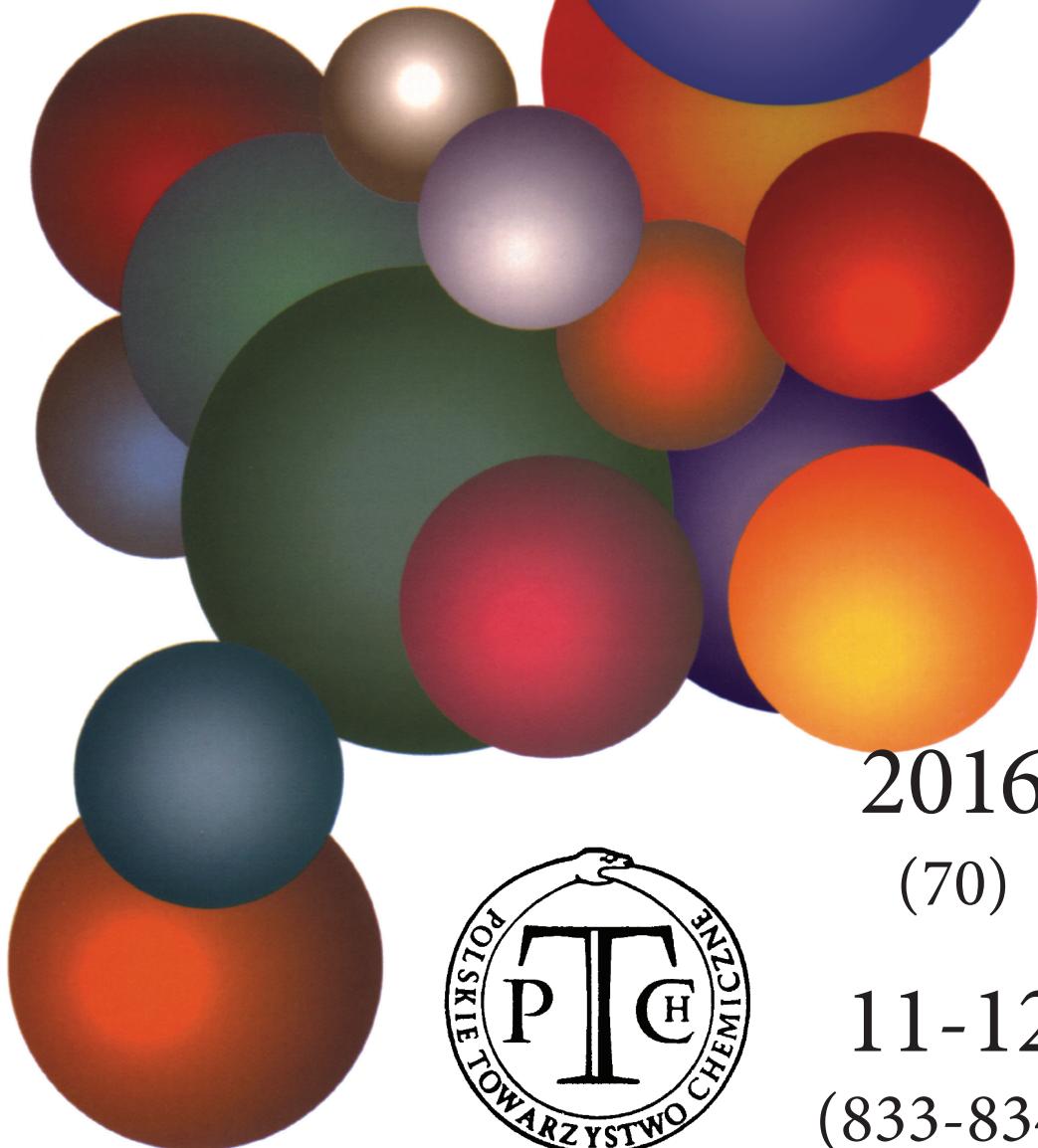


WIADOMOŚCI *chemiczne*



2016

(70)

11-12

(833-834)

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
BOGUSŁAW BUSZEWSKI (PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GORECKI, MIĘTEK JARONIEC,
ANATOL KOŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, JERZY LESZCZYNSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI,
PIOTR PANETH, JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ W. SOKALSKI,
ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

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

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA 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 styczniu 2017

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, e-mail: k2@druk-k2.pl

NOWI CZŁONKOWIE RADY REDAKCYJNEJ

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

prof. Tadeusz Górecki

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

prof. Mietek Jaroniec

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

prof. Jerzy Leszczynski,

Interdisciplinary Center for Nanotoxicity, Department of Chemistry and Biochemistry, Jackson State University, Jackson, USA

prof. Krzysztof Matyjaszewski

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

prof. dr hab. Janusz Pawliszyn,

Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Kanada

prof. Sławomir Rubinstajn

General Electric Global Research, Kiskuyua, NY 12309, USA

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

*prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny*

POLIHISTYDYLowe SEKWENCJE Z MOTYWEM HIS-TAG – ICH ROLA I BIOLOGICZNE ZNACZENIE ODDZIAŁYWANIA Z JONAMI METALI

POLYHISTIDINE SEQUENCES WITH HIS-TAG MOTIF
– THEIR ROLE AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF
INTERACTION WITH METAL IONS

Joanna Wątły*, Henryk Kozłowski

Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

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

** e-mail: joanna.watly@chem.uni.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Powtórzenia aminokwasowe w sekwencjach białkowych
 2. Histydyna
 3. Chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (IMAC)
 4. Naturalne białka bogate w reszty histydylowe
 - 4.1 Hpn i Hpn-like
 - 4.2 AdcR
 - 4.3 AtHMA i AtMTP
 - 4.4. Czynniki transkrypcyjne
 - 4.5. pHpG
 5. Termodynamiczne i strukturalne aspekty wiązania jonów metali przez sekwencje białkowe z motywem His-tag
- Uwagi końcowe
- Piśmiennictwo cytowane
-

Mgr Joanna Wątły uzyskała stopień magistra chemii na Uniwersytecie Wrocławskim w 2012 roku. Jej praca magisterska skupiała się na oddziaływaniu jonów metali z fragmentem białka opiekuńczego HypA z *H. pylori*. Obecnie kończy swoją pracę doktorską pod nadzorem prof. H. Kozłowskiego na tym samym uniwersytecie, badając zachowanie domen z motywami polihistydylowych tagów wiążących jony metali. Jej naukowe zainteresowania obejmują głównie równowagi tworzenia kompleksów pomiędzy jonami metali i ważnymi biologicznie ligandami, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zrozumieniu roli ‘nietypowych’ sekwencji białkowych w związku z metalami, zrozumieniu homeostazy jonów metali u bakterii i grzybów, a także roli metali w biologicznym i farmakologicznym działaniu hemopresyny.

Prof. dr hab. Henryk Kozłowski jest związany z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wywodzi się ze szkoły chemii koordynacyjnej prof. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej i jest twórcą polskiej chemii bionieorganicznej. Na Uniwersytecie Wrocławskim uzyskał tytuł zawodowy magistra (1968) oraz stopnie naukowe doktora (1973), doktora habilitowanego (1979) oraz profesora (1989). Lata 1974–75 to czas stażu podoktorskiego w Tokio. W 1979 roku stworzył na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego zespół odnoszący międzynarodowe sukcesy (do 1992 zespół nosił nazwę Bionieorganicznej Chemii Strukturalnej, obecnie jest to Zespół Chemii Bionieorganicznej i Biomedycznej). Tematyka badań prof. Henryka Kozłowskiego obejmuje zagadnienia z pogranicza chemii, biologii i medycyny, koncentrując się m.in. wokół takich zagadnień jak: termodynamika, struktura i właściwości biologiczne układów zawierających jony metali; struktura i funkcje biomolekuł (aminokwasów, peptydów i ich analogów fosfonowych, oksymowych i hydroksamowych; kwasów nukleinowych i ich podjednostek, kwasów peptydonukleinowych oraz nukleozydów modyfikowanych; cukrów i polisacharydów) i ich oddziaływanie z jonami metali; wpływ jonów metali na chemię i biochemię leków (m.in. tetracyklin, antracyklin, famotydyny) i pestycydów; elektrochemia układów bionieorganicznych; chemia bionieorganiczna metali toksycznych (m.in. Ni, Cd, Pb, Cr, Al) oraz molekularne mechanizmy toksyczności metali (m.in. karcynogenezy wywołanej związkami metali); homeostaza jonów metali w białkach bakteryjnych, a także oddziaływanie jonów metali z białkami zawierającymi sekwencje polihistydylowe o motywie His-tag. Profesor Henryk Kozłowski jest również światowym autorytem w dziedzinie chemii bionieorganicznej procesów neurodegeneracyjnych. Zajmuje się badaniem oddziaływań jonów metali (m.in. Cu, Zn) z fragmentami białek istotnych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.

ABSTRACT

His-tags are specific sequences containing six to nine subsequent histidyl residues and they are used commercially in immobilized metal affinity chromatography (IMAC) as molecular ‘anchors’ that bind to a metal ion (usually nickel), immobilized by chelation with nitrilotriacetic acid (NTA) bound to a solid support [37, 38]. Consecutive histidines are the common denominator for both His-tags used in molecular biology and for quite remote biological phenomena – more than 2000 histidine-rich proteins (HRPs) are found in microorganisms including 60% and 82% of archaeal and bacterial species, respectively and their roles are not well characterized [73]. The physicochemical properties of histidine make it a versatile amino acid that influences protein conformation and enzymatic activity [15]. Many natural proteins with a His-tag domain are assigned to different functions, for example: most bacterial proteins, containing this motif are probably involved in the homeostasis of nickel ions [68, 76], while others, e.g. newly isolated peptides from the venom of the snake genus *Atheris* contain poly-histidyl-poly-glycyl sequences (pHpG) can act on the cardiovascular system by inhibiting snake venom metalloproteinases and affect its function by acting on specific receptors [58, 62]. His-rich motifs have been found also e.g. in Zn^{2+} transporters, prion proteins, His-rich glycoproteins, transcription factors or numerous copper-binding proteins [56, 67, 84].

Binding mode and the thermodynamic properties of the system depends on the specific metal ion and the histidine sequence. Despite the wide application of the His-tag for purification of proteins, little is known about the properties of metal-binding to such tag domain. Recent experimental and theoretical studies have shown that metal ions, e.g. Cu^{2+} can bind to various sets of imidazoles depending on the number of histidine residues that are located in His-rich sequences. The occurrence of polymorphic binding states and the formation of an α -helical structure induced by metal ion coordination suggest that proteins with a His-tag domain may serve as the dynamic site able to ‘move’ metal ions along the tag sequence [99, 100]. This might explain the frequent occurrence of such sequences in bacterial Ni^{2+} chaperones, which transfer the metal ion between different proteins.

Keywords: histidine, His-tag motif, metal ions, proteins

Słowa kluczowe: histydyna, motyw His-tag, jony metali, białka

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADAM	– adamalizyny – białka spokrewnione z SVMPs (ang. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
ATCUN	– amino-terminalny motyw wiążący jony Cu ²⁺ i Ni ²⁺ (ang. <i>amino terminal Cu²⁺ and Ni²⁺ binding site</i>)
CD	– spektroskopia dichroizmu kołowego (ang. <i>circular dichroism spectroscopy</i>)
DFT	– teoria funkcjonalu gęstości – podstawa wielu metod kwantowo-mechanicznych, używanych do modelowania struktury (ang. <i>density functional theory</i>)
EPR	– spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. <i>electron paramagnetic resonance spectroscopy</i>)
His-tag	– sekwencja zawierająca ciąg sąsiadujących reszt histydylowych
Hpn	– polihistydylowe białko wiążące nikiel w <i>H. pylori</i> (ang. <i>H. pylori nickel-binding protein</i>)
HRPs	– białka bogate w reszty histydylowe (ang. <i>histidine rich proteins</i>)
IDA	– kwas iminodiocetyl (ang. <i>iminodiacetic acid</i>)
IMAC	– chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (ang. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
MD	– metoda symulacji komputerowej do badania oddziaływań atomów i cząsteczek (ang. <i>molecular dynamics</i>)
MJD	– ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3, choroba Machado-Josepha (ang. <i>Machado-Josepha disease</i>)
NTA	– kwas nitrylotriocetyl (ang. <i>nitrilotriacetic acid</i>)
pHpG	– sekwencja zawierająca polihistydylowy i poliglicylnowy motyw
SBMA	– opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni, choroba Kennedy’ego (ang. <i>spinal and bulbar muscular atrophy</i>)
SPR	– technika powierzchniowego rezonansu plazmowego (ang. <i>surface plasmin resonace</i>)
SRRs	– sekwencje bogate w jeden rodzaj aminokwasu (ang. <i>single residue rich sequences</i>)
SVMPs	– metaloproteinazy jadu węża (ang. <i>snake venom metalloproteinases</i>)
UV-Vis	– spektroskopia absorpcji elektronowej w zakresie widzialnym i nadfioletowym (ang. <i>ultraviolet-visible spectroscopy</i>)

Zastosowane skróty jedno- i trójliterowe dla nazw aminokwasów w sekwencjach wszystkich opisywanych peptydów oraz badanych ligandów przedstawiono zgodnie z zaleceniami IUB-IUPAC.

WPROWADZENIE

Polihistydylowe tagi (poli-His-tag) to peptydy zawierające wielokrotne powtórzenia reszt histydylowych, powszechnie stosowane w biologii molekularnej do oczyszczania rekombinowanych białek od ponad czterech dekad. Ich rozpowszechnienie oraz niezwykła skuteczność są przypisane właściwościom reszt histydylowych, które mają zdolność do efektywnego wiązania jonów metali. Takie motywy zostały również zidentyfikowane w kilkuset naturalnych białkach. Można je znaleźć m.in. w białkach transportujących jony metali, bakteryjnych białkach chaperonowych, białkach prionowych oraz jadach niektórych afrykańskich węży. Pomimo, iż oddziaływanie między histydyną i jonami metali przejściowych w układach biologicznych są badane od dziesięcioleci, wiedza na temat właściwości termodynamicznych i strukturalnych kompleksów metali przejściowych z peptydami zawierającymi motyw His-tag oraz rola polihistydylowych domen w naturalnych białkach jest wciąż znikoma.

1. POWTÓRZENIA AMINOKWASOWE W SEKWENCJACH BIAŁKOWYCH

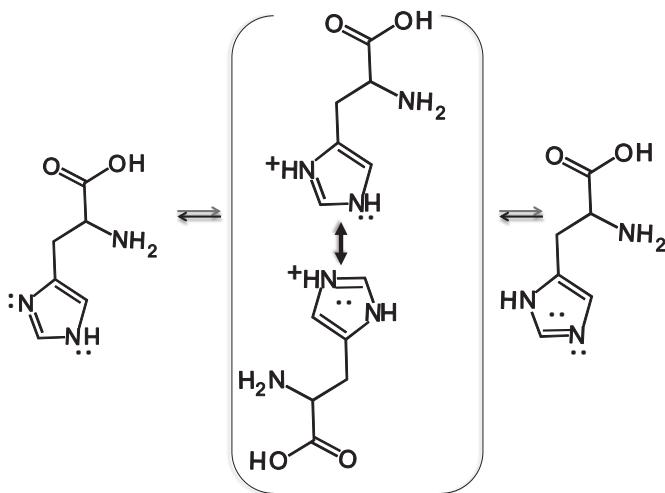
Aminokwasy są podstawową jednostką strukturalną budującą białko. Częstość występowania różnych aminokwasów wśród proteomów różnych organizmów żywych uważa się za podobną i waha się w granicy od 1 do 10% [1]. Jednakże, w niektórych przypadkach dany aminokwas może być wielokrotnie powielony w pewnym odcinku białka, w celu osiągnięcia unikalnych funkcji. Takie specyficzne fragmenty o małej różnorodności reszt aminokwasowych lub zawierające powtórzenia tylko jednego rodzaju aminokwasu zostały nazwane SRRs (ang. *single residue rich sequences*). Ich największa procentowa zawartość została zidentyfikowana w proteomach komórek eukariotycznych (około 5%) [2], zaś około 1,4% wszystkich naturalnych białek zawiera regiony z co najmniej sześciokrotnym powtórzeniem jednego aminokwasu [3, 4].

Do najczęściej występujących SRRs należą odcinki zawierające reszty, takie jak: Leu, Ala, Asp, Ser, Gly, Glu i Gln [5, 6]. Często są one istotne z funkcjonalnego i medycznego punktu widzenia. Na przykład białka zawierające długie powtórzenia glutamylowe (poly-Q) są związane z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak np. choroba Huntingtona, choroba Kennedy'ego (SBMA), czy ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typu 3 (choroba Machado-Josepha, MJD) [7–9]. Choroby te są wywoływane agregacją poliglutamylowych białek, co przyczynia się do neurotoksyczności i stopniowej śmierci neuronów [10–12]. Natomiast sekwencje zawierające powtórzenia reszt arginylowych, obecne w wirusowych białkach Tat i Rev, są związane z chorobami układu odpornościowego człowieka [13]. Inne reszty, takie jak cysteinowa czy histydylowa występują w sekwencjach białek ze względnie niską częstotliwością (< 2,5%) [5], mimo iż najczęściej pełnią kluczową rolę w miejscach aktywnych enzymów i/lub miejscach wiążących jony metali w białkach [14].

2. HISTYDYNIA

Spośród dwudziestu naturalnych aminokwasów histydyna (His, H) jest najbardziej wielofunkcyjnym aminokwasem, dzięki swojej unikalnej strukturze cząsteczkowej [15]. Histydyna w łańcuchu bocznym posiada imidazolową grupę funkcyjną, która zawiera dwa atomy azotu, z których oba mogą być protonowane przy wartościach $pK_a \sim 6$ oraz 14 dla wolnego aminokwasu. Wartości te mogą być zmieniane przez środowisko białka oraz koordynację jonów metali. Utrata pierwszego protonu skutkuje obojętnym donorem azotu imidazolowego, podczas gdy utrata drugiego protonu prowadzi do utworzenia anionu imidazolowego [16].

Histydyna, dzięki obecności dwóch atomów azotu w pierścieniu jest zaliczana do aminokwasów zasadowych. Jeden z wodorów w imidazolu jest labilny, dzięki czemu może być położony na jednym z atomów azotu, tworząc równoważne formy tautomeryczne. Dzięki możliwościom protonowania i deprotonowania atomów azotów w pierścieniu imidazolowym w sposób zależny od wartości pH, histydyna jest idealnym kandydatem do wiązania się z jonami metali w sposób odwracalny, w odpowiedzi na niewielkie zmiany pH środowiska (Rys. 1) [17].



Rysunek 1. Protonowanie i deprotonowanie bocznego łańcucha histydyny. Imidazolowy łańcuch boczny histydyny może być protonowany, gdy wartość pH ulega obniżeniu, podczas gdy wartość pH zwiększa się (do pH około 8) dochodzi do deprotonowania. Po związaniu z jonem metalu, pK_a reszty histydylowej może być obniżone ze względu na charakter jonów metali (kwasy Lewisa)

Figure 1. Protonation and deprotonation of the side chain of histidine. The imidazole side chain of histidine may be protonated when the pH is lowered, while the value of pH is increased (to about pH 8) comes to the deprotonation. After binding of a metal ion, pK_a of histidyl residue may be lowered due to the nature of the metal ions (Lewis acids)

Oddziaływanie histydyny z innymi aminokwasami oraz kationami metali w białkach zostały podzielone na kilka typów. Do najważniejszych z nich należą:

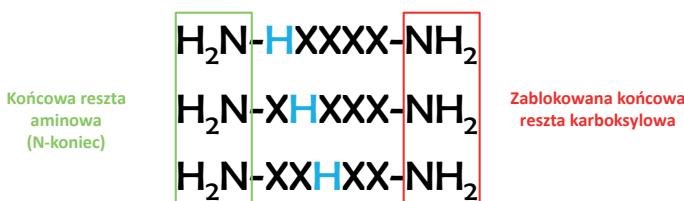
- (i) oddziaływanie kation- π (między resztami aromatycznymi a histydyną – jej

formą uprotonowaną w kwaśnym pH) [18]; (ii) oddziaływanie π - π (nazywane również ‘stakingiem’ – możliwe podczas oddziaływania z aromatycznymi łańcuchami bocznymi aminokwasów, takich jak: His, Phe, Tyr i Trp) [19]; (iii) oddziaływanie wodór- π (polarny atom wodoru w histydynie może tworzyć wiązanie wodorowe z innym aromatycznym aminokwasem w orientacji ‘T’) [20]; (iv) oddziaływanie prowadzące do powstania wiązania o charakterze koordynacyjnym (zasadowy atom azotu w pierścieniu imidazolowym, posiadający wolną parę elektronową jest idealnym ligandem dla jonów takich jak: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) [21].

Znaczenie oddziaływania histydyny z jonami metali przejściowych jest intensywnie badane od lat [22–29]. Obecność reszty histydylowej w dowolnej pozycji łańcucha peptydowego stanowi doskonały punkt kotwiczenia dla jonów Cu^{2+} , Zn^{2+} oraz Ni^{2+} . Sposób koordynacji jest silnie uzależniony od położenia i ilości reszt histydylowych w sekwencji białkowej oraz od obecności sąsiadujących reszt aminokwasowych, a także od struktury łańcucha peptydowego, co znacznie wpływa na stabilizację lub przeciwnie – destabilizację miejsca wiązania jonu metalu, dzięki bezpośredniemu lub pośredniemu oddziaływaniom [17]. Szczegółowa wiedza na temat chemii tych oddziaływań jest kluczem do zrozumienia ich biologicznych skutków.

Biologicznie istotne jony metali, takie jak miedź, nikiel, cynk, czy żelazo, zazwyczaj koordynują do jednego z imidazolowych atomów azotu N^1 -Im (tzw. atom ‘pyrrole-like’) lub N^3 -Im (tzw. atom ‘pyridine-like’) (jak np. w ureazie, karboksy-peptydzie, niebieskich białkach miedziowych, czy w białkach zawierających hem). Inną możliwością koordynacji jest funkcjonowanie imidazolu jako liganda mostkującego, w którym zarówno atomy N^1 (z grupy N^1H) oraz N^3 uczestniczą w wiązaniu jonów metali, jak np. w cynkowo-miedziowej dysmutazie ponadtlenkowej ($Cu-Zn SOD$) [30, 31].

Istotny wpływ na tworzenie kompleksów oraz ich właściwości termodynamiczne oraz strukturalne ma lokalizacja histydyny w łańcucha peptydowym. Szczegółowe badania zostały przeprowadzone dla układów, w których histydyna zajmuje pozycję 1, 2 lub 3 (Rys. 2).



Rysunek 2. Rozmieszczenie reszt His w sekwencji białkowej istotnie wpływa na właściwości wiążące jony metali. Najważniejsze właściwości His w pozycji 1, 2 lub 3 zostały opisane poniżej

Figure 2. Location of His residues in the protein sequence significantly affect the binding properties of the metal ions. The most important characteristics of His in position 1, 2 or 3 are described below

Usytuowanie histydyny jako *N*-terminalnego aminokwasu skutkuje tworzeniem kompleksów, w których jony niklu i miedzi są związane przez imidazolowy

azot His1 oraz azot z grupy aminowej His1. Taki sposób koordynacji nosi nazwę tzw. 'histamine-like'. Jest dobrze udokumentowane, że w przypadku gdy jon Cu^{2+} lub Ni^{2+} jest związany do reszty histydylowej, wraz ze wzrostem pH dochodzi do dysocjacji protonu i koordynacji kolejnych amidowych atomów azotu, zmieniając sposób koordynacji z $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}\}$ na $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{amid}}\}$, tworząc kompleks z sześcioczłonowym pierścieniem. W przypadku jonów cynku, sposób koordynacji 'histamine-like' występuje w całym zakresie pH, dodatkowo w wiązanie jonu metalu mogą być zaangażowane donory tlenowe (z grupy karbonylowej lub otaczających cząsteczek wody) [32, 33]. Peptydy, w których grupa aminowa histydyny w pozycji 1 jest zablokowana, wiążą jony Ni^{2+} oraz Cu^{2+} do imidazolowego azotu oraz do dwóch lub trzech azotów amidowych leżących po prawie stronie, prowadząc do utworzenia mniej stabilnego, siedmioczłonowego pierścienia chelatowego i jednego lub dwóch stabilnych pierścieni pięcioczłonowych [25].

W przypadku, gdy reszta His jest na drugiej pozycji w łańcuchu bocznym peptydu, jony niklu i miedzi tworzą wyjątkowo stabilne termodynamicznie kompleksy z pięcioczłonowymi $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{amid}}\}$ i sześcioczłonowymi $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}_{\text{amid}}\}$ pierścieniami chelatowymi, stabilizującymi strukturę kompleksu. W wiązanie jonu metalu zaangażowane są wówczas atomy azotu zarówno z pierścienia imidazolowego, wiązania peptydowego przy His2, jak i grupy aminowej z N-końca peptydu. Sfera koordynacyjna jonu metalu jest uzupełniona w pozycji ekwatorialnej atomem tlenu z cząsteczką wody lub np. grupy karbonylowej [33]. Natomiast gdy peptyd jest blokowany na N-końcu i posiada His w pozycji 2, zwykle dochodzi do utworzenia kompleksów z koordynacją $\{\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}_{\text{amid}}\}$ w zakresie pH 6–10, a czwarta pozycja w tym kompleksie o geometrii płaskiego kwadratu może być zajęta przez cząsteczkę wody lub inną grupę peptydową [22].

Białka z His w pozycji trzeciej są określane jako białka z motywem ATCUN (ang. *amino terminal Cu²⁺ and Ni²⁺ binding site*). Ze względu na to, iż takie motywy występują naturalnie w niektórych rodzajach albumin (np. albumina surowicy krwi ludzkiej, HSA – ang. *human serum albumin*, surowicza albumina wołowa, BSA – ang. *bovine serum albumin* oraz albumina królicza, RSA – ang. *rabbit serum albumin*), neuromedynach C i K, protaminie P2A ludzkiej spermy oraz histatynach, są nazywane również 'albumin-like' [35]. Sekwencje z motywem ATCUN posiadają wyjątkowe powinowactwo do jonów Cu^{2+} oraz Ni^{2+} , tworząc kompleksy z trzech połączonych ze sobą pierścieni chelatowych o sposobie koordynacji: $\{\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}_{\text{amid}}, \text{NH}_2\}$. Imidazolowy atom azotu jest głównym miejscem kotwiczenia jonu metalu, a wraz ze wzrostem pH, dochodzi do wiązania jonu metalu przez dwa amidowe atomy azotu oraz azot z grupy aminowej. Taki sposób koordynacji jest scharakteryzowany przez utworzenie trzech termodynamicznie stabilnych pierścieni chelatowych – jednego sześcioczłonowego pomiędzy jonom metalu, imidazolowym atomem azotu i azotem z grupy amidowej His3 oraz dwóch pięcioczłonowych pierścieni pomiędzy metalem, kolejnym amidowym atomem azotu oraz azotem z grupy aminowej [24]. Do deprotonowania dwóch grup amidowych i wiązania jonu metalu

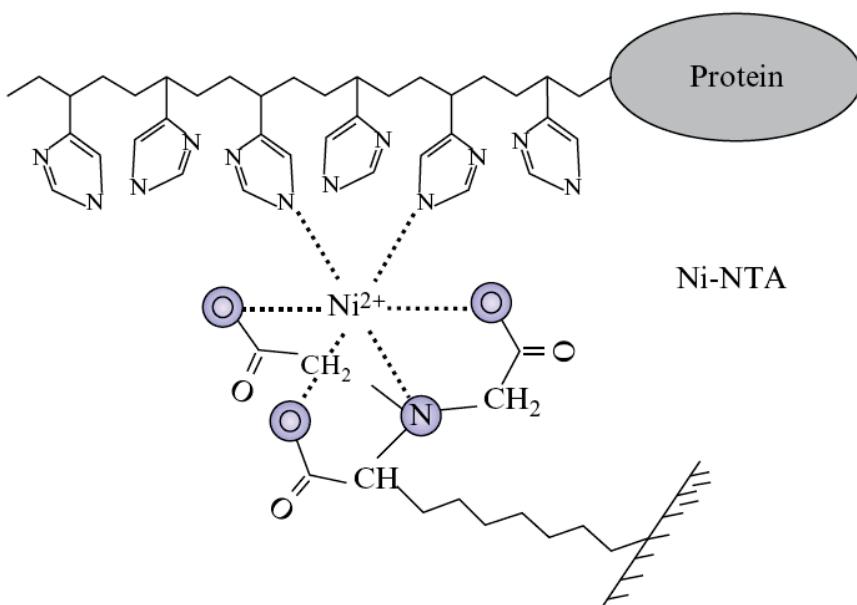
dochodzi w bardzo wąskim zakresie pH; w przypadku jonu Cu²⁺ proces ten zachodzi zazwyczaj przy wartości pH pomiędzy 4 i 5. Kompleks z czteroma atomami azotu skoordynowanymi do jonu metalu w sposób: {1N_{im}, 2N_{amid}, NH₂}, charakteryzuje się najwyższą stabilnością spośród wcześniej opisanych kompleksów z His w różnych położeniach. W przypadku peptydów N-terminalnie blokowanych z His w pozycji 3, jon metalu przy wyższych wartościach pH jest skoordynowany przez imidazolowy azot oraz trzy azoty amidowe [33].

Niezwykle wysoka skuteczność wiązania jonów metali przez histydynę wywołała lawinę pytań, na przykład: czy dostępność większej ilości reszt histydylowych w sekwencji aminokwasowej może prowadzić do utworzenia jeszcze bardziej stabilnych kompleksów?; czy kompleksy z jonami cynku(II), które nie są w stanie deprotonować azotów amidowych, ale mogą wiązać nawet kilka reszt histydylowych, będą najbardziej stabilne? Jaki jest wpływ ilości reszt histydylowych oraz ich rozmieszczenie w sekwencji na skuteczność wiązania jonów metali? Znalezienie odpowiedzi na te, i wiele innych pytań stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnego badacza.

3. CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA NA UNIERUCHOMIONYCH JONACH METALI (IMAC)

Reszta histydylowa, a właściwie peptyd z wielokrotnym powtórzeniem tego aminokwasu, jest nieodzownym elementem w inżynierii biomedycznej. Syntetyczne peptydy, bogate w reszty histydylowe, nazywane His-tagami, są powszechnie stosowane od ponad 40 lat do oczyszczania rekombinowanych białek w chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (IMAC) [36]. Takie peptydy posiadają specyficzną sekwencję od dwóch do dziesięciu sąsiadujących reszt histydylowych i są przyczepiane do C- lub N-końca rekombinowanego białka w procesie oczyszczania tą metodą. Polihistydylowa sekwencja His-tag jest łatwa do usunięcia po oczyszczeniu, a otrzymane białko uzyskuje bardzo wysoką czystość [37].

Ideologia techniki IMAC jest oparta na tworzeniu wiązań koordynacyjnych pomiędzy imidazolowymi azotami w resztach histydylowych His-tagu (przyczepionego do oczyszczanego białka) i jonami metali (zazwyczaj Ni²⁺, ale mogą to być również: Zn²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺). Wybrany jon metal jest częściowo skoordynowany za pomocą kwasu iminodioctowego (IDA) [38] lub kwasu nitrylotrioctowego (NTA) [39] (Rys. 3), przyczepionego do podłoża w kolumnie chromatograficznej. His-tagi nie są ustrukturyzowane, dzięki czemu posiadają dużą zdolność do łatwego tworzenia kompleksów chelatowych [39].



Rysunek 3. Sposób oddziaływanego imidazolowych azotów w resztach histydylowych His-tag z jonom metalu, unieruchomionym w podłożu za pomocą chelatującego liganda NTA w technice IMAC. W zaproponowanym modelu koordynacji jonów Ni^{2+} do NTA, dochodzi do utworzenia kompleksu o geometrii oktaedrycznej. Chelatowany jon niklu(II) posiada cztery miejsca koordynacyjne zajmowane przez ligand NTA oraz dwa wolne miejsca, zdolne do oddziaływanego z imidazolowymi azotami w His-tagu [36]

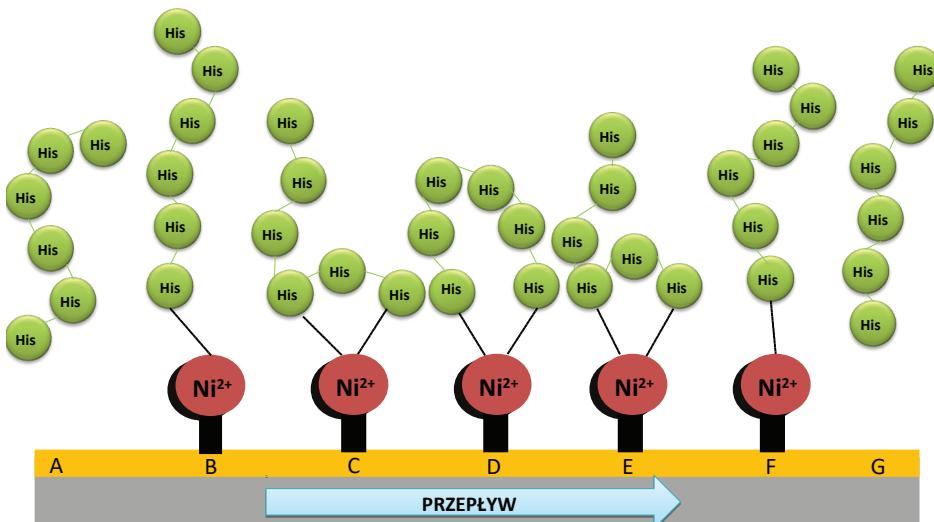
Figure 3. Interaction mode between imidazole nitrogens in histidine residues of His-tag and the metal ion immobilized by the chelating ligand NTA in IMAC technique. In the proposed model, the coordination of Ni^{2+} ion to the NTA leads to the formation of the octahedral complex. Chelated $\text{Ni}(\text{II})$ ion have four coordination sites occupied by the ligand NTA and two sites, capable of interacting with the imidazole nitrogens in the His-tag [36]

W 1988 roku Hochuli i współpracownicy w swojej pionierskiej pracy nad rozwojem technologii His-tag zastosowali tagi zawierające pięć i sześć sąsiadujących reszt histydylowych, uważając iż takie sekwencje rzadko występują w naturalnych białkach i będą stanowić gwarancję wysokiej selektywności [40]. Po dzień dzisiejszy, His-tag z sześcioma resztami histydylowymi jest najpowszechniej stosowanym tagiem w chromatografii IMAC, a niezwykle skuteczne wiązanie jonów Ni^{2+} przez histydynę zostało wykorzystane w oczyszczaniu białek i zyskało wielki sukces na rynku komercyjnym.

Technika IMAC jest stosowana również do oczyszczania niezmodyfikowanych białek, zawierających histydylowe reszty [38], a także w celu określenia powinowactwa metal-białko (również białek etykietowanych fluorescencyjnie lub innych cząsteczek w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*), we frakcjonowaniu oraz wykrywaniu białek, a także w oczyszczaniu immunoglobulin oraz izolacji kwasów nukleinowych [36].

W zależności od zastosowania, tagi w chromatografii powinowactwa muszą spełniać określone wymagania. Gdy są one przewidziane do zastosowania w testach wiążących ligand niezbędną jest silna interakcja. Z drugiej strony, gdy tagi stosowane są do oczyszczania, jedynie umiarkowane stałe dysocjacji są wymagane w celu umożliwienia łagodnego wymywania z kolumny [41].

Dokładny mechanizm wiązania jonów metali do tagów, stosowanych w IMAC nie jest znany. Istnieje jedynie kilka doniesień, opierających się głównie na symulacjach dynamiki molekularnej. Badania przeprowadzone przez Liu i współpracowników wykazały, że jony metali takie jak: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} oraz Co^{2+} wiążą się z dwiema resztami histydylowymi: n i $n+2$ w przypadku, gdy tag zawiera trzy lub więcej reszt His [42, 43].

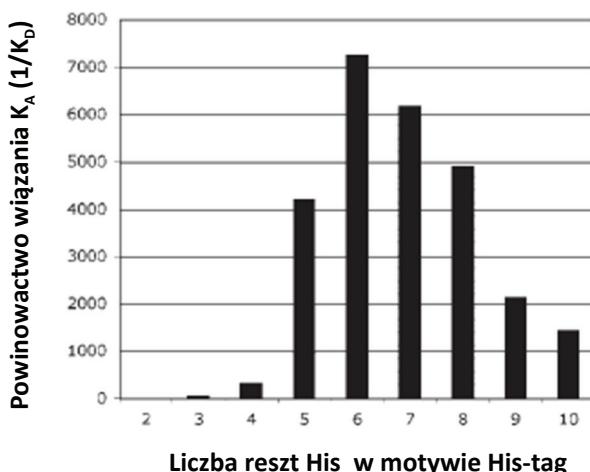


Rysunek 4. Schematyczny mechanizm wiązania His-tagu, zawierającego sześć reszt histydylowych, do fazy stacjonarnej – układu Ni^{2+} -NTA w chromatografii powinowactwa z unieruchomionym jonom metalu (IMAC). Ni^{2+} jest unieruchomiony w podłożu przez ligand chelatujący NTA. His₆-tag oddziałuje z jonom metalu w kilku etapach: A: wolny His-tag; B: pierwszy kontakt z Ni^{2+} i utworzenie kompleksu z jedną resztą histydylową; C–E: tworzenie kompleksów z dwiema resztami histydylowymi, w których n i $n+2$ lub n i $n+5$ reszty są skoordynowane do Ni^{2+} ; F, G: oddysocjowanie Ni^{2+} z His₆-tagu [37]

Figure 4. Schematic mechanism of His₆-tag binding to Ni^{2+} -NTA in IMAC chromatography. Ni^{2+} is immobilized to the surface by an NTA chelator. His₆-tag interacts with the metal ion in few steps: A: unbound His-tag; B: first contact with Ni^{2+} – monovalent complex, C-E: divalent complexes in which n and $n+2$ or n and $n+5$ imidazole nitrogens are coordinated to Ni^{2+} ; F,G: dissociation of Ni^{2+} from a His₆-tag [37]

Pierwsze próby eksperymentalnego scharakteryzowania mechanizmu oddziaływania jonów metali z His-tagami, o różnej kombinacji reszt histydylowych i alanylowych, zostały podjęte przez Knecht i współpracowników w 2009 roku [37]. Spód wiązania jonów Ni^{2+} został określony przez wartość pozornej stałej dysocjacji

(Kd) = 14±1 nM, za pomocą techniki powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR). W tych badaniach, His-tag zawierający sześć reszt histydylowych okazał się najskuteczniejszym tagiem, wiążąc jon metalu z najwyższym powinowactwem, gdy dwie reszty His (oddzielone od siebie jedną lub czterema histydynami) były zaangażowane w wiązanie metalu (Rys. 4). Wykazano również zależność między liczbą reszt His w His-tagu i ich właściwościami wiążącymi - wydłużenie polihistydylowej sekwencji z sześciu do siedmiu lub dziesięciu reszt His, powoduje zmniejszenie powinowactwa, prawdopodobnie ze względu na efekt entropowy (Rys. 5).



Rysunek 5. Powinowactwo wiązania KA (1/KD) różnej długości polihistydylowych tagów do fazy stacjonarnej Ni²⁺-NTA w eksperymencie SPR. Peptyd sześciohistydylowy wykazuje najwyższe powinowactwo ($3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), spośród wszystkich porównywanych peptydów. Peptydy zawierające dwie lub trzy reszty His wykazują dość niskie powinowactwo w stosunku do peptydów o długości od pięciu do ośmiu reszt His. Dla dwóch najdłuższych peptydów (zawierających dziewięć i dziesięć reszt histydylowych), powinowactwo spada znacznie poniżej 10^8 M^{-1} [37]

Figure 5. Binding affinity KA (1/KD) of different oligohistidine tags in surface plasmon resonance experiment (SPR). The hexahistidine peptide shows the highest affinity ($3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), among the compared peptides. Peptides containing two or three His residues exhibit a rather weak affinity compared to the peptides with a length of five to eight His residues. For the two longest peptides (containing nine and ten His), the affinity drops substantially below 10^8 M^{-1} [37]

Chociaż technika IMAC z wykorzystaniem polihistydylowych tagów jest standardową procedurą oczyszczania, mechanizm wiązania jonów metali przez peptydy z motywami His-tag nie jest wciąż w pełni poznany. W przypadku projektowania nowych tagów na podstawie technologii zaproponowanej przez Hochuli (polihistydylowy tag/Ni²⁺-NTA), wymagane jest lepsze zrozumienie molekularnych podstaw tych oddziaływań.

Niezwykle interesujące jest również powszechnie występowanie polihistydylowych motywów w wielu naturalnych białkach. Dlaczego natura wykształciła takie domeny? Jakie pełnią funkcje? Czy oddziaływanie z jonami metali jest podobne do tego obserwowanego w przypadku His-tagów stosowanych w IMAC?

4. NATURALNE BIAŁKA BOGATE W RESZTY HISTYDYLowe

Białka bogate w reszty histydylowe (ang. *histidine rich proteins*, HRPs) można podzielić na takie, które posiadają dużą ilość reszt His, oddzielonych od siebie innymi aminokwasami lub takie, które zawierają długie fragmenty sąsiadujących reszt His. HRPs są obecne w organizmach, należących zarówno do archeonów, bakterii jak i eukariontów. W proteomach organizmów prokariotycznych występuje ponad 2000 takich białek. Wiele z nich bierze udział w różnych procesach biologicznych, związanych między innymi z homeostazą jonów metali, ich transportem oraz przechowywaniem [14, 32]. Białka obecne w organizmach eukariotycznych mogą pełnić również inne funkcje, np. histatyny (rodzina małych białek HRPs obecna w ślinie) posiadają działanie przeciwdrobnoustrojowe w jamie ustnej [44–46], natomiast białko HRP-2 (ang. *histidine-rich protein 2*) z *Plasmodium falciparum* jest zaangażowane w polimeryzację hemu [47–49].

Szczególną grupę HRPs stanowią białka zawierające sekwencje z bardzo długimi powtórzeniami histydylowymi lub z kilkoma domenami krótkich polihistydylowych odcinków. Występują one między innymi w bakteryjnych białkach opiekuńczych (ch peronach), transporterach jonów metali, białkach prionowych, jadach niektórych węży oraz ludzkich czynnikach transkrypcyjnych (Tab. 1) [50]. W większości przypadków niewiele wiadomo na temat dokładnej roli oraz mechanizmu działania takich białek, ale pewnym jest, że są one niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania.

Tabela 1. Przykłady białek z motywami His-tagów zawierającymi co najmniej cztery sąsiadujące reszty histydylowe

Table 1. Examples of proteins with His-tag motifs having at least four consecutive histidine residues

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag	Źródło						
NikR (Ni-specyficzny czynnik transkrypcyjny) [51] motyw:His ₄ -tag	<i>Escherichia coli</i>	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>70</td> <td>80</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>EHEKRDLASR</td> <td>IVSTQHHHHHD</td> <td>LSVATLHVHI</td> </tr> </table> Długość białka: 133 reszty aminokwasowe	70	80	90	EHEKRDLASR	IVSTQHHHHHD	LSVATLHVHI	PDB ID: 1Q5Y UniProtKB: P0A6Z6
70	80	90							
EHEKRDLASR	IVSTQHHHHHD	LSVATLHVHI							
Gliosalaza II (nadrodzina metalo-beta-laktamaz) [52] motyw:His ₄ -tag	<i>Salmonella typhimurium</i>	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>EAAPVLKAIA</td> <td>EHKWMPEAIF</td> <td>LTHHHHHDHVG</td> </tr> </table>	40	50	60	EAAPVLKAIA	EHKWMPEAIF	LTHHHHHDHVG	PDB ID: 2QED UniProtKB: Q8ZRM2
40	50	60							
EAAPVLKAIA	EHKWMPEAIF	LTHHHHHDHVG							
AdcR (regulator transkrypcji z rodziny MarR) [53] motyw:His ₅ -tag	<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>100</td> <td>110</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>RVIFYQLTDL</td> <td>ARPIAEEHHH</td> <td>HHEHTLLTYE</td> </tr> </table> Długość białka: 146 reszt aminokwasowych	100	110	120	RVIFYQLTDL	ARPIAEEHHH	HHEHTLLTYE	PDB ID: 3TGN UniProtKB: Q04I02
100	110	120							
RVIFYQLTDL	ARPIAEEHHH	HHEHTLLTYE							

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag			Źródło
UreE (białko pomocnicze ureazy) [54] motyw:His ₅ -tag	<i>Proteus mirabilis</i>	150 PEPGAYGGSS	160 GGHHHHHDHH	161 H	UniProtKB: P17090
Długość białka: 161 reszt aminokwasowych					
MTP1 (białkowy przenośnik jonów metali1)[55] motyw:His ₅ -tag	<i>Arabi-dopsis thaliana</i>	190 GHDHGSHGH	200 GHGHGHDHHN	210 HSHGVTVTTH	UniProtKB: Q9ZT63
Długość białka: 398 reszt aminokwasowych					
ZIP (przypuszczalny transporter cynku)[56] motywy: His ₄ -tag His ₅ -tag His ₆ -tag	<i>Cryptosporidium parvum</i>	110 SPQDVAQFHM	120 HDHSFPHNRD	130 HHHHHHHKDPG	UniProtKB: Q5CXM3
Długość białka: 437 reszt aminokwasowych					
LIV1 (transporter cynku)[57] motyw: 2xHis ₄ -tag His ₅ -tag His ₆ -tag	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	140 CVGVNSNDVY	150 SIVNGEKKSH	160 YHHHHHRNDNN	
Długość białka: 742 reszty aminokwasowe					
Npun_AR245 (transporter o wysokim powinowactwie do jonów Ni ²⁺) motyw: His ₆ -tag	<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	310 SKSCIVHEDE	320 DEHSDHSHHH	330 KHHHHHHHDHQ	UniProtKB: Q6L8F3
Długość białka: 488 reszt aminokwasowych					

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag			Źródło
SVMI 02D01 (inhibitor metaproteinaz jadu węża) [58] motyw: His ₆ -tag	<i>Echis ocellatus</i>	260	270	280	UniProtKB: A8YPR6
		DHDHDHHHHH	HPGSSVGGGG	GGGGGGARRL	
Długość białka: 308 reszt aminokwasowych					
HypB (białko chaperonowe hydrogenazy) [59] motyw: His ₅ -tag His ₆ -tag	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	10	20	30	UniProtKB: Q45257
		MCTVCGCSDG	KASIEHAHDH	HHDHGHDHDH	
		40	50	60	
		GHDGHHHHHH	GHDQDHHHHH	DHAHGDAGLL	
Długość białka: 302 reszty aminokwasowe					
Hpn (polihistydylowe białko wiążące jony metali) [60] motyw: His ₄ -tag His ₅ -tag His ₇ -tag	<i>Helicobacter pylori</i>	10	20	30	UniProtKB: P0A0V6
		MAHHHEEQHGG	HHHHHHHHHTHH	HYHGGEHHH	
		40	50	60	
		HHHSSHHEEG	CCSTSDSHHQ	EEGCCHGHHE	
Długość białka: 60 reszt aminokwasowych					
NLK (serynowo-treonowa kinaza białkowa) [61] motyw: His ₅ -tag, His ₈ -tag	<i>Homo sapiens</i>	30	40	50	UniProtKB: Q9UBE8
		SAAAAGHHHH	HHHHLPHLPP	PHLHHHHHPQ	
Długość białka: 527 reszt aminokwasowych					
pHpG-1 (poli-His-poli-Gly peptyd-1) [62] motyw: His ₉ -tag	<i>Atheris squamigera; Atheris chlorechis</i>	10	20	24	UniProtKB: P0C7K4
		EDDHHHHHHH	HHGVGGGGGG	GGGG	
Długość białka: 24 reszty aminokwasowe					
CACNA1A (podjednostka α-1A kanału wapniowego typu P/Q) [63, 64] motyw: His ₁₀ -tag	<i>Homo sapiens</i>	2210	2220	2230	PDB ID: 3BXK UniProt KB: O00555
		GRPKDRKHRQ	HHHHHHHHHHHH	PPPPDKDRYA	
Długość białka: 24 reszty aminokwasowe					

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag			Źródło
Hox-A1 białko homeoboksowe[65] motyw: His ₅ -tag His ₁₀ -tag	<i>Homo sapiens</i>	60	70	80	UniProtKB: P49639
		DRFLVGRGVQ	IGSPHHHHHH	HHHHPPQPATY	
YY1 (białko represorowe transkrypcji)[66] motyw: His ₁₁ -tag	<i>Homo sapiens</i>	140	150	160	PDB ID: 1UBD UniProtKB: P25490
		YSGNLSSPMV	QHHHHHQGYA	GGAVGSPQYI	
Długość białka: 335 reszt aminokwasowych					
HMA4 (przypuszczalne białko transportujące Cd/Zn) [67] motyw: His ₁₁ -tag	<i>Arabi-dopsis thaliana</i>	70	80	90	PDB ID: 2KKH UniProtKB: O64474
		GGGGHGAGH	HHHHHHHHHH	PPMIALQPLV	
Długość białka: 414 reszt aminokwasowych					
Hpn-like (Hpn1, białko bogate w reszty His i Gln wiążące jony metali)[68] motyw: His ₄ -tag His ₁₁ -tag	<i>Helicobacter pylori</i>	1160	1170	1172	UniProtKB: A3RDS2
		AKELCSHRHH	HHHHHHHHHV	SA	
Długość białka: 1172 reszty aminokwasowe					
pHpG-2 (poli-His-poli-Gly peptyd 2) [62] motyw: His ₁₂ -tag	<i>Atheris nitschei</i>	10	20	30	UniProtKB: P0C7K6
		MAHHEQQQA	QQQQQQQANS	QHHHHHHAHH	
DYRK1A (kinaza o podwójnej specyficzności) [69] motyw: His ₄ -tag His13-tag	<i>Homo sapiens</i>	40	50	60	PDB ID: 2WO6 UniProtKB: Q13627
		HHYYGGEHHH	HNAEQHAEQQ	AEQQAQQQQA	
Długość białka: 1172 reszty aminokwasowe					
DYRK1A (kinaza o podwójnej specyficzności) [69] motyw: His ₄ -tag His13-tag	<i>Homo sapiens</i>	70	75		PDB ID: 2WO6 UniProtKB: Q13627
		HQQQQQKAQQ	QNQQY		
Długość białka: 30 reszt aminokwasowych					
DYRK1A (kinaza o podwójnej specyficzności) [69] motyw: His ₄ -tag His13-tag	<i>Homo sapiens</i>	600	610	620	PDB ID: 2WO6 UniProtKB: Q13627
		VAPQQNALHH	HHGNSSHHHH	HHHHHHHHHG	
Długość białka: 763 reszt aminokwasowych					

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag			Źródło
CDF (transporter dwuwartościowych kationów metali) [70] motyw: His ₄ -tag His ₁₉ -tag	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	160 VAPQQNALHH	170 HHGNSSHHHH	620 HHHHHHHHHG	UniProtKB: A3M8Y6

Długość białka: 328 reszt aminokwasowych

4.1. Hpn I Hpnl

Doskonałymi przykładami polihistydylowych białek są Hpn oraz Hpn-like (z ang. podobne do Hpn, Hpnl) z *Helicobacter pylori*, bakterii, która kolonizuje śluzówkę żołądka u ponad połowy populacji świata, powodując m.in. wrzody żołądka [68]. Białko Hpn jest 60-aminokwasowym białkiem, w którym 47% wszystkich aminokwasów stanowią reszty histydylowe, tworzące trzy długie polihistydylowe odcinki: z czteroma, sześcioma i siedmioma resztami His (Tab. 1). Badania *in vitro* wykazały, że całe białko Hpn tworzy bardzo stabilne kompleksy z jonami Cu²⁺ [71], jednakże badania *in vivo* sugerują, iż to białko odgrywa kluczową rolę w homeostazie jonów niklu (preferencje białka względem jonów metali zmniejszają się w kolejności: Ni²⁺ > Bi³⁺ > Cu²⁺ ≈ Zn²⁺) [72].

Badania eksperymentalne na kilku krótkich fragmentach Hpn: THHH-HYHGG [73], MAHHEEQHG [72] oraz EEGCCHGHHE [74] z różnymi jonami metali wykazały, że każdy z nich jest zdolny wiązać jony Ni²⁺ z wysokim powinowactwem, jednakże sekwencja zawierająca motyw Cys-Cys jest prawdopodobnie najbardziej korzystnym miejscem wiązania jonów niklu w całym białku i może być kluczowa dla przeżycia *H. pylori* [73].

Białko Hpnl zawiera 72 reszty aminokwasowe, przy czym 18 z nich to histydyny (25%). W sekwencji białka Hpnl występują również liczne reszty glutamino-wie, które stanowią aż 43% wszystkich aminokwasów (Tab. 1) [75]. Białko Hpnl posiada bardzo wysokie powinowactwo względem jonów Cu²⁺ ($K_d = 2,5 \mu\text{M}$) oraz Ni²⁺ ($K_d = 3,8 \mu\text{M}$), wiążąc 1,4 atomu miedzi i 2 atomy niklu na monomer. Białko to jest również skuteczne w wiązaniu jonów cynku ($K_d = 10,6 \mu\text{M}$) oraz kobaltu ($K_d = 12,4 \mu\text{M}$) [76].

Oba cytoplazmatyczne białka, Hpn i Hpnl, są zaangażowane w homeostazę jonów niklu – magazynowanie oraz ochronę przed jego bardzo wysokim, toksycznym stężeniem. Wspólną cechą charakterystyczną jest również zdolność do wiązania jonów niklu w sposób odwracalny, umożliwiając tym samym dostarczenie jonów Ni²⁺ do innych białek. W przypadku, gdy środowisko jest ubogie w nikiel, Hpn i Hpnl konkurują o ten metal z białkami zaangażowanymi w dojrzewanie ureazy [68]. Motywy polihistydylowe w sekwencjach białek Hpn oraz Hpnl prawdopodobnie odgrywają rolę regulacyjną w zdolnościach wiążących jony metali [73].

4.2. AdcR

Innym przykładem bakteryjnych białek bogatych w reszty histydylowe jest białko AdcR (ang. *adhesin competence repressor*), wyizolowane ze *Streptococcus pneumoniae* D39, patogenu kolonizującego górne drogi oddechowe [53, 77]. AdcR jest białkiem regulatorowym należącym do rodziny MarR, której wspólną cechą jest m.in. ekspresja czynników wirulencji oraz odpowiedź na antybiotyki oraz inne środki przeciwbakteryjne [53]. AdcR jest represorem operonu *acdRCBA*, obecnego u wszystkich paciorkowców, kodującego transporter ABC (system wychwytu z wysokim powinowactwem do jonów Zn²⁺), a także kodującego geny białek z rodziny Pht (ang. *pneumococcal histidine triad*, zawierających w swojej sekwencji kilka motywów HxxHxH) oraz *adcAII* [78]. Geny te, w swoich regionach promotorowych kodują możliwe miejsce wiążące AdcR z DNA. Białko AdcR z *S. pneumoniae* jest homodimerem, a jego C-końcowy fragment zawiera polihistydylowy fragment z pięcioma sąsiadującymi resztami His (Tab. 1). Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że dwie reszty z polihistydylowego odcinka: His108 oraz His112 oraz reszta His42 (obecna w domenie wiążącej DNA) są zaangażowane w wiązanie jonów cynku i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tego białka [79]. Te reszty aminokwasowe są konserwatywne we wszystkich znanych regulatorach z rodziny MarR. Białka z rodziny Pht zostały znalezione jedynie u patogennych gatunków paciorkowców. Ze względu na właściwości regulacyjne geny *pht* oraz *acdAII*, białko AdcR ma potencjalny wpływ na zdolność *S. pneumoniae* do wywoływania stanu chorobowego [78].

4.3. AtHMA I AtMTP

Niezwykle interesującymi białkami, zawierającymi sekwencje z długimi polihistydylowymi regionami są: AtHMA2, AtHMA4, AtMTP1 występujące w roślinie *Arabidopsis thaliana*.

Białka AtHMA2, AtHMA4 należą do rodziny transporterów metali ciężkich, P_{1B}-ATP-az, wykorzystujących ATP jako źródło energii do transportu jonów cynku i kadmu [80]. Sekwencje tych białek zawierają regiony bogate w reszty histydylowe – jedenaście sąsiadujących reszt His w ich C-końcowym odcinku (Tab. 1). Ten polihistydylowy region, razem zmotywem -Cys-Cys-X-X-Glu-, zlokalizowanym na N-końcu białka jest zaangażowany w wiązanie jonu metalu [81]. Badania wykazały, że polihistydylowy region jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania tych białek – mutacje lub usunięcie tego fragmentu białka skutkują utratą zdolności wiązania jonów metali [67].

Odcinki zawierające jedenaście sąsiadujących reszt histydylowych występują również w innych P_{1B}-APTazach, np. w HMA1 z *Arabidopsis thaliana* i BXA1 z *Oscillatoria brevis*, które są odpowiedzialne za transport kationów zarówno jednak i dwu-wartościowych. Jednakże w tych przypadkach, polihistydylowa domena jest zlokalizowana w N-końcowej części tych białek [82].

Białko MTP1 z *A. thaliana* (AtMTP1) należy natomiast do transporterów CDF (ang. *cation diffusion facilitator*), odpowiedzialnych za eksport jonów metali ciężkich i odgrywają istotną rolę w homeostazie i tolerancji jonów metali. Białko AtMTP1 jest zlokalizowane w błonie wakuolarnej i bierze udział w transporcie jonów cynku (grupa Zn-CDF) [83]. AtMTP1 posiada sześć transbłonowych domen, długi N- i C-końcowy ogon oraz hydrofilowy region bogaty w reszty histydylowe pomiędzy czwartą i piątą domeną [55]. Badania przeprowadzone przez Kawachi, mające na celu wyjaśnienie mechanizmu transportu jonów cynku przez AtMTP1 wykazały, że polihistydylowa pętla z pięcioma resztami His nie pełni kluczowej roli w transporcie, może pełnić natomiast funkcję ‘kieszeni buforującej’, pochłaniając nadmiar jonów Zn²⁺, odgrywając tym samym rolę ‘czujnika’ poziomu cynku w cytoplazmie [55].

Podobny region występuje również w białku MTP4 z *Cucumis sativus*, które jest funkcjonalnie ważne w komórkach ogórka, wpływając na homeostazę jonów cynku oraz kadmu [82].

4.4. CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Unikalna grupa białek z odcinkami powtórzeń histydylowych została zidentyfikowana również w ludzkim genomie. Ponad osiemdziesiąt takich białek posiada regiony zawierające co najmniej pięć sąsiadujących reszt histydylowych [84]. Większość z nich jest zlokalizowana w jądrowych strukturach, określanych jako ang. *speckles* (cętki, łatki) i odgrywa rolę w funkcjonowaniu DNA i RNA. Mogą one posiadać jeden lub kilka polihistydylowych fragmentów w swojej sekwencji, np. białko HOXA1 posiada jeden region z dziesięcioma resztami His: 65-HHHHHHHHHH-74, a białko MAFA kilka regionów o różnej ilości reszt His: 184-HHHGAHHAAHHAAHHHHHHSH-GGAGHGGAGHH-219. Badania wykazały, że prawdopodobnie większy wpływ na funkcjonalną rolę tych białek może mieć odstęp pomiędzy resztami, a nie ilość reszt histydylowych w sekwencji [84].

Niezwykle interesujące jest białko DYRK1A, które zawiera w swojej sekwencji regiony z czterema i trzynastoma sąsiadującymi resztami histydyny (Tab. 1). DYRK1A należy do rodziny kinaz odpowiedzialnych za kluczową rolę w rozwoju mózgu, regulację splicingu oraz apoptozy, a także stanowią potencjalne miejsca działania leków w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz raka. Białko DYRK1A bierze udział w komórkowym szlaku sygnalizacyjnym, regulowaniu ważnych procesów komórkowych, np. proliferacji komórek oraz jest związane z patologią zespołu Downa i chorób neurodegeneracyjnych [85, 86].

Innym przykładem jest białko NLK, należąca do grupy kinaz białkowych serynowo-treoninowych. W swojej sekwencji posiada dwa polihistydylowe odcinki zawierające 5 oraz 8 sąsiadujących reszt His. Białko to jest związane z regulacją liczby czynników transkrypcyjnych, pełniących kluczową rolę w określaniu losów komórki.

Dokładny mechanizm działania oraz przekazywania sygnału przez powtórzenia histydylowe nie jest jeszcze jasny, ale na pewno jest związany z unikalnymi właściwościami chemicznymi histydyny. Bardzo interesujący jest również fakt, że lokalizacja w cętkach jądrowych jest utracona, podczas gdy histydylowe powtórzenia zostają usunięte, udowadniając, że His-powtórzenia są niezbędne do lokalizacji tych białek w cętkach jądrowych. Z drugiej zaś strony, usunięcie polihistydylowych regionów z białek DYRK1A oraz NLK nie wpływa na podstawowe właściwości biochemiczne tych białek [87].

4.5. pHpG

Jady węży są mieszaniną bioaktywnych związków, takich jak, np. metaloproteinazy, wielodomenowe białka oraz ponad 100 enzymatycznie aktywnych toksyn białkowych [88]. Metaloproteinazy jadu węża (ang. *snake venom metalloproteases*, SVMPs) stanowią około 30% wszystkich białek w jadach węży i są jednym z kluczowych enzymów wpływających na toksyczność jadów. Ich aktywność jest związana z występowaniem u ofiary m.in. krwotoku (miejscowego lub ogólnoustrojowego), obrzęków, zapalenia czy martwicy [89]. SVMPs są spokrewnione z białkami z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*). Adamalizyny (ADAM) należą do nadrodziny białek zależnych od obecności jonów cynku oraz wapnia. SVMPs zostały podzielone na trzy klasy (PI, PII i PIII) w oparciu o skład domen. Z kolei w ramach każdej z klas wyróżnia się podklasy, które są pogrupowane w zależności od tego czy są monomerami, homo- lub hetero dimerami. Zmiany w składzie domen pomiędzy różnymi klasami SVMPs mają znaczenie w mechanizmie działania toksyn wywołujących krwotok. Szczegółowa analiza biochemicznej charakterystyki SVMPs została opisana w doskonałych publikacjach, dotyczących tego zagadnienia [90–92].

Wszystkie SVMPs posiadają domenę z motywem HEXXHXXGXXH, która jest odpowiedzialna za wiązanie jonu cynku [93]. Kilka dostępnych struktur krystalicznych SVMPs pokazuje, że jon cynku jest skoordynowany w tej cząsteczce tetradrycznie przez trzy reszty His oraz tlen z cząsteczką wody (polaryzowany przez resztę Glu). Jony wapniowe natomiast znajdują się po przeciwnej stronie miejsca aktywnego i najprawdopodobniej odgrywają rolę strukturalną [94].

Metaloproteinazy są syntezowane i przechowywane w gruczołach jadowym węży w formie nieaktywnej [95]. Gruczoł jadowy jest chroniony przed uszkodzeniem przez synergistyczne działanie kilku różnych czynników obecnych w jadzie, które są w stanie zahamować aktywność metaloproteinaz *in situ*: (i) niskie pH, (ii) chelację jonów wapnia cytrynianem, (iii) konkurencyjne hamowanie enzymatyczne przez tripeptydy [96, 97]. Aktywność ta może zostać całkowicie przywrócona poprzez rozcieńczenie lub fizykochemiczne zmiany, do których dochodzi podczas, gdy jad jest wstrzykiwany do ciała ofiary [98].

Ostatnie doniesienia wykazały, że jady węży z rodziny *Atheris* oraz *Echis* zawierają nową grupę peptydów z motywami powtarzającymi się reszt histydyny i glicyny (Tab. 1) [62]. Poli-His i poli-Gly (pHPG) sekwencje peptydowe z *Atheris squamigera* oraz *Atheris chlorechis* posiadają dziewięć sąsiadujących reszt His oraz dziesięciokrotne powtórzenie reszty Gly. Natomiast jad z *Atheris nitschei* zawiera peptyd aż z dwunastoma sąsiadującymi resztami His. W jadzie węża *Echis ocellatus* zidentyfikowano domenę z krótszym motywem, zawierającym sześć sąsiadujących reszt His, obok równie interesującego motywu z naprzemiennie ułożonymi resztami kwasowymi (Asp) i histydylowymi (His) [58] (Tab. 1). Obecność sekwencji poli-His i poli-Gly w jadach węży jest prawdopodobnie związana z ich aktywnością biologiczną. Istnieje hipoteza, że takie peptydy mogą odgrywać kluczową rolę w oddziaływaniu z jonami metali, hamując działanie metaloproteinaz, podczas przechowywania jadu w gruczołach jadowym [62, 89].

5. TERMODYNAMICZNE I STRUKTURALNE ASPEKTY WIĄZANIA JONÓW METALI PRZEZ SEKWENCJE BIAŁKOWE Z MOTYWEM HIS-TAG

W ostatnim czasie podjęto próbę określenia roli domen zawierających motyw His-tag w wiązaniu dwuwartościowych jonów metali (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}), a także porównania termodynamicznej trwałości tworzących się kompleksów oraz ich struktury. Zostały przeprowadzone szczegółowe badania dotyczące sześciohistydylowego peptydu His-tag, powszechnie stosowanego w biotechnologii do oczyszczania rekombinowanych białek oraz naturalnie występujących sekwencji z motywem His-tag w peptydach z jadów węży z rodzaju *Atheris* oraz *Echis* przy użyciu technik eksperymentalnych (spektrometria mas, potencjometria oraz metody spektroskopowe: UV-Vis, CD, EPR) oraz obliczeniowych (DFT oraz symulacji MD). Badania wykazały, że sekwencje z motywem His-tag bardzo skutecznie wiążą jony metali ($\text{Cu}^{2+} >> \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$). Polihistydylowy fragment z jadu węża *Atheris squamigera* zawierający ciąg dziewięciu reszt histydylowych (pHG) wykazywał najwyższą skuteczność w wiązaniu jonów metali w porównaniu z peptydem zawierającym sześciohistydylowy motyw His-tag oraz peptydem, który obok tej domeny zawiera dodatkowe dwie reszty His w sekwencji. Autorzy wykazali, że wiązanie jonu metalu indukuje tworzenie struktury α -helisy (regularna α -helisa w przypadku pHG), a dzięki zdolności tworzenia stanów ‘polimorficznych’ metal może ‘poruszać się’ wzduł długiej polihistydylowej domeny z motywem His-tag. Sekwencje zawierające ciąg sąsiadujących reszt His wiążą jony metali znacznie silniej niż inne sekwencje białkowe bogate w histydynę, rozzielone innymi aminokwasami. Dzięki zrozumieniu chemii bionieorganicznej kompleksów Cu^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} z sekwencjami zawierającymi motywy tagów polihistydylowych, zaproponowano hipotezę odnośnie ich roli w syntetycznych i naturalnych białkach: ze względu na wysoką trwałość tworzących kompleksów takie białka stanowią idealne miejsce przechowywania jonów metali, pełniąc funkcję ‘gąbki’, natomiast obecność stanów ‘polimorficznych’ może

świadczenie o ich roli w dystrybucji metali w i między białkami. Takie białka mogą również determinować strukturę białek ze względu na indukcję struktury α -helisy pod wpływem wiążania metali [99–101].

UWAGI KOŃCOWE

Sekwencje aminokwasowe, w których jeden rodzaj aminokwasu jest wielokrotnie powtórzony, często są nie tylko kuszącym miejscem wiązania jonów metali, lecz także niejednokrotnie, razem ze związanym metalem, determinują strukturę całego białka i wpływają na jego funkcje. Zrozumienie podstawowych korelacji pomiędzy daną sekwencją i właściwościami jego kompleksu z jonom metalu jest pierwszym krokiem w kierunku wyjaśnienia wielu istotnych procesów biologicznych. Kluczowy jest rodzaj i ilość poszczególnych reszt aminokwasowych wiążących jona metalu w sekwencji oraz obecność siedzących łańcuchów bocznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.F. Doolittle, *Redundancies in protein sequences [w:] Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, G.D. Fasman ed, Plenum Press, New York 1989.
- [2] J.M. Hancock, M. Simon, Gene, 2005, **345**, 113.
- [3] N.G. Faux, S.P. Bottomley, A.M. Lesk, J.A. Irving, J.R. Morrison, M.C. de la Banda, J.C. Whisstock, Genome Res., 2005, **15**, 537.
- [4] N.G. Faux, G.A. Huttley, K. Mahmood, G.I. Webb, M.G. de la Banda, J.C. Whisstock, Genome Res., 2007, **17**, 1118.
- [5] M.V. Katti, R. Sami-Subbu, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta, Protein Sci., 2000, **9**, 1203.
- [6] H. Lavoie, F. Debeane, Q.D. Trinh, J.F. Turcotte, L.P. Corbeil-Girard, M.J. Dicaire, A. Saint-Denis, M. Page, G.A. Rouleau, B. Brais, Hum. Mol. Genet., 2003, **12**, 2967.
- [7] M.F. Perutz, A.H. Windle, Nature, 2001, **412**, 143.
- [8] C.A. Ross, R.L. Margolis, M.W. Becher, J.D. Wood, S. Engelender, J.K. Cooper, A.H. Sharp, *Neurodegeneration and Regeneration: from Basic Mechanisms to Prospects for Therapy*, 1998, **117**, 397.
- [9] S.L. Hands, A. Wyttenbach, Acta Neuropathol., 2010, **120**, 419.
- [10] R.L. Margolis, C.A. Ross, Trends Mol. Med., 2001, **7**, 479.
- [11] H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, Annual Review of Neuroscience, 2007, **30**, 575.
- [12] I.A. Klement, P.J. Skinner, M.D. Kaytor, H. Yi, S.M. Hersch, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr, Cell, 1998, **95**, 41.
- [13] R. Truant, B.R. Cullen, Mol. Cell. Biol., 1999, **19**, 1210.
- [14] T. Cheng, W. Xia, P. Wang, F. Huang, J. Wang, H. Sun, Metallomics, 2013, **5**, 1423.
- [15] S.M. Liao, Q.S. Du, J.Z. Meng, Z.W. Pang, R.B. Huang, Chem. Centr. J., 2013, **7**, 12.
- [16] J.T. Rubino, K.J. Franz, J. Inorg. Biochem., 2012, **107**, 129.
- [17] R.J. Sundberg, R.B. Martin, Chem. Rev., 1974, **74**, 471.
- [18] K. Fink, J. Boratynski, Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczałnej, 2014, **68**, 1276.
- [19] S. Grimme, Angew. Chem. Int. Edit., 2008, **47**, 3430.
- [20] G.B. McGaughey, M. Gagne, A.K. Rappe, J. Biol. Chem., 1998, **273**, 15458.

- [21] G.L. Miessler, D.A. Tarr, Inorganic Chemistry, Wyd. 3, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2003.
- [22] M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozlowski, J. Brasun, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **97**, 299.
- [23] C. Conato, R. Gavioli, R. Guerrini, H. Kozlowski, P. Mlynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli, *BBA-Gen. Subjects*, 2001, **1526**, 199.
- [24] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 1.
- [25] B. Boka, A. Myari, I. Sovago, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 113.
- [26] C.E. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, B. Perly, H. Kozlowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1987, **3**, 661.
- [27] I. Sovago, E. Farkas, C. Bertalan, A. Lebkiri, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **51**, 715.
- [28] C. Conato, W. Kamysz, H. Kozlowski, M. Luczkowski, Z. Mackiewicz, F. Mancini, P. Mlynarz, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, **9**, 1694.
- [29] F. Carrera, E.S. Marcos, P.J. Merkling, J. Chaboy, A. Munoz-Paez, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6674.
- [30] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Journal of Molecular Biology*, 1982, **160**, 181.
- [31] P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, A.M. Nersessian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg, *Biochemistry*, 1999, **38**, 2167.
- [32] M. Rowinska-Zyreka, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, H. Kozlowski, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 58.
- [33] P. Kolkowska, A. Hecel, D. Kędzierska, M. Ostrowska, P.K. Walencik, J. Wątły, K. Zdyb, M. Spodzieja, S. Rodziewicz-Motowidło, S. Potocki, M. Łuczkowski, E. Gumienka-Kontecka, M. Rowińska-Zyreka, *J. Inorg. Biochem.* 2016, **163**, 258.
- [34] H. Kozlowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.* 2005, **249**, 2323.
- [35] C. Harford, B. Sarkar, *Accounts Chem. Res.*, 1997, **30**, 123.
- [36] H. Block, B. Maertens, A. Sprestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schaefer, *Guide to Protein Purification*, Second Edition, 2009, **463**, 439.
- [37] S. Knecht, D. Ricklin, A.N. Eberle, B. Ernst, *J. Mol. Recogn.*, 2009, **22**, 270.
- [38] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, 1975, **258**, 598.
- [39] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatography*, 1987, **411**, 177.
- [40] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Bio-Technology*, 1988, **6**, 1321.
- [41] F.H. Arnold, *Bio-Technology*, 1991, **9**, 151.
- [42] H.L. Liu, Y. Ho, C.M. Hsu, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2003, **21**, 31.
- [43] C.W. Chen, H.L. Liu, J.C. Lin, Y. Ho, *J. Chinese Chem. Soc.*, 2005, **52**, 1281.
- [44] F.G. Oppenheim, T. Xu, F.M. McMillian, S.M. Levitz, R.D. Diamond, G.D. Offner, R.F. Troxler, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 7472.
- [45] M.J. Oudhoff, J.G.M. Bolscher, K. Nazmi, H. Kalay, W. van't Hof, A.V.N. Amerongen, E.C.I. Veerman, *Faseb J.*, 2008, **22**, 3805.
- [46] K. Kavanagh, S. Dowd, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, **56**, 285.
- [47] S.R. Hawley, P.G. Bray, M. Munghin, J.D. Atkinson, P.M. O'Neill, S.A. Ward, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, **42**, 682.
- [48] A. Lynn, S. Chandra, P. Malhotra, V.S. Chauhan, *Febs Lett.*, 1999, **459**, 267.
- [49] D.J. Sullivan, I.Y. Gluzman, D.E. Goldberg, *Science*, 1996, **271**, 219.
- [50] H. Kozlowski, S. Potocki, M. Remelli, M. Rowinska-Zyreka, D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2625.

- [51] K. De Pina, V. Desjardin, M.A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, L.F. Wu, *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**, 670.
- [52] V.A. Campos-Bermudez, N.R. Leite, R. Krog, A.J. Costa-Filho, F.C. Soncini, G. Oliva, A.J. Vila, *Biochemistry*, 2007, **46**, 11069.
- [53] H. Reyes-Caballero, A.J. Guerra, F.E. Jacobsen, K.M. Kazmierczak, D. Cowart, U.M.K. Koppolu, R.A. Scott, M.E. Winkler, D.P. Giedroc, *J. Mol. Biology*, 2010, **403**, 197.
- [54] M.M. Pearson, M. Sebaihia, C. Churcher, M.A. Quail, A.S. Seshasayee, N.M. Luscombe, Z. Abdellah, C. Arrosmith, B. Atkin, T. Chillingworth, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabbinowitsch, D. Walker, S. Whithead, N.R. Thomson, P.N. Rather, J. Parkhill, H.L.T. Mobley, *J. Bacteriol.*, 2008, **190**, 4027.
- [55] M. Kawachi, Y. Kobae, T. Mimura, M. Maeshima, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 8374.
- [56] M.S. Abrahamsen, T.J. Templeton, S. Enomoto, J.E. Abrahante, G. Zhu, C.A. Lancto, M.Q. Deng, C. Liu, G. Widmer, S. Tzipori, G.A. Buck, P. Xu, A.T. Bankier, P.H. Dear, B.A. Konfortov, H.F. Spriggs, L. Iyer, V. Anantharaman, L. Aravind, V. Kapur, *Science*, 2004, **304**, 441.
- [57] S. Yamashita, C. Miyagi, T. Fukada, N. Kagara, Y.S. Che, T. Hirano, *Nature*, 2004, **429**, 298.
- [58] S.C. Wagstaff, P. Favreau, O. Cheneval, G.D. Laing, M.C. Wilkinson, R.L. Miller, R. Stoecklin, R.A. Harrison, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **365**, 650.
- [59] C.L. Fu, R.J. Maier, *BBA-Bioenergetics*, 1994, **1184**, 135.
- [60] J.V. Gilbert, J. Ramakrishna, F.W. Sunderman, A. Wright, A.G. Plaut, *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2682.
- [61] Z.Y. Zhang, S.Z. Li, H.H. Zhang, Q.R. Wu, J. Gong, T. Liang, L. Gao, N.N. Xing, W.B. Liu, R.L. Du, X.D. Zhang, *Mol. Cell. Biology*, 2015, **35**, 778.
- [62] P. Favreau, O. Cheneval, L. Menin, S. Michalet, H. Gaertner, F. Principaud, R. Thai, A. Menez, P. Bulet, R. Stocklin, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2007, **21**, 406.
- [63] S. Guida, F. Trettel, S. Pagnutti, E. Mantuano, A. Tottene, L. Veneziano, T. Fellin, M. Spadaro, K.A. Stauderman, M.E. Williams, S. Volsen, R.A. Ophoff, R.R. Frants, C. Jodice, M. Frontali, D. Pietrobon, *Am. J. Human Gen.*, 2001, **68**, 759.
- [64] Q. Yue, J.C. Jen, S.F. Nelson, R.W. Baloh, *Am. J. Human Gen.*, 1997, **61**, 1078.
- [65] Y.S. Hong, S.Y. Kim, A. Bhattacharya, D.R. Pratt, W.K. Hong, M.A. Tainsky, *Gene*, 1995, **159**, 209.
- [66] S. Gordon, G. Akopyan, H. Garban, B. Bonavida, *Oncogene*, 2006, **25**, 1125.
- [67] M. Zimmermann, O. Clarke, J.M. Gulbis, D.W. Keizer, R.S. Jarvis, C.S. Cobbett, M.G. Hinds, Z. Xiao, A.G. Wedd, *Biochemistry*, 2009, **48**, 11640.
- [68] S. Seshadri, S.L. Benoit, R.J. Maier, *J. Bacteriol.*, 2007, **189**, 4120.
- [69] M. Soundararajan, A.K. Roos, P. Savitsky, P. Filippakopoulos, A.N. Kettenbach, J.V. Olsen, S.A. Gerber, J. Eswaran, S. Knapp, J.M. Elkins, *Structure*, 2013, **21**, 986.
- [70] M.J. McConnell, L. Actis, J. Pachon, *Fems Microbiol. Rev.*, 2013, **37**, 130.
- [71] R.G. Ge, Y. Zhang, X.S. Sun, R.M. Watt, Q.Y. He, J.D. Huang, D.E. Wilcox, H.Z. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 11330.
- [72] D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 208.
- [73] D. Witkowska, R. Politano, M. Rowinska-Zyreka, R. Guerrini, M. Remelli, H. Kozlowski, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 11088.
- [74] M. Rowinska-Zyreka, D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz, H. Kozlowski, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5604.
- [75] J.F. Tomb, O. White, A.R. Kerlavage, R.A. Clayton, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, H.P. Klenk, S. Gill, B.A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L.X. Zhou, E.F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L.M. Fitzgerald, N. Lee, M.D. Adams, E.K. Hickey, D.E. Berg, J.D. Gocayne, T.R. Utterback, J.D. Peterson, J.M.

- Kelley, M.D. Cotton, J.M. Weldman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W.S. Hayes, J.M. Weidman, M. Borodovsky, P.D. Karp, H.O. Smith, C.M. Fraser, J.C. Venter, *Nature*, 1997, **388**, 539.
- [76] Y.B. Zeng, D.M. Zhang, H.Y. Li, H.Z. Sun, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 1121.
- [77] A. Kadioglu, J.N. Weiser, J.C. Paton, P.W. Andrew, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 288.
- [78] S. Shafeeq, T.G. Kloosterman, O.P. Kuipers, *Metalloomics*, 2011, **3**, 609.
- [79] A.J. Guerra, C.E. Dann, D.P. Giedroc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19614.
- [80] D. Hussain, M.J. Haydon, Y. Wang, E. Wong, S.M. Sherson, J. Young, J. Camakaris, J.F. Harper, C.S. Cobbett, *Plant Cell*, 2004, **16**, 1327.
- [81] F. Verret, A. Gravot, P. Auroy, S. Preveral, C. Forestier, A. Vavasseur, P. Richaud, *Febs Lett.*, 2005, **579**, 1515.
- [82] M. Migocka, A. Kosieradzka, A. Papierniak, E. Maciaszczyk-Dziubinska, E. Posyniak, A. Garbiec, S. Filleur, *J. Exp. Bot.*, 2015, **66**, 1001.
- [83] Y. Kobae, T. Uemura, M.H. Sato, M. Ohnishi, T. Mimura, T. Nakagawa, M. Maeshima, *Plant Cell Physiol.*, 2004, **45**, 1749.
- [84] E. Salichs, A. Ledda, L. Mularoni, M.M. Alba, S. de la Luna, *Plos Genet.*, 2009, **5**, 18.
- [85] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozlowski, N. Katsaros, *Metal-based drugs*, 2000, **7**, 293.
- [86] A. Dobosz, I.O. Fritsky, A. Karaczyn, H. Kozlowski, T.Y. Silva, J. Swiatek-Kozlowska, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1998, 1089.
- [87] A.M. Moreeuw, P. Decock, H. Timmerman, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70**, 107.
- [88] B.G. Fry, K. Roelants, D.E. Champagne, H. Scheib, J.D.A. Tyndall, G.F. King, T.J. Nevalainen, J.A. Norman, R.J. Lewis, R.S. Norton, C. Renjifo, R.C.R. de la Vega, R.C.R. *Ann. Rev. Genom. Hum. G.*, 2009, **10**, 483.
- [89] S. Takeda, H. Takeya, S. Iwanaga, *BBA-Proteins Proteom.*, 2012, **1824**, 164.
- [90] J.W. Fox, S.M.T. Serrano, *Toxicon*, 2005, **45**, 969.
- [91] J.W. Fox, S.M.T. Serrano, *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA 2010.
- [92] N.R. Casewell, K. Sunagar, Z. Takacs, J.J. Calvete, T.N.W. Jackson, B.G. Fry, *Venomous Reptiles and Their Toxins. Evolution, Pathophysiology and Discovery*, Oxford University Press: Oxford, UK 2015.
- [93] W. Bode, F.X. Gomisruth, W. Stockler, *Febs Lett.*, 1993, **331**, 134.
- [94] T.S. Kang, D. Georgieva, N. Genov, M.T. Murakami, M. Sinha, R.P. Kumar, P. Kaur, S. Kumar, S. Dey, S. Sharma, A. Vrielink, C. Betzel, S. Takeda, R.K. Arni, T.P. Singh, R.M. Kini, *Febs J.*, 2011, **278**, 4544.
- [95] A.S. Kamiguti, M. Zuzel, R.D.G. Theakston, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1998, **31**, 853.
- [96] R. Marques-Porto, I. Lebrun, D.C. Pimenta, *Comp. Biochem. Phys. C.*, 2008, **147**, 424.
- [97] G.V. Odell, E.C. Ferry, L.M. Vick, A.W. Fenton, L.S. Decker, R.L. Cowell, C.L. Ownby, J.M. Gutierrez, *Toxicon*, 1998, **36**, 1801.
- [98] J.M. Gutierrez, T. Escalante, A. Rucavado, C. Herrera, *Toxins*, 2016, **8**, 4.
- [99] J. Watly, E. Simonovsky, R. Wieczorek, N. Barbosa, Y. Miller, H. Kozlowski, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 13, 6675.
- [100] J. Watly, E. Simonovsky, N. Barbosa, M. Spodzieja, R. Wieczorek, S. Rodziewicz-Motowidlo, Y. Miller, H. Kozlowski, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 7692.
- [101] D. Brasili, J. Watly, E. Simonovsky, R. Guerrini, N.A. Barbosa, R. Wieczorek, M. Remelli, H. Kozlowski, Y. Miller, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 5629.

BUDOWA I FUNKCJE UKŁADÓW BIAŁKOWO-LIPIDOWYCH

STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEIN-LIPID SYSTEMS

**Adriana Litwińczuk-Mammadova,
Katarzyna Cieślik-Boczula*, Maria Rospenk**

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

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

**e-mail: katarzyna.cieslik@chem.uni.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Lipidowe matryce błon

1.1. Agregaty lipidowe

1.2. Liposomy

1.3. Przejścia fazowe dwuwarstwy

1.4. Hydratacja warstwy lipidowej

1.5. Wpływ kwasowości i siły jonowej na strukturę dwuwarstwy lipidowej

2. Białka błonowe

2.1. Białka integralne

2.2. Peryferyjne białka błonowe: α -laktoalbumina

2.2.1. Natywna postać α -laktoalbuminy

2.2.2. Forma „stopionej globuli”

2.2.3. Oddziaływanie α -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Adriana Litwińczuk-Mammadova ukończyła studia magisterskie w 2010 roku na kierunku Informatyka Chemiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2016 po publicznej obronie rozprawy doktorskiej pt. „Chemometrycznie wspomagana analiza oddziaływanie α -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową”. Jej zainteresowania naukowe obejmują oddziaływanie w układzie białkowo-lipidowym, przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, pośrednie stany konformacyjne białek i aplikacje metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych.

Dr Katarzyna Cieślik-Boczula w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizyko-chemicznych badań cieni erytroцитów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo -zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.

Prof. dr hab. Maria Rospenk absolwentka chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiążania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnętrzcząsteczkowym wiążaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy Profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnętrz- i międzycząsteczkowego wiążania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.

ABSTRACT

Biomembranes play many structural and functional roles in both prokaryotic and eukaryotic cells [10]. They define compartments, the communication between the inside and outside of the cell. The main components of biomembranes are lipids and proteins, which form protein-lipid bilayer systems [10]. A structure and physicochemical properties of protein-lipid membranes, which determines biological activities of biomembranes, are strongly dependent on interactions between lipid and protein components and external agents such as a temperature, pH, and a membrane hydration [4]. A lipid bilayer matrix serves as a perfect environment for membrane proteins (Fig. 1), and it assures activities of these proteins. Because biomembranes are composed of many different groups of lipids and proteins and have a complex structure, it is difficult to study in details their physicochemical properties using physicochemical methods. For these reason, lipid membranes of liposomes are used in many scientific laboratories for studding processes associated with a lipid phase transition, a membrane hydration, or protein-membrane interactions. The structure of liposomes (Fig. 5), and an influence of pH and an ionic strength on a lipid bilayer structure are discussed in the presented work. The role of membrane proteins in determination of biological activities of biomembranes is highlighted. A high variety of a structure and an enzymatic activity of membrane proteins is responsible for a high diversity of biological functions of cell membranes [2]. α -Lactalbumin (α -LA) is a peripheral membrane protein (Figs 8 and 9), its biological function is strongly related to its conformational structure and interaction with lipid membranes [49]. The complex of α -LA in a molten globule conformational state with oleic acid, termed as a HAMLET complex, are disused in a context of its anti-tumor activity.

Keywords: lipid-protein interactions, DPPC liposomes, phase transitions, α -lactalbumin, complex HAMLET/BAMLET, molten globule state

Słowa kluczowe: odziaływanie białko-lipid, liposomy DPPC, przejścia fazowe, α -laktoalbumina, kompleks HAMLET/BAMLET, stopiona globula

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

α -LA	– α -laktoalbumina (ang. <i>αlactalbumin</i>)
BAMLET	– kompleks bydlęcej α -laktoalbuminy i kwasu oleino-wego indywidualnego apoptozę komórek nowotworowych (ang. <i>bovine α-lactalbumin made lethal to tumor cells</i>)
CMC	– krytyczne stężenie micelizacji (ang. <i>critical micelle concentration</i>)
DPPC	– dipalmitoilofosfatylocholina (ang. <i>dipalmitoilphosphatidylcholine</i>)
FRET	– fluoresencyjne rezonansowe przeniesienie energii, homoFRET – efekt występujący między flouroforami jednego rodzaju (ang. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GUVE	– gigantyczne jednowarstwowe liposomy (ang. <i>giant unilamellar vesicles</i>)
GT	– galaktozylotransferaza (ang. <i>galactosyltransferase</i>)
HAMLET	– kompleks ludzkiej α laktoalbuminy i kwasu oleino-wego indywidualnego apoptozę komórek nowotworowych (ang. <i>human αlactalbumin made lethal to tumor cells</i>)
H	– heksagonalna symetria upakowania (ang. <i>hexagonal packing</i>)
H_I	– normalna faza heksagonalna (ang. <i>normal hexagonal phase</i>)
H_{II}	– odwrócona faza heksagonalna (ang. <i>inverted hexagonal phase</i>)
L_a	– lamelarna faza ciekłokrystaliczna (ang. <i>lamellar liquid crystalline</i>)
L_β	– lamelarna faza żelowa (ang. <i>lamellar gel phase</i>)
L_c	– lamelarna faza krystaliczna (ang. <i>lamellar crystalline phase</i>)
LUV	– duże jednowarstwowe liposomy (ang. <i>large unilamellar vesicles</i>)
MG	– stopiona globula (ang. <i>molten globule</i>)
MLV	– wielowarstwowe liposomy (ang. <i>multilamellar vesicles</i>)
MVV	– wieloprzeczykowe liposomy (ang. <i>multivesicular vesicles</i>)
O_\perp	– ortorombowa symetria upakowania (ang. <i>orthorhombic packing</i>)

OLV	<ul style="list-style-type: none">– kilkuwarstwowe liposomy (ang. <i>oligolamellar vesicles</i>)
$P_{\beta'}$, $P_{\beta'}$, PC	<ul style="list-style-type: none">– pofałowana faza żelowa (ang. <i>rippled gel phase</i>)– pofałowana faza żelowa (ang. <i>rippled gel phase</i>)– fosfatydylocholiny (ang. <i>phosphatidylcholines</i>)
S	<ul style="list-style-type: none">– parameter upakowanie cząsteczki lipidu
SDS	<ul style="list-style-type: none">– dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SUV	<ul style="list-style-type: none">– małe jednowarstwowe liposomy (ang. <i>small unilamellar vesicles</i>)
T_m	<ul style="list-style-type: none">– temperatura głównego przejścia fazowego (ang. <i>main phase transition temperature</i>)
T_p	<ul style="list-style-type: none">– temperature przedprzejścia (ang. <i>pretransition temperature</i>)
T_s	<ul style="list-style-type: none">– temperature subprzejścia (ang. <i>subtransition temperature</i>)
$T_{//}$	<ul style="list-style-type: none">– trójskośna symetria upakowania (ang. <i>triclinic packing</i>)
UDP-Gal	<ul style="list-style-type: none">– urydynodwufosforan galaktozy (ang. <i>uridine diphosphate glucose</i>)

WPROWADZENIE

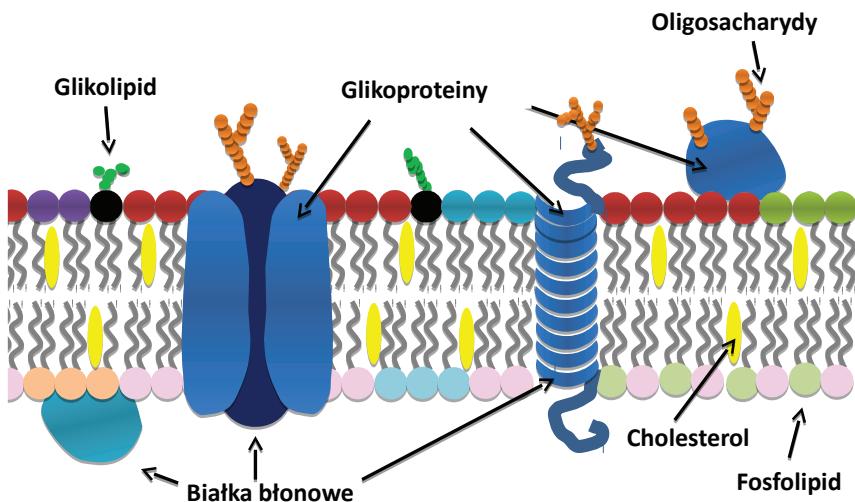
Obecność błon komórkowych jest wspólną cechą organizmów eukariotycznych i prokariotycznych. Błony plazmatyczne izolują komórki i nadają im indywidualny charakter. Dodatkowo, u eukariotów, błony wewnętrzkomórkowe otaczają organelle, takie jak, mitochondria, jądro komórkowe, chloroplasty i lizosomy. Tworzą przedziały międzykomórkowe utrzymujące indywidualny skład jonów i określoną wartość pH wydzielonej przestrzeni. Dzięki obecności specyficznych białek błonowych działających jako kanały, przekaźniki, receptory, pompy czy transformatory energii i enzymów, dwuwarstwy białkowo-lipidowe uczestniczą w kontrolowanym transporcie między oddzielanymi obszarami i tym samym umożliwiają ich integralność. Odgrywają także zasadniczą rolę w komunikacji biologicznej uczestnicząc w przekazie informacji lub samodzielnie generując sygnały o charakterze chemicznym lub elektrycznym. Tak różnorodne funkcje biologiczne jakie pełnią błonowe układy białkowo-lipidowe występują dzięki ich specyficznej budowie, w której lipidowa macierz błonowa stanowi idealne środowisko dla funkcjonowania białek błonowych o szerokim spektrum działania. Duża różnorodność w strukturze i składzie chemicznym błonowych dwuwarstw lipidowych ogranicza ich szczegółową analizę strukturalną w badaniach z wykorzystaniem metod fizykochemicznych. Z tego powodu, w badaniach złożonych układów błon biologicznych powszechnie stosuje się liposomalne modele błon lipidowych. Na ich podstawie zostaną omówione przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, ich hydratacja oraz wpływ kwasowości i siły jonowej na strukturę błon lipidowych. W kolejnych rozdziałach pracy zostanie podkreślona rola białek błonowych, których duża różnorodność w aktywności jest odpowiedzialna za złożone funkcje biologiczne błon komórkowych. Rola peryferyjnych białek błonowych, zależna od struktury modyfikowanej stanem fizykochemicznym dwuwarstwy lipidowej i czynnikami zewnętrznymi zostanie opisana na przykładzie α -laktoalbuminy.

1. LIPIDOWE MATRYCE BŁON

W 1925 r. Gorter i Grendel [1] na podstawie badań nad czerwonymi krwinkami dowiedli, że błony biologiczne zawierają lipidy zorganizowane w dwuwarstwy. Pół wieku później, Singer i Nicolson [2], zaprezentowali model błony biologicznej określany mianem „płynnej mozaiki”. W modelu tym rdzeniem błony jest płynna dwuwarstwa lipidowa penetrowana przez białka (Rys. 1). Błony biologiczne cechuje asymetryczność wynikającą z obecności odrébnego typu lipidów i białek wewnętrznej i zewnętrznej warstwie lipidowej. Białka i niektóre lipidy tworzące zewnętrzną powierzchnię błony, dodatkowo zawierają krótkie łańcuchy cukrowe i nazywane są odpowiednio glikoproteinami i glikolipidami. Integralność składników białkowo-lipidowych błon biologicznej zapewniają słabe oddziaływanie międzycząsteczkowe. Model „płynnej mozaiki” podkreśla dynamiczność struktury

błony biologicznej, której komponenty wykazują silną mobilność i zdolność do wykonywania ruchów lateralnych w obrębie błony [1].

Zgodnie z przedstawionym schematem błony biologiczne stanowią bardzo złożony i wieloskładnikowy układ. Z tego powodu, w badaniach nad ich właściwościami i oddziaływaniem z innymi cząsteczkami, powszechnie stosuje się modelowe sztuczne błony, w których macierz lipidowa przedstawiona jest poprzez zorientowaną dwuwarstwę lipidową, najczęściej jedno- lub dwuskładnikową [3].



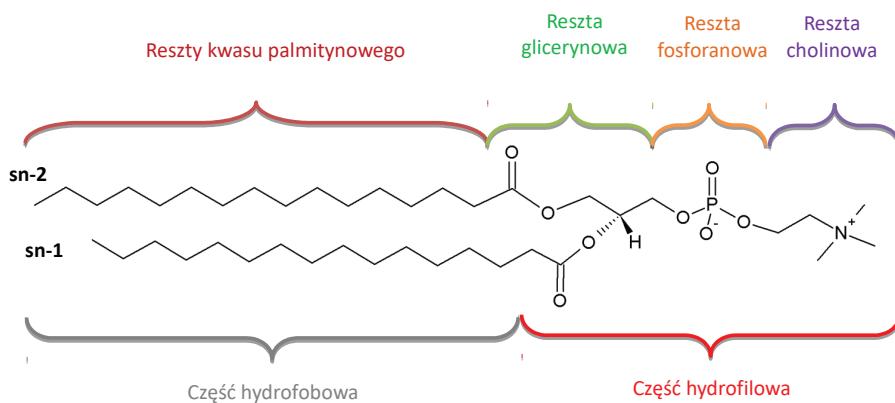
Rysunek 1. Schemat budowy błony biologicznej jako „pływnej mozaiki”
Figure 1. A fluid mosaic model of a structure of biological membrane

Lipidy budujące rdzeń błony biologicznej stanowią heterogenną grupę biocząsteczek, które praktycznie nie rozpuszczają się w wodzie, natomiast dobrze w rozpuszczalnikach niepolarnych [4, 5]. Pomimo znacznego zróżnicowania składu lipidowego błony, ściśle zależnego od miejsca jej występowania, w strukturze dwuwarstwy lipidowej występują trzy główne typy lipidów: fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol. Wśród fosfolipidów występujących w błonach plazmatycznych najliczniejszą grupę stanowią fosfatydylocholiny (PC), gdzie cholina jest połączona wiązaniem estrowym z grupą fosforanową [6, 7].

Jednym z najczęściej stosowanych fosfolipidów w preparacji sztucznych błon lipidowych jest dipalmitoilofosfatydylocholina (DPPC) (Rys. 2). Uzyskane modele w znacznym stopniu odzwierciedlają właściwości naturalnych błon biologicznych, z tego powodu są chętnie wykorzystywane zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i obliczeniowych [8].

Kolejną klasą cząsteczek lipidów wchodzących w skład błon biologicznych, reprezentowaną w mniejszej liczbie, są zawierające jednostki cukrowe glikolipidy. Związki te występują przede wszystkich w tkankach układu nerwowego, np. 21% glikolipidów buduje otoczkę mielinową szczurzego mózgu [6, 7]. Ponadto, w bło-

nach komórkowych zwierząt występuje również cholesterol, który dzięki swojej sztywnej strukturze reguluje płynność błon biologicznych.



Rysunek 2 . Schemat budowy cząsteczki DPPC
Figure 2. A structure of DPPC molecule

1.1. AGREGATY LIPIDOWE

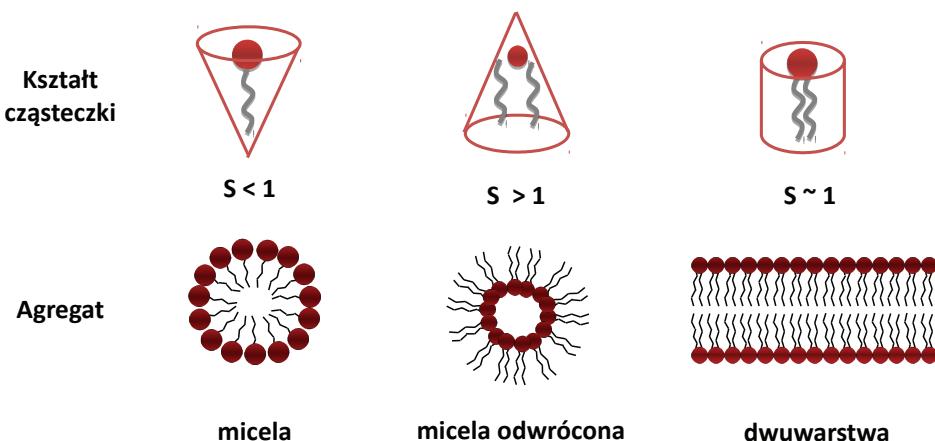
Lipidy wykazują amfibilowy charakter wynikający z obecności w jednej cząsteczce zarówno fragmentu o właściwościach hydrofilowych („polarna główka”) jak i hydrofobowych („ogon węglowodorowy”). Amfibilowość powoduje, że lipidy w rozpuszczalniku organizują się spontanicznie [7, 9, 10]. Przy niskich stężeniach, cząsteczki amfibilu w środowisku wodnym pozostają zwykle w postaci monomerycznej. Wzrost stężenia lipidu powyżej wartości tzw. krytycznego stężenia miceliacji (ang. *critical micelle concentration*, CMC) powoduje samoorganizację lipidów w przestrzenne struktury o różnej morfologii [11, 12]. Zasadniczą siłą tego procesu są oddziaływanie hydrofobowe. Ograniczenie kontaktów części hydrofobowej z polarnymi cząsteczkami wody powoduje znaczny wzrost uporządkowania całego układu. Ponadto, korzystne oddziaływanie van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi oraz oddziaływanie przez wiązania wodorowe i elektrostatyczne części polarnej cząsteczki lipidu, dodatkowo stabilizują powstałe formy [5, 10]. Siła oddziaływań międzycząsteczkowych, która odzwierciedla sposób agregacji zależy od kształtu cząsteczki lipidu (Rys. 3).

Typ formowanej struktury przestrzennej można przewidzieć na podstawie wartości tzw. parametru upakowania S , wyrażonego wzorem:

$$S = \frac{V}{al}$$

gdzie V oznacza objętość części hydrofobowej, a – powierzchnie przekroju poprzecznego części polarnej, l – długość łańcucha węglowodorowego. Cząsteczka amfibilu,

której grupy częściowej zajmują większy obszar niż łańcuchy alifatyczne ($S < 1$), ma kształt klinu i w środowisku wodnym tworzy micely. Natomiast, forma odwróconej miceli jest charakterystyczna dla cząsteczek o kształcie stożka, w których część hydrofobowa zajmuje większą objętość niż polarna głowa ($S > 1$). Obie struktury organizują się w cylindryczne nielameralne fazy, odpowiednio: heksagonalną H_I i heksagonalną odwróconą H_{II} . Cząsteczki lipidu, których część polarna i apolarna zajmują podobne obszary ($S \sim 1$), w wodzie grupują się w lamelarną strukturę dwuwarstwy, a przy większych stężeniach tworzą wielowarstwę [11, 13]. Przykładem związków, których cząsteczka ma kształt klinu są lizofosfolipidy i detergenty. Natomiast, odwrócone micely są charakterystyczne dla fosfatydyloloetanolaminy [13]. Wartości CMC dla ich form micelarnych znajdują się w granicach od 10^{-5} do 10^{-2} mol/dm³ [11]. Dla dwuwarstw tworzonych przez cząsteczki lipidu np. fosfatydylcholiny (PC), sfingomieliny [13], parametr CMC przyjmuje wartości z zakresu od 10^{-10} do 10^{-6} mol/dm³ [11]. Natomiast, uwodnienie cząsteczek PC w znacznym nadmiarze wody, prowadzi do powstania zawiesiny dwuwarstwowych agregatów, zwanych liposomami [11].



Rysunek 3. Zależność struktury agregatów lipidowych od kształtu cząsteczki amfifilowej lipidej przedstawiona na podstawie danych z literatury [11–13]

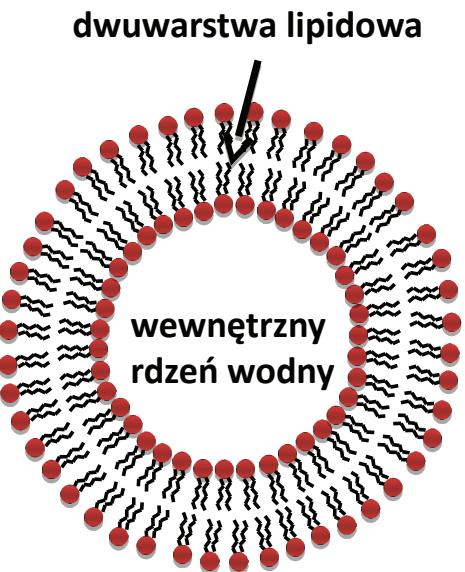
Figure 3. The dependence of a shape of lipid molecules on the aggregation structure based on the literature data [11–13]

Sposób agregacji można kontrolować poprzez zmianę czynników zewnętrznych. Kwasowość środowiska determinuje strukturę przestrzenną cząsteczek lipidej PC i PS. Przy pH obojętnym cząsteczki te organizują się w dwuwarstwy, po zakwaszeniu próbki agregują w postać odwróconej fazy heksagonalnej H_{II} . Wolna cząsteczka kardiolipiny chętnie przyjmuje strukturę dwuwarstwy, jednak po koordynacji kationu wapnia, preferuje formowane odwróconej miceli. W zależności od rodzaju lipidu, czynnik temperaturowy może powodować zmianę typu agregacji lub właściwości fizycznych agregatu przy zachowaniu jego ogólnej struktury. Wraz ze

wzrostem temperatury dwuwarstwy fosfatydyloloetanolaminy przechodzą w odwróconą fazę heksagonalną H_{II} [13].

1.2. LIPOSOMY

Niski stosunek liczby cząsteczek amfifilu do cząsteczek rozpuszczalnika utrudnia powstanie ciągłej fazy lameralnej [11]. W obszarze swobodnych krawędzi dwuwarstw dochodzi do niekorzystnych energetycznie kontaktów łańcuchów węglowodorowych z cząsteczkami wody. Dążąc do zminimalizowania energii układu, dwuwarstwy reorganizują się spontanicznie, zamkując struktury lamelarne w szczelny pęcherzyk lipidowy [15–17]. Nanopęcherzyki zawierające wewnętrzny rdzeń wodny otoczony przez koncentrycznie rozmieszczone dwuwarstwy lipidowe określa się jako liposomy (Rys. 4).

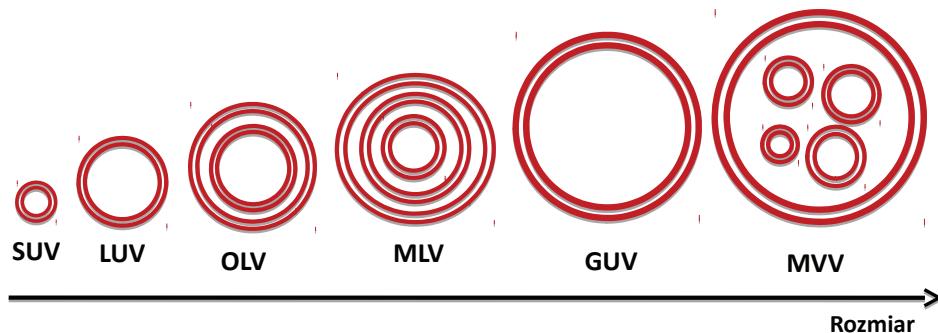


Rysunek 4. Przekrój pęcherzyka lipidowego zbudowanego z pojedynczej dwuwarstwy lipidowej
Figure 4. The cross-section of single bilayer lipid vesicle

W latach 60. ubiegłego wieku, Bangham jako pierwszy zaobserwował tworzenie liposomów w trakcie prowadzonych badań nad fosfolipidami i skrzepami krwi [16, 18, 20, 21]. Od tego momentu, są one przedmiotem szerokich badań w dziedzinie biochemii, medycyny, farmacji, kosmetologii i w technologii żywności. Liposomy z powodu podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego do naturalnych błon komórkowych, stały się nośnikami leków,抗原, białek błonowych, sond diagnostycznych i innych związków chemicznych w transporcie do komórki docelowej [16–19].

Liposomy klasyfikuje się na podstawie rozmiaru i liczby dwuwarstw (Rys. 5):

- małe jednowarstwowe liposomy (ang. *Small Unilamellar Vesicles*, SUV), których średnica przyjmuje wartości z zakresu od 20 do 100 nm,
- duże jednowarstwowe liposomy (ang. *Large Unilamellar Vesicles*, LUV) o średnicy powyżej 100 nm,
- olbrzymie jednowarstwowe liposomy (ang. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) o średnicy powyżej 1000 nm,
- kilkuwarstwowe liposomy (ang. *Oligolamellar Vesicles*, OLV), w których rdzeń wodny jest otoczony przez kilka centrycznie ułożonych dwuwarstw o średnicy 100–500 nm,
- wielowarstwowe liposomy (ang. *Multilamellar Vesicles* (MLV) zawierające znacznie większą liczbę dwuwarstw niż OLV, a ich średnica przekracza 500 nm,
- wielopęcherzykowe liposomy (ang. *Multivesicular Vesicles*, MVV) o średnicy przekraczającej 1000 nm, we wnętrzu których występuje kilka mniejszych liposomów.

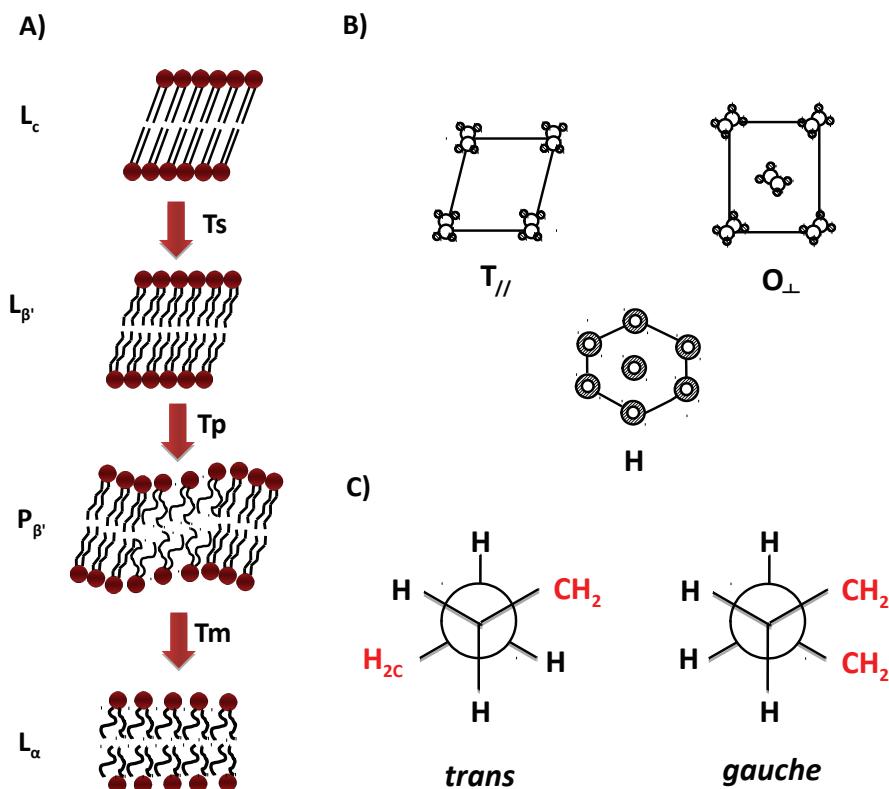


Rysunek 5. Klasyfikacja liposomów ze względu na rozmiar i liczbę dwuwarstw
Figure 5. The classification of liposomes based on a size and a number of bilayers

1.3. PRZEJŚCIA FAZOWE DWUWARSTWY LIPIDOWEJ

Dwuwarstwy lipidowe wykazują duży polimorfizm strukturalny w funkcji temperatury. Temperaturowe przejścia fazowe są uwarunkowane cechami budowy cząsteczek lipidu, i tak np. wydłużenie łańcuchów węglowodorowych podwyższa temperaturę przejścia fazowego. Zasadnicze znaczenie w determinacji temperatury przejścia fazowego mają również: stopień nasycenia acylowych łańcuchów lipidowych, stopień hydratacji dwuwarstwy, kwasowość oraz obecność jonów, cząsteczek cukrów, aminokwasów i cholesterolu. W pełni uwodniona dwuwarstwa DPPC przechodzi przez trzy przejścia fazowe przy zmianie temperatury od 18 do 42°C (Tab. 1 i Rys. 6 A), podczas których dochodzi do zmiany parametrów upakowania (Rys. 6 B). W trakcie grzania wzrostowi swobody ruchu cząsteczek towarzyszy

wzrost uwodnienia. Proces ten wynika między innymi z osłabienia oddziaływań elektrostatycznych i van der Waalsa [22].



Rysunek 6. (A) Graficzna projekcja przejść termotropowych uwodnionych dwuwarstw DPPC, przedsatwiona na podstawie danych z literatury [28–30]. (B) Rodzaje bocznego upakowania cząsteczek lipidowych w dwuwarstwie lipidowej: trójskośne ($T_{//}$), ortorombowe (O_{\perp}), heksagonalne (H) [26]. (C) Typy konformacji wiązań C-C łańcuchów alkilowych dwuwarstw lipidowych [31]

Figure 6. (A) Graphical representation of thermotropic transitions in fully hydrated DPPC bilayers based on the literature data [28–30]. (B) Lateral lipid chain-packing in a lipid bialayre: the triclinic ($T_{//}$), the orthorhombic (O_{\perp}), the hexagonal (H) [33]. (C) Conformations of C-C bonds in the lipid alkyl chains [31]

Tabela 1. Parametry termodynamiczne przejść fazowych dla uwodnionych dwuwarstw DPPC przedsatwione na podstawie danych z literatury [14]

Table 1. The thermodynamic parameters of phase transitions in fully hydrated DPPC bilayers based on the literature data [14]

Typ przejścia fazowego	$L_c \rightarrow L_{\beta'}$	$L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$	$P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$
Temperatura (°C)	$18,8 \pm 3,1$	$34,4 \pm 2,5$	$41,3 \pm 3,1$
ΔH (kcal/mol)	$3,4 \pm 1,1$	$1,3 \pm 1,0$	$8,2 \pm 1,4$

W zakresie niskich temperatur, dwuwarstwa DPPC znajduje się w fazie kryształicznej oznaczanej w nomenklaturze Luzzatiego symbolem L_c (ang. *lamellar crystalline phase*) [23]. Faza L_c charakteryzuje się uporządkowanymi, wydłużonymi i sztywnymi lipidowymi łańcuchami węglowodorowymi, których nachylenie względem normalnej dwuwarstwy wynosi 28° . Ponadto, wszystkie łańcuchy węglowodorowe znajdują się w konformacji typu *all-trans*. Sztywna trójskośna ($T_{\parallel\parallel}$) symetria upakowania łańcuchów węglowodorowych efektywnie utrudnia rotację wzduż wiązań węgiel-węgiel [24, 25]. Ciasne ułożenie polarnych główek lipidowych ogranicza ich ruch i uniemożliwia penetrację cząsteczek wody w głąb dwuwarstwy [25]. Dalszy wzrost temperatury powoduje przemianę z fazy kryształicznej do fazy żelowej (ang. *lamellar gel phase*, L_β), tzw. subprzejście (T_s) [14]. Dochodzi wówczas do spadku uporządkowania i zmiany symetrii bocznego upakowania cząsteczek lipidowych na ortorombowe (O_\perp), gdzie kąt nachylenia łańcuchów alifatycznych względem normalnej dwuwarstwy wynosi 32° [25–27]. W wyniku rozluźnienia struktury rośnie poziom hydratacji części polarnej i przyrasta grubość dwuwarstwy z 59 \AA do 64 \AA [28]. Kolejny wzrost temperatury wywołuje pojawienie się w obrębie dwuwarstwy domen zawierających cząsteczki DPPC bogate w konformację *gauche* łańcuchów alifatycznych (Rys. 6 C). Powoduje to dalszy wzrost nieuporządkowania prowadzący do heksagonalnej symetrii upakowania (H). Stan ten charakteryzuje wzrost hydratacji, swobody rotacji w łańcuchach alifatycznych oraz zwiększenie grubości dwuwarstwy do wartości 67 \AA [35]. Tak przedstawioną fazę określa się mianem pofałdowanej fazy żelowej (ang. *rippled gel phase*, P_β), a przemianę z L_β do P_β przedprzejściem [14, 25].

W temperaturze około 41°C dwuwarstwa DPPC ulega ogólnemu przejęciu fazowemu i przechodzi do fazy ciekłokryształicznej (ang. *liquid-crystalline phase*, L_α) [14]. Ta przemiana jest zdominowana topnieniem łańcuchów alkilowych. Wzrost liczby zagięć łańcucha alifatycznego (około 4–5 wiązań gauche na łańcuch) powoduje skrócenie ich długości i wzrost zajmowanej objętości [25], a także zaburzenie symetrii heksagonalnego upakowania lateralnego. W wyniku bocznego rozprężenia dwuwarstwa staje się cieńsza (60 \AA) [28]. Ponadto, faza L_α cechuje się największym stopniem nieuporządkowania, swobodą ruchu, rozluźnieniem warstw oraz dużą płynnością [25].

Błony biologiczne komórek żywych organizmów najczęściej występują w fazie ciekłokryształicznej. Ich płynność jest regulowana zawartością różnych substancji takich jak: cholesterol lub woda. Płynność determinuje ruchliwość cząsteczek budujących błonę, których ruch może odbywać się na drodze dyfuzji rotacyjnej i lateralnej [14]. Dodatkowo, fosfolipidy mogą ulegać ruchowi typu „*flipflop*”, podczas którego mogą przemieszczać się między sąsiednimi monowarstwami [5].

1.4. HYDRATACJA WARSTWY LIPIDOWEJ

Rodzaj i liczba faz termotropowych silnie zależy od stopnia uwodnienia dwuwarstwy lipidowej. Dehydratacja powoduje zanik fazy P_β i znaczne podwyższenie temperatury głównego przejścia fazowego (T_m), która dla całkowicie odwodnionej dwuwarstwy zwanej także suchym filmem, wynosi $99,3^\circ\text{C} \pm 3,3^\circ\text{C}$ [14]. Podwyższenie T_m o blisko 58°C jest wynikiem powstania sieci wiązań wodorowych w części polarnej dwuwarstwy. W oddziaływanie przez wiązanie wodorowe zaangażowany jest atom wodoru pochodzący od cholinowej grupy metylowej pierwszej cząsteczki DPPC i atom tlenu grupy drugiej cząsteczki DPPC. Konsekwencją utworzenia sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, jest reorientacja fragmentu cholinowego, który w suchym filmie DPPC ustawiony jest równolegle do powierzchni dwuwarstwy [32, 33].

W trakcie uwadniania suchego filmu, cząsteczki wody penetrują część polarną. Badania nad oddziaływaniem cząsteczek wody z fosfolipidami są zazwyczaj prowadzone z wykorzystaniem metod obliczeniowych [4, 33–35]. Cząsteczki wody zrywają sieć oddziałujących wodorowych między atomem wodoru części cholinowej i atomem tlenu części fosforanowej kolejnych cząsteczek lipidu. W wyniku uwolnienia, grupa cholinowa zmienia położenie i układa się prostopadle do powierzchni błony [34]. Obliczenia teoretyczne dla dwuwarstwy w fazie żelowej wykazały, że tlen grupy fosforanowej może tworzyć maksymalnie trzy wiązania wodorowe. Natomiast, z powodu bliskości części hydrofobowej, każdy atom tlenu fragmentu COPOC i grup C=O może tworzyć maksymalnie jedno wiązanie z wodą [35].

Jedna cząsteczka PC wchodząca w skład dwuwarstwy w fazie L_β może teoretycznie utworzyć do 11 wiązań wodorowych. Natomiast, dwuwarstwa w fazie ciekłokrystalicznej charakteryzuje się niemal dwa razy większą zawartością wody, 20,5 cząsteczek wody przypada na jedną cząsteczkę PC. Z kolei, cząsteczki wody mogą tworzyć mostki wewnętrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe. Pierwszy typ mostków powstaje poprzez oddziaływanie z dwoma atomami tlenu grupy fosforanowej jednej cząsteczki. Natomiast, w drugim przypadku formowany jest mostek typu PC-woda-PC [35]. Oddziaływanie przez wiązanie wodorowe między wodą a cząsteczkami PC są stale zrywane i tworzone na nowo. Powstała w ten sposób dynamiczna sieć wiązań wodorowych stabilizuje strukturę przestrzenną warstwy lipidowej. Występowanie „mostków wodorowych” w strukturze dwuwarstwy PC potwierdzono w badaniach krystalograficznych [4, 34].

1.5. WPŁYW KWASOWOŚCI I SIŁY JONOWEJ NA STRUKTURĘ DWUWARSTWY LIPIDOWEJ

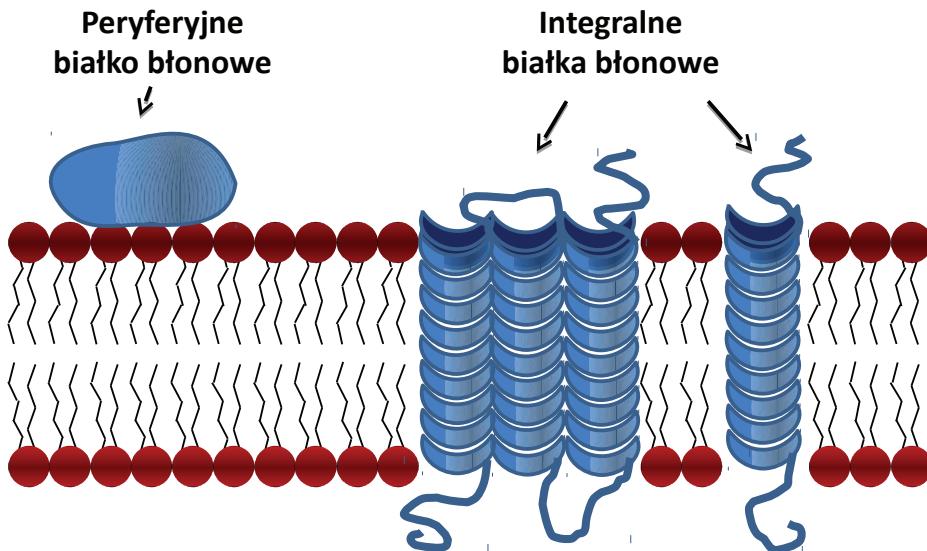
Struktura i własności fizyczne błon lipidowych są modyfikowane przez zmianę kwasowości i siły jonowej otaczającego je medium [36]. W obrębie dwuwarstwy zbudowanej z cząsteczek PC, gęstość elektronowa jest ulokowana na atomie tlenu części

fosforanowej, natomiast w części cholinowej występuje deficyt elektronów. Taka separacja ładunków powoduje, że część polarna cząsteczki PC przy pH neutralnym występuje w postaci jonu obojnaczego (zwitterjonu) [37]. Obniżenie wartości pH prowadzi do zniesienia zwitterjonowej postaci cząsteczek PC w wyniku protonacji grupy PO_2^- ($\text{pK} = 3,8\text{--}4,0$) [38, 39]. Cząsteczki PC stają się wówczas dodatnio naładowane na atomie azotu grupy cholinowej, co powoduje ich wzajemne odpychanie [40]. Te niekorzystne siły odpychające są kompensowane przez wiązania wodorowe typu $\text{PO}\cdots\text{HOP}$, tworzone między sprotojonowanymi grupami fosforanowymi kolejnych cząsteczek PC [14]. Powstała sieć wiązań wodorowych stabilizuje błonę lipidową poprzez zmniejszenie efektywności odpychania między dodatnio naładowanymi główkami [40], to z kolei prowadzi do zwiększenia siły oddziaływań van der Waalsa między hydrofobowymi łańcuchami alifatycznymi. O dominacji oddziaływań przyciągających nad odpychającymi w obrębie dwuwarstwy PC świadczy fakt podwyższenia temperatury głównego przejścia fazowego błony lipidowej w wyniku wzrostu kwasowości układu [14]. Jednym z dowodów na obecność wiązań wodorowych typu $\text{PO}\cdots\text{HOP}$ jest ograniczenie dyfuzji cząsteczek PC w obrębie dwuwarstwy lipidowej [41].

Ważnymi czynnikami zmieniającymi właściwości fizykochemiczne błony są jony jedno- i dwuwartościowe, które występują w naturalnej błonie lipidowej. Sposób oddziaływania błona-jony jest regulowany m.in. przez zmianę wartości pH. Zmiany wartości pH cytosolu stymulują wzrost i rozwój komórki oraz regulują oddziaływanie elektrostatyczne matrycy lipidowej z jonami (m.in. Ca^{2+} , Na^+ i Cl^-) w wielu procesach biologicznych. Przykładowo, gdy wartość pH medium jest większa od $\text{pK}_{\text{a},1}$ cząsteczki DPPC, jon Ca^{2+} wchodzi w oddziaływanie z błoną i inicjuje jej fuzję. Kation wapnia wypiera cząsteczki wody z mostka pomiędzy dwoma grupami PO_2^- sąsiednich cząsteczek PC i prowadzi do reorientacji polarnej główkii [42]. Powstały kompleks PC-Ca $^{2+}$ powoduje lokalną dehydratację i zwiększenie uporządkowania struktury lipidowej. Wpływ kationu wapnia na własności fizyczne dwuwarstwy silnie uwarunkowany jest jego stężeniem [43], i tak, przy stężeniach jonu Ca $^{2+}$ większych od 10 mM następuje zanik przedprzejścia i wzrost temperatury głównego przejścia fazowego do 43°C w wyniku stabilizacji struktury błony lipidowej [44]. Jony jednowartościowe (np. Na^+ i Cl^-) mają znacznie mniejszy wpływ na błonę i zaburzają strukturę warstwy dopiero przy stężeniach powyżej 300 mM [45, 46]. Z powodu niewielkiego promienia van der Waalsa, jony sodu penetrują dwuwarstwę i akumulują się w części glicerynowej. Oddziaływanie Na^+ z tlenem grupy karboksylowej redukuje mobilność kompleksu. Jony Cl $^-$ pozostają w oddziaływaniu z atomem azotu części cholinowej [45, 46]. Wykazano, że obecność jonu chloru na powierzchni dwuwarstwy lipidowej zmienia ustawienie części hydrofilowej, jednak nie ma wpływu na jej własności fizyczne [46].

2. BIAŁKA BŁONOWE

Strukturę błony biologicznej określa dwuwarstwa cząsteczek lipidowych, natomiast w jej charakterystycznych funkcjach takich jak np. transport cząsteczek, przekazywanie informacji biologicznej i przemiana energii, uczestniczą białka błonowe [1, 10]. Powszechnie w literaturze [1, 6, 10] stosuje się podział białek błonowych na białka integralne oraz białka powierzchniowe (peryferyjne), które różnią się sposobem związywania z błoną lipidową (Rys. 7).



Rysunek 7. Sposób oddziaływanego białek błonowych z błoną lipidową
Figure 7. Interactions of the membrane proteins with the lipid membrane

2.1. BIAŁKA INTEGRALNE

Białka integralne różnicują się pod względem stopnia osadzenia w matrycy lipidowej. Liczną grupę stanowią białka transbłonowe, które przechodzą jeden lub kilka razy poprzez dwuwarstwę lipidową, w taki sposób, że ich fragmenty hydrofilowe mają kontakt z płynem zewnętrzkomórkowym i cytosolem, natomiast fragmenty hydrofobowe oddziałują z apolarnym wnętrzem dwuwarstwy lipidowej. Niektóre białka błonowe są osadzone częściowo jedynie w monowarstwie błony. Najbardziej powszechnym błonowym motywem strukturalnym występującym w białkach integralnych jest amfipatyczna α -helisa. Jej hydrofobowa powierzchnia utworzona z apolarnych reszt bocznych otacza szkielet polipeptydowy spięty wiązaniami wodorowymi w spiralny kształt [1, 6, 10]. Z powodu współzawodnictwa cząsteczek wody w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy grupami $-\text{NH}$ i $-\text{C=O}$, α -helisa jest bardziej stabilna w środowisku węglowodorowym niż wodnym. Obecność błono-

wego fragmentu heliakalnego można przewidzieć na podstawie sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym białka. Do jej identyfikacji służy zmiana wartości wolnej energii przeniesienia danego aminokwasu ze środowiska apolarnego do wodnego. Jej dodatnia wartość wskazuje, że przeniesienie helisy zbudowanej tylko z np. fenyloalaniny z hydrofobowego wnętrza błony do środowiska wodnego byłoby termodynamicznie niekorzystne. Natomiast, transfer do środowiska polarnego byłby bardzo korzystny energetycznie dla helisy zbudowanej wyłącznie z argininy, ponieważ wartość wolnej energii przeniesienia jest w tym przypadku ujemna [47].

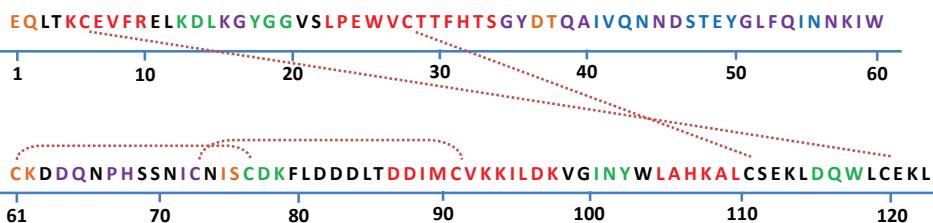
2.2. PERYFERYJNE BIAŁKA BŁONOWE: α -LAKTOALBUMINA

W odróżnieniu do białek integralnych, białka peryferyjne można wydzielić z błony stosując czynniki, które nie niszczą struktury dwuwarstwy lipidowej (np. zmiana wartości pH). Białka powierzchniowe wiążą się z błoną najczęściej w wyniku oddziaływania elektrostatycznego z polarną częścią fosfolipidów [1, 6, 10].

Do białek peryferyjnych należy α -laktoalbumina (α -LA) [48]. Tą metaloproteinę cechuje globularna struktura trzeciorzędowa oraz niska masa cząsteczkowa: 14,2 kDa [49]. α -Laktoalbumina odgrywa zasadniczą rolę w wielu procesach biologicznych. Przede wszystkim, uczestniczy w końcowym etapie biosyntezy laktozy w gruczołach sutkowych ssaków. Na błoniastej powierzchni aparatu Golgi'ego, α -laktoalbumina tworzy kompleks enzymatyczny z galaktozylotransferazą (GT), który katalizuje reakcję urydynodwufosforanu galaktozy (UDP-Gal) z glukozą. Produktem tej reakcji jest laktosa [49, 50].

2.2.1. Natywna postać α -laktoalbuminy

Pierwszorzędowa struktura bydlęcej α -laktoalbuminy stanowi łańcuch polipeptydowy zbudowany z 123 aminokwasów, zakończony resztą kwasu glutaminowego (końcowa grupa aminowa przy N-koniec) i resztą leucyny (końcowa grupa karboksylowa, C-koniec). W sekwencji aminokwasowej bydlęcej α -laktoalbumina występuje osiem reszt cysteinowych świadczących o obecności wiązań disiarczkowych (Rys. 8), które utrzymują globularną strukturę białka [51, 52].



Rysunek 8. Sekwencja reszt aminokwasowych natywnej α -laktoglobuliny pochodzącej z krowiego mleka (Źródło: RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. Elementy struktury drugorzędowej: α -helisa (kolor czerwony), β -kartka (kolor niebieski), β -zgięcia (kolor pomarańczowy), helisa 3₁₀ (kolor zielony), pętle (kolor fioletowy), mostek dwusiarczkowy (czarna linia przerywana)

Figure 8. The amino acid sequence of the native bovine α -lactoglobulin (RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. Secondary structural elements: α -helix (red), β -sheet (blue), β -turn (orange), 3₁₀-helix (kolor green), loop (violet), disulfide bond (red dotted line)

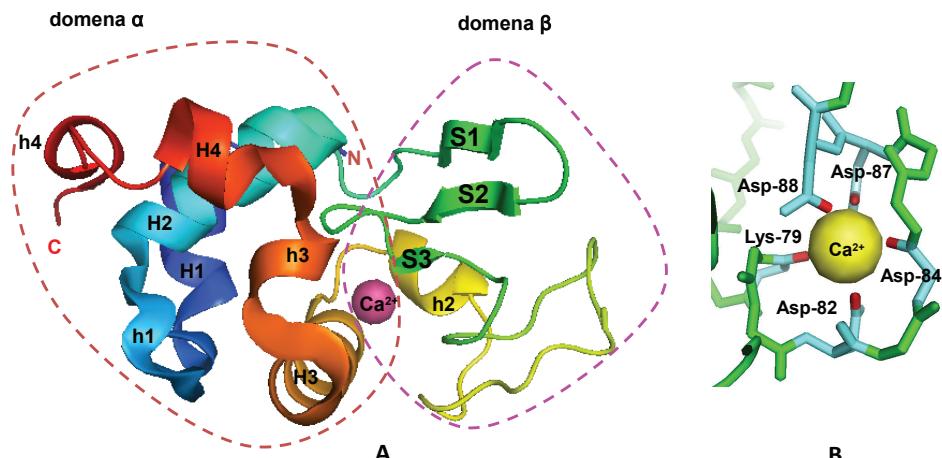
α -Laktoalbumina jest genetycznie i strukturalnie homologiczna do lizozymu typu c. Trójwymiarowa struktura wyznaczona na podstawie rentgenografii strukturalnej potwierdziła podobieństwo drugorzędowych struktur α -laktoalbuminy i lizozymu typu c. Pomimo tego, ich struktura pierwszorzędowa jest identyczna jedynie w 40%. Ta odmiennosć jest ściśle związane ze specyficzną rolą α -laktoalbuminy w syntezie laktozy [49, 51, 52].

Postać natywnej α -laktoalbuminy jest zdefiniowana przez dwie domeny (Rys. 9A). Większa jest domeną ahelikalną, której reszty aminokwasowe należące do obu końcowych odcinków łańcucha polipeptydowego (tj. reszty od pozycji 1 do 34 i od 86 do 123) układają się w przestrzenne formy czterech klasycznych ahelis typu 3,6₁₃ (H1: reszty 511, H2: 2334, H3: 8698, H4: 105109) i trzech krótszych helis typu 3₁₀ (h1: reszty 1820, h3: 101104, h4: 115118). Mniejszą domeną jest β -domena, którą budują reszty aminokwasowe od pozycji 35 do pozycji 85 zorganizowane w następujące struktury: trójsegmentową, antyrównoległą β -kartkę (S1: reszty 4144, S2: 4750, S3: 5556) oraz krótką 3₁₀-helisę (h2: reszty 7780). Te dwie domeny spinają cztery mostki cysteinowe utworzone między resztami: 6120, 6177, 7391 i 28111. Obecność wiązań CysCys oraz koordynacja kationów metali stabilizuje strukturę α LA. Miejsce wiązania jonu wapnia stanowi pętla utworzona przez dwa mostki disiarczkowe (Cys73-Cys91 i Cys61-Cys77) pomiędzy ahelisą (H3, adomena) i 3₁₀-helisą (h2, β -domena). Motyw wiążący wapń w cząsteczce α -laktoalbuminy jest krótszy od typowego fragmentu helisa-pętla-helisa charakterystycznego dla rodzin białek typu „EFhand” [49, 52, 53]. Stała asocjacji jonu Ca²⁺ dla bydlęcej α -laktoalbuminy wyznaczona w temperaturze 20–25°C przy pH 7 wynosi 3 × 10⁸ M⁻¹ [49].

Rysunek 9B przedstawia fragment struktury α -laktoalbuminy stanowiący miejsce wiązania jonu Ca²⁺. Bezpośrednio w koordynacji biorą udział tleny grup karboksylowych reszt Asp82, Asp87 i Asp88 oraz tleny grup karbonylowych reszt Lys79 i Asp84 tworzących szkielet polipeptydowy. Ponadto, w wiązaniu kationu wapnia uczestniczą dwie cząsteczki wody, które są rozlokowane przestrzennie formując zaburzoną bipiramidę pentagonalną. Odległości pomiędzy jonem wapnia i

atomami tlenu białkowego liganda znajdują się w przedziale 2.302.40 Å. Cząsteczka α -laktoalbuminy z jonom Ca^{2+} określana jest jako forma *holo* [49, 52].

Usunięcie jona wapnia z cząsteczki *holo* α -laktoalbuminy np. za pomocą odczynnika EDTA, powoduje pojawienie się niekorzystnych oddziaływań reszt Asp w kieszeni koordynacyjnej. Lokalny nadmiar ładunku wymusza zmianę strukturalną, podczas której dochodzi do reorganizacji α -helisy H3 i uformowania tzw. formy *apo* [52, 54]. Oba izomery różnią się pod względem stabilności termicznej, którą odzwierciedla temperatura przejścia (T_m) ze stanu natywnego do zdenaturowanego. Wartość T_m dla formy *apo* wynosi 34°C, z kolei dla formy *holo* jest o 30°C wyższa i wynosi 64°C [54].



Rysunek 9. (A) Wizualizacja drugorzędowej struktury natywnej holo α -laktoalbuminy pochodzącej z krowiego mleka (Źródło: RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. (B) Wyodrębniony fragment struktury α -laktoalbuminy stanowiący miejsce koordynowania jona wapnia. Atomy tlenu z terminalnych grup reszt aminokwasowych uczestniczących w koordynacji oznaczono kolorem czerwonym. W projekcji nie uwzględniono cząsteczek wody [52]

Figure 9. (A) A visualisation of secondary structure of the native bovine α -lactoglobulin (RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. (B) Th calcium ion-building side of the α -lactoglobulin. Oxygens from terminal groups of amino acid residues involved in the coordination of Ca^{2+} are marked in red. The projection does not include water molecules [52]

2.2.2. Forma „stopionej globuli”

Natywną cząsteczkę α -laktoalbuminy zarówno w postaci *holo* jak i *apo*, można przeprowadzić w formę nazywaną potocznie „stopioną globulą” (z ang. *molten globule*, MG) lub postacią częściowego statystycznego klębka globuli działając takimi czynnikami, jak: silne czynniki denaturacyjne (np. mocznik, chlorowodorek guanidyny) w średnich stężeniach, wysoka temperatura czy zakwaszenie środowiska. Forma stopionej globuli posiada kompaktową strukturę drugorzędową zbliżoną do postaci natywnej oraz jedynie zarys struktury trzeciorzędowej z nieuporządkowanymi i ruchliwymi łańcuchami bocznymi [49]. Konsekwencją braku upakowanej

struktury trzeciorzędowej jest wzrost promienia cząsteczki białka, który podczas przejścia z postaci natywnej do stanu stopionej globuli zmienia się od 15.7 Å do 17.2 Å. Rozluźnienie białka w stanie stopionej globuli ułatwia penetrację cząsteczek wody w głąb jego struktury powodując znaczny wzrost uwodnienia [53].

W wyniku działania czynnika denaturującego, natywna forma białka ulega częściowemu rozpleceniu. Wzrost odległości między łańcuchami bocznymi osłabia siłę oddziaływań van der Waalsa, które stabilizują strukturę trzeciorzędową białka. Związany z tym procesem wzrost energii układu jest bilansowany przez przyrost entropii towarzyszący zwiększeniu amplitudy ruchów międzycząsteczkowych. Jednocześnie w wyniku działania sił hydrofobowych, apolarne łańcuchy boczne są izolowane od środowiska wodnego. Oddziaływanie hydrofobowe stabilizuje strukturę stopionej globuli [49, 55]. Postać stopionej globuli jest uważana za trzeci stan termodynamiczny oddzielony barierą energetyczną od postaci natywnej (N) i rozfałdowanej (U) białka [56]:



Podobna sytuacja może zachodzić w żołądku noworodka karmionego piersią, gdzie α -laktoalbumina pochodząca z mleka matki przechodzi w środowisku kwasów żołądkowych w formę kwasowej stopionej globuli i wiąże się z kwasem oleinowym powstały w wyniku hydrolizy trójglicerydów katalizowanej przez lipazy. W tak utworzonym kompleksie stabilizowanym kwasem oleinowym forma stopionej globuli α -laktoalbuminy w określonych warunkach selektywnie indukuje apoptozę komórek nowotworowych i jest szczególnie skuteczna w walce z czerniakiem i białaczką [53, 57–59]. Kompleks ten jest znany pod nazwą HAMLET (ang. *human α -lactalbumin made lethal to tumor cells*) i porównywany jest do mitycznej Hydry Lernejskiej, ponieważ atakuje jednocześnie najważniejsze organelle komórki nowotworowej. Działanie przeciwnowotworowe wykazuje również kompleks kwasu oleinowego z α -laktoalbuminą otrzymaną z krowiego mleka, który określa się mianem BAMLET (ang. *bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells*) [60]. Stwierdzono, że decydującym momentem w procesie apoptozy jest wiązanie kompleksu HAMLET z powierzchnią błony komórkowej, po którym następuje jego szybka internalizacja przez komórkę nowotworową, gdzie wyniszcza strukturę chromatyny oraz powoduje fragmentację DNA.

Oddziaływanie błona – białko w stanie stopionej globuli, które zachodzi tylko na poziomie zewnętrznej hydrofilowej warstwy błony, jest traktowane jako czynnik, który w głównej mierze decyduje o ataku kompleksu HAMLET na organelle komórki nowotworowej [59]. Za słusznością przedstawionej tezy przemawia fakt, że natywna postać α -laktoalbuminy wyizolowana z serwatki ludzkiego mleka, nie wywołuje apoptozy komórkowej. Autorzy pracy [59] wskazują, że różnice pomiędzy aktywnością biologiczną formy natywnej i stopionej globuli wynikają z odmiennej struktury trzeciorzędowej. Przypuszcza się więc, że dzięki stabilizacji stanu stopio-

nej globuli cząsteczką kwasu oleinowego, białko α LA może skutecznie oddziaływać z błoną lipidową komórki nowotworowej.

2.2.3. Oddziaływanie α -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową

Kluczowym momentem apoptozy komórek nowotworowych przez kompleks HAMLET oraz regulacji laktogenezy jest specyficzne oddziaływanie α -laktoalbuminy w formie stopionej globuli z błoną biologiczną. Powinowactwo α -laktoalbuminy do błony może być modyfikowane odmiennym składem lipidowym błon komórek nowotworowych, jak również czynnikami zewnętrznyimi, np. kwasowością i temperaturą [61, 62]. W neutralnym pH α -laktoalbumina zachowuje się jak białko peryferyjne, które z powodu niskiej aktywności powierzchniowej oddziałuje jedynie z zewnętrzna powierzchnią dwuwarstwy lipidowej w wyniku sił elektrostatycznych. W tej sytuacji penetracja błony jest jedynie możliwa w temperaturze bliskiej temperaturze głównego przejścia fazowego charakterystycznej dla fosfatydylocholin. Redukcja wartości pH, prowadzi do przejścia białka ze stanu natywnego do stanu kwasowej stopionej globuli, podczas którego α -helisy stają się coraz bardziej wyeksponowane w kierunku powierzchni błony. Wówczas, dominującą rolę odgrywają oddziaływanie hydrofobowe, które promują integrację białka z wnętrzem dwuwarstwy lipidowej [62].

Warto podkreślić fakt, że w pewnych zakresach stężeń α -laktoalbumina prowadzi do rozbicia dwuwarstwy lipidowej w wyniku oddziaływań α -helis z apolarnym wnętrzem błony. W literaturze przedstawiono dwie koncepcje dotyczące hipotetycznego kształtu powstałych systemów. Według Hanssens i współpracownicy [63] α -laktoalbumina solubilizuje błonę lipidową i uczestniczy w powstaniu małych micelarnych układów, w których hydrofobowa powierzchnia α -helisy jest odseparowana od roztworu wodnego monowarstwą lipidową. Swoją teorię oparli na obserwacji znacznej redukcji rozproszenia światła dla próbki liposomy/ α -laktoalbumina o pH 4 i 2 przy stosunku molowym obu komponentów w zakresie od 50 do 200.

Dla porównania, Segrest [64] w swoich rozważaniach nad prawdopodobną geometrią asocjatu amfipatycznych α -helis z pęcherzykami lipidowymi zaproponował, że powstały kompleks ma kształt dysku. W centrum tarczy znajduje się dwuwarstwa lipidowa a na jej krawędziach hydrofobowe łańcuchy alkilowe są ekranowane przez amfipatyczne α -helisy.

UWAGI KOŃCOWE

Błonowe układy białkowo-lipidowe wykazują różnorodność w swej strukturze. Stan konformacyjny białek błonowych oraz struktura dwuwarstw lipidowych silnie na siebie wpływają, modyfikując się wzajemnie. To determinuje właściwości biologiczne układów błonowych oraz umożliwia ich regulację. Błonowe białko

α -laktoalbuminy wykazuje zdolność do przyjmowania różnych form strukturalnych, m.in. stopionej globuli, które określają jego aktywność biologiczną, np. przeciwnowotworową w kompleksie HAMLET/BALMET. Specyficzne oddziaływanie kompleksu kwasowej stopionej globuli α -laktoalbuminy z kwasem oleinowym na komórki nowotworowe jest najprawdopodobniej podyktowane odmienną i specyficzną dla komórek nowotworowych strukturą i składem lipidowym błon komórkowych. Dodatkowo, zmieniając czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura, pH, uwodnienie, siła janowa itd., następuje regulacja aktywności biologicznej układów błonowych poprzez zmianę ich właściwości fizykochemicznych.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe otrzymane w ramach dwóch grantów OPUS o numerach 2015/17/B/ST4/03717 i 2012/05/B/ST4/02029.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G. Karp, *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, John Wiley, 2010.
- [2] S.J. Singel, G.L. Nicolson, *Science*, 1972, **175**, 720.
- [3] K. Sugano, *Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery*, [w:] John B. Taylor, David J. Triggle, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, tom II, Elsevier, 2007.
- [4] M. Pasenkiewicz-Gierula, KOSMOS, 2009, **58**, 49.
- [5] E.P. Solomon, L.R. Berg, D.W. Martin, *Biology*, Thomson Books/Cole, Belmont USA 2008.
- [6] B. Alberts, *Podstawy biologii komórek 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [7] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła, *Błony biologiczne*, Wydawnictwo „Śląsk”, Katowice – Warszawa 2003.
- [8] J. Ulander, A.D.J. Haymet, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3475.
- [9] A. Kozubek, A.F. Sikorski, J. Szopa, *Molekularna organizacja komórek*, tom II, *Lipidy, liposomy i błony biologiczne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1996.
- [10] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [11] G. Tresset, *PMC Biophysics*, 2009, **2**, 1.
- [12] C. Chipot, M.L. Klein, M. Tarek, *Modeling lipid membranes*, [w:] *Handbook of Materials Modeling*, S. Yip (red.), Springer, Netherlands 2005.
- [13] D.E. Vance, J.E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier, 2008.
- [14] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1376**, 91.
- [15] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York 2002.
- [16] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol*, 2012, **1**, 147.
- [17] Y. P. Patil, S. Jadhav, *Chem. Phys. Lipids*, 2014, **177**, 18.
- [18] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, *ISRN Pharm.*, 2012, **2012**, 1.
- [19] V.V. Mody, M.I. Nounou, M. Bikram, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 795.
- [20] A.D. Bangham, *Adv. Lipid Res.*, 1963, **1**, 63.

- [21] G. Sessa, G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, 1968, **9**, 310.
- [22] D. Chapman, *Q. Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [23] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 711.
- [24] T. Le Bihan, M. Pézolet, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, **94**, 13.
- [25] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers*, [w:] *The Structure of Biological Membranes*, P. L. Yeagle (red), CRC Press, 2005.
- [26] D. Marsh, *Chem. Phys. Lipids*, 2012, **165**, 59.
- [27] S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R.M. Suter, C.R. Worthington, W.J. Sun, J.F. Nagle, *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1097.
- [28] D.M. Small, R.A. Zoeller, *Lipids, Structure and Biochemistry of*, [w:] *Encyclopedia of Human Biology*, Tom 4, Academic Press, Inc., 1991, 725.
- [29] M. Kranenburg, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 6553.
- [30] J.M. Rodgers, J. Sørensen, F.J.-M. de Meyer, B. Schiøtt, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 1551.
- [31] M. Eeman, M. Deleu, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2010, **14**, 719.
- [32] T. Kaasgaard, C.J. Drummond, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 4957.
- [33] J. Yin, Y.-P. Zhao, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **329**, 410.
- [34] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, *Langmuir*, 1995, **11**, 4519.
- [35] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Kusumi, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 3677.
- [36] H. Träuble, M. Teubner, P. Woolley, H. Eibl, *Biophys. Chem.*, 1976, **4**, 319.
- [37] M. Langner, K. Kubica, *Chem. Phys. Lipids*, 1999, **101**, 3.
- [38] A. Lucero, M.R. Rodríguez Niño, A.P. Gunning, V.J. Morris, P.J. Wilde, J.M. Rodríguez Patino, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 7651.
- [39] A. Lucero Caro, A.R. Mackie, A.P. Gunning, P.J. Wilde, V.J. Morris, M.R. Rodríguez Niño, J.M. Rodríguez Patino, *Role of Electrostatic Interactions on Molecular Self-Assembly of Protein + Phospholipid Films at the Air-Water Interface*, [w:] *Food Colloids: Self-assembly and Material Science*, E. Dickinson, M.E. Leser (Red.), Royal Society of Chemistry, Cambridge 2007.
- [40] S. Furuike, V.G. Levadny, S.J. Li, M. Yamazaki, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2015.
- [41] R. Zimmermann, D. Küttner, L. Renner, M. Kaufmann, J. Zitzmann, M. Müller, *Biointerphases*, 2009, **4**, 1.
- [42] N.N. Casillas-Ituarte, X. Chen, H. Castada, H.C. Allen, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 9485.
- [43] Z.K. Issa, Ch.W. Manke, B.P. Jena, J.J. Potoff, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 13249.
- [44] M.G. Ganesan, D.L. Schwinke, N. Weiner, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1982, **686**, 245.
- [45] R.A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, H. Grubmüller, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 1647.
- [46] A.A. Gurtovenko, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 244902.
- [47] D.M. Engelman, T.A. Steitz, A. Goldman, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1986, **15**, 321.
- [48] A.V. Agasøster, Ø. Halskau, E. Fuglebak, N.Å. Frøystein, A. Muga, H. Holmsen, A. Martínez, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 21790.
- [49] E.A. Permyakov, *αLactalbumin*, Nova Science Publishers, Inc., Nowy York 2005.
- [50] N.J. Kuhn, D.T. Carrick, C.J. Wilde, *J. Dairy Sci.*, 1980, **63**, 328.
- [51] K. Brew, F.J. Castellino, T.C. Vanaman, R.L. Hill, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 4570.
- [52] E.D. Chrysina, K. Brew, K.R. Acharya, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 37021.
- [53] K. Kuwajima, *FASEB J.*, 1996, **10**, 102.
- [54] R. Wijesinha-Bettoni, C.M. Dobson, C. Redfield, *J. Mol. Biol.*, 2001, **312**, 261.
- [55] O.B. Ptitsyn, *Biochemistry*, 1997, **63**, 367.
- [56] O.B. Ptitsyn, V.N. Uversky, *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 15.
- [57] K.H. Mok, J. Pettersson, S. Orrenius, C. Svanborg, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, **354**, 1.

- [58] L. Gustafsson, O. Hallgren, A.-K. Mossberg, J. Pettersson, W. Fischer, A. Aronsson, C. Svanborg, *J. Nut.*, 2005, **135**, 1299.
- [59] M. Svensson, A. Håkansson, A.-K. Mossberg, S. Linse, and C. Svanborg, *PNAS*, 2000, **97**, 4221.
- [60] J. Król, A. Litwińczuk, A. Zarajczyk, Z. Litwińczuk, *Medycyna Wet.*, 2008, **64**, 1375.
- [61] I. Hanssens, C. Houthuys, W. Herreman, F.H. van Cauwelaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **602**, 539.
- [62] W. Herreman, P. van Tornout, F.H. van Cauwelaert, I. Hanssens, *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, **640**, 419.
- [63] I. Hanssens, J.C. van Ceunenbroeck, H. Pottel, G. Preaux, F. van Cauwelaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **817**, 154.
- [64] J.P. Segrest, *Chem. Phys. Lipids*, 1977, **18**, 7.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 grudnia 2016

PRZEGŁĄD ZASTOSOWAŃ SPEKTROSKOPII W ZAKRESIE BLISKIEJ PODCZERWIENI W ANALIZIE WILGOTNOŚCI ŚLADOWEJ W PRODUKTACH LECZNICZYCH WETERYNARYJNYCH IMMUNOLOGICZNYCH

REVIEW OF APPLICATIONS OF NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY IN ANALYSIS OF RESIDUAL
MOISTURE IN IMMUNOLOGICAL VETERINARY
MEDICINAL PRODUCTS

**Krzysztof Bulenger*, Bogumił Biernacki,
Dorota Marta Krasucka, Jakub Szumiło, Beata Cuvelier**

*Zakład Farmacji Weterynaryjnej, Państwowy Instytut Weterynaryjny –
Państwowy Instytut Badawczy
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
e-mail: Krzysztof.Bulenger@piwet.pulawy.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wstęp

1. Teoretyczne podstawy spektroskopii NIR
2. Widma absorpcyjne a wilgotność śladowa
3. Metoda referencyjna Karla Fischera a NIRS
4. Budowa modelu kalibracyjnego

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Krzysztof Bulenger jest absolwentem Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Od 2015 roku pracuje w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytucie Badawczego i zajmuje się badaniami fizykochemicznymi produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych.

Dr n.wet. Bogumił Biernacki jest absolwentem Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od szeregu lat zajmuje się zagadnieniami z zakresu toksykologii prenatalnej, analityki pozostałości leków weterynaryjnych w żywności oraz farmacji weterynaryjnej.

Dr n.wet. Dorota Marta Krasucka jest absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od 2006 pracuje w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach jako adiunkt. Jest autorem wielu publikacji z dziedziny farmacji weterynaryjnej.

Mgr Jakub Szumiło jest absolwentem Uniwersytetu Śląskiego. Od 2015 roku pracuje w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego i zajmuje się badaniami fizykochemicznymi produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych.

Prof. dr hab. Beata Cuvelier jest absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od 1981 roku pracuje w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach. Pełni funkcję kierownika Zakładu Farmacji Weterynaryjnej a także Redaktora Naczelnego czasopisma naukowego Journal of Veterinary Research.

ABSTRACT

However, the infrared radiation has been discovered more than 200 years ago, near-infrared spectroscopy (NIRS), as a useful method, was recognized in the 1960s. Currently, under the influence of technological development, quantitative and qualitative methods require short time and precision of measurements. NIRS has a growing recognition in the industry, particularly pharmaceutical where each component of the finished product has impact on the quality and safety of the product. Freeze-dried immunological veterinary medicinal products (IVMPs), despite high specificity, contain not too complicated matrices for analysis. Karl Fischer titration is routinely used as accurate and effective method to determine the water content in the IVMPs, but the use of near-infrared spectroscopy allows to avoid the adverse impact of environmental factors on the measurements. However, for NIRS, there is a need to create a calibration model which will be precise for high diversity of samples. The most important is the optimization of the model by eliminating the factors that might influence the measurement of water content. Quantification methods most frequently used are: MLR, PLS and PCR, which are preceded by the appropriate pretreatments (derivatives of Savitzky Golay).

Keywords: near infrared spectroscopy, Karl Fischer titration, quantitative models, residual water determination

Słowa kluczowe: spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni, miareczkowanie Karla Fischera, modele ilościowe, oznaczanie wody śladowej

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

NIRS	- spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (ang. <i>near infrared spectroscopy</i>)
PLWI	- produkty lecznicze weterynaryjne immunologiczne (ang. IVMPs)
IR <i>tion</i>)	- promieniowanie podczerwone (ang. <i>infrared radiation</i>)
MIR	- średnia podczerwień (ang. <i>mid infrared</i>)
FIR	- daleka podczerwień (ang. <i>far infrared</i>)
KFT	- miareczkowanie Karla Fischera (ang. <i>Karl Fischer titration</i>)
SNV	- transformacja SNV (ang. <i>Standart Normal Variate</i>)
MSV	- trasformacja MSV(ang. <i>Multivariate Stochastic Volatility</i>)
MLR	- wielokrotna regresja liniowa (ang. <i>multiple linear regression</i>)
PCR	- regresja głównych składników (ang. <i>principal component regression</i>)
PLS	- regresja częściowych najmniejszych kwadratów (ang. <i>partial least squares</i>)
PCA	- analiza głównych składowych (ang. <i>principal component analysis</i>)
R2	- współczynnik determinacji (ang. <i>coefficient of determination</i>)
RMSEC	- średni błąd kwadratowy kalibracji (ang. <i>Root Mean Square Error of Calibration</i>)
RMSECV	- średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej (ang. <i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>)
RER	- błąd zakresu (ang. <i>response- error relationship</i>)
SEP	- standardowy błąd predykcji (ang. <i>standard error of prediction</i>)

WSTĘP

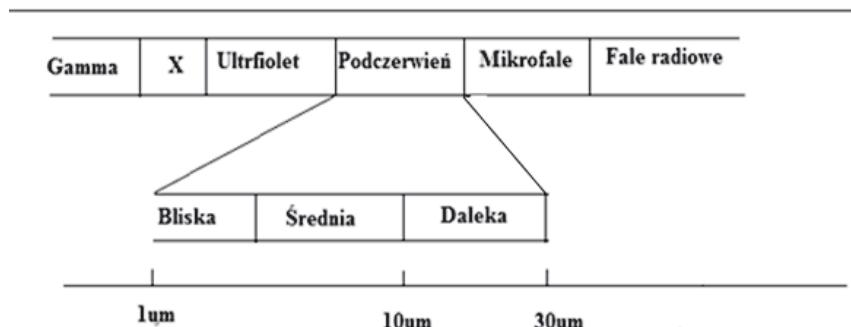
Spektroskopia jest to nauka a zarazem metoda analityczna zajmującą się analizą widm powstających w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią. Opiera się na zjawisku selektywnej absorpcji promieniowania przez próbki. Jedną ze szczególnych metod spektroskopowych jest spektroskopia w bliskiej podczerwieni. Promieniowaniem podczerwonym (IR) określa się promieniowanie elektromagnetyczne, o długościach fali większych od widzialnych promieni czerwonych i mniejszych od najkrótszych fal radiowych. Przyjmuje się umownie, że obszar promieniowania podczerwonego obejmuje fale o długościach od około $0,74 \text{ } \mu\text{m}$ do $2000 \text{ } \mu\text{m}$. IR dzieli się na: bliską podczerwień (NIR) $14\ 300\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ ($700\text{--}2500 \text{ nm}$), średnią (właścią) podczerwień (MIR) $4000\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ ($2500\text{--}14\ 300 \text{ nm}$) oraz daleką podczerwień (FIR) $700\text{--}200 \text{ cm}^{-1}$ ($14\ 300\text{--}50\ 000 \text{ nm}$) (Rys. 1) [1].

Odkrywcą IR był fizyk i kompozytor William Frederik Herschel (1800 r.) [2]. Badając temperaturę promieniowania słonecznego w różnych pasmach światła widzialnego – od fioletowego do czerwonego – zauważył, że najwyższe wskaźania uzyskuje się dla termometrów ustawionych tuż za czerwonym krańcem widma słonecznego. To odkrycie opisał w pracy „Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the Sun” (Doświadczenia dotyczące załamywania się niewidzialnych promieni słonecznych). Eksperyment doprowadził do odkrycia promieniowania IR. Po raz pierwszy zauważono istnienie formy światła niewidzialnego dla ludzkiego oka. Krokiem milowym dla rozwoju spektroskopii bliskiej podczerwieni było odkrycie i zarejestrowanie przez Abneya i Festinga w 1881 r. widma organicznych związków w zakresie $700\text{--}1200 \text{ nm}$ [3]. Badacze ci wykazali obecność organicznych grup funkcyjnych, szczególnie wodoru, w widmie NIR. Prawdziwy rozwój spektroskopii bliskiej podczerwieni nastąpił jednak po drugiej wojnie światowej. W 1960 r. Karl Norris z Amerykańskiego Departamentu Rolnictwa wykazał możliwość stosowania spektroskopii NIR do oznaczania zawartości wody w produktach rolnych. Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (NIRS) obecnie jest jednym z głównych narzędzi analitycznych we współczesnych laboratoriach. Wykorzystywana jest do analizy fizykochemicznej zarówno produktów, jak i surowców. Istotą działania tej metody jest absorpcja promieniowania podczerwonego przez badany materiał, dzięki której możliwa jest analiza zawartości takich składników jak woda, węglowodany czy białka. NIRS jest techniką o szerokim zastosowaniu w przemyśle kosmetycznym, petrochemicznym, spożywczym i farmaceutycznym. Z uwagi na fakt, iż przemysł farmaceutyczny posiada bardzo restrykcyjne wymagania dotyczące kontroli jakości, zarówno surowców jak i gotowych produktów, oczywistym jest coraz większe zainteresowanie NIRS [4, 5]. Liofilizaty produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych (PLWI) ze względu na posiadane właściwości fizykochemiczne są bardzo dobrym przykładem pokazującym szerokie możliwości zastosowania bliskiej podczerwieni. Liofilizacja jako proces suszenia sublimacyjnego zamrożonych substancji, podczas którego

rozpuszczalnik jest usuwany pod wpływem niskiego ciśnienia i zmniejszonej temperatury to proces bardzo dobrze poznany. W jego efekcie wzrasta stabilność przechowywania produktów niestabilnych hydrologicznie. Przykładem tego są produkty lecznicze weterynaryjne immunologiczne, które po procesie liofilizacji zawierają niewielką ilość wody (0,5–5%). Wilgotność to parametr, który wpływa nie tylko na wygląd i jakość szczepionki, ale również na jej okres ważności. Istnieje wiele doniesień potwierdzających wpływ wilgotności śladowej na stabilność wirusów i protein. Wykazano, że zarówno zbyt wysoka, jak i zbyt niska zawartość wody negatywnie wpływa na miano wirusa grypy, co potwierdzają późniejsze badania dotyczące stabilności innych wirusów i białek. Zaobserwowano również, że ekspozycja liofilizowanego ludzkiego fibrynogenu na wilgoć powoduje jego zmiany strukturalne. W zależności od wartości wilgotności względnej obserwowano zmiany w strukturze α -helisy i β -kartki [6–11]. Mając na uwadze szerokie możliwości spektroskopii bliskiej podczerwieni zasadniczym celem poniższej pracy było zestawienie możliwych jej zastosowań w analizie śladowej wody. Szczególnie ważne jest podkreślenie istotnej roli NIRS we współczesnej analityce, biorąc pod uwagę zarówno aspekty praktyczne, jak i doniesienia naukowe opisujące zastosowanie różnych matryc w oznaczaniu zawartości wody i narzędzi matematycznych analizujących zebrane dane.

1. TEORETYCZNE PODSTAWY SPEKTROSKOPII NIR

Istotą spektroskopii bliskiej podczerwieni jest zjawisko pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego przez związki chemiczne. Dzięki temu możliwe jest określenie parametrów ilościowych i jakościowych badanego produktu.



Rysunek 1. Widmo promieniowania elektromagnetycznego [5]

Figure 1.

Teoretyczne podstawy spektroskopii oscylacyjnej, w tym również w zakresie NIR, opisuje mechanika kwantowa. W wyniku absorbowanego promieniowania w zakresie podczerwieni następuje wzbudzenie elektronów w cząsteczce, co skutkuje zmianą energii oscylacyjnej i rotacyjnej. Powyższą sytuację dobrze opisuje oscylator

harmoniczny. Prezentuje jednak model, w którym siła przeciwdziałająca odkształceniom wiążania jest proporcjonalna do wartości tego odkształcenia. Trudno powyższą sytuację odnieść do warunków rzeczywistych, gdzie oscylacja jest tłumiona, a drgania cząsteczek wraz z upływem czasu posiadają coraz mniejszą amplitudę. Wobec powyższego lepszym modelem jest oscylator aharmoniczny, który obrazuje rzeczywiste oscylacje cząsteczek. Absorpcja promieniowania podczerwonego następuje, gdy układ będący dipolem oscylując zmienia moment dipolowy. Wodór będąc najbliższym atomem oscyluje z największą amplitudą. Na widmach w zakresie podczerwieni występują pasma absorpcyjne pochodzące od drgań podstawowych, nadtonów i kombinacyjnych. Dla zakresu bliskiej podczerwieni charakterystyczne są dwa ostatnie. Pasma nadtonów są wynikiem przejścia układu drgającego ze stanu podstawowego na drugi lub wyższy poziom energetyczny. Oddziaływanie co najmniej dwóch oscylatorów dających wspólny pik na widmie absorpcyjnym charakteryzuje pasma kombinacyjne [6].

Do pomiarów używany jest spektrofotometr zbudowany ze źródła światła, monochromatora, który emitemie promieniowanie elektromagnetyczne o odpowiedniej długości fali, kuwety pomiarowej i detektora połączonego z systemem rejestrującym i obliczeniowym. Obecnie duża część przyrządów pomiarowych dla zakresu NIR oparta jest na trasformacie Fouriera i nie posiadają monochromatora. Badana próbka jest umieszczona w celi pomiarowej pomiędzy źródłem promieniowania a detektorem. Istnieją trzy tryby pomiaru: transmisyjny, odbiciowy i transflektancji. Tryb transmisyjny opiera się na pomiarze spadku natężenia promieniowania o danej długości fali w wyniku przejścia promieniowania przez badaną próbkę. W tym trybie najczęściej badane są tabletki, zawesiny, żele i ciecze. Próbka umieszczona jest pomiędzy źródłem promieniowania i detektorem. Tryb odbiciowy mierzy stosunek natężenia światła odbitego od próbki do natężenia światła odbitego od tła lub próbki o zdefiniowanych właściwościach odbiciowych. Promieniowanie bliskiej podczerwieni przenika w głąb próbki i jest częściowo absorbowane, a następnie ulega odbiciu w kierunku detektora. Technika odbiciowa wykorzystywana jest głównie do badania past, zawiesin, proszków i tabletek. Połączeniem techniki odbiciowej z transmisyjną jest tryb transflektancji. Promieniowanie przechodząc przez próbkę jest odbite za pomocą zwierciadła w kierunku próbki. W tym trybie bada się najczęściej zawesiny i substancje ciekłe [12–17].

2. WIDMA ABSORBCYJNE A WIGOTNOŚĆ ŚLADOWA

Dla cząsteczek wody charakterystycznych jest 5 pasm absorpcji o długości: 760 nm, 970 nm, 1190 nm, 1450 nm i 1940 nm. Pasma te pochodzą od pierwszego nadtonu O–H wiązań rozciągających oraz od kombinacyjnych wiązań rozciągających oraz zginających: pierwszy nadton 1450 nm i drugi nadton 970 nm drgań rozciągających O–H oraz pik w zakresie 1887–1960 nm (rozciągające i zginające drgania kombinacyjne) [18, 19].

Zakres promieniowania bliskiej podczerwieni, dla którego woda wykazuje właściwości absorpcyjne jest szeroko wykorzystywany w przemyśle NIRS umożliwia badanie zawartości wody w proszkach, granulatach, tabletkach, kapsułkach oraz w roztworach i fiolkach zawierających liofilizat [17, 20–25]. Wyniki opisujące zawartość wody w liofilizatach potwierdzają korelację wyników otrzymywanych za pomocą kulometru Karla Fischera a NIRS, w szerokim zakresie bliskiej podczerwieni. Dalsze badania udowodniły, że za pomocą NIRS możliwe jest również obrazowanie zmiany położenia i orientacji wody w sieci krystalicznej [26–28]. Analiza liofilizatów zawierających różne proporcje mannitolu, sacharozy i wody potwierdziła możliwość analizy zróżnicowanych matryc za pomocą NIRS oraz możliwość oznaczania zawartości niewielkich ilości wody w skomplikowanych matrycach [29–31].

3. METODA REFERENCYJNA KARLA FISCHERA A NIRS

Metodą referencyjną, używaną do określenia wilgotności śladowej w PLWI jest metoda kulometryczna Karla Fischera (KFT). Miareczkowanie kulometryczne wody oparte jest na ilościowej reakcji wody z dwutlenkiem siarki i jodem w bezwodnym środowisku w obecności zasady o wystarczającej pojemności buforowania. Jod jest wytwarzany elektrochemicznie na anodzie przez utlenienie jodku, reagując z obecną w naczyniu reakcyjnym wodą i dwutlenkiem siarki. Ilość wody w substancji jest wprost proporcjonalna do zużytej ilości ładunku elektrycznego. Osiągnięcie końcowego punktu następuje w chwili zużycia całej ilości wody w komorze reakcyjnej i pojawiienia się nadmiaru jodu. Jeden mol jodu odpowiada jednemu molowi wody, natomiast ładunek 10,71 C odpowiada 1 mg wody. Współczesne kulometry Karla Fischera umożliwiają szybkie wykonanie analizy z dużą dokładnością lecz niezbędne jest użycie drogich odczynników chemicznych [13, 31, 32]. Badanie wilgotności tą metodą może ponadto stwarzać wiele problemów proceduralnych np. przyleganie wody do ścianek naczynia pomiarowego powodujące przeszacowanie zawartości wody śladowej w liofilizatach. Ponadto pęcherzyki powietrza powstałe w wyniku zbyt intensywnej pracy mieszanek mogą zakłócać pomiar poprzez zmianę przewodnictwa roztworu. Dlatego też, istotnym staje się poszukiwanie nowych metod, które umożliwiają redukcję wpływu środowiska na badaną próbkę. Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni spełnia te wymagania. NIRS jako metoda alternatywna, uważana jest za jedną z najbardziej efektywnych i zaawansowanych. Powierzchnie szklane opakowań nie wpływają znaczco na przeprowadzone pomiary w bliskiej podczerwieni, dzięki czemu możliwe jest badanie próbek bez ich otwierania [21, 28, 33, 34]. Wyniki pomiarów otrzymanych z użyciem NIRS są uzależnione od czynników chemicznych i fizycznych takich jak: wilgotność, temperatura, stan skupienia, właściwości optyczne próbki, pozostałości rozpuszczalników i grubość próbki [15, 26, 35–38].

4. BUDOWA MODELU KALIBRACYJNEGO

Kalibracja jest procesem budowania modelu matematycznego w oparciu o widma próbek i wyniki uzyskane z użyciem metody referencyjnej. Pomiar właściwej próbki jest procesem bardzo prostym i niezbyt czasochłonnym. O wiele bardziej skomplikowanym aspektem pomiarów w spektroskopii bliskiej podczerwieni jest zbudowanie modelu kalibracyjnego. Kluczowa w procesie projektowania doświadczenia jest decyzja, czy istotniejszy jest dokładny pomiar, czy silny model odporny na wysokie zróżnicowanie prób. Najważniejszym zaś elementem jest obróbka surowych widm NIR. Badana próbka zostawia unikalne widmo (tzw. odcisk palca) zależny od wielu czynników np. właściwości fizykochemicznych, form krystalicznych czy stanu fazowego. Niezbędne są zatem odpowiednie algorytmy obliczeniowe, które pozwolą na uzyskanie istotnych informacji. Widma absorpcyjne, oprócz danych interesujących z punktu widzenia analityka, posiadają również tzw. szum fotometryczny. Powstaje on w wyniku interferencji czynników fizycznych i chemicznych oraz niedoskonałości sprzętu pomiarowego. Nadmierny szum fotometryczny negatywnie wpływa na rozdzielcość widm, dokładność modeli kalibracyjnych i zaburza stosunek sygnału do szumu [5, 7, 38].

Oznaczanie ilościowe badanej substancji na podstawie widma opiera się na odpowiednim modelu matematycznym. Bardzo popularnym rozwiązaniem jest zastosowanie liniowej kalibracji wielowymiarowej, która pokazuje zależność między zawartością badanego składnika, a wartościami absorbancji przy różnej długości fali. Do zbudowania modelu kalibracyjnego potrzebne są trzy zbiory danych: budujący (zestaw kalibracyjny zawierający 2/3 widm ujętych w modelu), sprawdzający (zestaw walidacyjny zawierający 1/3 widm ujętych w modelu) i oceniający jakość modelu w oparciu o próbki, które nie zostały użyte przy kalibracji i walidacji (zestaw testowy). Kluczowe jest zbudowanie odpowiedniej strategii obróbki danych, gdyż każde działanie nie pozostaje bez konsekwencji dla ostatecznej wersji modelu. Liczba próbek ujętych w modelu kalibracyjnym zależy od złożoności próbki i zakłóceń związanych np. z temperaturą pomiaru i zawartością wody. Podczas budowania modelu kalibracyjnego dla metody ilościowej wszystkie próbki powinny dawać wyniki ilościowe w zakresie metody. Najbardziej pożądane jest, aby zakres wartości próbek w modelu kalibracyjnym obejmował również wartości skrajne tzn. posiadał wartości możliwie najniższe i najwyższe w odniesieniu do próbek badanych w oparciu o model. Najlepiej aby były one poniżej, jak i powyżej oczekiwanej wartości. Reprezentacyjność próbek może być poprawiona poprzez laboratoryjne wykreowanie określonych właściwości np. poprzez zwiększenie lub zmniejszenie zawartości wody. Powiększy to zakres, w którym model będzie działał właściwie (Rys. 2).

Rysunek 2. Oryginalne widma PLWI z różną zawartością wody – zestaw kalibracyjny (zielony) i walidacyjny (niebieski)

Figure 2.

Obróbka widm składa się z kilku etapów. Pierwszą fazą jest wstępna obróbka surowych widm (ang. *pre-processing*) np. przy użyciu pierwszej pochodnej Savitzky'ego Golaya (usuwanie przesunięć linii bazowej) oraz drugiej pochodnej Savitzky'ego Golaya (korekcja przesunięcia oraz nabylenia linii podstawowej). Kolejnym etapem jest wybór metody kalibracji. W oparciu o liczbę zmiennych i występującą między nimi korelację stosuje się odpowiednie algorytmy kalibracji ilościowej. Wielokrotna regresja liniowa (MLR) najlepiej sprawdza się, gdy występuje mała liczba zmiennych i brak jest korelacji między nimi. Przy dużej liczbie zmiennych i silnej korelacji stosuje się: regresję głównych składników (PCR), regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) i analizę głównych składowych (PCA) [34, 39–44]. Ostatnim etapem w tworzeniu modelu jest jego optymalizacja i sprawdzenie. Istotny jest dobór odpowiedniej liczby czynników w oparciu o które model będzie dokonywał analizy. Zbyt duża ich liczba powoduje mały błąd w badaniu zbioru kalibratornego, ale tracą na tym możliwości predykcyjne modelu. Mała liczba czynników utrudnia odpowiednie dopasowanie modelu do danych. Do sprawdzenia wydajności modelu kalibratornego często wykorzystywana jest walidacja krzyżowa (cross validation). Istotne jest sprawdzenie dopasowania modelu do uzyskanych danych oraz błąd tego dopasowania w oparciu o odpowiednie parametry statystyczne takie jak: współczynnik determinacji (R^2), średni błąd kwadratowy kalibracji (RMSEC), średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) oraz zależność odpowiedzi od błędów (RER). Im mniejsza wartość RMSEC i RMSECV, a wartość RER większa (powyżej 20) tym model jest lepszej jakości [5, 7, 9, 10, 45, 46]. Temat opracowania modelu kalibratornego i jego optymalizacji jest szeroko opisany w literaturze (Tab. 1).

Tabela 1. Przykładowe oznaczenia zawartości wody w różnych typach produktów
Table 1.

Typ próbki	Typ transformacji widma
Mięso	Do zbudowania modelu użyto 294 próbek mięsa na NIR system 6500 Silver Spring MD w zakresie 400–2500 nm. W obróbce wstępnej zastosowano pierwszą pochodną log1/R. Efekt rozproszenia w widmie skorygowano poprzez transformację SNV i przesunięcie linii bazowej (detrend correction). Zastosowano regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS), ograniczając liczbę czynników do 16. Otrzymano RPD = 5,0 [47].
Oliwa	Do zbudowania modeli użyto 159 próbek wtyłczyn z oliwek, w tym 108 przydzielono do walidacji. Dane były zbierane w zakresie 1000–2500 nm przy użyciu transflektacyjnej techniki pomiarowej. Grawimetryczna metoda utraty masy była metodą referencyjną. Zawartość wody w granicach 55,4–83,4%. Dwa modele stworzono w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS). W celu zmniejszenia błędu predykcji do obróbki wstępnej użyto transformacji SNV oraz pierwszą i drugą pochodną Savitzky'ego-Golaya. RMSECV 8,3–9,4% RMSEP 0,9–1,14% [48].

Typ próbki	Typ transformacji widma
Heparyna	W modelach użyto 44 próbek z trzech serii produkcyjnej heparyny API, dla zakresów spektralnych 1100–2300 nm, zakres zawartości wody 1,8–2,3%. Próbki przebadano na Brimrose Luminar 5030 AOTF-NIR. Metodą referencyjną była utrata masy poprzez suszenie. Stworzono 5 modeli w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS): bez obróki wstępnej (4 czynniki PLS, RMSECV = 1,24 RMSEP = 1,11), pierwsza pochodna Savitsky'ego-Golay'a (6 czynników PLS, RMSECV = 0,73 RMSEP = 0,49), druga pochodna Savitsky'ego-Golay'a (2 czynniki PLS, RMSECV = 1,28 RMSEP = 0,99), transformacja SNV (5 czynników PLS, RMSECV = 1,14 RMSEP = 1,38), transformacja MSC (1 czynnik PLS, RMSECV = 1,23 RMSEP = 1,13) [49].
Alkohol etylowy	Próbki stanowiły wysokiej czystości bezwodny etanol i metanol. Zastosowano transflektancyjny model pomiarowy w zakresie zawartości wody 1–19%. Regresja częściowych najmniejszych kwadratów (PLS), 3 czynniki PLS dla spectrum 1120–1730 nm. SECV = 0,16%, SEP = 0,16% [50].
Liofilizat mleka	Do stworzenia modelu użyto dwie serie mleka w proszku. Pierwsza zawierała 24 próbki z referencyjną metodą suszenia, a druga 81 próbek – referencyjna metoda – wolumetryczna metoda Karla Fischera. Zakres wody 2,0–6,5%. Powtarzalność 0,018% wyższa niż uzyskana metodami referencyjnymi. Model stworzony w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) dla różnych długości fal: 1425–1475 nm (5 czynników PLS), 1900–1950 nm (3 czynniki PLS). Walidacja krzyżowa przy zastosowaniu metody „wyrzuć jeden obiekt” [51].
Liofilizaty farmaceutyczne	Przy użyciu próbek liofilizatów farmaceutycznych zawierających API stworzono trzy modele kalibracyjne oparte o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS): a) bez obróki wstępnej z dziewięcioma czynnikami PLS dla regionów: 1320–1635 nm i 1850–2030 nm, RMSEC(%) = 0,175, RMSEP(%) = 0,193 b) przy obróbce wstępnej za pomocą pierwszej pochodnej z pięcioma czynnikami PLS dla regionów: 1320–1635 nm; 1850–2030 nm; c) przy obróbce wstępnej z użyciem Multiplicative Scatter Correction i pięcioma czynnikami PLS dla regionu: 1639–2355 nm (FT-NIR MPA, Bruker Optics). Zakres zawartości wody 1–8%. Referencyjnie użyto wagi grawimetrycznej, przy precyzijskiej metodzie 0,1% wilgotności [46]. W oparciu o pięć serii produkcyjnych stworzono dwa modele bazujące na regresji częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) w zakresie widma 1822–1948 nm: dla pierwszego zakresu 1–40% (w/w) i SEP = 1,85% oraz dla drugiego zakresu 1–10% (w/w), SEP = 0,42%. Metodą referencyjną była metoda Karla Fischera [52].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni w analizie produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych to obiecujący kierunek w poszukiwaniu alternatywnych metod fizykochemicznych, co znajduje swoje potwierdzenie w danych literaturowych. Obecnie w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego prowadzone są badania nad opracowaniem modeli kalibracyjnych spektroskopii bliskiej podczerwieni, które mogą być używane do badań fizykochemicznych produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych. Przedstawiona praca stanowi wstęp do tematyki dotyczącej NIRS w pomiarach ilościowych wody śladowej w PLWI.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

1. M. Kolbuszewski, Lab., 2009, **11**, 44.
2. W. Herschel, Philosop. Trans. Roy. Soc., 1800, **90**, 284.
3. W. Abney, E.R. Festing, Philos. Trans. Roy. Soc., 1881, **172**, 887.
4. K.H. Norris, J.R. Hart, Prin. Meth. Meas. Mois. Cont. Liq. Soli., 1965, **4**, 19.
5. P. Wrosz, A. Dopierała, J. Mazerski, Anal., 2011, **3**, 24.
6. V. Wahla, O. Scheibelhofera, U. Roessla, S. Leitgeba, T. DeBeerd, J. Khinasta, Inter. J. Pharm., 2015, **484**, 95.
7. Jr.R.G. Buice, T.B. Gold, R.A. Lodder, G.A. Digenis, Pharm. Res., 1995, **12**, 161.
8. H. Grohganz, D. Gildemyn, E. Skibsted, J.M. Flink, J. Rantanen, Anal. Chim. Acta, 2010, **676**, 34.
9. L. Chang, D.A. Shepherd, J. Sun, X. Tang, M.J. Pikal, J. Pharm. Sci., 2005, **94**, 1445.
10. M.A. Croyle, X. Cheng, J.M. Wilson, Gene Ther. 2001, **8**, 1281.
11. M.W.J. Derkxen, P.J.M. Oetelaar, F.A. Maris, J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, **17**, 473.
12. P. Wrosz, Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni i klasycznej podczerwieni w analizie jakościowej i ilościowej surowców w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Rozprawa doktorska, Gdańsk 2012.
13. European Pharmacopoeia 8.0, 2.2.40, 62.
14. T. Demski, Wykorzystanie data mining do oceny produktów na podstawie widma NIR. Stat-Soft. Dostępny w Internecie: http://www.statsoft.pl/Portals/0/Downloads/Wykorzystanie_data_mining.pdf.
15. A. Półtorak, J. Wyrwisz, U. Ulanicka, K. Żontała, A. Stelmasiak, J. Łopacka, M. Moczkowska, M. Zalewska, A. Wierzbicka, Agricul. Engineer., 2013, **141**, 319.
16. X. Zhou, P. Hines, M.W. Borer, J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, **17**, 219.
17. M.A. Czarnecki, Y. Morisawa, Y. Futami, Y. Ozaki, Chem. Rev., 2015, **115**, 9707.
18. N. Broad, P. Graham, P. Hailey, A. Hardy, S. Holland, S. Hughes, D. Lee, K. Prebble, N. Salton, P. Warren, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
19. P. Turner, *FT- Near Infrared Spectroscopic Determination of Hydroxyl number using a fiber optic probe*, Bruker Spectroscopy Ltd. 1999.
20. O. Berntsson, G. Zackrisson, G. Ostling, J. Pharm. Biomed. Anal., 1997, **15**, 895.
21. N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.J. Eaves, W.C. Mann, W. Dziki, Analyst, 2000, **125**, 2054.
22. W.P. Findlay, G.R. Peck, K.R. Morris J., Pharm. Sci., 2005, **94**, 604.
23. J. Rantanen, O. Antikainen, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, Pharm. Dev. Technol., 2000, **5**, 209.
24. X.B. Zhang, Y.C. Feng, C.Q. Hu, Anal. Chim. Acta, 2008, **630**, 131.
25. W. Dziki, J.F. Bauer, J.J. Szpylman, J.E. Quick, B.C. Nichols, J. Pharm. Biomed. Anal., 2000, **22**, 829.
26. M.S. Kamat, R.A. Lodder, P.P. DeLuca, Pharm. Res., 1989, **6**, 961.
27. T. Norris, P.K. Aldridge, S.S. Sekulic, Analyst, 1997, **122**, 549.
28. H. Grohganz, M. Fonteyne, E. Skibsted, T. Falck, B. Palmqvist, J. Rantanen, J. Pharm. Biomed. Anal., 2009, **49**, 901.
29. H. Grohganz, M. Fonteyne, E. Skibsted, T. Falck, B. Palmqvist, J. Rantanen, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2010, **74**, 406.
30. D. Greiff, W.A. Rightsel, Appl. Microbiol., 1968, **16**, 835.
31. Farmakopea Polska IX, 2.5.32, 235.
32. M. Savage, J. Torres, L. Franks, B. Masecar, J. Hotta, Biologicals, 1998, **26**, 119.
33. J.A. Jones, I.R. Last, B.F. MacDonald, K.A. Prebble, J. Pharm. Biomed. Anal., 1993, **11**, 1227.
34. L. Salguero-Chaparro, F. Peña-Rodríguez, Food Sci. Technol., 2014, **56**, 363.
35. S. Airaksinen, M. Karjalainen, A. Shevchenko, S. Westermark, E. Leppanen, J. Rantanen, J. Yliruusi, J. Pharm. Sci., 2005, **94**, 2147.

36. C.C. Corredor, D. Bu, D. Both, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **696**, 84.
37. B. Czarnik-Matusewicz, S. Pilorz, *Vib. Spectrosc.*, 2006, **40**, 235.
38. Kalibracje ilościowe i jakościowe NIR. Materiały szkoleniowe, Warszawa, 1–2 października 2015.
39. M. Blanco, M.A. Romero, M. Alcalà, *Talanta*, 2004, **64**, 597.
40. J.H. Kalivas, *Analyt. Chim.*, 2001, **428**, 31.
41. I.R. Last, K.A. Prebble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 1071.
42. G. Reich, *Adv. Drug Deli. Rev.*, 2005, **57**, 1109.
43. Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 683.
44. L. Sukowski, *NIR Based Process Analytical Technology: In-line Residual Moisture Determination for a Complete Batch Inspection of Lyophilized End-Products*. Rozprawa doktorska. Basel, 2003.
45. G. Balcerowska, R. Siuda, C. Sadowski, *Acta Agrophy.*, 2008, **11**, 323.
46. J. Mantanus, E. Ziémonts, P. Lebrun, E. Rozet, R. Klinkenberg, B. Streel, B. Evrard, P. Hubert, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **642**, 186.
47. M. Prevolnik, M. Škrlep, D. Škorjanc, M. Čandek-Potokar, *Tehnolog. Mesa*, 2010, **51**, 133.
48. A.S. Barros, A. Nunes, J. Martins, I. Delgadillo, *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.*, 2009, **3**, 180.
49. C. Sun, H. Zang, X. Liu, Q. Dong, L. Li, L.S. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **51**, 1060.
50. S. Cho, H. Chung, Y.A. Woo, H. J. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005, **26**, 115.
51. R. Nagarajan, P. Singh, R. Mehrotra, *J. Auto. Meth. Manage. Chem.*, 2006, **51342**, 1.
52. G.X. Zhou, Z. Ge, J. Dorwart, B. Izzo, J. Kukura, G. Bicker, J. Wyvratt, *J. Pharm. Sci.*, 2003, **92**, 1058.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 listopada 2016

WPŁYW NAPEŁNIACZY KRZEMOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI SAMOPRZYLEPNYCH KLEJÓW SILIKONOWYCH

INFLUENCE OF SILICONE FILLERS ON SILICONE PRESSURE-SENSITIVE ADHESIVES PROPERTIES

Adrian Krzysztof Antosik, Zbigniew Czech

*Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
e-mail do korespondencji: adriankrzysztofantosik@gmail.com*

Abstract

Wstęp

1. Silikonowe kleje samoprzylepne

2. Napełniacze krzemowe

3. Wpływ napełniaczy krzemowych na właściwości Si-PSA

 3.1. Adhezja

 3.2. Kohezja

 3.3. Kleistość

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr. inż. Adrian Krzysztof Antosik w roku 2012 ukończył studia inżynierskie na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej, specjalność polimery, w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie, w 2013 ukończył studia magisterskie na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Mechatroniki, specjalność Przetwórstwo Tworzyw Sztucznych w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie. Jest doktorantem w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie.



Prof. dr hab. inż. Zbigniew Czech jest kierownikiem Laboratorium Klejów i Materiałów Samoprzylepnych Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jest absolwentem Politechniki Szczecińskiej, doktorat w 1981 r., habilitacja w 2004 r. Od 1981 do 2002 r. zatrudniony w Firmach: Lohmann (Niemcy), UCB (Belgia) oraz Chemitec (Niemcy). Jest autorem ponad 500 publikacji naukowych oraz 100 patentów.

ABSTRACT

Pressure-sensitive adhesives (PSAs) represent a system that actually dates back to the invention of the self-adhesive articles in 1935 when R. Stanton Avery produced the first coating unit using a wooden cigar box with two holes cut in the bottom. PSAs can be defined as a special category of adhesive which in dry form are permanently tacky at room temperature [2, 6–8]. Since 1960s, silicone pressure-sensitive adhesives have found many uses. They are used in industrial plants, as tapes for joining materials with low surface energy, as well as in the sectors of electrical and electronic, medical care, health care and automotive industry. For about 10 years there has been great interest in new uses for the silicone PSA, particularly for medical and industrial belts. The above examples describe a growing range of potential commercial applications of silicone pressure-sensitive adhesives [2, 7, 9–11].

In contrast to the pressure-sensitive adhesives organic silicone pressure-sensitive adhesives show much better performance by this well known it happened that are used to obtain self-adhesive materials for special purposes. Si-PSA usually consist of large segments of the silanol-functional silicone polymers, and silicone resins. Polymeric chains comprising the silicone resins include methyl and phenyl groups thus are very little reactive chemicals. In order to obtain the best adhesion-cohesion balance are used crosslinked thermally in a temperature range of 120–150°C by using organic peroxides. Peroxides most commonly used in industry benzoyl peroxide (BPO) and 2,4-dichlorobenzoyl peroxide (DCIBPO). Silicone pressure-sensitive adhesives are characterized by high flexibility of connections Si-O-Si, low impact intermolecular, low surface tension, excellent thermal stability and transparency for UV radiation, excellent electrical properties, high chemical resistance and weather resistance [2, 6, 7, 14].

In the available literature the montmorillonite and kaolin modified silicone pressure-sensitive adhesives which exhibited increased thermal resistance are reported. The thermal properties of adhesives compositions are better to compared with “pure” silicon composition without any filler [6, 12–14].

Keywords: pressure-sensitive adhesives, kaolin, montmorillonite, silicone pressure-sensitive adhesives

Słowa kluczowe: kleje samoprzylepne, kaolin, montmorylonit, silikonowe kleje samoprzylepne

WSTĘP

W roku 1935 R. Stanton Avery otrzymał samoprzylepny produkt wykorzystując do jego produkcji pudełko po cygarach z dwoma wyciętymi otworami. Od tego momentu przyjmuje się rozpoczęcie historii klejów samoprzylepnych (PSA). Aktualnie używa się wiele rodzajów klejów samoprzylepnych charakteryzujących się dobrą adhezją, kohezją oraz kleistością – spełniającą wymogi przemysłowe. Podstawowymi różnicami pomiędzy PSA a innymi rodzajami klejów są niezmienne właściwości klejące w szerokim zakresie temperaturowym w czasie użytkowania, doskonała odporność na starzenie oraz stały poziom wytrzymałości na odrywanie. Spośród wielkocząsteczkowych polimerów używanych do produkcji PSA na szczególną uwagę zasługują silikony; powszechnie wiadomo, że samoprzylepne kleje na bazie silikonów (Si-PSA) są specjalistycznymi wyrobami o szczególnym zastosowaniu [1–5].

1. SILIKONOWE KLEJE SAMOPRZYLEPNE

W 1960 roku na rynek zostały wprowadzone silikonowe kleje samoprzylepne; od tamtego momentu znalazły one wiele zastosowań w przemyśle. Z racji swoich unikalnych właściwości jakimi są wysoka elastyczność połączeń Si–O–Si, niewielkie oddziaływanie międzycząsteczkowe, niskie napięcie powierzchniowe, doskonała stabilność termiczna oraz transparentność dla promieniowania UV. Ponadto, doskonałe właściwości elektryczne, duża odporność chemiczna oraz odporność na warunki atmosferyczne sprawiają, że kleje silikonowe są uważane za grupę materiałów samoprzylepnych stosowanych do specjalistycznych technologii. Posiadają lepsze właściwości w porównaniu do typowych polimerowych samoprzylepnych klejów organicznych. Si-PSA są wykorzystywane przemyśle medycznym, m.in. wchodzą w skład plastrów samoprzylepnych, w tym plastrów z lekami przezskórnymi; w przemyśle ciężkim i samochodowym jako łącznik elementów pracujących w podwyższonych temperaturach; w przemyśle elektrycznym jako taśmy nieprzewodzące; w kosmonautyce do klejenia baterii słonecznych na pokładach satelitów oraz stacji kosmicznych; jako taśmy maskujące [2, 6–8].

Fenomen silikonowych klejów samoprzylepnych jest głównie związany z ich budową. Si-PSA składają się zazwyczaj z dużych segmentów silano-funkcyjnych polimerów silikonowych oraz żywic silikonowych (MQ). Silikonowe kleje samoprzylepne zawierają grupy fenylowe i metylowe przez co są bardzo mało reaktywne chemiczne. W celu uzyskania najlepszych właściwości kohezyjno adhezyjnych są one sieciowane termicznie w zakresie temperaturowym 120–150°C za pomocą nadtlenków organicznych. Najczęściej stosowanymi nadtlenkami w przemyśle jest nadtlenek benzoilu (BPO) oraz nadtlenek 2,4-dichlorobenzoilu (DCIBPO). Pozwalają one na kontrolę reakcji sieciowania (a tym samym na równowagę pomiędzy adhezją i kohezją) poprzez odpowiednie dozowanie nadtlenku, co determinuje stopień usie-

ciowania otrzymanego filmu klejowego. W zależności od potrzeb i zastosowania otrzymywanych taśm samoprzylepnych na bazie samoprzylepnych klejów silikonowych używa się od 0 do 4% mas. nadtlenku w przeliczeniu na masę polimeru w kompozycji [2, 7, 9–11].

2. NAPEŁNIACZE KRZEMOWE

W dostępnej literaturze znaleźć można odniesienia do otrzymywania kompozycji samoprzylepnych klejów silikonowych modyfikowanych napełniaczami krzemowymi takimi jak montmorylonit czy kaolin [12–14].

Montmorylonit został odkryty w połowie XIX w. w miejscowości Montmorillon we Francji. Jest kopaliną pochodzenia wulkanicznego o gęstości wahającej się między 1,9–2,7 g/cm³. Jest materiałem ilastym wchodzącym w skład skał o nazwie bentonity, występujących również w Polsce. Ten silnie hydrofilowy minerał, jest używany jako napełniacz (wprowadzany do matrycy polimerowej w ilości ok. 5% mas.). Niewielka ilość tego glinokrzemianu wprowadzonego do polimeru powoduje wzrost modułu i polepszenie właściwości mechanicznych, zmniejszenie przepuszczalności gazów, poprawę odporności termicznej oraz zmniejszenie palności. W przypadku dodania go do polimerów biodegradowalnych poprawie ulega biodegradowalność całego kompozytu. Montmorylonit jest krzemianem warstwowy o strukturze płytowej. Grubość płyt montmorylonitu wynosi 0,96 nm, pozostałe jej wymiary mieszczą się w granicach 200 do 1000 nm. Montmorylonit składa się z trzech warstw: dwóch zewnętrznych tetraedrycznych (czworościan krzemowo-tlenowy) zawierających między sobą jedną warstwę oktaedryczną (ośmiościan powstający w wyniku otoczenia jonów glinu, żelaza czy magnezu atomami tlenu i grupami hydroksylowymi), przy czym warstwy te są ze sobą połączone poprzez uwspółnienie atomów tlenu. Są one połączone między sobą siłami Van der Waalsa, zachowując między sobą (kolejnymi płytami) odległości około 0,3 nm. Pięć do dziewięciu równoległych płytek tworzy cząstkę pierwotną montmorylonitu o grubości 7–12 nm [15–17].

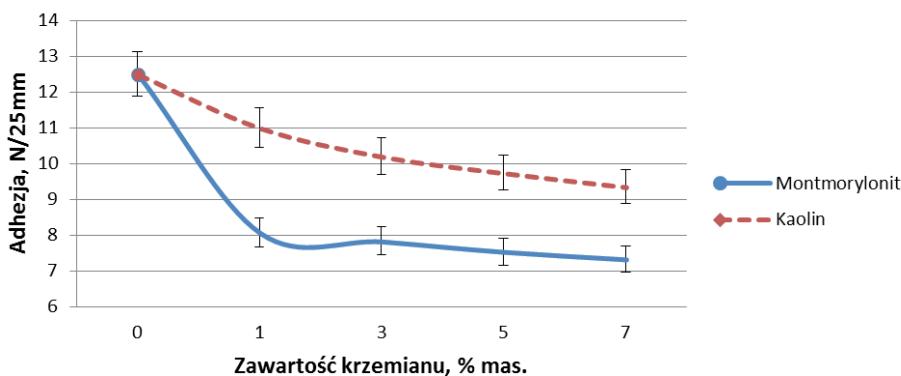
Kaolin w ok. 99% stanowi mieszaninę glinokrzemianów, głównie kaolinitu i illitu z niewielką ilością skalenia oraz kwarcu. Może być stosowany m.in. do produkcji ceramiki, włókien szklanych, materiałów budowlanych, nawozów i produktów rolnych. Znalazł również zastosowanie w kosmetice i farmacji. Używa się go, obok kredy, talku czy krzemionki powszechnie w przetwórstwie tworzyw sztucznych jako napełniacz proszkowy. Klasyczne mineralne napełniacze proszkowe mają za zadanie głównie podwyższenie sztywności oraz obniżenie ceny otrzymywanego materiału polimerowego, jednak skutkuje to równoczesnym nieznacznym obniżeniem jego wytrzymałości [18, 19].

3. WPŁYW NAPEŁNIACZY KRZEMOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI SI-PSA

W ostatniej dekadzie obserwuje się duże zainteresowanie samoprzylepnymi klejami na bazie klejów silikonowych i możliwościami ich modyfikacji. Ich unikalne właściwości wynikające z budowy sprawiły, że niemodyfikowane kompozycje klejowe znalazły wiele zastosowań. Są używane zwłaszcza do otrzymywania taśm medycznych oraz przemysłowych. Modyfikacja kompozycji klejowych napełniaczami krzemowymi pozwala na zwiększenie maksymalnej temperatury pracy taśm samoprzylepnych powyżej 200°C, co w porównaniu do zwykłych taśm samoprzylepnych na bazie polimerów organicznych jest bardzo wysoką wartością. Ponadto napełniacze krzemowe zapewniają doskonałą kohezję zarówno w temperaturze pokojowej jak i podwyższonej, kosztem spadku adhezji i kleistości filmów klejowych [2, 6, 7, 12–14].

3.1. ADHEZJA

Na Rysunku 1 przedstawiono wpływ napełniaczy krzemowych takich jak kaolin i montmorylonit na adhezję silikonowych klejów samoprzylepnych. W obydwu przypadkach zwiększanie stężenia napełniacza powodowało pogorszenie tej właściwości. W porównaniu z kaolinem gdzie spadek adhezji następował dość łagodnie już niewielki dodatek montmorylonitu powodował raptowny spadek adhezji, natomiast dalsze zwiększanie ilości napełniacza utrzymywało wartość adhezji oscylującą pomiędzy 7 a 8 N/25mm co jest graniczną akceptowalną wartością dla jednostronnie klejących taśm samoprzylepnych [7, 12–14].



Rysunek 1. Wpływ ilości krzemowego napełniacza na adhezję samoprzylepnych klejów silikonowych
Figure 1. Effect of silicium filler content on the adhesion of silicone pressure-sensitive adhesives

3.2. KOHEZJA

W Tabelach 1–2 przedstawiono wpływ kaolinu (Tab. 1) i montmorylonitu (Tab. 2) na kohezję oraz maksymalną temperaturę pracy silikonowych klejów samoprzylepnych. W obydwu przypadkach zwiększenie stężenia napełniacza wykazało stabilność termiczną badanych kompozycji zarówno w temperaturze pokojowej jak i temperaturze podwyższonej. Już niewielki dodatek montmorylonitu spowodował wyraźne polepszenie się maksymalnej temperatury pracy silikonowych klejów a następnie jego spadek. W przypadku kaolinu maksymalna temperatura pracy rosła wraz z zwiększeniem się ilości napełniacza osiągając najwyższą wartość przy 5% mas. w przeliczeniu na suchą masę żywicy klejowej [6, 12–14]. W obydwu przypadkach obniżenie maksymalnej temperatury pracy silikonowych klejów samoprzylepnych może być spowodowane skłonnością do aglomeracji napełniacza, a tym samym nie równomiernym rozłożeniem w filmie klejowym.

Tabela 1. Wpływ ilości kaolinu na kohezję oraz maksymalną temperaturę pracy samoprzylepnych klejów silikonowych

Table 1. Effect of kaolin content on the cohesion and maximum working temperature of silicone pressure-sensitive adhesives

Kompozycja	Zawartość [% mas.]	Kohezja [h]		Maksymalna temperatura pracy [°C]
		20°C	70°C	
Q2-7566 1,5% mas. DCIBPO	0	> 72	> 72	133
	1	> 72	> 72	147
	3	> 72	> 72	223
	5	> 72	> 72	226
	7	> 72	> 72	220

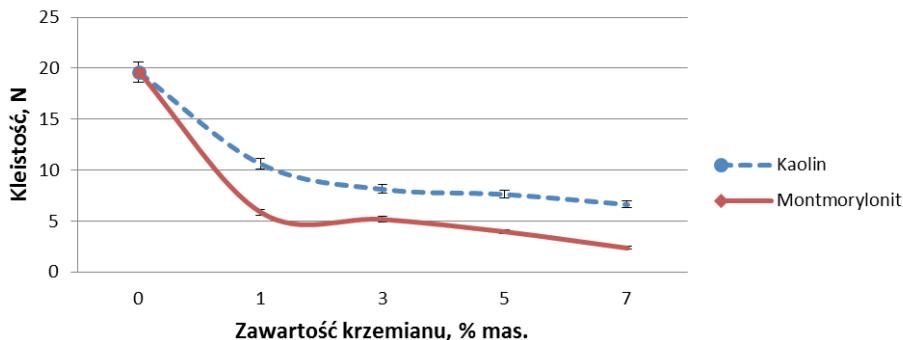
Tabela 2. Wpływ ilości montmorylonitu na kohezję oraz maksymalną temperaturę pracy samoprzylepnych klejów silikonowych

Table 2. Effect of montmorillonite content on the cohesion and maximum working temperature of silicone pressure-sensitive adhesives

Kompozycja	Zawartość [% mas.]	Kohezja [h]		Maksymalna temperatura pracy [°C]
		20°C	70°C	
Q2-7566 1,5% mas. DCIBPO	0	> 72	> 72	133
	1	> 72	> 72	242
	3	> 72	> 72	220
	5	> 72	> 72	216
	7	> 72	> 72	216

3.3. KLEISTOŚĆ

Wpływ kaolinu i montmorylonitu na kleistość silikonowych klejów samoprzylepnych przedstawiono na Rysunku 2. W obydwu przypadkach zwiększenie stężenia napełniacza powodowało pogorszenie tej właściwości, nawet o ponad połowę już dla 1 % mas. napełniacza w przypadku montmorylonitu [2, 12–14]. Przyczyną zaistniałej obserwacji może być punktowe „przebijanie” napełniacza przez film klejowy a tym samym zmniejszenie zwilżalności powierzchni przez warstwę klejącą.



Rysunek 2. Wpływ ilości krzemowego napełniacza na kohezję samoprzylepnych klejów silikonowych
Figure 2. Effect of silicium filler content on cohesion of silicone pressure-sensitive adhesives

PODSUMOWANIE

W odróżnieniu od samoprzylepnych klejów organicznych, silikonowe kleje samoprzylepne wykazują o wiele lepsze właściwości użytkowe dzięki czemu są używane do otrzymywania materiałów samoprzylepnych o specjalnym przeznaczeniu. Si-PSA zazwyczaj składają się z dużych segmentów silano-funkcyjnych polimerów silikonowych oraz żywic silikonowych. Polimerowe łańcuchy wchodzące w skład żywic silikonowych zawierają grupy fenylowe i metylowe przez co są bardzo mało reaktywne chemiczne. W celu uzyskania najlepszych właściwości kohezyjno-adhezyjnych są one sieciowane termicznie w zakresie temperaturowym 120–150°C za pomocą nadtlenków organicznych. Najczęściej stosowanymi nadtlenkami w przemyśle jest nadtlenek benzoilu (BPO) i nadtlenek 2,4-dichlorobenzoilu (DCIBPO). Silikonowe kleje samoprzylepne charakteryzują się wysoką elastycznością połączeń Si–O–Si, niewielkim oddziaływaniem międzycząsteczkowym, niskim napięciem powierzchniowym, doskonałą stabilnością termiczną oraz transparentnością dla promieniowania UV. Ponadto wykazują doskonałe właściwości elektryczne, dużą odporność chemiczną oraz odporność na warunki atmosferyczne [2, 6–8, 14].

Spośród ośmiu przedstawionych kompozycji silikonowych samoprzylepnych taśm modyfikowanych różną ilością montmorylonitu lub kaolini wszystkie wykazały stabilność kohezyjną w temperaturze pokojowej oraz podwyższonej. We

wszystkich przypadkach wzrost zawartości napełniacza krzemowego powoduje pogorszenie się właściwości adhezyjnych oraz kleistości. We wszystkich przypadkach odnotowano znaczny wzrost maksymalnej temperatury pracy (tylko w jednym przypadku poniżej 200°C). Opisane odpornie termiczne jednostronne klejące taśmy samoprzylepne mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle samochodowym, maszynowym oraz kosmonautyce. W codziennym zastosowaniu mogłyby być stosowane jako łączniki rur rozprowadzających ciepłe powietrze.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.K. Antosik, Z. Czech, Wiad. Chem., 2015, **69**, 111.
- [2] A.K. Antosik, Z. Czech, Wiad. Chem., 2016, **70**, 25.
- [3] A. Butwin, Z. Czech, ABiD, 2009, **14**, 8.
- [4] B. Pang, Ch.-M.Ryu, H.-II Kim, J. Appl. Polym. Sci., 2012, **129**, 276.
- [5] S. Mecham, A.Sentman, M. Sambasivam, J. App. Polym. Sci., 2010, **116**, 3265.
- [6] A.K. Antosik, P. Bednarczyk, Z. Czech, Chemik, 2015, **69**, 12.
- [7] A.K. Antosik, P. Ragańska, Z. Czech, Polimery, 2014, **59**, 792.
- [8] S.B. Lin, L.D. Durfee, R.A. Ekeland, J. McVie, G.K. Schalau, J. Adhes. Sci. Tech., 2007, **21**, 605.
- [9] G. Tolia, S.K. Li, European J. Pharm. Biopharm., 2012, **82**, 518.
- [10] F. Sun, Y. Hu, H.-G. Du, J. App. Polym. Sci., 2012, **125**, 3532.
- [11] Z. Czech, A. Butwin, Wiad. Chem., 2009, **63**, 269.
- [12] A.K. Antosik, Z. Czech, *Mała Wielka Nauka: W Labiryncie Nauki – Zbiór Artykułów*, Łódź 2016.
- [13] A.K. Antosik, J. Nanomed. Nanotoch., 2015, **5**, 100.
- [14] A.K. Antosik, Z. Czech, Przem. Chem., 2016, **95**, 1319.
- [15] W. Królikowski, Z. Rosłaniec, Kompozyty, 2004, **4**, 3.
- [16] M. Kacperski, Kompozyty, 2003, **3**, 225.
- [17] J. Gołębiowski, Przem. Chem., 2004, **83**, 15.
- [18] M. Środa, M. Gąsiorek, Ł. Sudół, Cera. Mater., 2014, **66**, 151.
- [19] A. Brożyna, J. Iwko, R. Mrzygłód, Tworz. Sztu. Przem., 2016, **1**, 39.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 grudnia 2016

DERYWATYZACJA CHEMICZNA W WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

THE CHEMICAL DERIVATIZATION IN HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Adrianna Kamińska*, Marta Joanna Krawczyk,
Grażyna Chwatko**

*Katedra Chemii Środowiska, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź
e-mail: adka367@interia.eu

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Techniki derywatyzacji

2. Derywatyzacja przedkolumnowa

 2.1. Derywatyzacja przez grupę aminową

 2.2. Derywatyzacja przez grupę sulfhydrylową

 2.3. Derywatyzacja przez grupę hydroksyloową

 2.4. Derywatyzacja przez grupę karboksylową

 2.5. Derywatyzacja przez grupę aldehydową

 2.6. Inne sposoby derywatyzacji analitu

3. Derywatyzacja pokolumnowa

 3.1. Derywatyzacja przez grupę aminową

 3.2. Derywatyzacja z wykorzystaniem nanocząstek

 3.3. Derywatyzacja przez grupę sulfhydrylową

 3.4. Inne sposoby derywatyzacji analitu

4. Derywatyzacja w kolumnie

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Adrianna Kamińska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w roku 2015. Pracę magisterską zatytułowaną „Oznaczanie siarki kwasowo labilnej techniką HPLC” obroniła w Katedrze Chemii Środowiska. Obecnie jest słuchaczką II roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Chemii UŁ. Jednym z jej głównych zainteresowań naukowych jest opracowywanie nowatorskich metod analitycznych, umożliwiających śledzenie metabolizmu biologicznie ważnych związków siarki stosowanych w prewencji chorób cywilizacyjnych.



mgr Marta Joanna Krawczyk jest doktorantką na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Tytuł magistra chemii ze specjalizacją Chemia i nanotechnologia nowoczesnych materiałów uzyskała w roku 2013 za pracę zatytułowaną „Wykorzystanie izotachoforezy do oznaczania anionów nieorganicznych w produktach kosmetycznych”. Jej praca naukowa obejmuje badania przemian związków siarki w próbkach biologicznych.



dr hab. Grażyna Chwatko od 1996 roku jest zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Pacę doktorską na temat „Wyznaczanie statusu redox tioli w osoczu krwi ludzkiej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej” obroniła w roku 2002. Roczny staż podoktorski, związany z badaniem biochemicalnych aspektów aterogennego działania homocysteiny, odbyła w New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, USA. W 2014 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych

po przedstawieniu rozprawy na temat: „Analiza próbek biologicznych na zawartość metabolicznie spokrewnionych związków siarki”. Jej zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych metody wykrywania i oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych oraz zastosowanie tych metod do monitorowania przemian metabolicznych w organizmach, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych.

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a method used to determine inorganic and organic substances in biological samples. Nevertheless, many analytes cannot be detected using HPLC method, because they do not contain a necessary chromophoric or fluophoric groups. Derivatization is the solution of this problem. This process can be defined as a conversion of analyte to corresponding derivative which possesses in its structure a moiety compatible with suitable detector [1, 2]. Reagent responsible for conversion of analyte to a derivative needs to meet a lot of requirements. It needs to be selective e.g. to react only with analysed substances and it should not generate by-products. The derivatization reagent should react rapidly, quantitatively, at lowest possible temperature and weakly pH, and the excess of reagent should be easily removable from reaction medium [1, 3, 5]. The derivatization can be carried out in pre-column, post-column and on-column mode. In the pre-column derivatization, analytes are derivatized before injection on HPLC system, and the reaction products are separated and detected. In the post-column derivatization, the reaction is performed automatically by adding the derivatization reagent after separation but before detection. The third method is based on reaction, which simultaneously proceeds with column separation [2, 3, 5, 6].

The derivatization processes in gas and liquid chromatography are subject matter among researcher from all over the world. The Polish literature has only few review articles on derivatization process in liquid chromatography [2, 4, 55]. The present article reviews derivatization techniques used in HPLC. Derivatization techniques used in gas chromatography are classified due to the chemical nature of derivatization reagent [3, 56]. Our attention is focused on the analyte and derivatization reagent, which can react with various functional groups such as amino, sulphydryl, hydroxyl or carboxyl groups, occurring in the examined molecules. By chemically modification compounds into derivatives, they obtain necessary properties for chromatographic separation and accurate analysis.

Keywords: high performance liquid chromatography, derivatization, chromophoric group

Słowa kluczowe: wysokosprawna chromatografia cieczowa, derywatyzacja, grupa chromoforowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 2-CA – 2-cyanoacetamid (ang. *2-cyanoacetamide*)
2-HAP – 2-hydroksyacetofenon (ang. *2-hydroxyacetophenone*)
2-ME – 2-merkaptetoanol (ang. *2-mercaptopethanol*)
APDS – karbaminian 3-aminopyridyl-N-hydroksysukcynoimidylu (ang. *3-amino-pyridyl-N-hydroxysuccinimimidyl carbamate*)
AQC – karbaminian 6-aminochinolinyl-N-hydroksysukcy-noimidylu (ang. *6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimimidyl carbamate*)
BCPB – bromek 1-benzyl-2-chloropyridyniowy (ang. *1-benzyl-2-chloropyridinium bromide*)
BCETS – 2-(11H-benzo[a]-karbazol-11-il)etylo-4-metylobenzenosulfonian (ang. *2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl)-ethyl-4-methylbenzenesulfonate*)
CMQT – tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinolinowy (ang. *2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate*)
DNFB – 2,4-dinitrofluorobenzen (ang. *2,4-dinitrofluorobenzene*)
DPPH – 2,2-difenyo-1-pikrylohydrazyl (ang. *2,2-difenyo-1-picylhydrazyl*)
DTNB – kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (ang. *5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*)
EAHC – chlorowodorek etoksyaminy (ang. *ethoxyamine hydrochloride*)
EDC – chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (ang. *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride*)
ESI – jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionization*)
FLC – fluoreskamina (ang. *fluorescamine*)
FLD – detektor fluorescencyjny (ang. *fluorescence detector*)
FMOC – chloromrówczan 9-fluorenylometylu (ang. *9-fluorenylmethylchloroformate*)
Hcy – homocysteina (ang. *homocysteine*)
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)
LA – kwas liponowy (ang. *lipoic acid*)
LOD – granica wykrywalności (ang. *limit of detection*)
LOQ – granica oznaczalności (ang. *limit of quantification*)
MASC – chlorek 10-metyloakrydyno-2-sulfonylu (ang. *10-methyl-acridone-2-sulfonyl chloride*)

MS/MS	– tandemowa spektrometria mas (ang. <i>tandem mass spectrometry</i>)
NAC	– N-acetylo-L-cysteina (ang. <i>N-acetyl-L-cysteine</i>)
NBD-COCl	– 4-(N-chlorometyloformylo-N-metyloamino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (ang. <i>4-(N-chloroformylmethyl-N-methylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole</i>)
NBD-F	– 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (ang. <i>4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole</i>)
NDA	– naftaleno-2,3-dikarboksyaldehyd (ang. <i>naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde</i>)
NQS	– 1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (ang. <i>sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate</i>)
N-Hcy	– homocysteina związana z białkami wiązaniem amidowym (ang. <i>homocysteine bound to protein by an amide linkage</i>)
OPA	– o-dialdehyd ftalowy (ang. <i>o-phthaldialdehyde</i>)
TMBB-EDAN	– 1,3,5,7-tetrametylo-8-butyretylenodiaminodifluoroboradiaza-s-indacen (ang. <i>1,3,5,7-tetramethyl-8-butyrethylene diamine difluoroboradiaza-s-indacene</i>)
tHcy	– homocysteina całkowita (ang. <i>total homocysteine</i>)
UV-Vis	– spektrofotometria UV-Vis (ang. <i>ultra violet visible spektrophotometry</i>)

WPROWADZENIE

Wiele substancji będących przedmiotem zainteresowania analityków wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) nie jest kompatybilnych ze stosowanymi detektorami takimi jak spektrofotometryczny czy spektofluorymetryczny, ponieważ w swojej strukturze nie zawierają aktywnych grup chromo- lub fluoroforowych. Ponadto niektóre związki obecne w próbkach materiału biologicznego występują na poziomie porównywalnym lub wyższym od poziomu analitów przez co przeszkadzają i niekiedy uniemożliwiają przeprowadzenie analizy. W rozwiązaniu takich problemów może pomóc zastosowanie reakcji derywatyzacji. Jest to proces polegający na przeprowadzeniu analitu w pochodną, która w swojej strukturze posiada ugrupowanie dobrze rozpoznawane przez określone detektory. Wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych do analitu, wskutek procesu derywatyzacji, może dodatkowo zmieniać właściwości fizykochemiczne związku takie jak polarność cząsteczki i jednocześnie jej rozpuszczalność. Nadanie nowych właściwości pozwala zatem na odróżnienie analitu od innych substancji obecnych w próbce i dodatkowo ułatwia a niekiedy wręcz umożliwia rozdzielenie składników w mieszaninie [1, 2].

Odczynnik derywatyzujący wykorzystywany do przekształcania analitu w pochodną winien spełniać wiele kryteriów. Przede wszystkim powinien być selektywny, tj. reagować tylko z oznaczaną substancją, a stochiometria reakcji oraz struktura powstającego w reakcji produktu powinna być dokładnie znana [3]. Reakcja pomiędzy odczynnikiem a analitem powinna zachodzić szybko, ilościowo, powtarzalnie i najlepiej przebiegać w łagodnych warunkach [1, 3]. Z analitem odczynnik powinien tworzyć tylko jedną pochodną, której maksimum absorpcji byłoby przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych (w przypadku detekcji UV). Dzięki czemu występujące zjawisko przesunięcia batochromowego umożliwiły stosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego w stosunku do analitu, skracając jednocześnie czas reakcji derywatyzacji [4]. Niezwykle istotne jest, aby powstające w czasie reakcji produkty uboczne, nie wykazywały absorpcji promieniowania UV czy fluorescencji, ewentualnie maksima absorpcji tych związków znacząco różniły się. Nadmiar odczynnika, jeśli przeszkaźda w analizie, powinien być łatwo eliminowany ze środowiska reakcji [1, 3].

Odczynniki derywatyzujące można podzielić na cztery grupy [5]: (1) absorbowjące światło w zakresie UV-Vis, które w reakcji z analitem wprowadzają do cząsteczek grupę chromoforową, np. chlorek benzoilu, tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinolinowy (CMQT); (2) odczynniki fluorogeniczne, które same nie fluoryzują, ale reagując z określonymi związkami przekształcają się w emitujące światło cząsteczki, np. fluoreskamina; (3) odczynniki fluoresencyjne, które posiadają wysoce fluoresencyjną grupę aromatyczną (fluorofor) i grupę reaktywną; (4) odczynniki o właściwościach redoks, wykorzystywane w elektrochemii. Wybór odpowiedniego odczynnika derywatyzującego jest uzależniony od stosowanego detektora.

1. TECHNIKI DERYWATYZACJI

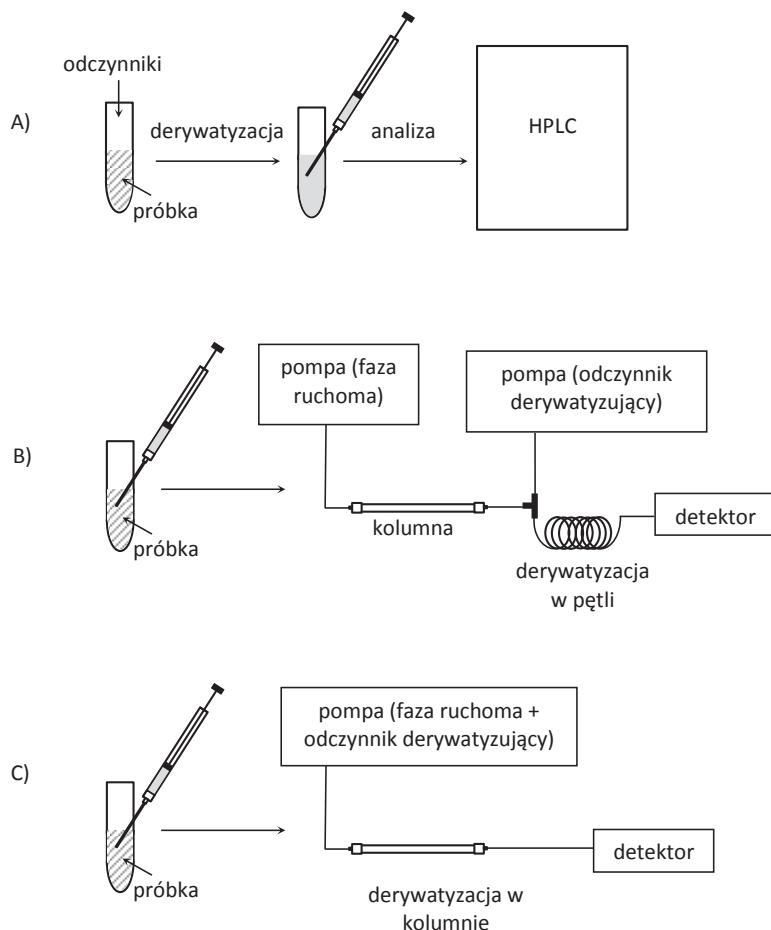
Proces derywatyzacji znany jest od ponad sześćdziesięciu lat i stosowany niemal w każdym laboratorium analitycznym. Zarys historyczny i główne kierunki rozwoju tego procesu wykorzystywanego w połączeniu z techniką HPLC zostały przedstawione w Tabeli 1.

Derywatyzacja w połączeniu z techniką HPLC jest bardzo przydatnym narzędziem w nowoczesnym laboratorium analitycznym, ponieważ umożliwia oznaczanie związków, które są trudno wykrywalne nawet przy pomocy zróżnicowanych detektorów. Zastosowanie derywatyzacji umożliwia znaczne obniżenie wartości granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ), a także eliminację interferencji pochodzących od składników matrycy. Derywatyzacja w HPLC może być prowadzona w trybie przedkolumnowym (ang. *pre-column*), pokolumnowym (ang. *post-column*) oraz w kolumnie (ang. *on-column*). Wyżej wymienione techniki różnią się w oparciu o „miejscie” prowadzenia reakcji derywatyzacji (Rys. 1). W przypadku derywatyzacji przedkolumnowej odczynnik dodawany jest do próbki przed jej wprowadzeniem do układu HPLC. W derywatyzacji pokolumnowej odczynnik dodaje się do strumienia eluatu pomiędzy kolumnę a detektor [6]. Z kolei w przypadku derywatyzacji w kolumnie do układu HPLC wprowadza się mieszaninę odczynnika derywatyzującego i próbki, a reakcja pomiędzy nimi zachodzi w kolumnie chromatograficznej w trakcie rozdzielania [2]. We wszystkich trzech sposobach prowadzenia derywatyzacji, reakcja może być zakłócona przez wpływ składników matrycy próbki. Na wybór sposobu przeprowadzenia derywatyzacji wpływa zarówno posiadana aparatura, jak i parametry w których prowadzona jest reakcja (pH buforu, czas trwania reakcji czy temperatura) [1, 3].

Tabela 1. Kamienie milowe w rozwoju technik derywatyzacyjnych łączonych z chromatografią cieczową, które znalazły zastosowanie w praktyce analitycznej.
 Table 1. Milestones in development of field of application of derivatization supported liquid chromatography in analytical practice.

Rok	Opis	Lit.
1957	Derywatyzacja małych ilości związków karbonylowych.	[7]
1966	Derywatyzacja tioli za pomocą izocyjanianu trichloroacetylu w celu uproszczenia interpretacji widm NMR.	[8]
1973	Zastosowanie reakcji benzoilowania do derywatyzacji hydroksysterydów. Oznaczanie powstałych pochodnych za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz.	[9]
1973	Zastosowanie 1-benzylo-3-p-tolilotriazenu do derywatyzacji kwasów tłuszczyowych w analizie HPLC z detekcją UV. Potwierdzenie struktur powstałych pochodnych za pomocą spektrometrii mas.	[10]
1976	Pokolumnowa derywatyzacja nonapeptydów.	[11]
1977	Pierwsza opublikowana książka na temat zastosowania derywatyzacji w chromatografii.	[12]

Rok	Opis	Lit.
1978	Automatyzacja procesu derywatyzacji przedkolumnowej.	[13]
1995	Zastosowanie derywatyzacji w kolumnie do oznaczania amin.	[14]
2002	Derywatyzacja na włóknie (SPME) w połączeniu z układem HPLC.	[15]
2008	Automatyzacja procesu derywatyzacji chemicznej oraz techniki mikroekstrakcji do fazy sta-cjonarnej w postaci filmu pokrywającego wewnętrzną ściankę rurki.	[16]
2009	Jednoczesne zastosowanie derywatyzacji <i>in situ</i> oraz mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej w celu oznaczenia amin w próbках żywiości.	[17]
2011	Zastosowanie dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym z wykorzystaniem cieczy jonowych oraz procesu derywatyzacji do oznacza-nia sulfonamidów w wodach rzecznych, miodzie, mleku i osoczu zwierząt.	[18]



Rysunek 1. Schemat ilustrujący sposoby prowadzenia derywatyzacji: A) przedkolumnowej, B) pokolumnowej, C) w kolumnie

Figure 1. The scheme of possible derivatization procedures A) pre-column, B) post-column

Większość odczynników derywatyzujących można stosować tylko dla jednego sposobu prowadzenia derywatyzacji. Jednakże są i takie, jak na przykład *o*-dialdehyd ftalowy (OPA), który jest szeroko stosowany zarówno w derywatyzacji przed-kolumnowej, jak i w derywatyzacji pokolumnowej i w kolumnie. W tym przypadku wybór trybu prowadzonej reakcji uzależniony jest tylko od dostępnego sprzętu, bądź efektywności rozdzielenia.

Proces konwersji chemicznej analitów w ich pochodne można również prowadzić podczas pobierania próbek, w przypadku derywatyzacji *in situ*. Ten rodzaj derywatyzacji stosuje się, aby polepszyć właściwości fizykochemiczne analitów, a także dezaktywować ich reaktywne grupy funkcyjne, jak np. grupy tiolowe. Ze względu na to, iż grupę –SH charakteryzuje duża aktywność oksydoredukcyjna, dodanie akrylanu metylu zabezpiecza tę grupę w płynach biologicznych. Należy mieć jednak na uwadze, że wydłużenie czasu reakcji derywatyzacji czy też dodanie zbyt dużej ilości odczynnika derywatyzującego do matrycy, może spowodować rozcieńczenie próbki, a niekiedy nawet powstanie produktów ubocznych [19].

Ciekawym rozwiązaniem przekształcania analitu w pochodne jest połączenie techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) z procesem derywatyzacji chemicznej. Konwersję chemiczną analitu na włóknie mikroekstrakcyjnym można prowadzić jednocześnie z procesem ekstrakcji poprzez umieszczenie włókna nasyconego odczynnikiem derywatyzującym w roztworze analizowanej próbki. Przykładem takiej derywatyzacji jest przeprowadzenie w pochodną metyloaminy w próbkach wody [20]. W przypadku konwersji chemicznej analitu prowadzonej po procesie ekstrakcji, anality najpierw są adsorbowane na włóknie, a następnie derywatyzowane przez zanurzenie tych włókien w roztworze zawierającym odczynnik derywatyzujący. Zaletą derywatyzacji chemicznej na włóknie mikroekstrakcyjnym jest wyeliminowanie dużej ilości rozpuszczalników stosowanych podczas przygotowania próbki oraz czasochłonnego i pracochłonnego etapu obróbki próbki. Wadą tej metody jest jednak niska dokładność i precyza.

W myśl koncepcji „zielonej chemii analitycznej” coraz większy nacisk kładzie się na automatyzację i miniaturyzację technik analitycznych. Procesy te są kluczem w projektowaniu bardziej ekologicznych procedur derywatyzacyjnych. Konstrukcja płaskich urządzeń o bardzo małych rozmiarach tzw. chipów, stanowi alternatywę dla konwencjonalnych kapilar w elektroforezie, czy też kolumn w chromatografii. Główną cechą tego typu urządzeń jest wysoki poziom automatyzacji procesów, które mogą na nim zachodzić. Dzięki czemu na jednym urządzeniu możliwe jest pobieranie próbki, derywatyzacja, separacja oraz detekcja. Chipy są powszechnie stosowane w elektroforezie kapilarnej, a rzadziej w chromatografii cieczowej [21].

„Zielony” charakter derywatyzacji chemicznej w laboratoriach chemicznych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zielona chemia analityczna w derywatyzacji chemicznej.
 Table 2. Green chemistry in chemical derivatization.

Idea zielonej chemii	Rozwiążanie	Lit.
redukacja czasu, pracy i energii	derywatyzacja w kolumnie	[52–54]
automatyzacja czynności laboratoryjnych, równoczesne oznaczanie wielu analitów podczas pojedynczej analizy	derywatyzacja w układzie on-line	[23–27]
jednoczesna derywatyzacja i ekstrakcja	derywatyzacja na włóknie SPME	[20]
miniaturyzacja procesów analitycznych	derywatyzacja na chipie	[21]

W niniejszej pracy zostaną omówione tylko te techniki derywatyzacji, które w połączeniu z techniką HPLC przyczyniły się do rozwoju chemii analitycznej. Nie-stety, w tak krótkim artykule nie jest możliwe szczegółowe omówienie wszystkich sposobów prowadzenia derywatyzacji, dlatego naszą uwagę skupiliśmy głównie na technikach derywatyzacji przedkolumnowej, pokolumnowej i w kolumnie wykorzystywanych w chromatografii cieczowej. Główne wady i zalety tych technik zostały zebrane i przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3. Mocne i słabe strony technik derywatyzacji stosowanych w HPLC
 Table 3. The advantages and drawbacks of derivatization techniques used in HPLC

Rodzaj derywatyzacji	Zalety	Wady	Lit.
przedkolumnowa	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość stosowania wszystkich rodzajów odczynników derywatyzujących, nawet jeśli wymagają zastosowania wysokiej temperatury lub długiego czasu reakcji; - możliwość stosowania odczynników derywatyzujących znakowanych izotopowo, jako uniwersalnego wzorca wewnętrznego, eliminuje błędy popełniane na etapie przygotowania próbki; - automatyzacja procesu pozwala zmniejszyć czasochlonność i pracochnośc procedury 	<ul style="list-style-type: none"> - czasochlonność; - możliwość wystąpienia interferencji sygnału analitycznego pochodzącego od zanieczyszczeń z pi-kami analitów; - nieprawidłowy dobór optymalnych warunków derywatyzacji wpływa na pogorszenie wydajności reakcji, wystąpienie produktów ubocznych, bądź degradację powstającej pochodnej; 	[1, 2, 22–40]

Rodzaj derywatyzacji	Zalety	Wady	Lit.
pokolumnowa	<ul style="list-style-type: none"> - wyeliminowanie wieloetapowego procesu derywatyzacji przedkolumnowej, który może być źródłem mniejszej powtarzalności wyników; - możliwość stosowania kilku detektorów; - tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją - zniwelowanie ryzyka rozkładu pochodnej podczas prowadzonej analizy chromatograficznej; 	<ul style="list-style-type: none"> - aparat pomiarowy wyposażony jest w dużą pętlę reakcyjną, co zmniejsza efektywność separacji; - koszty związane z koniecznością zakupu dodatkowej aparatury - pompy dozującej odczynnik derywatyzujący; - duża ilość zużywanych odczynników; 	[6, 40, 41–51]
w kolumnie	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość prowadzenia reakcji derywatyzacji podczas rozdzielania chromatograficznego; - nie wymaga zastosowania dodatkowej aparatury, tak jak w przypadku derywatyzacji pokolumnowej; - znacząco upraszcza procedurę analityczną - skraca całkowity czas analizy. 	<ul style="list-style-type: none"> - nieprawidłowy dobór ilości odczynnika wpływa znaczco na pogorszenie czułości metody; - niekiedy wymaga zastosowania kolumny, której wypełnienie jest stabilne w skrajnych warunkach pH. 	[52–54]

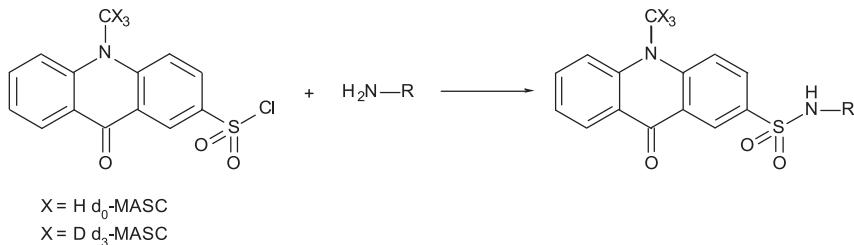
2. DERYWATYZACJA PRZEDKOLUMNOWA

Derywatyzacja przedkolumnowa wymaga dodatkowych operacji podczas przygotowania próbki do analizy, w konsekwencji czego jest procesem bardziej czasochłonnym. Oznaczany związek przekształcany jest w pochodną przed wprowadzeniem go na kolumnę chromatograficzną, co może wiązać się z ryzykiem destabilizacji próbki podczas wykonywanej analizy chromatograficznej, bądź wręcz przeciwnie, zwiększyć jej stabilność [6]. Jednak, mimo ograniczeń derywatyzacja przedkolumnowa znajduje szerokie zastosowanie w przypadku kiedy przebieg reakcji wymaga długiego czasu, mieszania czy użycia wysokiej temperatury [1, 3]. Reakcje derywatyzacji prowadzone są poprzez przyłączenie odczynnika derywatyzującego w wyniku jego reakcji z różnymi grupami funkcyjnymi: aminową, sulfhydrylową, hydroksylową czy karboksylową, występującymi w badanych cząsteczkach.

2.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

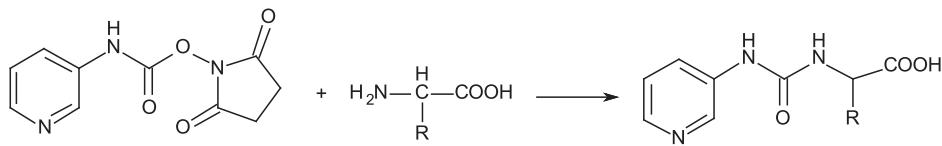
Do derywatyzacji amin biogennych zawartych w winie ryżowym Cai wraz z grupą badaczy [22] wykorzystali chlorek d_0 -10-metyloakrydono-2-sulfonu (d_0 -MASC) oraz chlorek d_3 -10-metyloakrydono-2-sulfonu (d_3 -MASC). Zastosowanie tej pary odczynników derywatyzujących znakowanych izotopowo, która

pełniła rolę uniwersalnego wzorca wewnętrznego, pozwoliło zniwelować błędy popełniane na etapie przygotowania próbki, a także pozytywnie wpłynęło na skrócenie czasu analizy chromatograficznej. Przebieg reakcji derywatyzacji ilustruje Schemat 1.



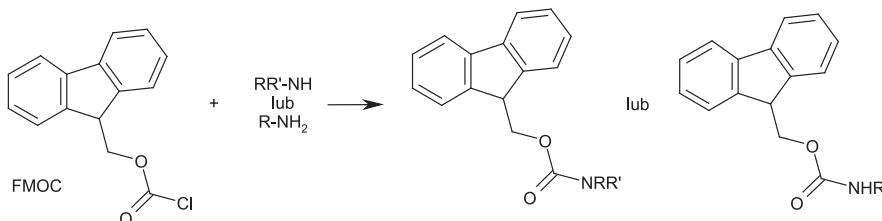
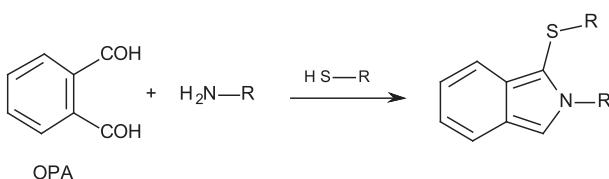
Schemat 1
Scheme 1

Do oznaczania aminokwasów w próbkach osocza człowieka procedurę derywatyzacji przedkolumnowej poddano automatyzacji, co niewątpliwie pozytywnie wpłynęło na jej precyzyję i powtarzalność oraz zwiększenie ilości próbek, które mogą być jednocześnie analizowane w krótszym czasie [23]. Anality przeprowadzano w pochodne, stosując 3-aminopyridylo-N-hydroksysukcynimid (APDS) jako odczynnik derywatyzujący (Schemat 2).

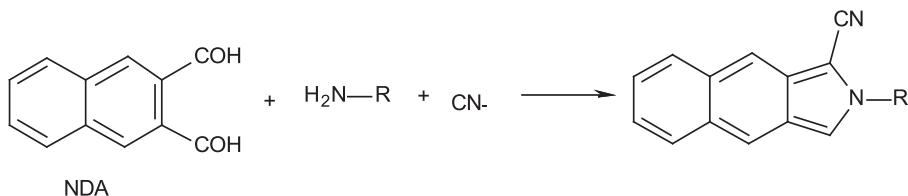


Schemat 2
Scheme 2

Automatyczną procedurę derywatyzacji wykorzystano również do oznaczenia zawartości aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych [24]. Do oznaczenia aminokwasów pierwszorzędowych jako odczynnik derywatyzujący zastosowano OPA w obecności 2-merkaptoetanolu (2-ME). Natomiast do derywatyzacji przedkolumnowej aminokwasów drugorzędowych wykorzystano chloromrówczan 9-fluorenylmetylu (FMOC). Równania reakcji z udziałem powyższych odczynników ilustrują odpowiednio Schematy 3 i 4. Automatyzacja procedury derywatyzacji, niskie zużycie rozpuszczalników oraz krótki czas analizy (< 19 min), skutkowały znaczącą liczbą analiz o wysokiej przepustowości. Ograniczeniem stosowania OPA i FMOC była ich niestabilność w temperaturze pokojowej. W swojej pracy Ezquer-Garin i in. wykazali, że OPA w temperaturze otoczenia jest trwały tylko przez co najmniej 4 godziny [25]. OPA i FMOC przechowywane w temperaturze około 5°C nadawały się do użytku tylko przez 7 dni.



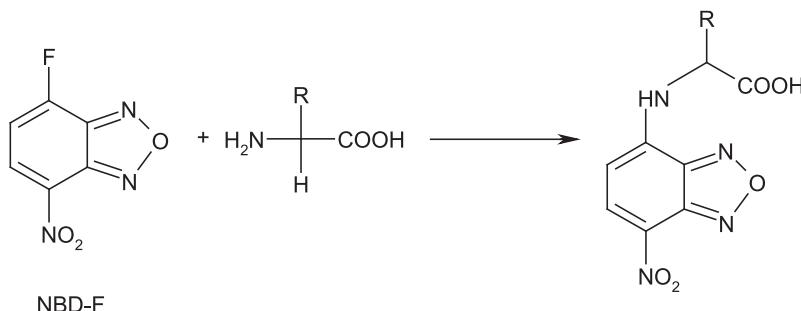
OPA zastosowano również do oznaczenia amikacyny – antybiotyku należącego do grupy aminoglikozydów. W odróżnieniu od metody opisanej przez Buha i in. [24] odczynnikem sprzągającym w reakcji derywatyzacji z OPA była N-acetylo-L-cysteina (NAC) (Schemat 3) [25]. Wyniki badań wykazały, że wzrost stężenia NAC zwiększał stabilność powstającej pochodnej fluorescencyjnej, hamując kinetykę reakcji jej rozpadu i jednocześnie spowalniając kinetykę reakcji tworzenia. Konsekwencją tego było wydłużenie czasu potrzebnego do uzyskania maksymalnej wydajności reakcji.



W roku 2016, aby oznaczyć śladowe ilości amin alifatycznych reakcję derywatyzacji prowadzono z naftaleno-2,3-dikarboksyaldehydem (NDA) w obecności jonu cyjankowego (Schemat 5) [26]. Podczas opracowania procedury derywatyzacji bardzo ważny był dobór odpowiedniej ilości NDA, ponieważ jego zbyt wysokie stężenie sprzyjało powstawaniu produktów ubocznych. Stosowany odczynnik derywatyzujący charakteryzował się wysoką trwałością. Mógł być przechowywany w lodówce przez kilka tygodni w postaci roztworu w brązowej butelce, owiniętej folią aluminiową. Jedynym ograniczeniem stosowania NDA jest jego cena, ponie-

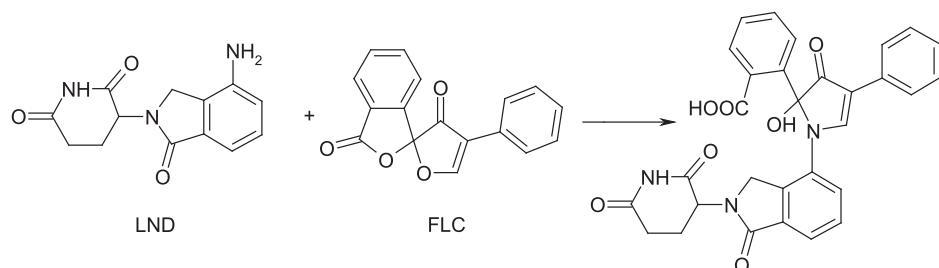
waż jest to jeden z droższych odczynników wykorzystywanych w derywatyzacji przedkolumnowej.

Innym odczynnikiem derywatyzującym wykorzystywanym do przekształcenia związków, zawierających grupy aminowe pierwszorzędowe i drugorzędowe w pochodną fluoryzującą był wysoce reaktywny 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksalidazol (NBD-F) (Schemat 6). NBD-F został zastosowany do oznaczenia proliny w miodzie [27]. W wyniku reakcji derywatyzacji tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej. Ograniczeniem procesu derywatyzacji był dobór odpowiedniej masy próbki miodu. Ponieważ w przypadku cięższych naważek, NBD-F nie mógł w pełni reagować z oznaczanym analitem, co było prawdopodobnie spowodowane faktem, iż podobnie jak prolin, również inne związki mogły reagować z NBD-F.



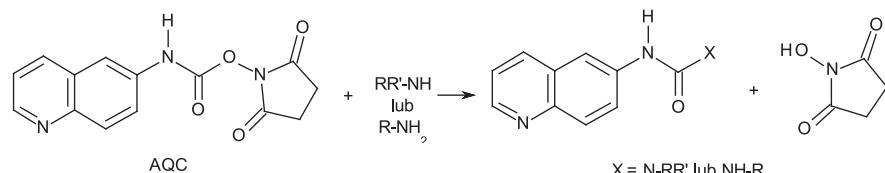
Schemat 6
Scheme 6

Derywatyzację przedkolumnową zastosowano również do oznaczenia lenalidomidu (LND), którego stężenie monitorowano w osoczu człowieka [28]. Konwersję analitu (Schemat 7) z utworzeniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej prowadzono z fluoreskaminą (FLC). FLC po rozpuszczeniu w acetonitrolu mogła być przechowywana w temperaturze -20°C w ciągu 7 dni bez dostępu światła.



Schemat 7
Scheme 7

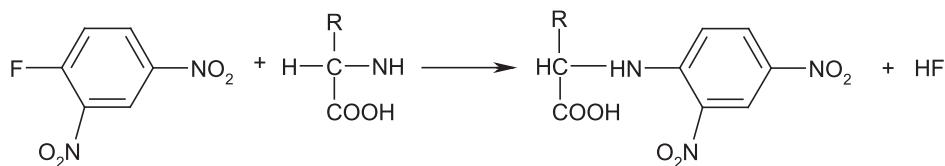
Odczynnikiem derywatyzującym, który zastosowano do oznaczania aminokwasów w osoczu krwi pacjentów będących w ostrzych stanach chorobowych był karbaminian 6-aminochinolinilo-N-hydroksysukcynoimidylu (AQC) (Schemat 8) [29]. Zaletą tego odczynnika był fakt, że tworzące się pochodne mogły być oznaczone z wykorzystaniem detektora UV-Vis oraz detektora FLD. Wybór podwójnej detekcji podyktowany był ograniczeniami opracowanej metody. Znaczną ilość oznaczeń wykonano za pomocą detektora UV-Vis. Ponieważ niektóre zderywatyzowane aminokwasy, z uwagi na ich zbyt niskie stężenie, były słabo widoczne na chromatogramie detektora FLD.



Schemat 8

Scheme 8

Uniwersalnym i niedrogim odczynnikiem wykorzystywanym w derywatyzacji przedkolumnowej aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych jest także 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB) (Schemat 9) [30]. Zaletą tego odczynnika derywatyzującego była wysoka stabilność tworzących się pochodnych aminokwasów w temperaturze pokojowej. Natomiast ograniczeniem procedury derywatyzacji był dobór odpowiedniej ilości DNFB, ponieważ nadmiar tego odczynnika derywatyzującego powodował sygnał analityczny, który interferował z sygnałem analitu.



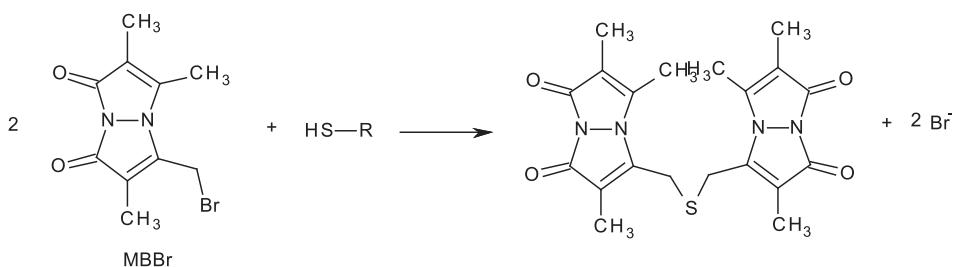
DNFB

Schemat 9

Scheme 9

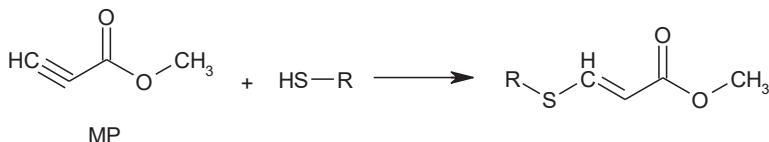
2.2. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHODYLOWĄ

W 2014 roku do derywatyzacji kwasu 3-merkaptopropionowego zastosowano monobromobiman (MBBr) (Schemat 10) [31]. Wybór tego odczynnika derywatyzującego podyktowany był wysoką wydajnością i stabilnością tworzącej się pochodnej fluorescencyjnej. Dzięki temu próbki mogły być przechowywane w temperaturze 4°C, przez co najmniej jeden rok przy zaledwie około 3–5% straty analitu.



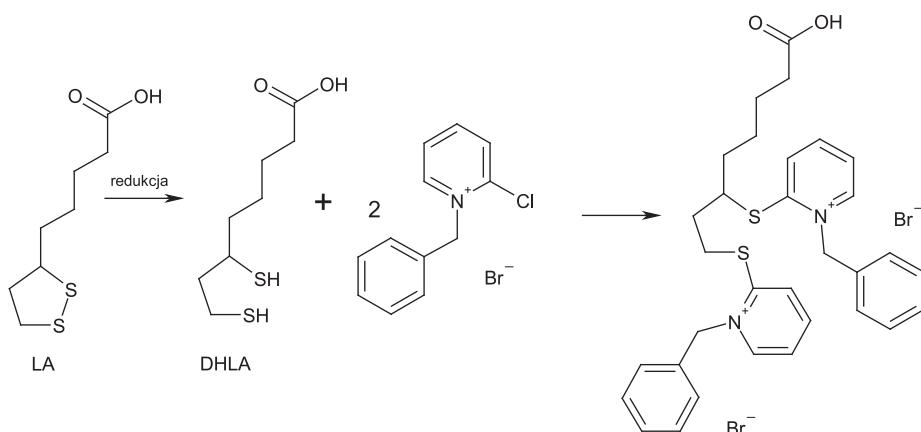
Schemat 10
Scheme 10

Samara wraz z grupą badaczy derywatyzację endogennych tioli (Schemat 11) prowadzili z użyciem propiolanu metylu (MP) [32]. Jak podkreślają autorzy dobór optymalnych warunków do reakcji derywatyzacji zapewnił odpowiednią czułość metody oraz wyeliminował powstanie produktów ubocznych.



Schemat 11
Scheme 11

Proces konwersji chemicznej analitu wykorzystano także do oznaczenia kwasu liponowego (LA) w moczu oraz suplementach diety [33]. Reakcję derywatyzacji poprzedzono etapem redukcji wiązania disiarczkowego, w celu przekształcenia LA do kwasu dihydroliponowego (DHLA). Zredukowana forma LA była następnie przeprowadzana w pochodną za pomocą bromku 1-benzylo-2-chloropirydyniowego (BCPB) (Schemat 12). W odróżnieniu do innych odczynników derywatyzujących, BCPB z DHLA reagował bardzo szybko w temperaturze pokojowej i z dobrą wydajnością.

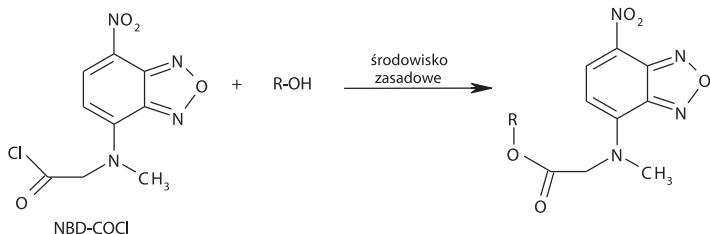


Schemat 12

Scheme 12

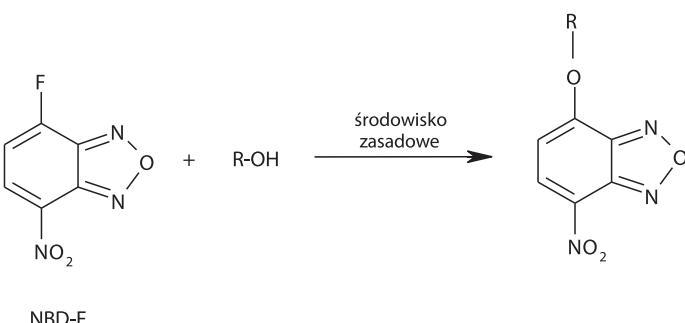
2.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ HYDROKSYLOWĄ

Przykładem analitu zawierającego w swojej cząsteczce grupę -OH jest eugenol. Do derywatyzacji tego związku zastosowano dwa odczynniki derywatyzujące. Jak wynika z danych literaturowych, metoda analityczna oznaczania eugenolu z wykorzystaniem 4-(N-chlorometyloformylometyl-N-amino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu) (NBD-COCl) (Schemat 13) [34] charakteryzowała się 6,7-krotnie wyższą czułością w porównaniu do tej, w której derywatyzację prowadzono z 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu (NBD-F) (Schemat 14) [35]. Reakcja derywatyzacji eugenolu z NBD-COCl zachodziła w bardzo krótkim czasie w temperaturze pokojowej. Dzięki temu etap przygotowania próbek do analizy nie był czasochłonny, a opracowana metoda oznaczania eugenolu w oleju goździkowym może być z powodzeniem stosowana do rutynowych analiz.



Schemat 13

Scheme 13

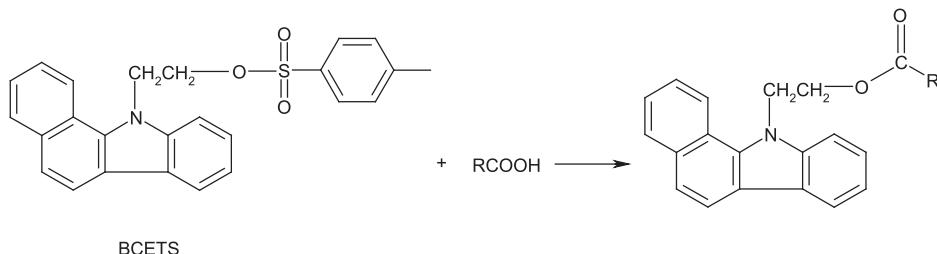


Schemat 14

Scheme 14

2.4. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ KARBOKSYLOWĄ

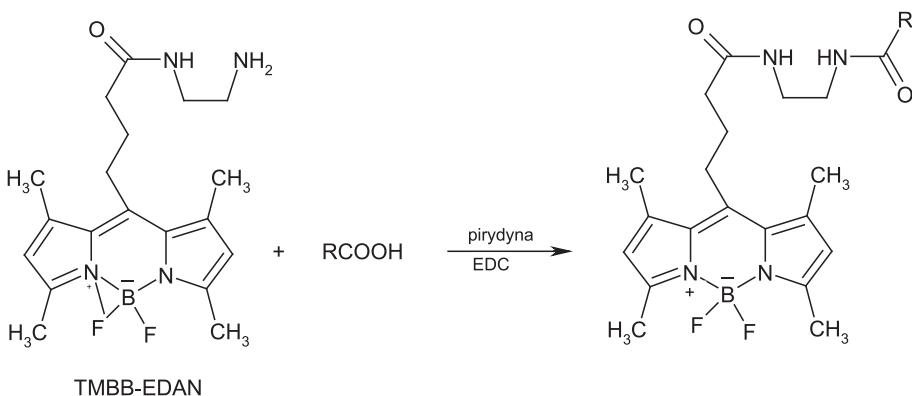
Derywatyzacja przedkolumnowa została również do oznaczania fitohormonów – związków zawierających w swojej strukturze grupę karboksylową [36]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcenia analitów w pochodne fluoryzujące był 2-(11H-benzo[*a*]-karbazol-11-il)etylo-4-metylobenzenosulfonian (BCETS). Reakcję (Schemat 15) prowadzono w obecności współrozpuszczalnika *N,N*-dimetyloformamidu i katalizatora K_2CO_3 , aby zwiększyć jej wydajność i selektywność, poprawić czułość detekcji oraz zapobiec wytrącaniu się produktów ubocznych.



Schemat 15

Scheme 15

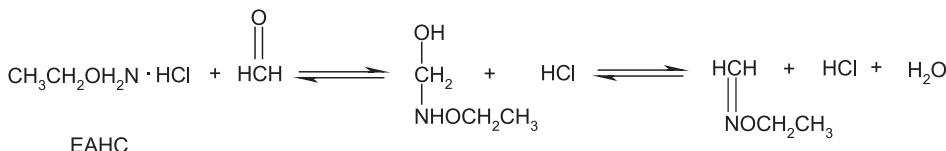
Grupę innych fitohormonów, którą stanowiło 8 giberelin oznaczono również w pomidorach i gruszkach [37]. W tym celu derywatyzację przedkolumnową prowadzono z 1,3,5,7-tetrametylo-8-butrytrylenodiaminodifluoroboradiaz-s-indacenem (TMBB-EDAN) w obecności chlorowodorku 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) i pirydyny (Schemat 16). Autorzy w swojej pracy podkreślili, że TMBB-EDAN reagował selektywnie z grupą karboksylową tylko w łagodnych warunkach, co wpłynęło na wydłużenie czasu reakcji derywatyzacji.



Schemat 16
Scheme 16

2.5. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ ALDEHYDOWĄ

W roku 2015 opracowano metodę oznaczania formaldehydu w próbkach piwa [38]. Do reakcji derywatyzacji zastosowano chlorowodorek etoksyaminy (EAHC), którego pochodne były stabilne tylko przez 2 dni. Procedura przekształcenia analitu w pochodną była relatywnie szybka i przebiegała w łagodnych warunkach.

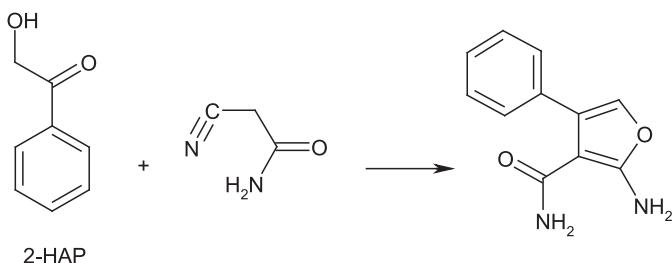


Schemat 17
Scheme 17

2.6. INNE SPOSÓBY DERYWATYZACJI ANALITU

W celu określenia zawartości 2-cyanoacetamidu (2-CA) w próbkach farmaceutycznych, optymalizacji poddano dwie procedury przeprowadzania analitu w pochodną fluoryzującą – derywatyzację przed- i pokolumnową [39]. Reakcje wykonywano stosując jako odczynnik derywatyzujący 2-hydroksyacetofenon (2-HAP) (Schemat 18). Douša i in. wykazali, że metoda oznaczania 2-cyanoacetamidu oparta na derywatyzacji przedkolumnowej charakteryzowała się wyższą czułością w porównaniu do metody z zastosowaniem derywatyzacji pokolumnowej, ale nieco mniejszą precyzją i dokładnością. Autorzy podkreślali, że ograniczeniem procedury derywatyzacji przedkolumnowej była bardzo wysoka temperatura, która nie mogła być przekroczena, ponieważ dochodziło wówczas do degradacji powstającej pochodnej. Z kolei duży nadmiar odczynnika derywatyzującego powodował spadek

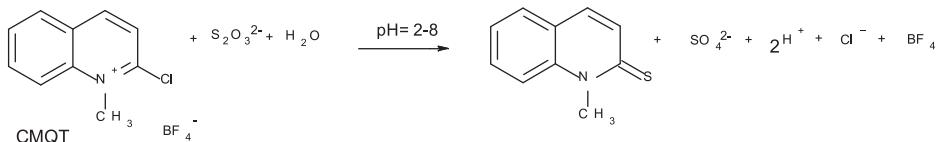
intensywności fluorescencji, dlatego też bardzo ważne było dobranie odpowiedniej objętości 2-HAP do reakcji derywatyzacji, w wyniku której tworzące się pochodne były stabilne przez około 24 godziny.



Schemat 18

Scheme 18

W ostatnich latach opracowano metodę oznaczania tiosiarczanów w moczu człowieka z wykorzystaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylochinolinowego (CMQT). Odczynnik ten był również szeroko stosowany do oznaczania egzo- i endogennych tioli w próbkach biologicznych [4]. Ze względu na to, iż reakcji CMQT z tiosiarczanami towarzyszy silne przesunięcie batochromowe, możliwe było zastosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, co również wpłynęło na skrócenie czasu reakcji derywatyzacji [40].



Schemat 19

Scheme 19

W Tabeli 4 zebrano informacje dotyczące prezentowanych w pracy związków, które oznaczane są z zastosowaniem derywatyzacji przedkolumnowej.

Tabela 4. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatyzację przedkolumnową
 Table 4. The selected methods using pre-column derivatization

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aminy biogenne	d ₀ -MASC, d ₃ -MASC	wino ryżowe	Derywatyzacja prowadzona w ciągu 15 minut w podwyższonej temperaturze 55°C w środowisku buforu boranowego o pH 9,4.	MS/MS ESI	–	0,15–0,23 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,50–0,77 ^a $\mu\text{mol/l}$	[22]	
aminokwasy I° i II°	APDS	osocze	Reakcje derywatyzacji prowadzono w środowisku buforu boranowego w zakresie pH 8,7–8,9 w temperaturze 50°C w ciągu 5 minut.	MS/ESI	–	0,12–2,27 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,39–7,55 ^a $\mu\text{mol/l}$	[23]	
aminokwasy I°	OPA/2-ME	układy biologiczne	Derywatyzację prowadzono w środowisku, buforu boranowego o pH 9,5 w temperaturze pokojowej.	FLD	340/450	34,17–196,05 ^a ng/ml	94,27–594,08 ^a ng/ml	[24]	
aminokwasy II°	Fmoc				266/305	b.d.	b.d.		
amikacyna	OPA/NAC	osocze	Reakcja przebiegała w ciągu 5 minut w temperaturze 80°C.	FLD	–	337/439	b.d.	1 $\mu\text{g/ml}$	[25]
aminy alifatyczne	NDA	wody pitne i z jeziora	Reakcja derywatyzacji zachodziła w obecności jonu cyjanowego. Czas reakcji był krótki i w środowisku alkalicznym (pH = 9), w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	FLD	–	440/480	0,01–0,04 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,04–0,1 ^a $\mu\text{mol/l}$	[26]
prolina	NBD-F	miod	Derywatyzacja przebiegała w ciągu 12 minut w temperaturze 60°C, a tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.	FLD	–	470/530	3 ^a mg/kg	10 ^a mg/kg	[27]
lenalidomid	FLC	osocze	Derywatyzacja poprzedzona była deproteinizacją białek przez acetonitryl i związaniem aminokwasów w stabilny kompleks, wskutek dodania octanu metyle. Supernatant poddawano reakcji derywatyzacji, której czas w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	FLD	–	495/382	0,8 ^a ng/ml	2,3 ^a ng/ml	[28]

Tabela 4.
Ciąg dalszy
Table 4.
Continuation

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywacjacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aminokwasy I i II ^o	AQC DNFB	osocze herbata	Reakcja derywacjacji trwała zaledwie 10 sekund i prowadzona była w obecności buforu boranowego o pH 8,8 w temperaturze pokojowej.	FLD UV-Vis	250 250/395	0,17-8,06 ^a μmol/ml	0,52-24,42 ^a μmol/ml	[29]	
tiole endogenne	MBBr	osady rzeczne	Derywacjację przedkolumnową prowadzono w buforze węglanowym o pH = 9 w temperaturze 60°C w ciągu 60 minut bez dostępu światła. Derywacjczę prowadzono w buforze kwasu 2-(cykloheksyloamino)etanosulfonowego (pH 9,3), bądź Tris-HCl (pH 7,5). Reakcja derywacjacji w temperaturze pokojowej przebiegała w czasie 15 min.	UV-Vis	360	-	0,11-4,05 ^a μg/ml	0,34-12,26 ^a μg/ml	[30]
LA	MP BCPB	owoce mocz, suplementy diety	Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej w buforze boranowym o pH=8 z dodatkiem kwasu etylenodiaminotetraoctowego. Reakcję derywacjacji prowadzono w buforze Tris-HCl o pH 9, której czas w temperaturze pokojowej wynosił 5 minut.	UV-Vis	285 321	-	0,1-0,5 ^a μmol/l	0,4-1,5 ^a μmol/l	[32]
eugenol	NBD-COCl NBD-F	olejek goździkowy olejki eteryczne	Reakcja w temperaturze pokojowej w środowisku buforu boranowego o pH 9 przebiegła w ciągu 1 min. Czas reakcji derywacjacji w temperaturze 40°C oraz w środowisku buforu boranowego o pH 8,5 wynosił 4 min.	FLD	- 470/540	0,006 ^a μg/ml	0,02 ^a μg/ml	[34]	
				UV-Vis	380	-	0,04 ^a μg/ml	0,13 ^a μg/ml	[35]

Tabela 4.
Ciąg dalszy
Table 4.
Continuation

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Detekcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
BCETS fitohormony	owoce i warzywa		Reakcję prowadzono w obecności wspólnopuszczalnika <i>N,N</i> -dimetyloformamidu i katalizatora K_2CO_3 w temperaturze 90°C. Czas reakcji derywatyzacji był stosunkowo krótki i wynosił 20 minut.	MS/APCI	–	279/380	1,7–2,6 ^a nmol/l	b.d.	[36]
				FLD					
TMBB-EDAN formaldehyd	gruszki ipomidory	piwo	Odczynnik derywatyzujący efektywnie reagował z giberelinami w temperaturze 25°C w ciągu 75 minut, w obecności EDC i pirydyny.	FLD	–	490/510	0,081–0,22 ^a nmol/l	b.d.	[37]
				UV-Vis	205	–	0,016 ^a mg/l	0,042 ^a mg/l	[38]
2-CA	2-HAP	farmaceutyczne	Reakcja derywatyzacji w środowisku buforu boranowego o pH 11 w temperaturze około 100°C przebiegała w ciągu 8 minut.	MS/APCI	–				[39]
				FLD		315/383	0,4 ^a $\mu\text{g/l}$	1,1 ^a $\mu\text{g/l}$	
tiosiarczany	CMQT	mocz	Reakcję prowadzono w środowisku kwaśnym w zakresie pH 2–8. Czas derywatyzacji był krótki i w temperaturze pokojowej przy 10-krotnym nadmiarze odczynnika wynosił zaledwie 2 minuty.	UV-Vis	375	–	0,3 ^a $\mu\text{mol/l}$	0,5 ^a $\mu\text{mol/l}$	[40]

^a Obliczone dla roztworów standardowych.

b.d. - brak danych.

3. DERYWATYZACJA POKOLUMNOWA

Derywatyzacja pokolumnowa posiada wiele zalet oraz wad (Tab. 3). Do jej nie-wątpliwych atutów można zaliczyć skrócenie czasu przygotowania próbki, ponieważ odczynnik derywatyzujący wprowadzany jest do układu. Zostaje zatem wyeliminowany wieloetapowy proces derywatyzacji przedkolumnowej, który może być źródłem zmniejszonej powtarzalności uzyskiwanych wyników. Kolejną zaletą jest tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją, co ułatwia pracę z analitami, które tworzą mało stabilne pochodne. Mocną stroną tej metody jest także możliwość stosowania kilku detektorów, które wykorzystywane są do oznaczania zarówno powstałych po reakcji pochodnych, jak i związków przed derywatyzacją. Niestety, jak każda procedura analityczna, również derywatyzacja pokolumnowa posiada swoje wady. Największym minusem jest konieczność częstego stosowania długich pętli reakcyjnych, co wpływa niekorzystnie na efektywność rozdzielania. Dodatkowo ten rodzaj derywatyzacji wiąże się z większymi kosztami zakupu sprzętu, ponieważ konieczne jest wyposażenie chromatografu w dodatkową pompę dozującą odczynnik derywatyzujący. Zastosowanie derywatyzacji pokolumnowej wiąże się również z zużyciem większych ilości odczynnika derywatyzującego. Odczynnik ten, z uwagi na szybkość przepływu analitu z kolumny do detektora, musi charakteryzować się wysoką reaktywnością [6].

3.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

Do oznaczania amin biogennych techniką HPLC najczęściej stosuje się jako odczynnik derywatyzujący OPA, który reaguje z grupą aminową analitu w obecności grup sulfhydrylowych (Schemat 3) [41–45]. W świetle derywatyzacji pokolumnowej odczynnik ten charakteryzuje się szybką kinetyką reakcji w temperaturze pokojowej, a także tworzeniem wysoce fluoresencyjnej pochodnej. Co jest ważne, odpowiedni dobór czynnika nukleofilowego np. 2-ME, jak również ograniczony dostęp światła zapobiegają degradacji odczynnika derywatyzującego. Natomiast dodanie środka powierzchniowo czynnego (np. Brij 35) znacznie poprawia stabilność tworzących się pochodnych. Innym odczynnikiem derywatyzującym, który reaguje ze związkami zawierającymi grupę aminową jest 1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (NQS) [46]. W przeciwieństwie do OPA jest jednym z rzadziej stosowanych odczynników, mimo, iż cechuje się niskimi kosztami. NQS reaguje z grupami aminowymi w roztworze alkalicznym tworząc pochodną fluoresencyjną. Ze względu na ten fakt odczynnik derywatyzujący rozpuszczano w fazie ruchomej, a dopiero eluat mieszał się z NaOH w pętli reakcyjnej. NQS został zastosowany do derywatyzacji pokolumnowej streptomycyny występującej w ogórku i kapuście pekińskiej.

3.2. DERYWATYZACJA Z WYKORZYSTANIEM NANOCZĄSTEK

Proces derywatyzacji pokolumnowej można również prowadzić z zastosowaniem nanocząstek tlenku terbu (Tb_4O_7 NPs) jako odczynnika derywatyzującego do oznaczania pozostałości antybiotyków chinolonowych w próbkach mleka [47]. Etap derywatyzacji opierał się na tworzeniu luminescencyjnych chelatów chinolonów z Tb_4O_7 NPs. Derywatyzację pokolumnową prowadzono również z wykorzystaniem nanocząstek złota (AuNPs) pokrytych niejonowym surfaktantem - Zonylem. Indukowana przez analit agregacja AuNPs mierzona była kolorymetrycznie. Zaletą takiej reakcji jest niezwykle szybka kinetyka agregacji nanocząstek oraz wysoka selektywność wiązania się z homocysteiną [48].

3.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHIDRYLOWĄ

Derywatyzację związków zawierających w swojej cząsteczce nukleofilową grupę $-SH$ w obecności odpowiedniej aminy pierwszorzędowej w środowisku zasadowym prowadzono z użyciem OPA [49]. Jony amonowe niezbędne do utworzenia wysoce fluorescencyjnej pochodnej rozpuszczone były w fazie ruchomej. Innym odczynnikiem derywatyzującym, który zastosowano do derywatyzacji związków tiolowych był odczynnik Ellmana (kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoëowy)) (DTNB) [50]. Reakcję derywatyzacji biotioli z DTNB prowadzono w obecności metylo- β -cyklodekstryny. Dodanie tego związku cyklicznego do odczynnika derywatyzującego ułatwiało jego reakcję z tiolami. Özyürek wraz z współ. zaobserwowali również, że DTNB uprzednio rozpuszczony w roztworze metylo- β -cyklodekstryny zwiększał stabilność tworzących się pochodnych.

3.4. INNE SPOSÓBY DERYWATYZACJI ANALITU

Jak opisano wcześniej w podrozdziale 2.6, odczynnik derywatyzujący 2-HAP może być stosowany do derywatyzacji 2-cyanoacetamidu zarówno w reakcji prowadzonej przedkolumnowo, jak i pokolumnowo (Schemat 18) [40]. Autorzy wykazali, że w przeciwieństwie do metody opartej na derywatyzacji przedkolumnowej, metoda wykorzystująca derywatyzację pokolumnową charakteryzowała się wyższą precyją i dokładnością. W 2015 r. opublikowano pracę, w której derywatyzację pokolumnową z 2,2-difeno-1-pikrylhydrazylem (DPPH) wykorzystano do oznaczania szeregu homologicznego skondensowanych polifenoli w niepalonych ziarnach kakaowca [51]. Niewątpliwie zaletą tego odczynnika derywatyzującego jest fakt, iż umożliwia oznaczanie polifenoli, a także określenie zdolności przeciwwietlającej wydzielonych skondensowanych polifenoli.

Zestawienie omawianych metod oznaczania wybranych związków z zastosowaniem derywatyzacji pokolumnowej przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatyzację pokolumnową
Table 5. The selected methods using post-column derivatization

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Dekrepcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aminy biogenne	owoce tropikalne		Mieszanka niezbędna do przeprowadzenia badanych analitów w pochodną fluoryzującą składała się z OPA, 2-ME oraz dostępnego handlowo roztworu Brij-35. Całość rozpuszczało w buforze boranowym, aby pH otrzymanego roztworu było równe 10,5. Reakcję derywatyzacji prowadzono w warunkach temperatury pokojowej.	FLD	–	340/450	b.d.	0,01–0,08 ^a mg/100g	[41]
histamina	świeże ryby oraz z puszki			FLD	–	340/450	0,03 ^a mg/kg	0,09 ^a ng/kg	[42]
OPA	mięso i produkt jego pochodzenia			FLD	–	330/465	0,2 mg/kg	0,5 mg/kg	[43]
aminy biogenne	lukurydza i produkt jej pochodzenia			FLD	–	340/450	0,1 μ g/ml	0,04 mg/100g	[44]
aminoalkohole	OPA	L-walinol	Odczynnik derywatyzujący z dodatkiem 2-ME rozpuszczało w roztworze tetraboranu sodu, a końcowa wartość pH wynosiła 10. Temperatura układu reakcyjnego nie przekraczała 25°C. Reakcja derywatyzacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym PCRS-100 o objętości 250 μ l, którego pętla kapilarna miała średnicę 0,42 mm.	FLD	–	345/450	0,001–0,004%	0,004–0,011% ^a	[45]
streptomycyna	NQS	ogórek i kapusta pekińska	Reakcja derywatyzacji zachodziła w środowisku alkalicznym w pętli kapilarnej o wymiarach 0,3 mm \times 10 m. Temperatura układu reakcyjnego utrzymywana była na poziomie 50°C.	FLD	–	263/435	10 ng/g	30 ng/g	[46]
chinolony	Tb ₄ O7NPs	mleko o różnej zawartości tłuszczy	Mieszanka derywatyzująca składała się z Tb4O7NPs, tlenku trioktylofosfiny, dodecylosiarczanu sodu oraz buforu Tris i heksaminy. Reakcję derywatyzacji prowadzono w zakresie pH 7–7,5.	FLD	–	340/545	2–35 ^a ng/ml	5–65 ^a ng/ml	[47]

Tabela 5.
Ciąg dalszy
Table 5.
Continuation

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Dekrekcja	λ [nm]	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
Hcy	AuNPs	mocz i osocze	Reakcja derywatyzacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym RXN 1000 o objętości 1 ml, o średnicy pętli kapilarnej 0,45 m. Proces agregacji niejonowych nanoząsteczek fluorosurfaktantu zachodził w środowisku buforu fosforanowego o pH = 6 w temperaturze 70 °C w ciągu 30 sekund.	UV	680	-	80 ^a pmol	b.d.	[48]
glutation	OPA	wino	Pętla reakcyjna miała wymiar 0,5 mm × 120 cm. Reakcja prowadzona była w buforze boranowym o pH 10, w którym rozpuszczony był OPA, natomiast jony amonowe biorące udział w tworzeniu pochodnej znajdowały się w fazie ruchomej płynącej przez kolumnę.	FLD	-	340/455	19 ^a nmol/l	62 ^a nmol/l	[49]
biotole	DTNB	plny biologiczne i farmaceutyczni	Reakcję derywatyzacji prowadzono w pętli reakcyjnej o wymiarach 0,5 mm × 5 m. Reakcja zachodziła w środowisku buforu fosforanowego o pH 2,85.	UV	410	-	0,04–0,58 μmol/l	b.d.	[50]
2-CA	2-HAP	farmaceutyczni	Reakcję derywatyzacji prowadzono w środowisku buforu boranowego o pH 11. Temperatura układu reakcyjnego utrzymywana była na poziomie 100°C. Reaktor wyposażony był w kapilarną pętlę długosci 127 cm. Czas reakcji derywatyzacji wynosił 8 min.	MS/APCI	-	356/445	3,8 ^a μg/l	12,5 ^a μg/l	[40]

Tabela 5.
Ciąg dalszy
Table 5.
Continuation

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Dekcja	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]	LOD	LOQ	Lit.
aktywność antyoksydacyjna	DPPH	niepalone ziarna kakaowca	Reakcja derywatyzacji zachodziła w pętli kapilarnej o wymiarach 0,38 mm × 4,5 m. Czas reakcji był krótki i odpowiadał 1 minutowe. Wyposażony w kapilarną pętlę reaktor termostatowany był w temperaturze 60°C.	UV-Vis	515	–	6–27 ^a µg/ml	19–83 ^a µg/ml [51]

^a Obliczone dla roztworów standardowych.
b.d. – brak danych.

4. DERYWATYZACJA W KOLUMNIE

Spośród trzech rodzajów prowadzenia reakcji derywatyzacji ta w kolumnie jest najrzadziej stosowana. W połączeniu z techniką HPLC umożliwia prowadzenie szybkich i prostych analiz z uzyskaniem wąskich i ostrzych pików w porównaniu do analiz z wykorzystaniem derywatyzacji pokolumnowej [1].

Na przestrzeni lat 2010–2016 zostały opublikowane 3 artykuły, dotyczące zastosowania derywatyzacji chemicznej biegącej w kolumnie chromatograficznej (Tab. 6).

Tabela 6. Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatyzację w kolumnie

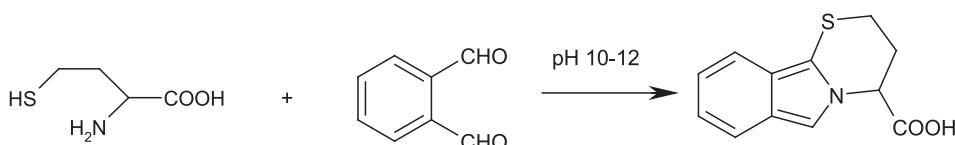
Table 6. The selected methods using on-column derivatization

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Detekcja	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	LOQ [$\mu\text{mol/l}$]	Lit.		
zred. Hcy	OPA	mocz	FLD	370/480	b.d.	0,025 ^a	[52]		
tHcy					b.d.	0,025 ^a			
tiolakton Hcy		mocz			b.d.	0,02 ^a	[53]		
tHcy					b.d.	0,25 ^a			
tHcy		osocze			b.d.	0,25 ^a			
N-Hcy					b.d.	0,25 ^a			
tHcy		wino			0,05 ^a	0,1 ^a	[54]		

^a Obliczone dla roztworów standardowych.

b.d. – brak danych.

Opisane analizy prowadzono techniką HPLC z detekcją FLD [52–54]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcania badanych analitów w pochodną fluoryzującą był OPA (Schemat 20). Opracowane metody pozwoliły na oznaczanie: formy zredukowanej (Hcy) i całkowitej homocysteiny (tHcy) w moczu człowieka [52]; tiolaktonu homocysteiny, homocysteiny związanej z proteinami wiążaniem amidowym (N-Hcy) oraz tHcy w osoczu i moczu człowieka [53]; jak również tHcy w winie [54]. Do fazy ruchomej dodawano OPA oraz 0,1 M NaOH, w konsekwencji czego pH fazy było silnie zasadowe. Wykonanie analizy o wysokiej wydajności w drastycznych warunkach umożliwiło zastosowanie kolumny PRP-1 Hamilton C18. Z uwagi na jej stabilność w zakresie pH 1–13, reakcja derywatyzacji mogła być prowadzona przy wysokich wartościach pH (8–13). Dzięki temu nie dochodziło do degradacji wypełnienia kolumny i utraty jej sprawności.



Derywatyzacja w kolumnie uprościła procedurę, umożliwiając tym samym bezpośrednie oznaczenie hydrolizatów białek osocza [54], co znacząco przyspieszyło również oznaczenie formy N-Hcy. Dodatkowo pozwoliła ona obniżyć wartości LOD tHcy w moczu, w porównaniu do wcześniej opisanej metody [53]. Przedstawione powyżej metody oparte na derywatyzacji w kolumnie z OPA, przede wszystkim eliminują ograniczenia derywatyzacji pokolumnowej. Skracają całkowity czas analizy oraz pozwalają uzyskać wąskie piki chromatograficzne.

PODSUMOWANIE

Koncepcja zielonej chemii propaguje działania zmierzające do wyeliminowania, bądź ograniczenia stosowania procesu derywatyzacji. Dostępne są procedury analityczne stosowane do rozdzielania analitów bez ich uprzedniego przeprowadzenia w pochodne. Jednakże często są one bardzo pracochłonne, bądź wymagają specjalistycznej aparatury. Dlatego też alternatywą wobec tych ograniczeń staje się proces derywatyzacji, który przede wszystkim zwiększa selektywność i czułość oznaczeń. Poprzez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych, poprawia właściwości separacyjne analizowanych związków oraz umożliwia ich detekcję. Przeprowadzenie analitu w pochodną z wykorzystaniem powszechnie dostępnych odczynników derywatyzujących można łatwo zautomatyzować, zmniejszając ilość etapów przygotowania próbki i tym samym poprawić powtarzalność uzyskiwanych wyników. Liczne zalety oraz szeroka gama odczynników derywatyzujących warunkują nieustanny rozwój technik derywatyzacji i opracowywanie nowych procedur oznaczania.

PIŚMIENIECTWO CYTOWANE

- [1] R.L. Grob, M.A. Kaiser, *Environmental problem solving using gas and liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam, New York 1982.
- [2] J. Kalembkiewicz, T. Ruman, Wiad. Chem., 2004, **58**, 113.
- [3] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, CEEAM, Gdańsk 2003.
- [4] P. Furmaniak, M. Wyszczelska-Rokiel, P. Kubalczyk, R. Głowiński, Wiad. Chem., 2014, **68**, 211.

- [5] L. Coppex, Derivatives for HPLC Analysis. Diploma thesis, [online], University of Genf, 2000, [dostęp: 2016-07-12]. Dostępny w Internecie: <https://pl.scribd.com/doc/189706760/Derivatives-for-HPLC-Analysis>.
- [6] A. Jones, S. Pravadali-Cekic, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **889**, 58.
- [7] N.D. Cheronis, H. Stein, V.M. Levey, *Microchem. J.*, 1957, **1**, 39.
- [8] P.E. Butler, W.H. Mueller, *Anal. Chem.*, 1966, **38**, 1407.
- [9] F.A. Fitzpatrick, S. Siggia, *Anal. Chem.*, 1973, **45**, 2310.
- [10] I.R. Politzer, G.W. Griffin, B.J. Dowty, J.L. Laseter, *Anal. Lett.*, 1973, **6**, 539.
- [11] R.W. Frei, L. Michel, W. Santi, *J. Chromatogr.*, 1976, **126**, 665.
- [12] K. Blau, G.S. King, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden & Son Ltd.: London 1977.
- [13] J.C. Gfeller, J.M. Huen, J.P. Thevenin, *J. Chromatogr.*, 1978, **166**, 133.
- [14] K. Saito, M. Horie, H. Nakazawa, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 1995, **36**, 639.
- [15] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2002, **963**, 295.
- [16] M.C. Prieto-Blanco, C. Ch'afér-Peric'as, P. L'opez-Mah'ia, P. Camp'ins-Falc', *J. Chromatogr. A*, 2008, **1188**, 118.
- [17] M. Saaid M, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 5165.
- [18] X. Xu, R. Su, X. Zhao, Z. Liu, Y. Zhang, D. Li, X. Li, H. Zhang, Z. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **707**, 92.
- [19] Y.Z. Baghdady, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 102.
- [20] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 425.
- [21] E. Kłodzińska, W.A. Filipiak, M. Szumski, B. Buszewski, *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, 2004, **11**, 423.
- [22] Y. Cai, Z. Sun, G. Chen, X. Liu, J. You, C. Zhang, *Food Chem.*, 2016, **192**, 388.
- [23] H. Yoshida, K. Kondo, H. Yamamoto, N. Kageyama, S.I. Ozawa, K. Shimboa, T. Muramatsu, A. Imaizumi, T. Mizukoshi, J. Masuda, D. Nakayama, Y. Hayakawa, K. Watanabe, K. Mukaibatake, H. Miyano, *J. Chromatogr. B*, 2015, **88**, 998.
- [24] S.M. Buha, A. Panchal, H. Panchal, R. Chambhare, S. Kumar, M. Jain, P.R. Patel, *J. Chromatogr. Sci.*, 2011, **49**, 118.
- [25] C. Ezquer-Garin, L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, R.F. Lisart, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, *Talanta*, 2016, **150**, 510.
- [26] C.Y. Wang, S.Y. Tung, Y.S. Lo, H.L. Huang, C.H. Ko, Ch.H. Wu, *Talanta*, 2016, **152**, 475.
- [27] Y. LI, J. Zhou, X. Xue, L. Wu, L. Chen, J. Zhang, S. Yang, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 7625.
- [28] N.Y. Khalil, I.A. Darwish, T.A. Wani, A.R. Al-Majed, *Chem. Cent. J.*, 2013, **1**, 52.
- [29] H. Wang, Y.R. McNeil, T.W. Yeo, N.M. Anstey, *J. Chromatogr. B*, 2013, **940**, 53.
- [30] N. Li, Y. Liu, Y. Zhao, X. Zheng, J. Lu, Y. Liang, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 1307.
- [31] P. Salgado, T. Visnevski-Necrasov, R.P. Kieneb, I. Azevedo, A.C.S. Rochaa, C.M.R. Almeida, C. Magalhães, *J. Chromatogr. B*, 2015, **992**, 103.
- [32] A. Samara, A. Zotou, P. Tzanavaras, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 680.
- [33] G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.*, 2014, **10**, 320.
- [34] Y. Higashi, *J. Anal. Chem.*, 2015, **70**, 1401.
- [35] Y. Higashi, Y. Fujii, J. Liq. Chromatogr. R. T., 2011, **34**, 18.
- [36] G. Li, S. Liu, Z. Sun, L. Xia, G. Chen, J. You, *Food Chem.*, 2015, **170**, 123.
- [37] Y.H. Lu, Y.M. Cao, X.F. Guo, H. Wang, H.S. Zhang, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 1520.
- [38] J. Zhao, G. Wang, T. Cao, Z. Guo, *Food Anal. Methods*, 2016, **9**, 156.
- [39] M. Douša, J. Břicháč, M. Tkadlecová, S. Man, J. Zezula, J. Hájíček, T. Pekárek, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2016, **128**, 391.

- [40] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2009, **79**, 229.
- [41] P. Santiago-Silva, R.A. Labanca, M. Beatriz, A. Gloria, *Food Rest Int.*, 2011, **44**, 1264.
- [42] W.P. Evangelista, T.M. Silva, L.R. Guidi, P.A.S. Tette, R.M.D. Byrro, P. Santiago-Silva, Ch. Fernandes, M.B.A. Gloria, *Food Chem.*, 2016, **211**, 100.
- [43] D. Rosinska, J. Lehotay, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2014, **37**, 609.
- [44] C.M. Bandeira, W.P. Evangelista, M.B.A. Gloria, *Food Chem.*, 2012, **131**, 1355.
- [45] M. Douša, J. Stach, P. Gibala, K. Lemr, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 851.
- [46] B. Chen, H. Zhang, B. Lin, J. Ge, L. Qiu, *J. AOAC Int.*, 2012, **95**, 523.
- [47] G.S. Yáñez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1405**, 126.
- [48] C. Lu, Yanbing Zu, V.W-W. Yam, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 666.
- [49] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, T.D. Karakosta, D.G. Themelis, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **795**, 75.
- [50] M. Özyürek, S. Baki, N. Güngör, S.E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **750**, 173.
- [51] V. Pedan, N. Fischer, S. Rohn, *Food Res. Int.*, 2015, **89**, 890.
- [52] R. Głowiacki, K. Borowczyk, E. Bald, H. Jakubowski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 2363.
- [53] R. Głowiacki, E. Bald, H. Jakubowski, *Amino Acids*, 2011, **41**, 187.
- [54] R. Głowiacki, K. Borowczyk, E. Bald, *Amino Acids*, 2012, **42**, 247.
- [55] R. Głowiacki, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 11.
- [56] J.M. Płotka-Wasyłka, C. Morrison, M. Biziuk, J. Namieśnik, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 4693.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 grudnia 2016

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE

NOWE TERMOWRAŻLIWE POWIERZCHNIE POLIMEROWE DO HODOWLI I UWALNIANIA KOMÓREK SKÓRY

NEW THERMORESPONSIVE POLYMER LAYERS
FOR SKIN CELL CULTURE AND DETACHMENT

**Natalia Oleszko-Torbus*, Alicja Utrata-Wesołek,
Wojciech Wałach, Andrzej Dworak, Barbara Trzebicka**

*Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk,
ul. M. Curie-Skłodowskiej 34 41-819 Zabrze*

*e-mail: noleszko@cmpw.pan.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Cel rozprawy doktorskiej

2. Opis uzyskanych wyników

2.1. Synteza i charakterystyka termowrażliwych polimerów

2.2. Synteza i charakterystyka termowrażliwych warstw polimero-wych na podłożach

2.3. Oddziaływanie polimerów i warstw polimerowych z komórkami skóry

Wnioski

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Natalia Oleszko-Torbus w roku 2009 ukończyła studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W tym samym roku podjęła pracę w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej „Nowe termowrażliwe powierzchnie polimerowe do hodowli i uwalniania komórek skóry” uzyskała stopień doktora nauk chemicznych nadany uchwałą Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego, z dnia 16 kwietnia 2015 roku. Promotorem przewodu doktorskiego była prof. dr hab. Barbara Trzebicka, a promotorem pomocniczym dr Alicja Utrata-Wesołek. Recenzentami pracy doktorskiej byli dr hab. inż. Paweł Parzuchowski, prof. Politechniki Warszawskiej oraz dr hab. inż. Piotr Ułański, prof. Politechniki Łódzkiej.

Dr Alicja Utrata-Wesołek w roku 2001 ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W 2006 roku uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej.

Dr hab. Wojciech Wałach w 1998 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. W 2015 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Dworak otrzymał doktorat w dziedzinie chemii polimerów na Politechnice Śląskiej, a habilitował się na Politechnice Warszawskiej. W roku 2007 otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych. Jest dyrektorem Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu i kierownikiem Pracowni Materiałów Nano- i Mikrostrukturalnych w tym instytucie.

Prof. dr hab. Barbara Trzebicka W 1987 roku uzyskała stopień doktora nauk technicznych na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. W 2011 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. W 2016 roku otrzymała tytuł profesora w dziedzinie nauk chemicznych. Od roku 2012 pełni obowiązki kierownika Pracowni Materiałów Węglowych i Polimerowo-Węglowych w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk.

ABSTRACT

Covalent attachment of a thermoresponsive polymer to solid support leads to layers exhibiting temperature-dependent properties. Below the cloud point temperature (T_{CP}) of the thermoresponsive polymer the layer is hydrophilic – it is hydrated and polymer chains adopt an expanded conformation. Above T_{CP} the polymer chains collapse due to dehydration and the surface becomes hydrophobic. This is a reversible process, lowering the temperature cause hydration and swelling of the layer. Such thermoresponsive layers can be obtained via reactions of entities present on the surface (e.g. functional groups, radicals etc.) with complementary functionalities in the polymer chains (grafting to) or with monomer subjected to polymerization (grafting from). Thermoresponsive layers may be used in many biomedical applications such as separation of molecules or cell sheet engineering.

In this work, well-defined thermoresponsive (co)polymers of glycidol and ethyl glycidyl carbamate (mPGl), 2-ethyl and 2-nonyl-2-oxazoline (PENOx) as well as homopolymers of 2-isopropyl-2-oxazoline (PIPOx) were grafted to functionalized glass and silica substrates with the aim to obtain thermoresponsive layers for potential application in cell sheet engineering. Presence of polymers covalently bonded to substrates was confirmed by FT-IR and XPS studies. The polymer layers were 5–50 nm thick, depending on the molar mass and polymer concentration. Microscopic techniques indicated a smooth surface of mPGl layers, slightly rough texture of PENOx layers and fibrille-like fibers surface of PIPOx layers. Ellipsometry and contact angle studies revealed the response of layers to temperature changes. Biocompatibility of layers with dermal fibroblasts was confirmed by toxicity tests. Thermoresponsive surfaces were employed as substrates for skin cell culture and harvesting. Fibroblasts adhesion and proliferation on investigated surfaces was comparable with control sample. A confluent cell sheet was formed after 24 hours of culture. The influence of surface properties on cell adhesion and proliferation was examined. Detachment of cells from surfaces was controlled by variation of the temperature. An intact monolayer of cultured dermal fibroblasts was detached. No mechanical or enzymatic methods were required to harvest the cell sheets. Skin cell sheets, detached from thermoresponsive polymer layers may be applied in the cell sheet engineering that is highly desirable in tissue regeneration.

Keywords: thermoresponsive polymer surfaces, biomaterials, cell sheet engineering, intelligent polymers

Słowa kluczowe: termowrażliwe powierzchnie polimerowe, biomateriały, inżynieria warstw komórkowych, inteligentne polimery

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

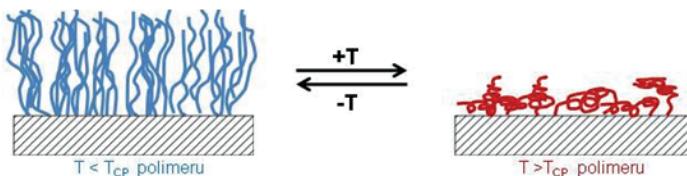
- AFM – mikroskopia sił atomowych
- ECM – macierz zewnętrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)
- EOx – 2-etylo-2-oksazolina
- FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
- IPOx – 2-izopropylo-2-oksazolina
- LCST – dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (ang. *lower critical solution temperature*)
- mPGI – poliglicydol modyfikowany izocyanianem etylu
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy
- NOx – 2-nonylo-2-oksazolina
- PE-MA – poli(etylen-*alt*-bezwodnik maleinowy)
- PENOX – poli[(2-etylo-2-oksazolina)-*co*-(2-nonylo-2-oksazolina)]
- PIPOx – poli(2-izopropylo-2-oksazolina)
- PNIPAM – poli(*N*-izopropyloakrylamid)
- T_{CP} – temperatura zmętnienia (ang. *cloud point temperature*)
- TCPS – naczynie hodowlane z polistyrenu (ang. *tissue culture polystyrene*)
- XPS – spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X

WPROWADZENIE

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają polimery wrażliwe na bodźce środowiska, tak zwane polimery inteligentne. Wśród nich szczególnie interesującą grupę stanowią polimery termowrażliwe, ponieważ ich właściwości fizyko-chemiczne mogą być kontrolowane jedynie poprzez zmiany temperatury.

Termowrażliwe polimery rozpuszczone w wodzie wraz ze wzrostem temperatury przestają się rozpuszczać i ulegają wytrąceniu. Obserwowana separacja fazowa między termowrażliwym polimerem a rozpuszczalnikiem jest odwracalna – po obniżeniu temperatury polimer powraca do stanu początkowego. Temperatura, w której następuje separacja fazowa określana jest jako punkt zmętnienia (ang. *the cloud point temperature, T_{CP}*). Zaobserwowano, że T_{CP} polimerów termowrażliwych jest zależne od ich stężenia. Na wykresie przedstawiającym zależność temperatury od stężenia polimeru, najwyższa temperatura, w której następuje separacja fazowa między polimerem a rozpuszczalnikiem, określona jako dolna krytyczna temperatura rozpuszczania (ang. *the lower critical solution temperature, LCST*) stanowi minimum krzywej [1].

Termowrażliwy polimer naniesiony na podłoże stałe tworzy warstwę, której właściwości fizykochemiczne takie jak zwilżalność i grubość można kontrolować wykorzystując zmiany temperatury otoczenia [2]. Takie warstwy umieszczone w wodzie o temperaturze poniżej T_{CP} polimeru pęcznią i wykazują właściwości hydrofilowe. Zmiana konformacji łańcuchów na podłożu, spowodowana podwyższeniem temperatury, prowadzi do odwracalnej dehydratacji łańcuchów i ich kurczenia się, warstwa polimerowa staje się hydrofobowa, zmniejsza swoją zwilżalność i przylega do podłoża (Rys. 1).



Rysunek 1. Pęcznienie i kurczenie łańcuchów polimerowych na podłożu indukowane zmianami temperatury
Figure 1. Swelling and shrinking of polymer chains on the surface induced by temperature changes

Szczególne zainteresowanie wzbudzają stabilne warstwy polimerowe przyczepione do podłoża za pomocą wiązań kowalencyjnych. Mogą być one otrzymane na drodze polimeryzacji monomeru inicjowanej grupą funkcyjną, która znajduje się na podłożu (tak zwana metoda „szczepienia od”) lub poprzez immobilizację na podłożu wcześniej zsyntetyzowanych łańcuchów polimerowych (metoda „szczepienia do”). W zależności od metody, możliwe jest otrzymanie warstw o grubości od nano- do mikrometrów, o określonej gęstości szczepienia.

Termowrażliwe, biokompatybilne warstwy polimerowe mogą być wykorzystane w medycynie i biotechnologii, na przykład jako elementy bioreaktorów. Od 1990 roku

termowrażliwe warstwy polimerowe na podłożach stałych badane są jako rusztowania do hodowli komórkowych i bezinwazyjnego odczepiania komórek w postaci arkusza [3]. Do otrzymania takich powierzchni wykorzystano dotychczas tylko poli(*N*-izopropylakrylamid) (PNIPAM) i jego pochodne [4, 5]. Warstwy PNIPAM uzyskano głównie poprzez radiacyjne szczepienie tego polimeru na powierzchniach modyfikowanego polistyrenu.

Hodowla komórkowa na termoczułych warstwach polimerowych prowadzona jest powyżej temperatury przejścia fazowego polimeru, kiedy podłożę jest hydrofobowe. Komórki ulegają wtedy adhezji, dzielą się i namnażają tworząc integralną monowarstwę spojoną przez tak zwaną macierz zewnątrzkomórkową, wypełniającą przestrzeń między komórkami. Obniżenie temperatury poniżej T_{CP} dzięki zmianie charakteru warstwy na hydrofilowy, prowadzi do odczepienia komórek w postaci arkusza. Zbędne jest stosowanie mechanicznych czy enzymatycznych technik oddzielania komórek od podłożu i pozwala uniknąć uszkodzenia wyhodowanego arkusza. Arkusze komórek wyhodowane na termowrażliwym podłożu mogą znaleźć zastosowanie w hodowli tkanek koniecznych w terapii narządów.

Niniejszy artykuł oparty jest na wyróżnionej pracy doktorskiej, w której otrzymano i badano właściwości termowrażliwych warstw (ko)polimerów glicydolu i oksazolin na szklanych i krzemowych podłożach stałych. Warstwy polimerowe na podłożach uzyskano stosując technikę „szczepienia do” podłożu, w której wykorzystano reakcje chemiczne pomiędzy grupami funkcyjnymi wprowadzonymi na podłożu a komplementarnymi grupami obecnymi w łańcuchu polimerowym. Istotne dla potrzeb pracy było sprawdzenie, czy poprzez kontrolę warunków syntezy polimerów i ich szczepienia do podłożu można wpływać na właściwości warstw, zwłaszcza na termowrażliwość. Na otrzymanych warstwach hodowano modelowe komórki skóry. Termowrażliwość podłoży wykorzystano do bezinwazyjnego odczepiania wyhodowanego arkusza komórek. Zbadano, które właściwości warstwy polimerowej i w jaki sposób wpływają na adhezję i odczepianie fibroblastów w postaci arkusza. Taka analiza pozwoliła na weryfikację otrzymanych warstw pod kątem ich przydatności w medycynie w stosunku do powierzchni stosowanych dotychczas.

1. CEL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Celem badań było opracowanie nowych, osadzonych na stałym podłożu termoczułych warstw polimerowych do hodowli komórek skóry i bezinwazyjnego ich odczepiania w postaci arkusza.

Do otrzymania warstw wybrano termowrażliwe (ko)polimery glicydolu i kopolimery oksazolin ze względu na ich nietoksyczność względem komórek skóry, łatwość sterowania właściwościami i łatwość immobilizacji do podłożu. Postanowiono, że warstwy tych polimerów na podłożu stałym zostaną otrzymane techniką „szczepienia do”, która pozwala na uzyskanie warstwy o dobrze zdefiniowanych właściwościach.

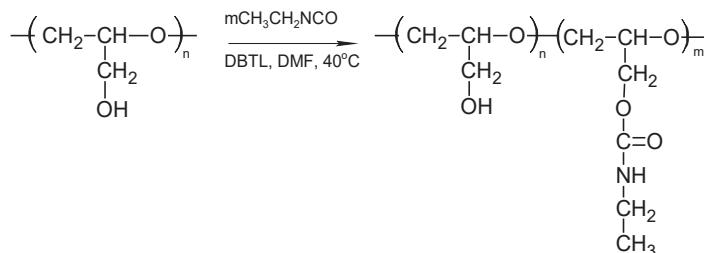
2. OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

Praca była podzielona na następujące etapy:

- synteza, charakterystyka i zbadanie cytotoksyczności wrażliwych na temperaturę polimerów opartych na glicydolu i 2-podstawionych-2-oksazolinach,
- immobilizacja termowrażliwych polimerów na funkcjonalizowanym podłożu stałym (szklanym i krzemowym),
- charakterystyka warstwy polimerowej (badanie morfologii, powinowactwa do wody, grubości, reakcji na zmiany temperatury),
- hodowla fibroblastów na otrzymanych powierzchniach oraz próby ich odczepienia w postaci arkusza pod wpływem obniżonej temperatury,
- określenie wpływu właściwości podłożu na adhezję, proliferację i odczepianie komórek skóry.

2.1. SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA TERMOWRAŻLIWYCH POLIMERÓW

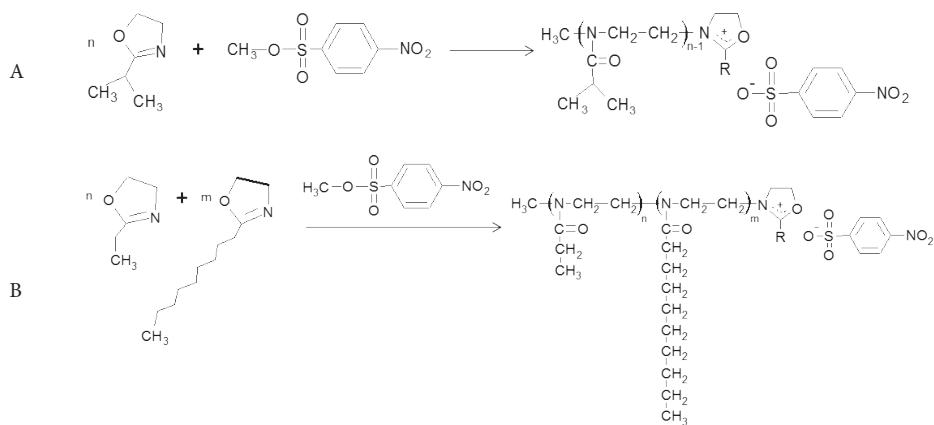
Liniowy poliglicydol otrzymano na drodze polimeryzacji koordynacyjnej eteru 2,3-epoksypropylu-(1-etyl)etylowego, inicjowanej częściowo zhydrolizowanym dietylocynkiem ($ZnEt_2/H_2O$, 1:0,8). Grupy etoksyetylowe, zabezpieczające grupy hydroksylowe podczas polimeryzacji glicydolu, zostały usunięte przez hydrolizę w środowisku kwaśnym. Tak otrzymany polimer nie wykazuje termowrażliwości. Wiadomo, że hydrofobowa modyfikacja poliglicydolu grupami octanowymi i etylokarbaminowymi prowadzi do otrzymania polimerów termowrażliwych [6]. Przeprowadzono więc reakcję modyfikacji grup hydroksylowych poliglicydolu izocyjanianem etylu, wprowadzając do łańcucha grupy etylokarbaminowe (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat modyfikacji poliglicydolu za pomocą etyloizocyjanianu

Figure 2. Modification of polyglycidol with ethyl isocyanate

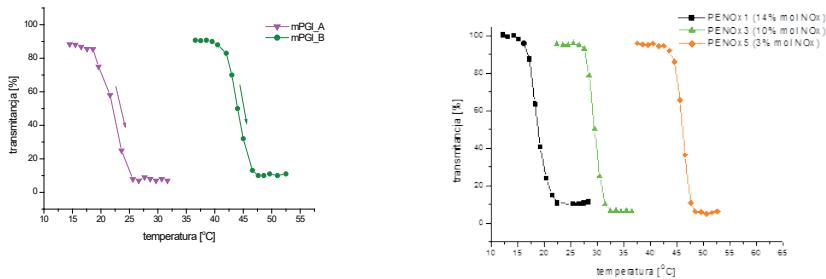
(Ko)polimery 2-oksazolin otrzymano na drodze kationowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia 2-izopropyl-2-oksazoliny (IPOx) oraz 2-etyl- (EOx) i 2-nonylo-2-oksazoliny (NOx) stosując 4-nitrobenzenosulfonian metylu jako inicjator, zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [7, 8] (Rys. 3).



Rysunek 3. Otrzymywanie homopolimeru 2-isopropyl-2-oksazoliny (A) oraz kopolimeru 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny (B)

Figure 3. Synthesis of 2-isopropyl-2-oxazoline (A) and copolymer of 2-ethyl- and 2-nonyl-2-oxazoline (B)

Otrzymano szereg kopolimerów glicydolu (mPGl) i 2-oksazolin (PENOx, PIPOx) o różnym składzie i masach molowych. Masy molowe otrzymanych polimerów wyznaczone techniką chromatografii żelowej z detekcją wielokątowego rozpraszania światła (GPC MALLS) były zgodne z wartościami teoretycznymi. Obserwano wąski i monomodalny rozkład mas molowych. Strukturę i skład otrzymanych kopolimerów potwierdzono techniką ^1H NMR. Oznaczony eksperymentalnie skład kopolimerów był zgodny z założeniami teoretycznymi. Otrzymane kopolimery wykazywały termowrażliwość – obserwowano zmianę transmitancji ich roztworów wodnych i w pożywce do hodowli komórek w funkcji temperatury (Rys. 4).



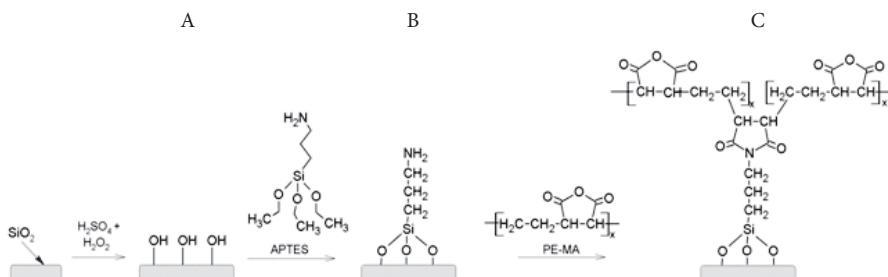
Rysunek 4. Transmitancja w funkcji temperatury dla wybranych polimerów rozpuszczonych w pożywce hodowlanej (5 g/L, $\lambda = 700$ nm)

Figure 4. Transmittance – temperature curves for chosen polymers dissolved in cell culture medium

Otrzymane termowrażliwe (ko)polimery glicydolu i 2-oksazolin nanoszono w dalszym etapie prac na podłoże stałe.

2.2. SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA TERMOWRAŻLIWYCH WARSTW POLIMEROWYCH NA PODŁOŻACH

Termowrażliwe warstwy otrzymano metodą „szczepienia do”. W tym celu uprzednio syntezowane i scharakteryzowane polimery nanoszono na podłożę zawierające odpowiednie grupy funkcyjne. Funkcjonalizacja podłoży obejmowała hydroksylację (Rys. 5A), aminosililowanie (Rys. 5B) oraz immobilizację tzw. warstwy pośredniej poli(etylenu-*alt*-bezwodnika maleinowego) (PE-MA) (Rys. 5C).

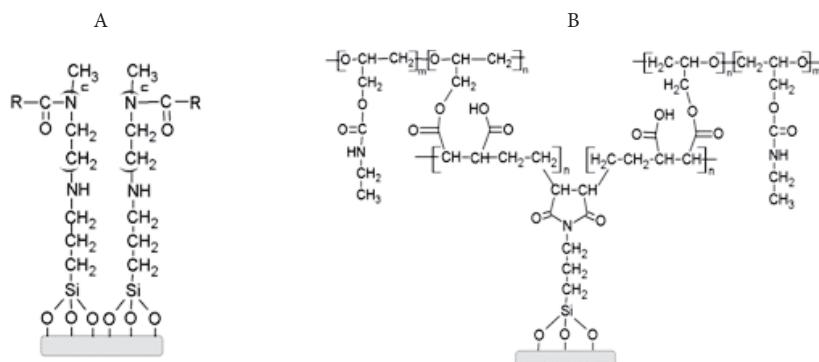


Rysunek 5. Etapy modyfikacji podłożu: hydroksylacja (A), aminosililowanie (B), wprowadzenie warstwy poli(etylenu-*alt*-bezwodnika maleinowego) (C)

Figure 5. Surface modification steps: hydroxylation (A), aminosililation (B), the intermediate layer of poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride) (C)

Po każdym etapie modyfikacji obecność grup funkcyjnych na podłożach potwierdzono techniką spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Wraz z postępem modyfikacji obserwowano wzrost chropowatości i zwilżalności podłoża.

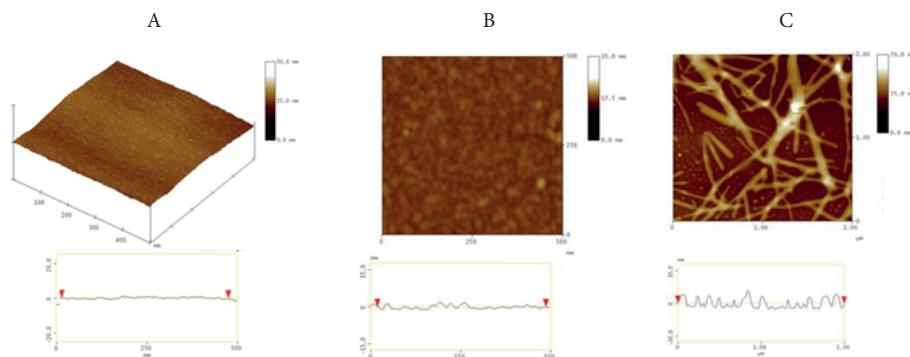
W wypadku termowrażliwych polioksazolin, żyjący koniec łańcucha polimeru terminowano grupami aminowymi na podłożu (Rys. 5B). Otrzymano w ten sposób warstwę o strukturze szczotek (Rys. 6A). Natomiast warstwa PE-MA (Rys. 5C) służyła do związania z podłożem termowrażliwej pochodnej poliglicydu, w wyniku czego otrzymano warstwy polimerowe o łańcuchach wielokrotnie przyczepionych do powierzchni (Rys. 6B).



Rysunek 6. Warstwa poli(2-oksazolin) o strukturze szczotek (A), warstwa pochodnej poliglicydu (B)
 Figure 6. Poly(2-oxazoline) layer of "brush" structure (A), layer of polyglycidol derivative (B)

Analiza składu powierzchni techniką FT-IR potwierdziła obecność termowrażliwych polimerów szczepionych na podłożu. Morfologię warstw badano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM). Warstwy poliglycydu miały strukturę gładkiego, regularnego filmu (Rys. 7A) o grubości od 20 do 60 nm. Ze wzrostem stężenia roztworu polimeru nanoszonego na podłożu zwiększała się chropowatość powierzchni oraz grubość warstwy.

Stosując kopolimer PENOx otrzymano warstwy o chropowej strukturze (Rys. 7B). Chropowatość warstwy zwiększała się wraz ze wzrostem masy molowej kopolimeru oraz z zawartością hydrofobowej 2-nonylo-2-oksazoliny w łańcuchu. Na powierzchniach warstw PIPOx występowały zarówno gładkie obszary, jak i podłużne struktury – pojedyncze lub połączone w większe skupiska, kształtem przypominające fibryle (Rys. 7C). Wykazano, że fibrylarne struktury utworzone zostały przez krystality PIPOx zaadsorbowane na powierzchni warstwy. Zawartość krystalitów na powierzchni kontrolowano poprzez zmiany czasu polimeryzacji 2-izopropylo-2-oksazoliny.



Rysunek 7. Morfologia otrzymanych warstw mPGI (A), PENOx (B) i PIPOx (C)
 Figure 7. The morphology of obtained layers: mPGI (A), PENOx (B) and PIPOx (C)

Badano termowrażliwość otrzymanych warstw polimerowych na podłożach stałych. Zmiana konformacji termowrażliwych makrocząsteczek na podłożu, spowodowana podwyższeniem temperatury, prowadzi do odwracalnej dehydratacji łańcuchów, w wyniku czego warstwa polimerowa zmniejsza swoją zwilżalność, kurczy się i przylega do podłoża. Badano grubość warstwy oraz jej zwilżalność w temperaturze poniżej i powyżej temperatury przejścia fazowego immobilizowanego polimeru. Do tego celu wykorzystano elipsometrię i pomiar kąta zwilżania.

Wszystkie warstwy inkubowane w wodzie w temperaturze 20°C wykazywały zwiększone powinowactwo do wody przy jednoczesnym zwiększeniu grubości warstwy w porównaniu z warstwami suchymi. Woda przenika w obszary międzycząsteczkowe polimeru i solwatuje łańcuchy. Warstwa polimeru wykazuje wysokie powinowactwo do niej i pęcznieje. Wartość kąta zwilżania dla inkubowanych w wodzie warstw mPGl wynosiła od 30 do 60° w zależności od grubości warstwy polimerowej, dla warstw PENOx od 50 do 56° w zależności od zawartości hydrofobowej 2-nonylo-2-oksazoliny w kopolimerze tworzącym warstwę oraz dla warstw PIPOx od 54 do 61° w zależności od stopnia pokrycia krystalitami. Jednocześnie obserwowano zwiększenie grubości wszystkich warstw podczas inkubacji w wodzie w temperaturze 20°C.

Po określonym czasie inkubacji w wodzie zwiększo temperaturę powyżej T_{CP} immobilizowanych kopolimerów. Spowodowało to zmniejszenie się grubości warstw PIPOx i PENOx wywołane kurczeniem się łańcuchów polimerowych na powierzchni. Największą zmianę grubości wykazywały warstwy PIPOx o zawartości krystalitów do 40%. Dla wszystkich warstw zaobserwowano również zmniejszenie powinowactwa do wody. Powyżej temperatury przejścia fazowego woda usuwana jest z wnętrza warstwy, powierzchnia staje się hydrofobowa, czemu towarzyszy powyższenie kąta zwilżania.

Nietypowo na zmianę temperatury reagowały warstwy mPGl. Wzrost temperatury powyżej punktu zmętnienia polimeru powodował dalszy, choć nieznaczny wzrost grubości warstw. Badany w pracy termowrażliwy łańcuch kopolimeru zawierający wiele grup funkcyjnych wiąże się z podłożem w wielu miejscach (Rys. 6B). Taka warstwa może zupełnie inaczej reagować na zmiany temperatury niż warstwy o strukturze szczotek [9]. Pomimo że warstwy mPGl w temperaturze powyżej T_{CP} ulegają dehydratacji i zmieniają swoją filowość, to jednak usuwaniu wody z ich wnętrza musi towarzyszyć częściowe rozciąganie łańcuchów prowadzące do wzrostu grubości warstwy.

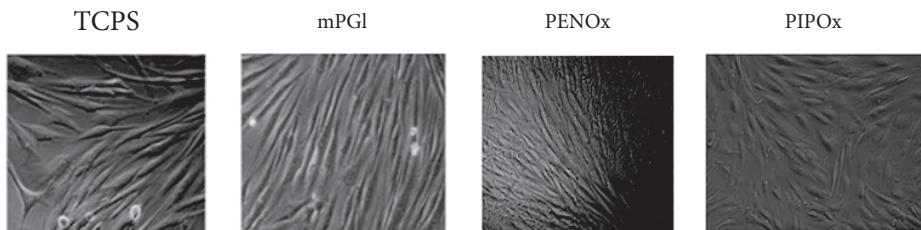
Zmiany kątów zwilżania i grubości warstw pod wpływem temperatury potwierdziły, że otrzymane warstwy są termowrażliwe.

2.3. ODDZIAŁYWANIE POLIMERÓW I WARSTW POLIMEROWYCH Z KOMÓRKAMI SKÓRY

W pracy jako modelowe komórki do badań oddziaływanego z termowrażliwymi warstwami polimerowymi zastosowano komórki skóry. Hodowle komórek skóry w formie arkuszy mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu ran i oparzeń. Istotnym postępem w leczeniu oparzeń jest możliwość stosowania arkuszy komórek spojonych macierzą zewnątrzkomórkową, a nie zawiesiny pojedynczych komórek. Wyhodowanie *in vitro* komórek naskórka lub skóry właściwej w postaci płata i jego nałożenie bezpośrednio na ranę to alternatywa, która mogłaby znacznie skrócić proces gojenia.

W pracy przeprowadzono hodowlę i próby odczepiania arkusza komórek skóry – fibroblastów, z wykorzystaniem termowrażliwych powierzchni mPGL, PENOx i PIPOx. W pierwszym etapie zbadano wpływ tych polimerów na żywotność komórek. W pracy do oceny przeżywalności fibroblastów w obecności termowrażliwych pochodnych poliglicydu i polioksazolin zastosowano standardowy test metaboliczny Alamar Blue [10]. Wykazano, że badane polimery nie były toksyczne w stosunku do fibroblastów w szerokim zakresie stosowanych stężeń, co pozwoliło na ich wykorzystanie do hodowli tych komórek.

Następnie fibroblasty wysiewano na termowrażliwe warstwy mPGL, PENOx i PIPOx w temperaturze 37°C (powyżej T_{CP} polimerów). Po określonym czasie hodowli obliczano odsetek komórek, które uległy adhezji do termowrażliwej warstwy kopolimeru. Próbę kontrolną stanowiła hodowla fibroblastów na podłożu stosowanym standardowo w laboratoriach medycznych i biologicznych – modyfikowanym polistyrenie (TCPS). W temperaturze prowadzenia hodowli fibroblasty ulegały adhezji i rozplaszczały na badanych podłożach. Po 24 godzinach hodowli na wszystkich badanych warstwach komórki osiągnęły pełną konfluencję (cała powierzchnia wzrostowa warstw była porośnięta przez komórki). Utworzony został zwarty arkusz komórek, w obrębie którego komórki ściśle przylegały do siebie i były połączone macierzą zewnątrzkomórkową. W wypadku warstw PIPOx obecność krystalitów na warstwach sprzyjała adhezji komórek. Fibrylarne krystality podobne są kształtem do włóknistych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, elastyna, fibronektyna czy laminina, przez co mogą imitować naturalne warunki wzrostu komórek. Przestrzenna sieć krystalitów, na której rosną fibroblasty, może dodatkowo ułatwiać przepływ substancji odżywczych do komórek oraz metabolitów z komórek do macierzy, co sprzyja proliferacji komórek. Na Rysunku 8 porównano przykładowy arkusz komórek wyhodowany na TCPS po 24 godzinach oraz arkusze wyhodowane na termowrażliwych warstwach mPGL, PENOx i PIPOx.

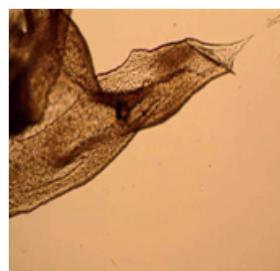


Rysunek 8. Porównanie arkusza komórek wyhodowanego na TCPS, PENOx i PIPOx i po 24 godzinach hodowli

Figure 8. Comparison of cell sheets cultured on TCPS PENOx and PIPOx after 24 hours of culture

Po osiągnięciu przez fibroblasty pełnej konfluencji przeprowadzono próby indukowanego termicznie odczepienia jednolitego arkusza fibroblastów od termowrażliwych warstw. W tym celu obniżono temperaturę hodowli do 20°C w wypadku warstw mPGl i PIPOx oraz do 15°C w wypadku warstw PENOx. W tych warunkach warstwy są dehydratowane. Pod wpływem fizykochemicznych zmian właściwości podłoża, na którym znajdują się komórki, zmienia się charakter oddziaływań białek i innych składników ECM z podłożem, co jest koniecznym bodźcem zapoczątkowującym proces odczepiania komórek od podłożu. Dla żadnej z badanych warstw mPGl po obniżeniu temperatury hodowli do 20°C nie zaobserwowano efektu samoczynnego odczepiania arkusza fibroblastów. Było to najprawdopodobniej spowodowane specyficzną reakcją warstwy na zmianę temperatury. Spośród wszystkich otrzymanych warstw PENOx, tylko dla jednej powierzchni zaobserwowano samoczynne, indukowane termicznie odczepianie arkusza komórek. Powierzchnia ta charakteryzowała się najbardziej chropowatą strukturą i najmniejszym powinowactwem do wody i wykazywała największą różnicę w kątach zwilżania pomiędzy stanem hydratowanym a dehydratowanym. W wypadku warstwy PIPOx o stopniu pokrycia krystalitami 40%, natychmiast po obniżeniu temperatury zaobserwowano odczepianie się fragmentu arkusza fibroblastów. Po około 15 minutach fibroblasty uległy całkowitemu odczepieniu, tworząc oddzielony, zwinięty arkusz (Rys. 9). W wypadku warstw PIPOx o stopniu pokrycia krystalitami 70%, a także warstw, z powierzchni których usunięto krystality, nawet po całonocnej inkubacji w temperaturze 20°C nie obserwowano efektu odczepiania arkusza fibroblastów. Zaobserwowano, że doszło jedynie do odklejenia pojedynczych komórek i fragmentów arkusza. Przeprowadzone badania wskazują, że obecność pewnej liczby krystalitów sprzyja odczepianiu arkusza.

Arkusz fibroblastów podczas samoczynnego odczepiania ulegał zwijaniu (Rys. 9). Aby zapobiec zwijaniu się arkusza użyto narzędzi do wspomagania odczepiania i przenoszenia komórek. W tym celu zastosowano trzy różne opatrunki biologiczne w postaci membran: krążek kolagenowy, syntetyczny naskórek „Suprathel” składający się z kopolimeru laktydu, węglanu trimetylenu i ε-kaprolaktonu oraz opatrunki hydrożelowy „Aqua-Gel”, w skład którego wchodzą poliwinylopirolidon, glikol polietylenowy i agar.



Rysunek 9. Odklejanie arkusza fibroblastów od warstwy PIPOx w temperaturze 20°C (rysunek lewy) oraz zwinięty arkusz fibroblastów odczepiający się od tej warstwy (rysunek prawy)

Figure 9. Detachment of fibroblast sheet from PIPOx layer at temperature 20 °C (left) and rolling of fibroblast sheet during detachment (right)

Membrany nanoszono na arkusz fibroblastów wyhodowany na termowrażliwej warstwie w temperaturze 37°C. Po przyczepieniu się komórek do danej membrany obniżono temperaturę hodowli poniżej T_{CP} . Po 15 minutach podnoszono membranę z przyczepioną warstwą komórek i przenoszono arkusz do wyjałowionych naczyń hodowlanych. Doświadczenia z wykorzystaniem membran dowiodły, że ich użycie ułatwia odczepienie i umożliwia przeniesienie arkusza fibroblastów w nienaruszonej formie.

WNIOSKI

W ramach pracy opracowano termowrażliwe warstwy wykorzystując pochodne poliglicydolu i (ko)polimery oksazolin na podłożach stałych do hodowli i bezinwazyjnego odczepiania komórek skóry w postaci arkusza.

Termowrażliwe kopolimery glicydolu i etylokarbaminianu glicydylu, 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny oraz homopolimery 2-izopropylo-2-oksazoliny nie wykazywały toksyczności względem fibroblastów.

Funkcionalizacja powierzchni krzemiu i szkła pozwoliła na wprowadzenie na podłoże reaktywnych grup funkcyjnych, zdolnych do reakcji z polimerem. W wyniku reakcji kompatybilnych grup podłoża i polimeru metodą „szczepienia do” utworzone zostały stabilne warstwy. Warstwa poliglicydolu składała się z łańcuchów polimerowych, przyczepionych do podłoża w wielu miejscach wzdłuż łańcucha. Warstwy polioksazolin miały strukturę szczotkową.

Ustalono, że struktura i grubość warstwy poliglicydolu zależy od warunków szczepienia i stężenia roztworu polimeru stosowanego podczas nanoszenia polimeru. Otrzymano warstwy o grubości od 20 do 60 nm. O chropowatości warstw kopolimerów 2-etylo- i 2-nonylo-2-oksazoliny i ich powinowactwie do wody decydowała zawartość hydrofobowej NO_x w łańcuchu. Warstwy poli(2-izopropylo-2-oksazoliny) były pokryte zaadsorbowanymi krystalitami w kształcie fibryli, a ich liczba zależała od czasu polimeryzacji PIPOx w acetonitrolu. Stopień pokrycia

powierzchni krystalitami można kontrolować stosując odpowiednie procedury (stopienie, zamorfizowanie i wymycie). Powinowactwo warstw PIPOx do wody zmniejszało się ze zwiększającą ilością krystalitów na podłożu.

Wszystkie otrzymane nanometrowe warstwy były termowrażliwe i zmieniały swój charakter z hydrofilowego na hydrofobowy wraz ze wzrostem temperatury powyżej temperatury zmętnienia immobilizowanych (ko)polimerów. Dzięki tym właściwościom otrzymane warstwy mogły być zastosowane do hodowli i odczepiania komórek.

W temperaturze hodowli, 37°C, fibroblasty dokonywały adhezji do wszystkich warstw, i w ciągu 24 godzin tworzyły jednolity, zwarty arkusz, w obrębie którego ściśle przylegały do siebie i były połączone macierzą zewnętrzkomórkową. Po obniżeniu temperatury poniżej T_{C_p} gdy warstwy wykazywały właściwości hydrofilowe, arkusz fibroblastów samoczynnie odczepił się od warstw (ko)polioksazolin. Najszybciej (w czasie 15 minut od obniżenia temperatury) arkusz fibroblastów odczepiał się od warstwy poli(2-izopropylo-2-oksazoliny), której powierzchnia była w 40% pokryta krystalitami. Badania wykazały, że obecność pewnej liczby krystalitów sprzyja odczepianiu arkusza fibroblastów od warstw poli(2-izopropylo-2-oksazoliny). Arkusz nie odczepia się samoczynnie ani od w pełni amorficznej warstwy PIPOx, ani wtedy, gdy na powierzchni znajduje się zbyt wiele hydrofobowych krystalitów. Spośród warstw PENOx, najszybsze odczepianie fibroblastów obserwowano w wypadku powierzchni o najwyższej chropowatości oraz najmniejszym powinowactwie do wody. Nie obserwowało samoczynnego odczepiania arkusza fibroblastów od warstw poli(glicydolu-co-etylokarbaminianu glicydu).

Stwierdzono, że zastosowanie narzędzi w postaci syntetycznego naskórka, opatrunku hydrożelowego lub krążka kolagenowego wspomaga odczepianie i umożliwia przenoszenie arkuszy fibroblastów w niezmienionej formie.

PODZIĘKOWANIE

Praca była współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, projekt DERMOSTIM, UDA-POIG.01.03.01-00-088/08

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] M. Heskins, J.E. Guillet, J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem., 1968, **2**, 1444.
- [2] T. Chen, R. Ferris, J. Zhang, R. Ducker, S. Zauscher, Prog. Polym. Sci., 2010, **35**, 94.
- [3] T. Takezawa, Y. Mori, K. Yoshizato, Biol. Technol., 1990, **8**, 854.
- [4] N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, Makromol. Chem. Rapid Commun., 1990, **11**, 571.
- [5] L.Q. Chu, X.N. Zou, W. Knoll, R. Förch, Surf. Coat. Tech., 2008, **202**, 2047.
- [6] M. Jamróz-Piegza, A. Utrata-Wesołek, B. Trzebicka, A. Dworak, Eur. Polym. J., 2006, **42**, 2497.
- [7] K. Aoi, M. Okada, Prog. Polym. Sci., 1996, **21**, 151.

- [8] M.W.M. Fijten, J.M. Kranenburg, H.M.L. Thijss, R.M. Paulus, B.M. van Lankvelt, J. de Hullu, M. Springintveld, D.J.G. Thielen, C.A. Tweedie, R. Hoogenboom, K.J. Van Vliet, U.S. Schubert, *Macromolecules*, 2007, **40**, 5879.
- [9] T. Chen, R. Ferris, J. Zhang, R. Ducker, S. Zauscher, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, **35**, 94.
- [10] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 5421.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2017

JUBILEUSZE

JUBILEUSZ ODDZIAŁU WROCŁAWSKIEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Elżbieta Wojaczyńska

*Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławskiego
Wybrzeże Wyspińskiego 27, 50 370 Wrocław
e-mail: elzbieta.wojacynska@pwr.edu.pl*

Oddział Wrocławski Polskiego Towarzystwa Chemicznego obchodził w 2016 roku swoje siedemdziesięciolecie. Jego utworzenie zostało formalnie zatwierdzone podczas posiedzenia Zarządu Głównego Towarzystwa w dniu 17 czerwca 1946 roku. Pierwszym prezesem Oddziału został prof. Włodzimierz Trzebiatowski, a w skład zarządu weszła ponadto inż. (poźniej profesor) Zofia Skrowaczewska, pełniąca funkcję skarbnika. W czasie swojej dotychczasowej działalności Oddział działał aktywnie na rzecz krzewienia wiedzy chemicznej, organizując wykłady, odczyty, wycieczki do zakładów pracy, patronując różnorodnym projektom edukacyjnym i konkursom. Oddział współorganizował szereg konferencji naukowych, w tym 5 zjazdów PTChem: w 1948 (piąty zjazd w ogóle, a pierwszy po wojnie), 1967, 1979, 1998 i 2004 roku. Również najbliższy, jubileuszowy, 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego zaplanowany jest we Wrocławiu.

Uroczyste spotkanie członków Oddziału poświęcone jubileuszowi siedemdziesięciolecia odbyło się 15 grudnia 2016 roku w budynku H-14 Politechniki Wrocławskiej. Wzięło w nim udział ok. 40 osób, obecnych i byłych pracowników wrocławskich uczelni i nauczyciele. Przybyłych powitała prezes Oddziału, dr hab. inż. Elżbieta Wojaczyńska (Wydział Chemiczny PWr). Głos zabrał następnie prof. dr hab. inż. Andrzej Trochimczuk, prorektor Politechniki Wrocławskiej ds. Badań Naukowych i Umiędzynarodowienia, pełniący w poprzedniej kadencji

funkcję dziekana Wydziału Chemicznego PWr, który odczytał list gratulacyjny wystosowany przez rektora uczelni, prof. dr. hab. inż. Cezarego Madryasa, ale także podzielił się osobistymi przemyśleniami. Okolicznościowe wystąpienia wygłosili również obecny dziekan Wydziału Chemicznego PWr, prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar, dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, prof. dr hab. Anna Trzeciak oraz dziekan Wydziału Nauk o Żywieniach Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, dr hab. Anna Czubaszek, prof. UP. Prezes oddziału przedstawiła następnie list gratulacyjny, jaki na jej ręce przesłał prezes Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, prof. dr hab. inż. Jerzy Błażejowski. Głos zabrał z kolei członek Zarządu Głównego, dr hab. Rafał Latajka, prof. PWr, który skupił się głównie na wyzwaniu stojącym przed Oddziałem, czyli organizacji 60. Zjazdu PTChem.



Rysunek 1. Prof. Lucjan Sobczyk w towarzystwie przewodniczącej Oddziału Wrocławskiego PTChem, dr hab. inż. Elżbiety Wojaczyńskiej

Historię Oddziału przypomniała zebranym w krótkiej prezentacji dr hab. inż. E. Wojaczyńska, która następnie wręczyła okolicznościowe dyplomy osobom pełniącym funkcje prezesów Oddziału Wrocławskiego (prof. dr hab. Lucjan Sobczyk, prof. dr hab. Henryk Ratajczak, prof. dr hab. inż. Zygmunt Sadowski; prof. dr hab. Florian Pruchnik nie mógł wziąć udziału w spotkaniu). Listy gratulacyjne odebrali także prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski, który pełnił w latach 2005–2009 funkcję prezesa Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, oraz redaktor naczelny „Widomości Chemicznych”, prof. dr. hab. Zdzisław Latajka. Krótkie wystąpienia wygłosili prof. Lucjan Sobczyk, prof. Zygmunt Sadowski oraz prof. Paweł Kafarski, który zilustrował swoje wspomnienia kilkoma slaj-

dami. Część historyczno-wspomnieniową spotkania zakończyło przedstawienie historii i dnia dzisiejszego czasopisma „Wiadomości Chemiczne”, przygotowane i przedstawione przez prof. Zdzisława Latajkę.

W części naukowej spotkania zebrani mieli przyjemność wysłuchać wykładu laureata Nagrody Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, prof. dr. hab. inż. Marka Samocia. Można było poznać jego drogę „Od kryształów molekularnych do nieliniowej nanobiofotoniki”, jaką przebył wyruszywszy niegdyś z Politechniki Wrocławskiej, by poprzez Kanadę, Stany Zjednoczone i Australię powrócić na macierzysty Wydział Chemiczny, na którym stworzył preżny zespół badawczy.

Spotkanie jubileuszowe zakończyła część towarzyska. W świąteczny nastrój wprowadziły zgromadzonych kolędy w wykonaniu wrocławskiego zespołu „Za Horyzontem”. Nie zabrakło opłatka i gwiazdkowych życzeń. Po poczęstunku trwały jeszcze rozmowy i wspomnienia z dawnych lat. Wielu spośród obecnych od dawna aktywnie uczestniczyło lub nadal bierze udział w pracach Oddziału, a staż członkowski w Polskim Towarzystwie Chemicznym kilku osób przekracza pięćdziesiąt lat (prof. Lucjan Sobczyk, dr Andrzej Puszyński, dr Jan Starosta). Dzięki ich doświadczeniu i wskazówkom przekazywanym kolejnym pokoleniom osób zaangażowanych w działanie Oddziału Wrocławskiego funkcjonuje on już od 70 lat.

Więcej zdjęć ze spotkania jubileuszowego, a także informacji o historii Oddziału, można znaleźć na stronie internetowej <http://ptchem.pwr.edu.pl/>

NOWE WYDAWNICTWA



Redakcja naukowa Robert J. Whitehurst, Maarten Van Oort, *Enzymy w technologii spożywczej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2016, wyd. pierwsze, oprawa miękka, s. 478

W 2016 roku ukazała się na polskim rynku wydawniczym książka pt. „Enzymy w technologii spożywczej”, pod redakcją naukową Roberta J. Whitehursta oraz Maartena Van Oorta wydana przez Wydawnictwo Naukowe PWN. Zgodnie ze słowem wstępym stanowi ona uzupełnienie i uaktualnienie pierwszego wydania tej książki, które ukazało się na początku XXI w. w Stanach Zjednoczonych, a celem jej powstania jest przedstawienie podstaw zastosowania enzymów i aktualnego stanu wiedzy dotyczącej produkcji enzymów stosowanych w przemyśle spożywczym. O obszerności zawartego materiału świadczyć może także liczba współautorów: 28. Książka zawiera 15 rozdziałów, w kolejności: 1) Wprowadzenie: enzymy w przemyśle spożywczym, 2) GMO a inżynieria białek, 3) Wytwarzanie enzymów przemysłowych, 4) Asparaginaza – enzym redukujący zawartość akryloamidu w produktach spożywczym, 5) Zastosowanie enzymów w produkcji wyrobów mleczarskich, 6) Enzymy w piekarnictwie, 7) Enzymy w produkcji żywności innej niż pieczywo, opartej na pszenicy, 8) Warzenie piwa z udziałem enzymów, 9) Wykorzystanie enzymów w produkcji alkoholi spożywczym oraz win, 10) Enzymy w przetwórstwie ryb, 11) Wykorzystanie enzymów w przetwórstwie owoców i warzyw oraz ekstrakcji soków, 12) Enzymy w przemyśle mięsnym, 13) Wykorzystanie enzymów w modyfikacji białek, 14) Enzymy stosowane w przetwórstwie skrobi, 15) Wykorzystanie lipaz w produkcji składników żywności. Redaktorzy naukowi i większość spośród Autorów poszczególnych rozdziałów to osoby pracujące w ośrodkach badawczo-rozwojowych firm związanych z przemysłem spożywczym, np. AB Mauri, Novozymes, DSM Food Specialties, Kerry Ingredients.

Ponieważ w intencji Autorów odbiorcami książki będą m.in. studenci oraz specjalści nie związani bezpośrednio z inżynierią spożywczą, bardzo cenny jest rozdział pierwszy wprowadzający w temat. Rozdział ten to przypomnienie w bardzo przystępny sposób podstawowych definicji, wiadomości o historii odkrycia enzymów, mechanizmie i specyficzności ich działania, kinetyce reakcji enzymatycznych poprzez czynniki wpływające na aktywność enzymów, tj. stężenie enzymu i substratu, obecności kofaktorów, koenzymów i inhibitorów. Dalsza część tego rozdziału to przegląd enzymów wykorzystywanych w różnych gałęziach przemysłu spożywczego (np. w piekarnictwie, produkcji serów, tenderyzacji mięsa). Jest to potwierdzenie sukcesu, jaki odniósły enzymy jako preferowane i użyteczne katalizatory, wynikającego z ich przewagi nad substancjami chemicznymi: integracji funkcji katalitycznych, a także specyficzności i możliwości działania w łagodnych warunkach. Autorzy nie poprzestają jednak tylko na zastosowaniu enzymów w przemyśle spożywczym i przypominają o ich roli w produkcji detergentów, wyrobów włókienniczych, biopalów i paszy dla zwierząt; ogólnie: użyciu enzymów w procesach chemicznych, fizycz-

nich i mechanicznych, czego modelowym przykładem jest zastosowanie enzymów degradujących lub modyfikujących celulozę zamiast pumeksu przy ścieraniu dżinsów.

Zastosowanie biotechnologii w produkcji produktów spożywcznych pozwala na modernizację przekształcania surowców w produkty końcowe, takie jak np. sery, jogurty, pieczywo i napoje alkoholowe poprzez zastosowanie enzymów pochodzących z różnych mikroorganizmów jako alternatywę dla chemicznych technologii. Autorzy donoszą, że obecnie w przetwórstwie żywności stosuje się ponad 55 enzymów, których ilość naturalnie będzie się zwiększać wraz z postępem spożytkowania bogactwa mikroorganizmów i inżynierii genetycznej. Kolejny rozdział jest tego potwierdzeniem i krok po kroku prezentuje procesy produkcji enzymów przemysłowych wraz z zawartym krótkim rysem historycznym, bo przecież do produkcji żywności enzymy były używane od wieków.

Kolejne rozdziały to ciekawie napisane, poparte danymi naukowymi w postaci licznych tabel, wykresów, schematów analizy zastosowania enzymów w produkcji najważniejszych produktów spożywczych: od produktów mleczarskich, piekarniczych, poprzez produkcję piwa, wina, soków owocowych i warzywnych, do produktów mięsnych i rybnych aż do enzymatycznego modyfikowania białek, skrobi i tłuszczów. Podane informacje zaciekawią nie tylko studentów, technologów żywności czy chemików, ale i szerszą publiczność zainteresowaną szczegółami nowoczesnej produkcji żywności. Każdy rozdział zakończony jest bibliografią, w której można również znaleźć rozwinięcie interesujących wątków technologicznych. Jest to cenne, ponieważ książka stara się łączyć funkcję ogólnego podręcznika z elementami monografii przy opisie konkretnych procesów podając nieraz szczegółowe dane dotyczące wydajności czy warunków transformacji.

Ciekawym aspektem prezentowanej książki jest również omówienie biokatalizatorów i końcowych produktów związanych z coraz częściej spotykanymi w populacjach dysfunkcjach układu pokarmowego, np. produkcję syropu serwatkowego jako zamiennika w produkcji lodów i deserów mlecznych dla chorych z nietolerancją laktozy spowodowanej niedoborem laktazy w przewodzie pokarmowym. Innym przykładem jest wykorzystanie hydrolizy białek w celu zmniejszenia alergenności produktów spożywczych – cenna metoda stosowana przy produkcji substytutów mleka matki dla niemowląt uzupełnionych na krowie mleko oraz dla dzieci obciążonych ryzykiem wystąpienia takiej alergii.

Książka jest ciekawie napisana i estetycznie wydana. Mimo że zastosowanie koloru podniosłoby przejrzystość schematów biochemicznych i czytelność wykresów, zastosowanie druku czarno-białego wydaje się wystarczające. Zachowano równowagę między ściśleścią języka naukowego a atrakcyjnością przekazu popularnonaukowego. Przedstawiona książka to rzeczowy podręcznik dla licznych odbiorców, nie tylko ze względu na kompendium wiedzy o katalitycznym podstawowym zastosowaniu enzymów, ale i o ich użyciu w coraz bardziej rozwijającym się przemyśle spożywczym.

Anna Panek
Katedra Chemii,
Wydział Nauk o Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek, *Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2016, str. 300, oprawa miękka.

W tym roku ukazała się książka pt. „Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki” będąca pracą zbiorową pod redakcją dr hab. Kamilli Małek. Autorami poszczególnych rozdziałów książki są wybitni specjaliści z zakresu spektroskopii w podczerwieni i spektroskopii ramanowskiej, w większości podobnie jak dr hab. Kamilla Małek, pracownicy Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Zaproszeni zostali również do współpracy przy tworzeniu książki naukowcy z Uniwersytetu Warszawskiego, Polskiej Akademii Nauk, AGH w Krakowie oraz Politechniki Wrocławskiej. Książka zawiera siedem rozdziałów, z których pierwsze pięć (Podstawy spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni (FT-IR), Podstawy spektroskopii rozpraszania ramanowskiego, Techniki spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni, Techniki spektroskopii ramanowskiej i Analiza chemometryczna widm FT-IR i ramanowskich) podaje w zwięzły i jasny sposób najważniejsze informacje dotyczące podstaw teoretycznych, aparatury i stosowanych technik spektroskopii w podczerwieni i ramanowskiej. Oprócz najbardziej popularnych technik stosowanych w obu spektroskopach bardzo cieszy fakt, że w książce znalazły się również informacje o mniej znanych ich odmianach. W rozdziale poświęconym spektroskopii w podczerwieni omówione zostały między innymi takie metody jak spektroskopia fotoakustyczna, spektroskopia emisyjna w podczerwieni, mikroskopia i obrazowanie FT-IR oraz niezwykle cenny przy badaniu chiralności, oscylacyjny dichroizm kołowy. Z kolei, oprócz normalnego efektu ramanowskiego przedstawione zostały: rezonansowy efekt ramanowski, powierzchniowo wzmacnione rozpraszanie ramanowskie, obrazowanie ramanowskie oraz jedna z metod chiraloptycznych, ramanowska aktywność optyczna.

Dwa ostatnie rozdziały książki zawierają przykłady zastosowań spektroskopii FT-IR oraz spektroskopii ramanowskiej, przedstawione w postaci instrukcji do ćwiczeń. Każda z instrukcji zawiera część teoretyczną obejmującą zakres materiału przydatnego do zrozumienia i wykonania ćwiczenia, jego cele oraz sposób wykonania. Opisane zastosowania obejmują szeroki zakres zagadnień. Oprócz ćwiczeń pozwalających na utrwalenie wiedzy teoretycznej, są również tematy z dziedziny ochrony środowiska i dziedzictwa kulturowego. Najobszerniejszą część stanowią badania FT-IR i ramanowskie dotyczące: identyfikacji, struktury, konfiguracji oraz dystrybucji związków czynnych biologicznie w roślinach, tkankach, płynach ustrojowych czy preparatach farmaceutycznych. Moim zdaniem, ta część książki, zawierająca tak liczny i różnorodny zbiór ćwiczeń w zakresie spektroskopii FT-IR i ramanowskiej jest unikatowa. Jestem przekonana, że okaże się ona niezwykle przydatną pozycją zarówno dla studentów jak i dla pracowników naukowo-dydaktycznych wydziałów chemicznych i biotechnologicznych.

Wielką zaletą omawianego wydawnictwa jest fakt, że równocześnie z jego polską wersją ukazała się wersja w języku angielskim „Vibrational spectroscopy. From theory to practice”. Książka taka niewątpliwie stanowić będzie doskonały podręcznik dla studentów i wykładowców coraz liczniejszych w naszym kraju chemicznych studiów anglojęzycznych.

Pragnę zauważyć, że choć zarówno spektroskopia w podczerwieni jak i ramanowska znane są od dawna, przedstawione w książce zagadnienia i problematyka są wciąż aktualne, co obok składu zespołu autorskiego i wysokiego poziomu naukowego poszczególnych rozdziałów stanowi o wyjątkowych zależach książki.

Książka jest ładnie i starannie wydana, a liczne rysunki i czytelne wykresy stanowią znakomite uzupełnienie jej interesującej treści.

Maria Wierzejewska
Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

Gottfried W. Ehrenstein, Żaneta Brocka-Krzemińska, *Materiały polimerowe. Struktura, właściwości, zastosowanie*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2016, wydanie I polskie, oprawa twarda, s. 348.

W 2016 roku staraniem Wydawnictwa Naukowego PWN ukazała się książka pt. „Materiały polimerowe. Struktura, właściwości, zastosowanie”, autorstwa Gottfrieda W. Ehrensteina oraz Żanety Brockiej-Krzemińskiej. Jest to najnowsze, zaktualizowane, pierwsze polskie wydanie tej pozycji, która jest obecna od 40 lat na rynku wydawniczym jako ceniony na całym świecie podręcznik z zakresu technologii polimerów. Przez te lata książka została przetłumaczona na wiele języków oraz była uhonorowana nagrodą Choice Magazine jako Wybitny Tytuł Roku. Autor podręcznika profesor Gottfried Wilhelm Ehrenstein jest wybitnym naukowcem oraz praktykiem specjalizującym się w technologii i przetwórstwie tworzyw sztucznych. Był m.in. kierownikiem katedry Materiałoznawstwa Tworzyw Sztucznych na Uniwersytecie w Kassel, następnie na Uniwersytecie Erlangen-Norymberga. Podobnie autorka prezentowanej książki dr inż. Żaneta Brocka-Krzemińska jest cenionym specjalistą w zakresie technologii polimerów, która skutecznie łączy karierę akademicką z praktyką przemysłową.

Materiały polimerowe są podstawą szeregu tradycyjnych oraz zawansowanych, innowacyjnych technologii stosowanych w interdyscyplinarnych aplikacjach. Aspekty wiedzy o polimerach są istotne nie tylko dla chemików czy technologów, ale również dla specjalistów z zakresu inżynierii materiałowej, elektroniki, medycyny, farmacji, nanomateriałów.

Książka „Materiały polimerowe. Struktura, właściwości, zastosowanie” jest na polskim rynku wydawniczym uzupełnieniem pozycji literaturowych dotyczących chemii i fizyki polimerów. Autorzy szczególnie koncentrują się na gruntownej analizie właściwości mechanicznych i termicznych polimerów oraz ich modyfikacji w odniesieniu do dedykowanych zastosowań i technik przetwórstwa. Książka zawiera osiem rozdziałów, w których przedstawiono analizę struktury i właściwości głównie polimerowych materiałów konstrukcyjnych oraz wynikające z tych danych aplikacje przemysłowe. Interesujący jest pierwszy rozdział prezentujący przegląd rynku tworzyw sztucznych, który jest również wprowadzeniem w praktyczne aspekty chemii polimerów. W kolejnych rozdziałach przedstawiono podstawy budowy materiałów polimerowych, bardziej w kontekście technologii niż chemii polimerów. Prawdopodobnie dlatego polireakcje są ograniczone do polikondensacji i poliaddycji. Podobnie, rozważania z zakresu struktury makrocząsteczek są przedstawione fragmentarycznie. Pomimo to, ten krótki zarys dotyczący budowy i struktury klasycznych polimerów umożliwia zrozumienie treści związanych z analizą właściwości tych materiałów przedstawioną w następnych rozdziałach. Więcej uwagi natomiast poświęcono aspektom z zakresu fizyki polimerów i materiałów kompozytowych w tym charakterystykom wytrzymałościowo-odkształceniowym, starzeniu i degradacji tworzyw. Szczególnie wyczerpująco przedstawiono analizę właściwości mechanicznych i termicznych oraz techniki przetwórstwa, które mają istotny wpływ na parametry wyrobów z tworzyw sztucznych. Dużą zaletą książki jest kompendium w postaci tabel zawierających syntetyczne informacje dotyczące struktury, charakterystyki i właściwości użytkowych klasycznych tworzyw sztucznych.

Książka jest skierowana głównie do inżynierów i techników pracujących w branży polimerów/kompozytów, ale stanowi również cenny podręcznik dla studentów wydziałów chemicznych, inżynierii materiałowej, technologii chemicznej.

Jolanta Ejfler
Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

Witold M. Lewandowski, Robert Aranowski, *Technologie ochrony środowiska w przemyśle i energetyce*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2016, wydanie 1, oprawa miękka, s. 483.

Wydawnictwo Naukowe PWN w 2016 wydało książkę „Technologie ochrony środowiska w przemyśle i energetyce”, autorstwa Witolda Lewandowskiego i Roberta Aranowskiego. Podręcznik ten jak uzasadniają Autorzy jest odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie studentów kierunków nauk ścisłych i przyrodniczych oraz kadry technicznej zakładów przemysłowych na holistyczne przedstawienie technologicznych aspektów ochrony środowiska.

Technologie ochrony środowiska są intensywnie rozwijanym, interdyscyplinarnym zagadnieniem, obecnym na rynku wydawniczym.

Przedstawienie tematu, szczegółowej oceny konkretnej technologii, na odpowiednim poziomie zawszanowania w danej dziedzinie, z odniesieniem do filarów zrównoważonego rozwoju, nie jest łatwe, jeśli opracowanie ma służyć szerokiemu gronu czytelników. Nie mniej jednak, w książce wybrane zagadnienia ochrony środowiska, opisane pod kątem systematyzowania i popularyzacji wiedzy, w zakresie znanych technologii a przedstawione w ujęciu holistycznym; można uznać za walor publikacji.

Wszystkie omawiane zagadnienia są poprzedzone wstępem zawierającym podstawy teoretyczne, następnie prezentowane są techniczne i technologiczne rozwiązania z uwzględnieniem metodyki pomiarowej, zastosowania odpowiednich aparatów i urządzeń. Podsumowanie każdego z rozdziałów zawiera charakterystykę środowiskową i ekonomiczną proekologicznych technologii łącznie z podaniem miejsc ich realizacji. Książka zawiera siedemnaście rozdziałów, pierwsze dotyczą ogólnej charakterystyki antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska (atmosfery, wody, gleby) z uwzględnieniem analiz dotyczących szkodliwych emisji na terenie Polski. Podsumowanie tej części to przedstawienie skutków emisji i zrzutów do środowiska generowanych przez energetykę opartą na nie-ekologicznych paliwach i surowcach kopalnych. W kolejnych rozdziałach konsekwentnie w aspekcie ochrony środowiska są opisywane technologie adekwatne do antropogenicznych zanieczyszczeń generowanych przez przemysł energetyczny. Stąd też jak wspominają Autorzy wywodzi się tematyka książki, która poprzez analizę tych zjawisk propaguje metody redukcji zanieczyszczeń energetyczno-przemysłowych. W kolejnych rozdziałach opisywane są klasyczne technologie stosowane w ochronie środowiska. Wprowadzenie w daną tematykę jest niezwykle uproszczone, daje to oczywisty pogląd w sensie popularnonaukowym, jednak nie na poziomie akademickim, ale właśnie taki był zamiar Autorów. Opis przytaczanych technologii ochrony powietrza, wody, gleby jest prosty, klarowny, bez zawszanowanego aparatu matematycznego co pozwala na dobre zobrazowanie problemu dla czytelnika również spoza obszaru nauk ścisłych. Podręcznik zawiera szereg schematycznych rysunków ułatwiających zrozumienie prezentowanych technik oraz sposobu działania aparatów technologicznych, ponadto dołączono wiele zdjęć z realnych rozwiązań przemysłowych.

Książka jest skierowana głównie do inżynierów i techników pracujących w branży energetycznej oraz wybranych zakładach oczyszczania i ochrony środowiska, ale stanowi również uzupełniający podręcznik dla studentów wydziałów chemicznych, technologii chemicznej i ochrony środowiska/

Jolanta Ejfler
Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

Praca zbiorowa pod redakcją: Anny Świderskiej-Środy, Witolda Łojkowskiego, Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego, *Świat nanocząstek*, PWN Warszawa 2016, wyd. pierwsze, oprawa miękka, str. 420

Na polskim rynku wydawniczym jest stosunkowo mało publikacji książkowych poświęconych nanotechnologiom. Powszechnie uważa się, że dyscypliny naukowe z przedrostkami bio, info i nano są wiodącymi na początku XXI wieku. Dlatego z olbrzymią przyjemnością przeczytałem książkę pt. *Świat nanocząstek*, będącą pracą zbiorową pod redakcją: Anny Świderskiej-Środy, Witolda Łojkowskiego, Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego.

Książka jest niezwykle obszerna i trudno ją omówić w szczegółowej recenzji. Pierwszy rozdział jest poświęcony definicji i jak piszą autorzy „postrzegania nanotechnologii”. W kolejnych rozdziałach, w sposób kompetentny opisano: technologie otrzymywania nanocząstek, nanomateriały węglowe oraz nanocząstek tlenków, zastosowanie nanocząstek w katalizie heterogenicznej, zwiększających przewodność elektryczną oraz w zastosowaniach biomedycznych. Niezwykle ważne są rozdziały skoncentrowane na metodach i procedurach morfologii nanocząstek, obrazowaniu nanocząstek metodami mikroskopii sił atomowych i mikroskopii elektronowej. W książce przedstawiono różne sposoby opisu kształtu i wielkości nanocząstek za pomocą różnorodnych metod doświadczalnych (np. rozpraszania laserowego, stabilności koloidów a także dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego) a ponadto, czego wg. mojej wiedzy dotychczas nie było a co jest niezwykle istotne – nanotoksyczności (czyli rozdziały poświęcone bhp pracy z nanocząsteczkami a także regulacjom prawnym Unii Europejskiej). Na dodatek, jeden z rozdziałów jest poświęcony polityce i aktywności Unii Europejskiej w odniesieniu do nanomateriałów.

Uważam, że jest to pierwsza książka na polskim rynku księgarskim z tak szeroko przedstawioną tematyką poświęconą nanotechnologiom w chemii. Moim zdaniem, kilku rzeczy zabrakło w tej książce. W pierwszym rozdziale oczekiwaliśmy odniesienia do fundamentalnego wystąpienia Richarda P. Feynmana (noblisty) wygłoszonego w dniu 29 grudnia 1959 roku w Caltech do członków Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego, które uważa się za zapowiedź pojawienia się nanotechnologii [R. P. Feynman, „Jest bardzo daleko od dna”, w „Przyjemność poznania”, rozdział 5, str. 107 – 125, wyd. Prószyński i s-ka].

Również zabrakło rozdziału poświęconego nanomaszynom. Ale przecież nie można w jednym opracowaniu monograficznym uwzględnić wszystkich możliwych aspektów poruszanych zagadnień.

Książkę polecam studentom studiów magisterskich i doktorantom wydziałów chemicznych oraz wszystkim osobom zainteresowanym rozwojem nanotechnologii.

Zdzisław Latajka
Wydział Chemiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

INFORMACJE

PATRONAT MEDIALNY

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

Wiktor Kubiński

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

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek

„Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki.”

Zdzisław Migaszewski, Agnieszka Gałuszka

„Geochemia środowiska”

Robert J. Whitehurst, Marten Van Oort

„Enzymy w technologii spożywczej”

Jan F. Rabek

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

Jan F. Rabek

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

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

Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego

„Świat nanocząstek”

Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej

„Nanotechnologia w praktyce”

W najbliższych numerach czasopisma ukażą się recenzje wyżej wspomnianych książek.

III Konferencja Naukowa Doktorantów i Młodych Naukowców

MŁODZI DLA TECHNIKI 2017

Płock, 7-8 września 2017 roku

KONFERENCJA NAUKOWA MŁODZI DLA TECHNIKI 2017 EDYCJA TRZECIA

Organizator:	Politechnika Warszawska Wydział Budownictwa, Mechaniki i Petrochemii w Płocku
Data:	7–8 września 2017.
Miejsce:	Politechnika Warszawska Filia w Płocku ul. Łukasiewicza 17, Płock

Konferencja Młodzi dla Techniki 2017 stanowi integralną część obchodów 50-lecia Filii Politechniki Warszawskiej w Płocku.

Celem Konferencji jest prezentacja dorobku naukowego młodych pracowników nauki, doktorantów i studentów. Konferencja dedykowana jest nie tylko początkującym, ale także doświadczonym młodym badaczom, działającym w szerokim obszarze budownictwa i inżynierii lądowej, inżynierii środowiska, inżynierii mechanicznej i materiałowej, jak również inżynierii chemicznej i petrochemicznej.

Założeniem organizatorów jest stworzenie okazji do wymiany doświadczeń, poglądów, jak również integracji środowiska zainteresowanego współczesnymi problemami techniki.

Tematyka Konferencji Młodzi dla Techniki 2017 obejmuje następujące zagadnienia:

- konstrukcje budowlane i inżynierskie
- technologia i organizacja budowy
- mechanika budowli
- fizyka budowli
- ciepłownictwo, ogrzewnictwo, wentylacja, gazownictwo
- inżynieria wodna i sanitarna
- konwencjonalne i alternatywne źródła energii

- technologia chemiczna i petrochemiczna
- inżynieria mechaniczna i materiałowa
- urządzenia i systemy mechaniczne,
- budowa maszyn,
- ochrona środowiska.

Terminarz konferencji

- 1 grudnia 2016–31 stycznia 2017: rejestracja, przesłanie abstraktu on-line (wyłącznie po rejestracji)
- 10 lutego 2017: akceptacja abstraktów
- 31 marca 2017: ostateczny termin nadsyłania prac
- 05 maja 2017: ostateczna kwalifikacja referatów
- 15 maja 2017: termin uiszczenia opłaty konferencyjnej
- 7–8 września 2017: KONFERENCJA

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego – dr inż. Anna Krawczyńska-Piechna
Przewodniczący Komitetu Naukowego – prof. nzw. dr hab. inż. Roman Marcinkowski

Kontakt: mdt2017@pw.plock.pl

Więcej informacji na: www.mdt2017.pw.plock.pl

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2017

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2017 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 2017 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

ERRATA

Redakcja czasopisma informuje, że w wersji drukowanej zeszytu 9–10/2016, na zewnętrznej stronie okładki oraz na stronie 613 brakuje nazwiska jednego ze współautorów pracy pt. „Aktywność biologiczna związków acetylenowych pochodzenia naturalnego” – Stanisława Boryczki. Wszystkie nazwiska autorów pracy ukazały się w wersji elektronicznej ww. zeszytu.

Jednocześnie wyjaśniamy, że błąd nie jest wynikiem pomyłki Redakcji.

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

- Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł
- Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996*, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł
- I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł
- K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł
- Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowe*, red. B. Burczyk, cena 18 zł
- Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł
- I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł
- M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.
- Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.
- Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł
- Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994)*, red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.
- Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi*, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.
- Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin*, cena 12,00 zł.
- Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I*. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.
- Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II*. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna
- Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w rozwiązaniach*, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.
- Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzegień 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” (któro wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

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

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

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

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

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

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginami z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoywaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).**
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami 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 tytułem naukowym (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji)),

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

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

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

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

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

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

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

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

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Nowi członkowie Rady Redakcyjnej	695
Joanna WĄTŁY, Henryk KOZŁOWSKI: Polihistydylowe sekwencje z motywem His-tag – ich rola i biologiczne znaczenie oddziaływanie z jonami metali	697
Adriana LITWIŃCZUK-MAMMADOVA, Katarzyna CIEŚLIK-BOCZULA, Maria ROSPENK: Budowa i funkcje układów białkowo-lipidowych	723
Krzysztof BULENGER, Bogumił BIERNACKI, Dorota Marta KRASUCKA, Jakub SZUMIŁO, Beata CUVELIER: Przegląd zastosowań spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni w analizie wilgotności śladowej w produktach leczniczych weterynaryjnych immunologicznych	747
Adrian Krzysztof ANTOSIK, Zbigniew CZECH: Wpływ napełniaczy krzemowych na właściwości samoprzylepnich klejów silikonowych	761
Adrianna KAMIŃSKA, Marta Joanna KRAWCZYK, Grażyna CHWATKO: Derywatyzacja chemiczna w wysokosprawnej chromatografii cieczowej	771
Wyróżnione prace doktorskie	
Natalia OLESZKO-TORBUS, Alicja UTRATA-WESOLEK, Wojciech WAŁACH, Andrzej DWORAK, Barbara TRZEBICKA: Nowe termowraźliwe powierzchnie polimerowe do hodowli i uwalniania komórek skóry	803
Jubileusze	
Elżbieta WOJACZYŃSKA: Jubileusz Oddziału Wrocławskiego Polskiego Towarzystwa Chemicznego ..	819
Nowe wydawnictwa	
Informacje	
	823
	829

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIE:

Daria KUPCZYK, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Renata STUDZIŃSKA, Joanna SIKORA: Antyoksydacyjne właściwości i przeciwmaźdzycowe działanie paraoksonazy
Karol SIKORA, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Beata LIBEREK, Janusz MADAJ, Barbara DMOCHOWSKA: Alditole i anhydroalditole
Andrzej GÜNTHER, Jacek A. SOROKA: Główne metody syntezy soli piryliowych
Małgorzata SOBOCIŃSKA, Elżbieta KAMYSZ: Zastosowanie enkefalin w diagnostyce i terapii różnych chorób