekcji mikroorganizmów tj. *E. coli*, *S. marcescen*, *B. lactis*; *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* w próbkach żywności [44]. Badane były także wzajemne oddziaływanie bakterii z nanocząstками odpowiedzialnymi za możliwość wykrywania i identyfikacji substancji mikrobiologicznych za pomocą techniki MALDI MS.

4. AKTYWNE POWIERZCHNIE Z NANOSTRUKTURAMI SREBRA W LDI-MS

MALDI MS jest dosyć rzadko stosowany w analizie związków małocząsteczkowych ($MW < 800$ Da), ponieważ najczęściej stosowane matryce to małocząsteczkowe kwasy organiczne przyczyniające się do powstania większej ilości sygnałów w niskim zakresie mas [40, 45, 46]. Problem ten może zostać częściowo rozwiązany poprzez zastosowanie techniki SALDI (laserowa desorpcaja/jonizacja wspomagana powierzchnią), którą pierwotnie opracował Sunner i in. [16]. W technice SALDI proces desorpcji/jonizacji odbywa się z wykorzystaniem aktywnych powierzchni bez konieczności stosowania „tradycyjnej” organicznej matrycy. Powierzchnie SALDI często zawierają organiczne, nieorganiczne lub metaliczne mikro- lub nanostruktury. SALDI należy traktować jako ogólne określenie metod z zastosowaniem nanocząstek np. AgNPET, AuNPET, NALDI (laserowa desorpcaja/jonizacja wspomagana nanostrukturami) [49], nano-PALDI (laserowa desorpcaja/jonizacja wspomagana nanocząstkami) lub inne metody [50], w których nanostruktury związane są do powierzchni płytka przed nałożeniem badanej próbki. Należy zaznaczyć, że pomimo, iż NALDI jest ogólną nazwą metod opartych o zastosowanie powierzchni złożonych z nanostruktur to w literaturze nazwa ta głównie odnosi się do metody

opracowanej przez firmę Bruker Daltonics wykorzystującej powierzchnie zawierające nanodruty krzemowe.

Metody LDI zaliczają się do metod miękkiej jonizacji gdzie fragmentacja analitu jest stosunkowo niewielka w porównaniu do innych metod jonizacji, dzięki czemu znacznie ułatwiają analizy delikatnych związków chemicznych czy makrocząsteczek [51]. Metody SALDI z wykorzystaniem AgNPs mają ogromny potencjał, ponieważ AgNPs wyjątkowo skutecznie pochłaniają ultrafioletowe promieniowanie lasera, energia ta jest następnie przekazywana w procesie desorpcji/jonizacji m.in. do cząsteczek analitu [52–54].

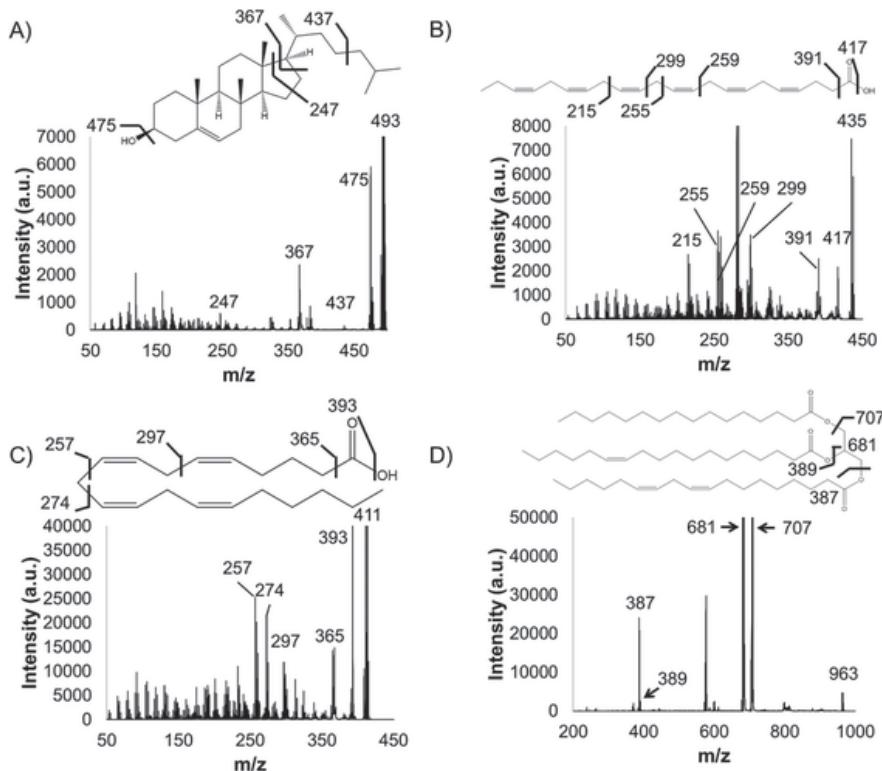
W literaturze można znaleźć liczne doniesienia naukowe dowodzące, iż srebro jest bardzo dobrym czynnikiem kationizującym, często stosowanym w spektrometrii mas do analizy różnych olefin tj. cholesterol, kwasy tłuszczone, ale także do analizy średnio- oraz mało polarnych polimerów. Zostało również udowodnione, że AgNPs mają zdolność do skutecznego wiązania na swojej powierzchni różnych związków chemicznych. Promuję tym samym ich kationizację. Limity detekcji dla związków wykrywanych z ich użyciem są rzędu fmol [23].

W 1999 roku grupy Buriak'a i Siuzdak'a opracowały metodę laserowej desorpcji/jonizacji na porowatym krzemie (DIOS) (ang. *desorption/ionization on porous silicon*, DIOS) pozwalającą na analizę cząsteczek o małych masach cząsteczkowych [55]. W metodzie tej stosuje się stałe podłożo, najczęściej porowaty krzem lub zmodyfikowaną krzemionkę, spełniające funkcję matrycy. Porowaty krzem, uzyskano poprzez trawienie płytka krzemowych, np. metodą galwanostatyczną. Materiał ten charakteryzuje się dobrze rozwiniętą powierzchnią, co umożliwia nie tylko skuteczne osadzanie na niej analitu, ale i intensywną absorpcję promieniowania laserowego. Wadą metody DIOS jest często ograniczony zakres mas badanych związków. Podejście to zostało rozwinięte przez możliwość wykorzystania różnych nanostruktur krzemu oraz kilku rodzajów nanocząstek (Ag, Au, P, HgTe, ZnS, nanokrystaliczne TiO₂, MnO₂, Mn₂O₃) [56]. Jednakże główną wadą materiałów porowatych jest utrata aktywności po odparowaniu wody, proces ten może nastąpić już w ciągu kilku dni.

Kilka lat temu grupa Xiao zaproponowała ulepszoną metodę DIOS (desorpcja jonizacja na porowatym krzemie) do LDI MS, w której porowatą powierzchnię krzemu zmodyfikowano poprzez osadzenie AgNPs. Autorzy do testów zmodyfikowanej metody wykorzystali tetra-pirydylo porfirynę (TPyP), oligomery glikolu polietylenowego (PEG 400 i 2300) oraz peptyd oksytocynę. Wartości limitu wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) dla PEG-400, PEG-2300, oksytocyny oraz TPyP są bardzo niskie i wynoszą odpowiednio 3,0 pmol, 30 pmol, 400 fmol, 5 fmol. Należy jednak zaznaczyć, że porfiryny były proponowane wcześniej jako potencjalne matryce, dlatego też nie są najlepszym przykładem związków testowych [57].

Dufresne i in. zbadali możliwość napylenia metalicznego srebra na skrawki tkanek w celu umożliwienia analizy MS oraz wysokorozdzielczego obrazowania spektrometrią mas olefin metodą laserowej desorpcji/jonizacji [58]. Na Rysunku 3

przedstawiono widma MS/MS wykonane dla skrawka nerki, na którym osadzona została bardzo cienka warstwa srebra grubości 16 ± 2 nm. Zaproponowano także ścieżki fragmentacji adduktu srebra z kwasem arachidowym, kwasem dokozahexaenowym, cholesterololem oraz triacyloglicerydem typu 52:3. Zaproponowana metoda jest interesującym podejściem pozwalającym za uzyskanie dużej ilości informacji z fragmentu badanej tkanki [58].



Rysunek 3. Widma MS/MS cholesterolu (A), kwasu dokozahexaenoowego (B) kwasu arachidowego (C) oraz triacyloglicerydu 52:3 (D) uzyskane dla skrawka nerki, na którym osadzona została bardzo cienka warstwa srebra oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji badanych molekuł. Przedrukowano za zezwoleniem M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, Anal. Chem., 2013, **85**, 3318. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 3. MS/MS spectra of cholesterol (A), docosahexaenoic acid (B), arachidonic acid (C), and triacylglyceride 52:3 (D) acquired from a kidney tissue section after silver sputtering with fragmentation pathways proposed for each molecule. Reprinted with permission from M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, Anal. Chem., 2013, **85**, 3318. Copyright 2013 American Chemical Society

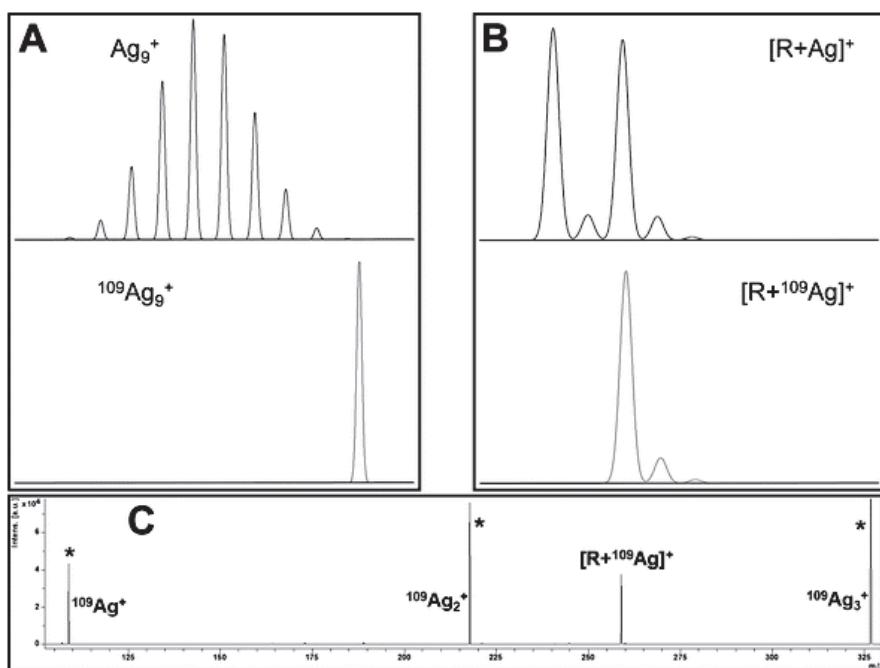
Niedawno grupa Volmera zaprezentowała doskonałą pracę na temat elektrochemicznej metody osadzania ok. 100 nm grubości warstwy nanostruktur palladu i srebra oraz ich zastosowania w metodzie SALDI MS do analizy małych cząsteczek biologicznych. Autorzy do testów nowej metody wykorzystali kwasły tłuszczone, triglicerydy, węglowodany i antybiotyki. Co ciekawe, autorzy stwierdzili, że addukty

potasowe były widoczne jedynie gdy grubość warstwy była niższa niż 100 nm, podczas gdy addukty Pd i Ag są generowane gdy grubość warstwy jest równa lub większa niż 120 nm [48]. Pomimo, iż metoda ta pozwala na analizę związków cechujących się małym ciężarem cząsteczkowym to jednak jej główną wadą jest brak na widmach pików przypisanych do nanostruktur srebra, które mogłyby posłużyć do precyzyjnej kalibracji wewnętrznej.

Niedawno naukowcom udało się otrzymać metodą zol-żel porowate nanocząstki srebra [59]. Cienki film porowatych AgNPs wytworzono na powierzchni szkła przez powlekanie wirowe z roztworu kompleksu zawierającego ortokrzemian tetraetylu, kwas azotowy, 2-etoksyetanol oraz azotan srebra. Świeże pokryte płytki poddano obróbce cieplnej w atmosferze powietrza w temperaturze 700°C w ciągu 7 godzin. Otrzymane cienkie folie były następnie bezpośrednio nanoszone na powierzchnię stali nierdzewnej płytki MALDI i wykorzystane do analizy. Na widmach MS widoczne są piki pochodzące od adduktów angiotensyny II, a także różnych triglicerydów i fosfatydylocholiny ze srebrem [59].

Metoda syntezy nanocząstek srebra bezpośrednio na powierzchni płytki stowej zaprezentowała niedawno nasza grupa. W wyniku przeprowadzonych prac udało się otrzymać bardzo cienkie warstwy kationowych nanocząstek srebra wielkości około 100 nm zarówno na zmodyfikowanych jak również komercyjnie dostępnych płytach MALDI. Syntezę nanocząstek srebra elektrostatycznie związanych z płytą stalową przeprowadzono poprzez redukcję trifluorooctanu srebra z DHB w tetrahydrofuranie w temperaturze pokojowej bezpośrednio nad powierzchnią płytki. Przygotowanie próbki do analizy wymagało jedynie naniesienia 0,5–1 µl roztworu analitu na płytę oraz wysuszenia na powietrzu. Za pomocą tej metody analizowano różne grupy związków różniące się m.in. polarnością tj. aminokwasy, sacharydy, nukleozydy, glikozydy, kwasy sulfonowe, aldehydy i zasady nukleinowe. Zastosowanie kationowych nanocząstek srebra pozwoliło na wykrycie D-rybozy na poziomie attomolowym, jak również analizę próbek biologicznych, takich jak mocz czy osocze krwi [47, 51]. Ponadto, nasza grupa jako pierwsza zaprezentowała możliwość zastosowania w technice LDI MS monoizotopowych ^{109}Ag NPs pozwalających na uzyskanie wyższej czułości, dokładności i rozdzielczości, m.in. ze względu na uproszczony rozkład izotopowy.

Metoda ^{109}Ag NPET pozwala osiągnąć około 2-krotnie wyższe poziomy intensywności adduktów z $^{109}\text{Ag}^+$ (Rys. 4B), a nawet 10- do 100-krotnie wyższe w przypadku złożonych adduktów z $^{109}\text{Ag}_5^+ - ^{109}\text{Ag}_2^+$ (Rys. 4A). Na widmie D-rybozy wykonanym metodą ^{109}Ag NPET (Rys. 4C) występuje pojedynczy pik przypisany do addaktu [rybozy + ^{109}Ag]⁺ o m/z 256,96.



Rysunek 4. Obliczone rozkłady izotopowe dla jonów $^{109}\text{Ag}_9^+$ (A, dół), Ag_9^+ (A, góra) oraz adduktów [ryboza+ ^{109}Ag] $^+$ (B, dół) i [ryboza+Ag] $^+$ (B, góra). Widmo LDI MS wykonane dla D-rybozy (R) na płytce ^{109}Ag NPET w trybie dodatnim z reflektronem. Przedrukowano za zezwoleniem J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, Anal. Chem., 2013, **85**, 1926. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 4. Calculated isotopic distributions of a $^{109}\text{Ag}_9^+$ (A, bottom), Ag_9^+ (A, top), $[\text{ribose} + ^{109}\text{Ag}]^+$ (B, bottom) and $[\text{ribose} + \text{Ag}]^+$ (B, top) ions along with ^{109}Ag NPET mass spectrum (C) of D-ribose (R) in positive reflection mode. Reprinted with permission from J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, Anal. Chem., 2013, **85**, 1926. Copyright 2013 American Chemical Society

Hong i współpracownicy zaproponowali metodę redukcji srebra na powierzchni ciała stałego. Nowe nanostruktury otrzymane poprzez redukcję jonów srebra za pomocą powierzchniowo związań polidopaminy były testowane w celu określenia wydajności jonizacji małych peptydów [61].

5. AgNPs W OBRAZOWANIU LDI-MS

Obrazowanie spektrometrią mas (ang. *MS imaging*, MSI) to technika wykorzystywana do wizualizacji rozkładu powierzchniowego biomolekuł bez konieczności wykonywania ekstrakcji, oczyszczania, rozdzielania oraz znakowania próbek biologicznych. O ile najczęściej stosowane obrazowanie MS to analiza powierzchni (2D MS) to należy pamiętać, że wyniki mają charakter 4-wymiarowy ponieważ każdy analizowany punkt posiada dwie współrzędne powierzchniowe, a także 2-wymiarowe (m/z oraz intensywność). Poza szeregiem problemów z zastosowaniem MALDI

do analizy małych cząsteczek, pozostaje problem ograniczenia rozdzielczości przestrzennej w MALDI-MSI. Aby przezwyciężyć ten problem, naukowcy wykorzystali nanostruktury srebrowe jako zamienniki organicznych matryc [58, 62].

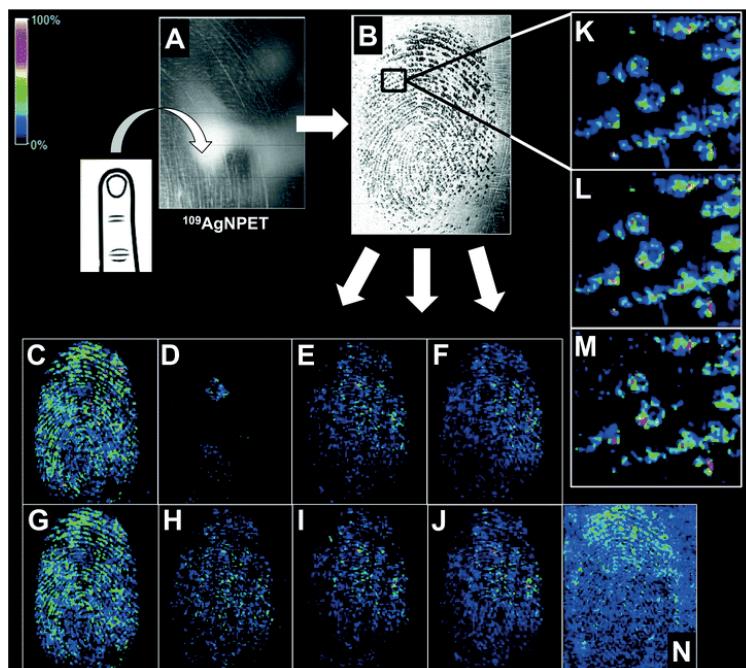
Dufresne i współpracownicy zaprezentowali metodę obrazowania MS, w której metaliczne srebro zostało napycone na powierzchnię skrawków tkanek myszy i szczura. Autorzy uzyskali obrazy jonowe m.in. dla adduktu cholesterolu z kationem srebra w warstwie zwojowej oraz ziarnistej kory mózdzika myszy [58]. Grupa Lee zastosowała obrazowanie LDI-MS, w celu określenia lokalizacji poszczególnych astrocytów oraz zbadania rozkładu cholesterolu na poziomie pojedynczej komórki. W celu zapewnienia jednorodnego pokrycia komórek nonocząstkami srebra zastosowano procedurę polegającą na ośmiokrotnym rozpyleniu zawesiny AgNPs za pomocą nebulizera. Co ciekawe autorzy dostrzegli, że niemal wyłącznym widocznym na widmie MS składnikiem komórkowym był cholesterol [64].

Jackson i współpracownicy zastosowali matryce AgNP, aby uzyskać lokalizację kilku klas lipidów występujących w tkance serca poprzez bezpośrednią iniekcję AgNPs do skrawka tkanki oraz następnie analizę tkanek metodą LDI MSI w trybie jonów dodatnich. Autorzy w celu wykonania badań pokryli metodą napylania magnetronowego nanocząstkami srebra wielkości 0,5–15 nm cały wieńcowy przekrój mózgu szczura [65]. Godne uwagi jest to, że zastosowanie AgNPs pozwoliło na uzyskanie wysokiej wydajności jonizacji triacyloglicerydów (TAG) cechujących się niską polarnością, co bywa problematyczne np. w analizie metodami opartymi o ESI. Na widmach masowych wykonanych w regionie naczyń krwionośnych serca wyraźnie widoczne są piki przypisane do TAG, natomiast widma z regionu mięśnia sercowego zawierają głównie piki przypisane do fosfatydylocholin (PC) i fosfatydyloetanolaminy (PE) [65].

Niedawno grupa Ewing'a przedstawiła ciekawą możliwość wykorzystania nanocząstek srebra oraz złota w technice LDI oraz spektrometrii mas jonów wtórnych (SIMS). Autorzy wykorzystali nanocząstki srebra i złota w analizie LDI próbki lipidu zawierającego 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholinę (ang. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, POPC), w celu identyfikacji fragmentów lipidów zawierających POPC. Ponadto, autorzy zaobserwowali dwukrotne wzmacnienie sygnałów dla pików przy m/z 184 i 86 przypisanych do fragmentów POPC, jak również do adduktu POPC z protonem (m/z 760) [66].

Metodę nano-PALDI-MSI z wykorzystaniem AgNPs zastosowano, w celu wizualizacji rozkładu przestrzennego kwasów tłuszczywych w skrawkach wątroby oraz siatkówki myszy. Nanocząstki srebra o rozmiarach $3,84 \pm 0,45$ nm otrzymano w reakcji prekursora – $n\text{-C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOAg}$ z stearylaminą [15, 62]. Istotnym jest fakt, iż zidentyfikowanych metodą nano-PALDI-MSI z wykorzystaniem AgNPs kwasów tłuszczywych, nie można było wykryć przy użyciu metody MALDI z użyciem matrycy DHB. Wyniki otrzymane metodą nano-PALDI-MSI wskazują, że limit detekcji dla kwasu palmitynowego jest mniejszy niż 50 pmol [62]. Nanocząstki srebra zastosowano także do stworzenia map rozkładu powierzchniowego różnych klas kwasów tłuszczywych w przekroju siatkówki myszy [62].

Grupa Lee przedstawiła szereg ciekawych usprawnień systemu obrazowania LDI MS z pułapką jonową. Wspomnianej grupie udało się zmodyfikować typowy układ optyczny poprzez zmianę światłowodu o średnicy 25 mikrometrów na ok. 12 μm , w wyniku czego uzyskali rozdzielcość przestrzenną umożliwiającą obrazowanie MS pojedynczych komórek w kwiatach *Arabidopsis thaliana* [67]. Związków występujących w kwiatach i korzeniach rośliny jonizowano przy pomocy koloidalnego srebra rozpylonego na materiale biologicznym z wykorzystaniem nebulizera własnej konstrukcji. Przy zastosowaniu wspomnianych ulepszeń autorzy skoncentrowali się na związkach o długich łańcuchach, takich jak alkany, alkohole, kwasy tłuszczyowe i ketony zawierające 27–31 atomów węgla [67].



Rysunek 5. Analiza MSI odcisku palca (rozmiar piksela 150 μm) na płytkę $^{109}\text{AgNPET}$. A, B – zdjęcia mikroskopowe powierzchni $^{109}\text{AgNPET}$ bez (A) oraz z odciskiem palca (B). C–J – reprezentacje graficzne (normalizacja TIC) związków występujących w odcisku palca o m/z : 131,895 (C), 315,036 (D), 312,301 (E), 240,259 (F), 147,864 (G), 396,150 (H), 284,286 (I), 311,303 (J) i 168,982 (N). Obrazy K (m/z 96,922), L (m/z 80,948) i M (m/z 83,022) przedstawiają reprezentacje graficzne innego doświadczenia wykonanego z rozdzielcością przestrzenną 50 \times 50 μm . Przedrukowano za zezwoleniem J. Nizioł, T. Ruman, Anal. Chem., 2013, **85**, 12070. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 5. Latent fingerprint MSI analysis (150 μm pixel size) on $^{109}\text{AgNPET}$. A, B – Optical microscopy images of a $^{109}\text{AgNPET}$ surface without (A) and with a fingerprint (B). C–J – Graphical representations (TIC normalization) of fingerprint compounds at m/z : 131.895 (C), 315.036 (D), 312.301 (E), 240.259 (F), 147.864 (G), 396.150 (H), 284.286 (I), 311.303 (J) and 168.982 (N). The K (m/z 96.922), L (m/z 80.948) and M (m/z 83.022) representations are from another experiment of 50 \times 50 μm spatial resolution. Reprinted with permission from J. Nizioł, T. Ruman, Anal. Chem., 2013, **85**, 12070. Copyright 2013 American Chemical Society

Metodę pokrywania standardowej płytki MALDI kationowymi nanocząstkkami ^{109}Ag ($^{109}\text{AgNPs}$) zastosowano w obrazowaniu MS organicznych i nieorganicznych związków chemicznych pochodzenia endo- i egzogennego obecnych w odcisku palca, który uzyskano przez bezpośrednie dotknięcie palcem do płytki-targetu oraz takiego transferowanego przy użyciu winylowej taśmy klejącej [51]. Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ może być również użyta do obrazowania MS śladów obcej substancji umieszczonej na palcu (Rys. 5) [68]. Odciski palca były także badane przez grupę Lauzon'a proponującą metodę obrazowania odcisków palca z użyciem napyłonego srebra [69].

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy zostały zaprezentowane przykłady zastosowania nanostruktur srebrowych w rodzinie metod LDI MS. Metody te zostały z powodzeniem zastosowane do analizy budowy związków chemicznych zarówno jonowych jak i niejonowych, o dużym i małym ciężarze cząsteczkowym. Przedstawione w tym przeglądzie metody umożliwiają analizę złożonych mieszanin biologicznych, takich jak osocze krwi czy moczu, nawet w ilościach śladowych. Omówiono również wiele zastosowań nanostruktur srebra w obrazowaniu LDI-MS. Wizualizacja lokalizacji związków w różnych typach tkanek roślinnych i zwierzęcych, a także możliwość analizy kryminalistycznej odcisków palców za pomocą obrazowania LDI-MS z wykorzystaniem AgNPs ma ogromny potencjał dla przyszłego rozwoju laserowej spektrometrii mas.

Publikacja została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer UMO-2015/19/N/ST4/00379.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1987, **78**, 53.
- [2] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1193.
- [3] F. Hillenkamp, M. Karas, *Methods Enzymol.*, 1990, **193**, 280.
- [4] J. Albrethsen, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 852.
- [5] R. Knochenmuss, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, **10**, 871.
- [6] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- [7] P.C. Lin, P.H. Chou, S.H. Chen, K.L. Liao, K.Y. Wang, Y.J. Chen, C.C. Lin, *Small*, 2006, **4**, 485.
- [8] B. Domon, R. Aebersold, *Science*, 2006, **312**, 212.
- [9] S. Berkenkamp, F. Kirpekar, F. Hillenkamp, *Science*, 1998, **281**, 260.
- [10] K.C. Ho, P.J. Tsai, Y.S. Lin, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 7162.
- [11] K. Shrivastava, H.F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 3103.
- [12] K. Shrivastava, H.F. Wu, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1637.
- [13] R. Pilolli, F. Palmisano, N. Cioffi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 601.
- [14] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 151.

- [15] N. Cioffi, L. Colaianni, R. Pilolli, C.D. Calvano, F. Palmisano, P.G. Zambonin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1375.
- [16] J. Sunner, E. Dratz, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4335.
- [17] M.J. Dale, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3321.
- [18] M. Schurenberg, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 221.
- [19] Y.E. Silina, M. Koch, D.A. Volmer, *J. Mass Spectrom.*, 2014, **49**, 468.
- [20] I.D.G. Macdonald, W.E. Smith, *Langmuir*, 1999, **12**, 706.
- [21] L. Hua, J. Chen, L. Ge, S.N. Tan, *J. Nanopart. Res.*, 2007, **9**, 1133.
- [22] S.D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796.
- [22] K. Shrivs, H.E. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 2863.
- [23] F. Frederix, J. Friedt, K. Choi, W. Laureyn, A. Campitelli, D. Mondelaers, G. Maes, G. Borghs, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6894.
- [24] C.L. Su, W.L. Tseng, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1626.
- [25] C.H. Teng, K.C. Ho, Y.S. Lin, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 4337.
- [26] P.R. Sudhir, H.F. Wu, Z.C. Zhou, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7380.
- [27] K. Shrivs, H.F. Wu, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2583.
- [28] P.T. Sudhir, K. Shrivs, Z.C. Zhou, H.F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 3076.
- [29] S.K. Kailasa, H.F. Wu, *Talanta*, 2010, **83**, 527.
- [30] L. Shastri, H.N. Abdelhamid, M. Nawaz, H.-F. Wu, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 41595.
- [31] M. Inuta, R. Arakawa, H. Kawasaki, *Anal. Methods*, 2013, **19**, 5031.
- [32] M. Yang, T. Fujino, *Chem. Phys. Lett.*, 2013, **576**, 61.
- [33] T.C. Chiu, L.C. Chang, C.K. Chiang, H.T. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2008, **19**, 1343.
- [34] P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391.
- [35] M.T. Wang, M.H. Liu, C.R.C. Wang, S.Y. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1925.
- [36] Y. Gholipour, S.L. Giudicessi, H. Nonami, R. Erra-Balsells, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5518.
- [37] B. Nie, R.N. Masyukoa, P.W. Bohn, *Analyst*, 2012, **137**, 1421.
- [38] B. Vrbková, V. Roblová, E.S. Yeung, J. Preisler, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1358**, 102.
- [39] S. Taira, H. Taguchi, R. Fukuda, K. Uematsu, Y. Ichiyanagi, Y. Tanaka, Y. Fujii, H. Katano, *Mass Spectrom.*, 2014, **3**, S0025.
- [40] T.C. Chiu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 7266.
- [41] J.J. Bright, M.A. Claydon, M. Soufian, D.B. Gordon, *J. Microbiol. Methods*, 2002, **48**, 127.
- [42] Z.P. Yao, P.A. Demirev, C. Fenselau, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2529.
- [43] C.H. Lee, J. Gopal, H.F. Wu, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **31**, 77.
- [44] J. Gopal, H.-F. Wu, C.H. Lee, *Analyst*, 2011, **136**, 5077.
- [45] J. Gopal, M. Manikandan, N. Hasan, C.-H. Lee, H.-F. Wu, *J. Mass Spectrom.*, 2013, **48**, 119.
- [46] J. Nizioł, Z. Zieliński, W. Rode, T. Ruman, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2013, **335**, 22.
- [47] Y.E. Silina, F. Meier, V.A. Nebolsin, M. Koch, D.A. Volmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, **25**, 841.
- [48] M.F. Wyatt, S. Ding, B.K. Stein, A.G. Brenton, R.H. Daniels, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1256.
- [49] K.P. Law, J.R. Larkin, *Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2597.
- [50] J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1926.
- [51] C. Lei, K. Qian, O. Noonan, A. Nouwens, C. Yu, *Nanoscale*, 2013, **5**, 12033.
- [52] C.-C. Hu, M.-F. Huang, H.-T. Chang, *Bioanalysis*, 2013, **5**, 633.
- [53] J.A. Stolee, B.N. Walker, V. Zorba, R.E. Russo, A. Vertes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8453.
- [54] J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, 1999, **399**, 243.
- [55] O.A. Boryak, M.V. Kosevich, V.V. Chagovets, V.G. Zobnina, V.V. Orlov, V.S. Shelkovsky, S.G. Stepanian, *J. Anal. Chem.*, 2012, **67**, 994.

- [56] H. Yan, N. Xu, W.-Y. Huang, H.-M. Han, S.-J. Xiao, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **281**, 1.
- [57] M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3318.
- [58] R.C. Gamez, E.T. Castellana, D.H. Russell, *Langmuir*, 2013, **29**, 6502.
- [59] J. Nizioł, T. Ruman, *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, 2013, **2**, 46.
- [60] S. Hong, J.S. Lee, J. Ryu, S.H. Lee, D.Y. Lee, D.-P. Kim, C.B. Park, H. Lee, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 494020.
- [61] T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivastava, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1446.
- [62] J.C. Jurchen, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 1654.
- [63] D.C. Perdian, S. Cha, J. Oh, D.S. Sakaguchi, E.S. Yeung, Y.J. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 1147.
- [64] S.N. Jackson, K. Baldwin, L. Muller, V.M. Womack, J.A. Schultz, C. Balaban, A.S. Woods, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 1377.
- [65] A.S. Mohammadi, J.S. Fletcher, P. Malmberg, A.G. Ewing, *Surf. Interface Anal.*, 2014, **46**, 379.
- [66] J.H. Jun, Z. Song, Z. Liu, B.J. Nikolau, E.S. Yeung, Y.J. Lee, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3255.
- [67] J. Nizioł, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 12070.
- [68] N. Lauzon, M. Dufresne, V. Chauhan, P. Chaurand, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2015, **26**, 878.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca 2016

FOTOREAKTWNE POLIAKRYLANOWE KLEJE SAMOPRZYLEPNE

PHOTOREACTIVE ACRYLICS PRESSURE-SENSITIVE ADHESIVES

Jagoda Kowalska, Zbigniew Czech

*Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
e-mail: jagoda.kowalska@zut.edu.pl*

Abstract

Wstęp

1. Metody otrzymywania samoprzylepnych klejów poliakrylanowych
2. Sieciowanie klejów samoprzylepnych
3. Kleje samoprzylepne sieciowane promieniowaniem UV
4. Mechanizm sieciowania promieniowaniem ultrafioletowym
5. Źródła promieniowania ultrafioletowego

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Jagoda Kowalska w roku 2012 ukończyła studia na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jest doktorantką w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej ZUT w Szczecinie. Specjalność-technologia polimerów.

Prof. zw. dr hab. inż. Zbigniew Czech w roku 1975 ukończył studia na Politechnice Szczecińskiej. Jest kierownikiem Laboratorium Klejów i Materiałów Samoprzylepnych Instytutu Technologii Chemicznej Organicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Od 1983 do 2003 r pracował w firmach Lohmann (Niemcy), UCB (Belgia) oraz Chemitec (Niemcy). Specjalność – technologia klejów i wyrobów samoprzylepnych.

ABSTRACT

Pressure-sensitive adhesives (PSAs) are non-metallic materials used to bond other materials, mainly on their surfaces through adhesion and cohesion. Adhesion and cohesion are phenomena, which may be described thermodynamically and chemically, but actually they cannot be measured precisely. It was shown that the most important bonding processes are bonding by adhesion and bonding with pressure-sensitive adhesives. The difference between pressure-sensitive adhesives and other adhesives, such as contact adhesives, is in the permanent surface stickiness of the pressure-sensitive adhesives before, or after, the application.

The fastest developing polymers departments are: initiating UV photopolymerization and photocrosslinking. Ultraviolet radiation (UV) part of the electromagnetic radiation having a wavelength of 100 to 400 nm, the practical use has an area of 200 to 400 nm. UV radiation does not cause visual impressions results in a strongly fluorescence, photoelectric, photochemical reactions and has a high biological activity. It is particularly important industrial use of UV crosslinking which is used in the manufacture of a wide range of self-adhesives, such as assembly lines, labels, decorative films, protective films, patches and biomedical electrode.

Especially important critical point during UV-curing is the balance between adhesion and cohesion of the crosslinked pressure-sensitive adhesive layer. An important element is finding the appropriate beneficial relationship between tack, adhesion and cohesion of the crosslinked pressure-sensitive adhesives that offer assurance to their respective industrial applications. Ultraviolet radiation crosslinking is carried out at room temperature and does not require high temperatures, an important disadvantage pressure-sensitive adhesives crosslinked by heat. Compared to systems crosslinked thermally, the use of UV crosslinking process provides greater speed and effective a crosslinking process, and also does not damage the materials with low thermal resistance.

Keywords: pressure-sensitive adhesives, photoreactive, crosslinking

Słowa kluczowe: kleje samoprzylepne, fotoreaktywne, sieciowanie

WSTĘP

Kleje samoprzylepne poprzez swoje lepko-sprężyste właściwości mogą być użyte do połączeń, w których istotną rolę spełnia samoprzylepność, zarówno w trakcie aplikacji jak i w gotowym połączeniu. Z drugiej strony, samoprzylepność może umożliwiać kontrolowaną odkrywalność, świadczącą o tymczasowym charakterze złącza. Ze względu na samoprzylepność połączenia adhezyjnego, ilość kleju jest limitowana, co wpływa na pracę złącza klejowego połączenia adhezyjnego w laminatach lub kompozytach. Powoduje to występowanie różnicy pomiędzy mierzonymi właściwościami kleju przed zastosowaniem do łączenia oraz kleju w zastosowanym laminacie.

Istotne właściwości charakteryzujące naturę kleju samoprzylepnego to kleistość, adhezja przy odrywaniu oraz jego wytrzymałość wewnętrzna (kohezja). Pierwsza właściwość opisuje samoprzylepność kleju, druga odporność kleju na odrywanie od różnych materiałów, a trzecia dotyczy utrzymania właściwej pozycji obciążonej warstwy samoprzylepnej.

Kleje samoprzylepne, szczególnie na bazie poliakrylanów, są w coraz większym stopniu stosowane do produkcji różnorodnych wyrobów zastępujących dotychczasowe tradycyjne techniki łączenia, takie jak spawanie czy nitowanie. Kleje samoprzylepne są stosowane do produkcji:

- jednostronnych i dwustronnych taśm klejących;
- samoprzylepnych etykiet;
- samoprzylepnych folii dekoracyjnych na bazie PVC;
- szyldów;
- folii ochronnych;
- samoprzylepnych kartek wielokrotnego użytku (post-it);
- taśm ochronnych;
- taśm izolacyjnych i elektroizolacyjnych;
- plastrów oraz innych samoprzylepnych materiałów opatrunkowych;
- rozpuszczalnych w wodzie taśm samoprzylepnych;
- taśm operacyjnych (OP-tapes);
- elektrod biomedycznych;
- innych materiałów samoprzylepnych.

Coraz częściej obserwuje się zastosowanie fotoreaktywnych klejów, otrzymywanych na drodze fotopolimeryzacji oraz fotosieciowania promieniowaniem ultrafioletowym, do produkcji nowatorskich wyrobów samoprzylepnych.

1. METODY OTRZYMYWANIA SAMOPRZYLEPNYCH KLEJÓW POLIAKRYLANOWYCH

Poliakrylanowe kleje samoprzylepne opatentowano po raz pierwszy w 1932 r. w USA. Najczęściej syntezę wysokowartościowych poliakrylanowych klejów samoprzylepnych prowadzi się na drodze polimeryzacji rodnikowej w rozpuszczalniku organicznym w obecności termicznego inicjatora rodnikowego w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. W technologicznych procesach polimeryzacyjnych jako rozpuszczalniki organiczne stosuje się przeważnie octan etylu, *n*-heksan, *n*-heptan, aceton, frakcje benzyny o temperaturze wrzenia od 60 do 95°C, metyloetyloketon czy teżtoluen. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika następuje przy uwzględnieniu następujących czynników:

- cena;
- możliwość odzyskania kleju po procesie powlekania;
- brak wpływu rozpuszczalnika na przebieg reakcji polimeryzacji;
- odpowiednia temperatura wrzenia (50–120°C);
- duża zdolność do rozpuszczania powstałego polimeru;

Brak występowania problemów przy produkcji gotowych wyrobów (tworzenia się pęcherzy przy odparowaniu rozpuszczalnika w trakcie procesu powlekania kleju na nośniku).

Inną metodą syntezy jest polimeryzacja emulsyjna. Do otrzymywania klejów samoprzylepnych w postaci dyspersji wodnych stosuje się monomery rozpuszczalne w wodzie, których homopolimery lub kopolimery charakteryzują się dobrą dyspergowalnością w wodzie. Monomery, które nie są rozpuszczalne w wodzie, mogą być w niewielkich ilościach dodane do mieszaniny reakcyjnej pod warunkiem, że mają zdolności do tworzenia w wodzie emulsji.

Próby polimeryzacji akrylanów w masie, prowadzone bez udziału rozpuszczalnika, powodowały nawet przy zastosowaniu najwcześniejszych reaktorów, niebezpieczeństwo przegrzania mieszaniny reakcyjnej, niekontrolowany przebieg reakcji łańcuchowej i w efekcie eksplozji. Pierwszym skutkiem braku możliwości odprowadzenia energii wyzwolonej w wyniku polimeryzacji jest zmiana zabarwienia polimeru, a bardzo często zżelbowanie całego układu w reaktorze (efekt Trommsdorfa). Proces polimeryzacji rodnikowej polimerów akrylanowych w masie można prowadzić w wytłaczarce lub bezpośrednio na nośniku, co komplikuje proces technologiczny i zwiększa koszty wytwarzania końcowych wyrobów samoprzylepnych.

2. SIECIOWANIE KLEJÓW SAMOPRZYLEPNYCH

Najszybciej rozwijającymi się działami polimerów są: fotopolimeryzacja inicjowana promieniowaniem UV oraz fotosieciowanie. Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest częścią promieniowania elektromagnetycznego o długości fali od 100 do 400 nm, przy czym praktyczne zastosowanie ma obszar od 200 do 400 nm. Pro-

mieniowanie UV może powodować porażenia wzroku, zjawisko fotoelektryczne, reakcje fotochemiczne oraz odznacza się dużą aktywnością biologiczną. Szczególnie istotne jest przemysłowe zastosowanie promieniowania UV do sieciowania klejów, stosowanych do wyrobu szerokiej gamy produktów samoprzylepnych, takich jak taśmy montażowe, etykiety, folie dekoracyjne, folie ochronne, plastry oraz elektrody biomedyczne.

W technologii klejów samoprzylepnych powszechnie stosowane są następujące związki i metody sieciowania:

- sole metali z kwasami organicznymi, np. tytaniany, cyrkoniany,
- chelaty metali, np.: acetyloacetonian żelaza, acetyloacetonian glinu,
- żywice aminowe,
- wielofunkcyjne monomery, np. akrylan 1,4-butanodiolu, eter allilowiny-lowy,
- wielofunkcyjne izocyjaniany, np. diizocyjanian toluenu, diizocyjanian heksametylenu,
- wielofunkcyjne propylenoiminy, pochodne 2-metyloazyrydyny,
- promieniowanie UV,
- strumień elektronów.

Sieciowanie klejów poliakrylanowych jest konieczne w celu uzyskania odpowiednich właściwości termicznych i mechanicznych warstwy klejącej. Kleje nie poddane sieciowaniu nie są w stanie spełnić żadnych podstawowych wymagań odbiorców przemysłowych. Sieciowanie uniemożliwia przesuwanie się makrocząsteczek względem siebie pod wpływem występujących obciążen mechanicznych czy też termicznych. Usieciowane kleje nie topią się, mogą jedynie mięknąć. Decydującymi parametrami usieciowania kleju samoprzylepnego są stopień usieciowania i gęstość usieciowania.

Sieciowanie klejów poliakrylanowych powinno być przeprowadzone w ten sposób, aby charakteryzowały się one wysokim stopniem usieciowania, ale za to mała gęstość usieciowania. Niska gęstość usieciowania oznacza duże odstępy pomiędzy punktami wiążącymi ze sobą poszczególne makrocząsteczki, natomiast stopień usieciowania określa, jaka część makrocząsteczek jest włączona w sieć przestrzenną usieciowanego kleju. Duży stopień usieciowania decyduje o znikomej tendencji kleju do topienia i rozpuszczania. Ze wzrastającą gęstością usieciowania kleju rośnie kohezja, ale równocześnie wzrasta też jego skurcz. Zbyt wysoka gęstość usieciowania kleju powoduje obniżenie elastyczność, adhezji oraz kleistości.

3. KLEJE SAMOPRZYLEPNE SIECIOWANE PROMIENIOWANIEM UV

Koncept technologiczny fotoreaktywnych klejów samoprzylepnych, szczególnie poliakrylanowych klejów samoprzylepnych, bazujących na zdolnych do reakcji kopolimeryzacji fotoinicjatorów znalazł odzwierciedlenie w ponad 200 patentach opisujących badania technologiczne oraz zastosowanie tych fotoinicjatorów w tech-

nologii fotoreaktywnych klejów samoprzylepnych i polimerów. Zdolne do reakcji kopolimeryzacji nienasycone fotoinicjatory muszą być rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych oraz monomerach akrylanowych, wykazywać dużą reaktywność z innymi monomerami oraz nie tworzyć w procesie sieciowania promieniowaniem UV produktów ubocznych.

Podstawową zasadą sieciowania klejów za pomocą promieniowania ultrafioletowego jest konwersja promieniowania UV w energię chemiczną. Sieciowanie polimerów za pomocą promieniowania ultrafioletowego może zachodzić według mechanizmu rodnikowego lub kationowego. W przypadku gdy proces sieciowania zachodzi według mechanizmu rodnikowego, polimeryzację wiązań nienasyconych obecnych w łańcuchu polimeru wywołują cząsteczki zwane wolnymi rodnikami, które powstają na skutek rozpadu ich prekursorów, tj. najczęściej ketonów aromatycznych.

Warunkiem koniecznym do zapoczątkowania reakcji sieciowania według mechanizmu rodnikowego jest więc obecność odpowiednich fotoinicjatorów. Sieciowanie rodnikowe jest najbardziej rozpowszechnionym sposobem sieciowania UV. Sieciowanie polimerów według mechanizmu kationowego polega na otwarciu pierścieni epoksydowych lub reakcjach grup winyloeterowych obecnych w łańcuchu polimeru.

Typowe kleje przeznaczone do sieciowania za pomocą UV zawierają następujące składniki:

- fotoreaktywny polimer,
- fotoinicjatory,
- fotoreaktywne prepolymer, fotoreaktywne oligomery lub rozcieńczalniki reaktywne, które mają zdolność nie tylko regulacji lepkości kompozycji, ale także ze względu na obecność w ich cząsteczkach wiązań nienasyconych przyczyniają się w procesie sieciowania do powstania dodatkowych sieci (wiązań wewnętrzcząsteczkowych w polimerze). Jako fotoreaktywne rozcieńczalniki stosowane się różnorodne monomery wielofunkcyjne, jak np. wielofunkcyjne akrylany, uretanoakrylany oraz poliestroakrylany.

Kluczowe znaczenie w procesie sieciowania promieniowaniem ultrafioletowym odgrywa fotoinicjator. Od rodzaju i stężenia fotoinicjatora zależą szybkość polimeryzacji i stopień usieciowania kompozycji polimerowej, a w konsekwencji także podstawowe właściwości usieciowanych klejów.

Fotoinicjator może być więc wbudowany w strukturę polimeru w trakcie reakcji polimeryzacji, wprowadzony osobno do struktury polimeru w wyniku reakcji z odpowiednimi grupami funkcyjnymi obecnymi w polimerze lub też może być dodany bezpośrednio do kompozycji polimerowej. Zdolne do reakcji polimeryzacji fotoinicjatory są najczęściej ciałami stałymi. Dobry fotoinicjator powinien charakteryzować się znakomitą rozpuszczalnością w monomerach wyjściowych, wysoką reaktywnością podczas procesu polimeryzacji oraz nie powinien powodować powstawania produktów ubocznych podczas sieciowania promieniowaniem

UV. Typowe konwencjonalne fotoinicjatory tworzą niestety w trakcie rozkładu fotolitycznego produkty uboczne o charakterystycznym, nieprzyjemnym zapachu. Najważniejszą jednak cechą fotoinicjatorów jest efektywność inicjowania reakcji, co oznacza, że dobry fotoinicjator powinien wykazywać wysoką absorpcję w zakresie emisji promieniowania UV, w celu rozszczepienia na aktywne rodniki o najwyższej wydajności kwantowej, a powstałe stany wzbudzone powinny wykazywać krótki czas istnienia, aby nie nastąpiło wygaszenie przez atomy tlenu lub cząsteczki monomerów. W zależności od mechanizmu rozpadu fotoinicjatora, pod wpływem promieniowania UV, można je zaszerować w następujące grupy:

- fotoinicjatory konwencjonalne pierwszego rodzaju, α -fotodysocjujące, w których rodniki tworzą się w wyniku rozpadu wzbudzonej cząsteczki w stanie tripletowym, ale nie dochodzi do rozpadu pierwotnie powstałych rodników (np. benzoyna, dimetoksyacetofenon, acylooksymoester lub benzoiloktale),
- fotoinicjatory konwencjonalne pierwszego rodzaju, β -fotodysocjujące, w których pierwotnie tworzące się rodniki, w wyniku rozpadu wzbudzonej cząsteczki, w stanie tripletowym mogą ulegać dalszemu rozpadowi fotolitycznemu (np. halogenoketon),
- fotoinicjatory drugiego rodzaju, które ulegają rozpadowi na wolne rodniki w wyniku międzymiąsteczkowego przeniesienia atomu wodoru z koinicjatora (np. aminy) na wzbudzoną cząsteczkę inicjatora w stanie tripletowym, a rodnikiem inicjującym jest rodnik powstały z koinicjatora (np. benzofenon, dibenzoil, tioksantan, antrachinon lub keton Michlera).

Do nowej klasy efektywnych nienasyconych fotoinicjatorów, zdolnych do reakcji polimeryzacji należą:

- fotoinicjatory zawierające grupy akrylanowe,
- fotoreaktywne pochodne akryloamidu,
- fotoinicjatory z grupami winylooksylarbonylowymi,
- fotoinicjatory zawierające grupy winylowe.

Szczególnie ważnym, a jednocześnie krytycznym punktem sieciowania UV klejów samoprzylepnych jest balans pomiędzy adhezją a kohezją usieciowanych warstw samoprzylepnego kleju. Istotnym elementem jest znalezienie odpowiednich korzystnych relacji pomiędzy kleistością, adhezją oraz kohezją usieciowanych klejów samoprzylepnych dających gwarancję odpowiedniego ich zastosowania w aplikacjach przemysłowych. Sieciowanie promieniowaniem ultrafioletowym odbywa się w temperaturze pokojowej i nie wymaga wyższych temperatur, co jest istotnym mankamentem klejów samoprzylepnych sieciowanych termicznie. W porównaniu do układów sieciowanych termicznie, zastosowanie promieniowania UV w procesie sieciowania gwarantuje większą szybkość procesu sieciowania, a ponadto nie niszczy materiałów o stosunkowo niskiej wytrzymałości termicznej.

4. MECHANIZM SIECIOWANIA PROMIENIOWANIEM ULTRAFAIOLETOWYM

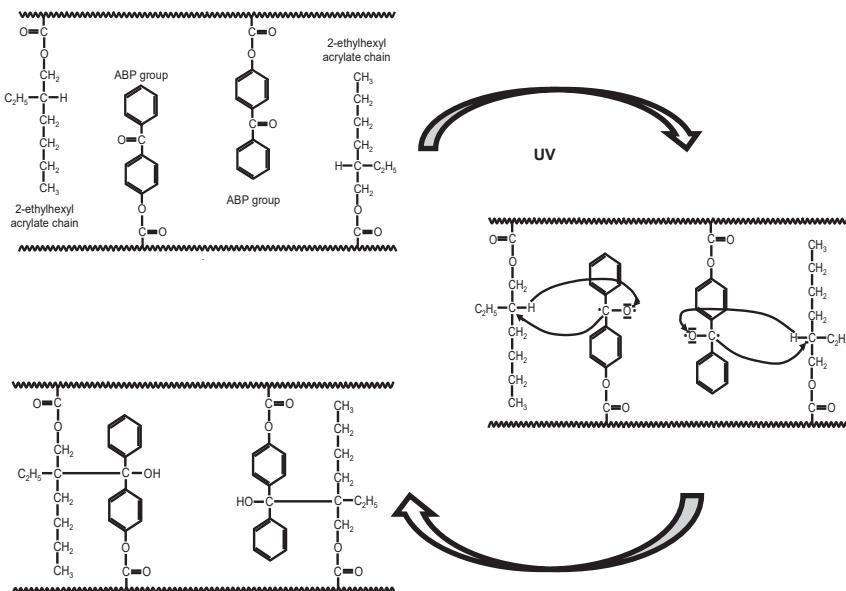
Sieciowanie fotoreaktywnych klejów samoprzylepnych odbywa się za pomocą specjalnych lamp UV o różnej mocy. Może się ono odbywać w atmosferze powietrza, gdyż obecność tlenu nie wpływa w istotny sposób na przebieg reakcji sieciowania.

Zakres promieniowania ultrafioletowego leży pomiędzy 100–400 nm, dzieląc się na następujące obszary:

- UV A: 315–400 nm,
- UV B: 280–315 nm,
- UV C: 100–280 nm.

Spektrum absorpcyjne fotoinicjatora oraz spectrum emisyjne źródła UV powinny być możliwie do siebie dokładnie dopasowane. Istotnym elementem jest także ilość energii emitowanej przez źródło UV oraz odległość naświetlanej warstwy kleju samoprzylepnego od lampy UV. Pochłanianie przez sieciowaną warstwę kleju emitowanej ilości energii promieniowania UV jest odwrotnie proporcjonalne do kwadratu odległości lampy od naświetlanej powierzchni.

W czasie naświetlania warstwy kleju następuje pobudzenie związku fotoinicjatora, który po zaadsorbowaniu promieniowania UV reaguje z sąsiednimi trzeciorzędowymi atomami węgla bocznych łańcuchów polimerów. Mechanizm opisanego wyżej sieciowania przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Sieciowanie promieniowaniem UV akrylanowych klejów samoprzylepnych (PSA) zawierających 4-acryloyloooksybenzofenon (ABP)

Figure 1. UV crosslinking of acrylic PSAs containing 4-acryloyloxy-benzophenone (ABP)

5. ŹRÓDŁA PROMIENIOWANIA ULTRAFIOLETOWEGO

W przemyśle opierającym się na procesach fotochemicznych stosuje się obecnie różne źródła promieniowania ultrafioletowego. Generalnie jednak można je podzielić ze względu na charakter emitowanego promieniowania ultrafioletowego na źródła promieniowania spektralnego, które emittują różne długości fali zarówno z interesującego zakresu UV jak i widzialnego czy nawet podczerwieni oraz na źródła promieniowania monochromatycznego, o ściśle określonej fali.

Podstawowym źródłem promieniowania UV są lampy oraz lasery ultrafioletowe. Wśród lamp wyróżniamy spektralne lampy UV oraz monochromatyczne lampy UV (lampy eksymerowe). Monochromatyczne eksymerowe lampy UV (brak promieniowania IR) nie powodują obciążenia termicznego naświetlanej warstwy kleju samoprzylepnego. Emitowane przez tego typu lampy promieniowanie UV o długości fali 308 nm jest przydatne do sieciowania klejów samoprzylepnych tylko w ograniczonym zakresie. Związane jest to ze słabą przepuszczalnością fal UV o długości większej niż 300 nm przez kleje poliakrylanowe. Sposób pracy lampy może być stały lub pulsacyjny.

Tymczasem w zależności od potrzeb użytkownika jako źródła światła spektralnego stosowane są między innymi rtęciowe lampy nisko-, średni- i wysokociśnieniowe, lampy ksenonowe, diody UV-LED, lampy domieszkowe (ang. *doped lamp*) a także lampy bezelektrodowe zasilane promieniowaniem mikrofalowym (ang. *electrodesless discharge microwave lamp-EDL*) przeznaczone do reaktorów mikrofalowych. Jako typowe lampy UV stosuje się lampy rtęciowe nisko-, średnio- lub wysoko-kortęciowe, o mocy między 80 a 150 W/cm. Należy dodać, że obecny stan techniki umożliwia stosowanie lamp UV o mocy dochodzącej nawet 350 W/cm. Zakres promieniowania ultrafioletowego stosowany do sieciowania klejów fotoreaktywnych leży najczęściej w obszarze UV-A, który obejmuje zakres od 315 do 400 nm, przy czym wszystkie spektralne lampy UV emitują dodatkowo nieprzydatne promieniowanie podczerwone (IR).

PODSUMOWANIE

Promieniowanie ultrafioletowe znajduje coraz szersze zastosowanie w przemyśle. Promieniowanie UV, stosowane w fotochemicznych reakcjach sieciowania klejów samoprzylepnych, pozwala na otrzymanie szerokiej gamy wyrobów samoprzylepnych, takich jak taśmy montażowe, etykiety, folie dekoracyjne, folie ochronne, plastry oraz elektrody biomedyczne. Kleje samoprzylepne sieciowane promieniowaniem UV, zarówno w postaci klejów rozpuszczalnikowych, dyspersji wodnych jak i klejów bezrozpuszczalnikowych charakteryzują się doskonałymi właściwościami samoprzylepnymi oraz doskonałą wytrzymałością wewnętrzną.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] A.K. Antosik, Z. Czech, Wiad. Chem., 2015, **69**, 111.
- [2] A.K. Antosik, Z. Czech, Wiad. Chem., 2015, **70**, 25.
- [3] Z. Czech, *Vernetzung von Haftklebstoffen auf Polyacrylatbasis*, Technische Universität Szczecin, Szczecin 1999.
- [4] I. Benedek, *Developments in Pressure-Sensitive Products*, Taylor & Francis, New York 2006.
- [5] Z. Czech, A. Butwin, J. of Adhesion Scie. and Techn., 2009, **23**, 1689.
- [6] Z. Czech, A. Kowalczyk, J. Kabatc, J. Świderska, Europ. Polym. J., 2012, **48**, 1446.
- [7] Z. Czech, A. Butwin, J. Kabatc, J. Świderska, Polym. Bulletin, 2012, **69**, 71.
- [8] Z. Czech, A. Butwin, J. Kabatc, J. Appl. Polym. Sci., 2011, **120**, 3621.
- [9] Z. Czech, R. Milker, A. Butwin, E. Herko, Pol. J. of Chem. Technology, 2008, **3**, 37.
- [10] Z.W. Wicks, F.N. Jones, S.P. Pappas, D.A. Wicks, *Organic Coatings*, Wiley, New Jersey 2007.
- [11] Z. Czech, A. Butwin, Wiad. Chem., 2009, **63**, 3.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 czerwca 2016

INFORMACJE

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

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

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

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

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

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

Polskie Towarzystwo Chemiczne
Sekcja Chemii Organicznej

Zakład Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny
Politechniki Wrocławskiej

Zapraszają do udziału w VIII seminariu p.t.:

„Postępy w syntezie związków nieracemicznych”

które odbędzie się w dniach 19-22 października 2016
w Lądku Zdroju

<http://org.wch.pwr.edu.pl/konf>

Zapraszamy do deklarowania udziału oraz wystąpień w formie:
wykładów (30 min) lub komunikatów (15 min).

Informacje o terminach i opłatach dostępne na stronie internetowej:
<http://org.wch.pwr.edu.pl/konf>

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 Chilmontczyk – 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 roztworach, 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.
- 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” (któroś wniosł 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 marginem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).**
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczoneymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:
Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Tytuł rozdziału
1.1. Tytuł podrozdziału itp.
Uwagi końcowe
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane

• Kolejne strony pracy powinny zawierać:

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji)),

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

Wspomnienie o Profesorze Józefie Hurwicu (1911-2016)	429
Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Piotr ROGUSZCZAK, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Rutyna – budowa, właściwości	435
Katarzyna KULIK, Janina BARANIAK: Adenozyno-5'-O-(N-acylosulfamiloilowe) pochodne jako potencjalne leki przeciwgruźlicze	455
Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Monika KuźMA, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Egzopolisacharydy bakteryjne – budowa i funkcje	473
Barbara DMOCHOWSKA, Karol SIKORA, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Janusz MADAJ: Cukrowe czwartorzędowe sole amoniowe	497
Justyna SEKUŁA, Joanna Nizioł, Tomasz RUMAN: Zastosowanie nanocząstek srebra w laserowej spektrometrii mas oraz w obrazowaniu MS	519
Jagoda KOWALSKA, Zbigniew CZECH: Fotoreaktwne poliakrylanowe kleje samoprzylepne	543
Informacje	553

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

Monika KADELA-TOMANEK, Elwira CHROBAK, Ewa BĘBENEK, Agnieszka LUBCZYŃSKA, Szymon SIUDAK, Anna WÓJCIK, Agnieszka OTULAKOWSKA: Aktywność biologiczna związków acetylenowych pochodzenia naturalnego